



**Universidade Federal do Amazonas - UFAM**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada**

**Estudo da Associação dos Polimorfismos dos *Exons* 4,5,6,18 e 19  
do Gene *SLC4A1* em Pacientes com e sem Alteração de  
Membrana Eritrocitária.**

**EDALTON CESAR BEZERRA SANGUINO**

**Manaus, 2014**

**Universidade Federal do Amazonas - UFAM  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada**

**EDALTON CESAR BEZERRA SANGUINO**

**Estudo da Associação dos Polimorfismos dos *Exons* 4,5,6,18 e 19  
do Gene *SLC4A1* em Pacientes com e sem Alteração de  
Membrana Eritrocitária.**

Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-  
Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da  
Universidade Federal do Amazonas.

**Orientador:** Prof<sup>o</sup> Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque

**Co orientador :** Prof<sup>o</sup> Dr José Pereira de Moura Neto

**Manaus, 2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

SANGUINO, Edalton Cesar Bezerra.

Título. Estudo da Associação dos Polimorfismos dos *Exons* 4,5,6,18 e 19 do Gene SLC4A1 em Pacientes com e sem Alteração de Membrana Eritrocitária. : UFAM. 2009.

97 p. il.

(Dissertação de Mestrado – Imunologia Básica Aplicada) – Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica Aplicada.

1. Sistema de Grupos Sanguíneos 2. SLC4A1 3. Banda 3 4. Sistema Diego. ABO 5. Rh 6. Duffy I. Edalton Cesar Bezerra Sanguino.

CDU:

**Universidade Federal do Amazonas**  
**Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada**

**Instituições Participantes Neste Estudo:**

Universidade Federal do Amazonas - UFAM  
Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**Início:** Fevereiro de 2012

**Instituição Financiadora:**

Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Amazonas- FAPEAM

**Coordenador do Programa:**

Professora Doutora Adriana Malheiros

## ***DEDICATÓRIA***

**À Deus, minha família, amigos, colegas de trabalho e orientadores pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.**

## **AGRADECIMENTOS**

- A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.
- Aos meus orientadores e amigos Prof. Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque e Prof. Dr José Pereira de Moura Neto, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, fazerem parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por serem exemplos de profissional.
- À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.
- Aos meus amigos de laboratório Lucianna Tezza, Katiane Gomes, Rechefy Abuali, Diana Mota, Agda Blenda, Alexandre Terço, Vanessa da Mata, Marcia Souza, Celiane Batista e Monique que sempre estiveram do meu lado dando força e apoio.
- A todos os colegas e professores da pós-graduação em Imunologia Básica Aplicada pelo convívio e aprendizado.
- A todos os amigos da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas (HEMOAM) pelo carinho e apoio.
- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas (HEMOAM) e a Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

## EPÍGRAFE

“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade.”

Rui Barbosa.

## **BANCA DE QUALIFICAÇÃO**

**Profa. Dr. Katia Luz Torres Silva (FCECON)**

**Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa (ICB/UFAM)**

**Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy;**

## **BANCA DE DEFESA DE TESE**

**Profa. Dra. Carine Prisco Arnoni**

**Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy;**



**Título: Estudo da Associação dos Polimorfismos dos Exons 4,5,6,18 e 19 do Gene *SLC4A1* em Pacientes com e sem Alteração de Membrana Eritrocitária.**

**RESUMO**

**Introdução** O gene *SLC4A1*, responsável pela expressão da Banda 3 (*anion exchanger 1- AE1*), tem os *exons* 4,5,6 envolvidos na expressão da banda 3 Memphis e os *exons* 18 e 19 ligados a expressão do sistema eritrocitário Diego apresentando polimorfismos de grande importância antropológica e transfusional. Polimorfismos envolvendo este gene já foram descritos também associados às alterações na membrana eritrocitária como esferocitose, ovalocitose e eliptocitose hereditária. Diante dessas associações, além dos poucos estudos realizados na população brasileira, estudamos associações entre polimorfismos do gene *SLC4A1* com alterações da membrana eritrocitária em pacientes hematológicos da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM). **Objetivo:** Investigar polimorfismo nos *exon* 4, 5, 6, 18 e 19 do gene *SLC4A1*, em pacientes com e sem alterações na membrana eritrocitária. **Materiais e Métodos:** Foram realizadas técnicas de AS-PCR e sequenciamento gênico em 385 pacientes hematológicos para esclarecimento diagnóstico. Foram consideradas as análises clínicas e laboratoriais onde foram estabelecidas as associações com os polimorfismos no gene *SLC4A1*. **Resultados:** Foram coletadas 385 amostras de pacientes sendo formados 4 grupos: Grupo A. pacientes anêmicos com poiquilocitose e/ou anisocitose, Grupo B. pacientes anêmicos sem poiquilocitose e/ou anisocitose, Grupo C. pacientes sem anemia com poiquilocitose e/ou anisocitose e Grupo D. indivíduos saudáveis, que, diante dos vários polimorfismos observados em nosso estudo, o gene *SLC4A1* pode ser considerado polimórfico, dentre eles, mais de 5 alterações nucleotídicas que causam alteração na sequência de aminoácidos que constituem a proteína banda 3. Em nossos estudos foram encontrados também, através de correlações estatísticas, dois SNPs que possivelmente estejam associados ao fator de proteção à anemia e 2 SNPs que provavelmente estejam associados ao fator de risco da anemia. Para o *exon* 19 foram sequenciadas, 302 amostras, constatamos que o alelo *DI\*A* ocorre numa incidência de 5,30% e o alelo *DI\*B* com uma frequência de 94,70% e que correlacionamos o *A166G* (Banda 3-Memphis). Diante dos resultados, foi encontrado o alelo *DI\*A* correlacionada com a *166A* (Banda 3 –Normal),sendo assim constatado uma nova variante do alelo *DI\*A*.

**Palavra-chave:** Proteína Banda 3, Gene *SLC4A1*, Alterações de Membrana, Eritrócitos, Anemias

**Title: Study of the Association of Polymorphisms in *Exons 4,5,6,18 and 19* of the *SLC4A1* Gene in Patients with and without amendment Erythrocyte Membrane.**

**Abstract**

**Keyword: Band 3 Protein Gene SLC4A1, Membrane Changes, Erythrocytes, Anemias**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Proteína Banda 3.....	18
<b>Figura 2.</b>	Membrana Eritrocitária.....	24
<b>Figura 3.</b>	Polimorfismos na Banda 3.....	30
<b>Figura 4.</b>	Fluxograma do Desenho do Estudo.....	35
<b>Figura 5.</b>	Eliptocitoses.....	37
<b>Figura 6.</b>	Eliptocitoses.....	37
<b>Figura 7.</b>	Esferocitoses.....	38
<b>Figura 8.</b>	Esferocitoses.....	38
<b>Figura 9.</b>	Amplificação do Fragmento do <i>Exon</i> 4, 5 e 6.....	40
<b>Figura 10.</b>	Amplificação do Fragmento do <i>Exon</i> 18 e 19.....	41
<b>Figura 11.</b>	Alinhamento dos Principais SNPs dos <i>Exons</i> 4, 5 e 6.....	48
<b>Figura 12.</b>	Variações de 6 mudanças de Aminoácidos da Proteína Banda 3.....	49
<b>Figura 13.</b>	Eletroferograma com Alteração Nucleotídica em Herozigose.....	50

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1.</b>	Organização do Gene <i>SLC4A1</i> .....	17
<b>Tabela 2.</b>	Oligonucleotídeos iniciadores de Reação ( <i>primers</i> ).....	41
<b>Tabela 3.</b>	Grupos de Pacientes Estudados.....	43
<b>Tabela 4.</b>	Tipo de Alteração de Membrana – Grupo A.....	44
<b>Tabela 5.</b>	Tipo de Alteração de Membrana – Grupo C.....	44
<b>Tabela 6.</b>	Frequência dos Polimorfismos Encontrados no Grupo A.....	45
<b>Tabela 7.</b>	Frequência dos Polimorfismos Encontrados no Grupo B.....	46
<b>Tabela 8.</b>	Frequência dos Polimorfismos Encontrados no Grupo C.....	46
<b>Tabela 9.</b>	Frequência dos Polimorfismos Encontrados no Grupo A.....	47
<b>Tabela 10.</b>	Correlação entre O SNP no <i>Exon 6 – 426A/G</i> .....	49
<b>Tabela 11.</b>	Correlação entre O SNP no <i>Exon 6 – 459G/T</i> .....	50
<b>Tabela 12.</b>	Correlação entre O SNP no <i>Íntron 5 – 449A/G</i> .....	51
<b>Tabela 13.</b>	Correlação entre O SNP no <i>Íntron 5 – 695A/G</i> .....	51
<b>Tabela 14.</b>	Polimorfismo no <i>Exon 19_ 2587G/A</i> .....	52
<b>Tabela 15.</b>	Frequência Genotípica do Sistema Diego.....	52
<b>Quadro 1.</b>	Sequência de Aminoácidos que Constituem a Banda 3.....	20

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>SLC4A1</b>	Gene Proteína Banda 3( <i>Solute Carrier Family 4, Anion Exchanger Member 1</i> )
<b>AE1</b>	Proteína Transportadora de Anios ( <i>anion exchanger</i> )
<b>Eli H</b>	Eliptocitose hereditária
<b>PPH</b>	Piropoiquilocitose hereditário
<b>EH</b>	Esferocitose hereditária
<b>SCA</b>	Antígeno de células senescentes
<b>GPA</b>	Glicoforina A
<b>H2DIDS/DIDS</b>	Deidrodiiisotiocianatodisulfonato
<b>MSP1</b>	Merozoito proteína-1
<b>SÃO</b>	Ovalocitose
<b>CDB3</b>	Receptor do N-terminal Banda3
<b>ETH</b>	Estomatocitose Hereditária
<b>AS-PCR</b>	Allele-Specific polymerase chain reaction
<b>HGM</b>	Humam Gene Mapping
<b>IgG</b>	Imunoglobulina de classe G
<b>EPO</b>	eritropoietina
<b>IL-3</b>	interleucinas 3
<b>SNPs</b>	<i>single nucleotide polymorphism</i>

## Sumário

INTRODUÇÃO.....	15
1. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	17
1.1 Gene <i>SLC4A1</i> .....	17
1.2.1 Banda 3-Memphis.....	21
1.2.2 Membrana Eritrocitária.....	22
1.2.3 Anemias de Doenças Crônicas .....	25
1.2.4 Anemia Siderobláticas .....	25
1.2.5 Alteração de Membrana Eritrocitária .....	25
1.2.6 Ovalocitose Hereditária (SAO).....	26
1.2.7 Eriptocitose Hereditária (EIH) .....	27
1.2.8 Esferocitose Hereditária.....	27
2. JUSTIFICATIVA .....	31
3. OBJETIVOS .....	32
3.1 Objetivo Geral .....	32
3.2 Objetivo Específico .....	32
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	33
4.1 Área do Estudo .....	33
4.2 Indivíduo do Estudo .....	33
4.3 Critérios de Elegibilidade .....	33
4.3.1 Inclusão.....	33
4.3.2 Exclusão .....	34
4.4 Tamanho Amostral .....	34
4.5 Aspectos Éticos .....	34
4.6 Metodologia do Estudo.....	36
4.6.1 Procedimentos de Inclusão dos Participantes no Estudo.....	36
4.6.1.1 Pacientes Encaminhados do laboratório de Hematologia do HEMOAM.....	36
4.6.2 Coleta Material .....	36
4.6.3 Análises Hematológicas.....	37
4.6.3.1 Coloração hematológica .....	37
4.6.4 Análises Sorológicas.....	38
4.6.5 Análise Molecular.....	38
5. RESULTADOS .....	43
6. DISCUSSÃO .....	53
7. CONCLUSÕES .....	61
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	62
APENDICE A .....	67
APENDICE B.....	68
APENDICE C.....	70

## INTRODUÇÃO

O gene *SLC4A1* (Solute Carrier Family 4, Anion Exchanger Member 1), constituído 22 exons e 19 íntrons sendo localizado no cromossomo 17q12.31, expressa a glicoproteína Banda 3, evidenciada nos eritrócitos e nas células tubulares renais.

A Banda 3 é composta por dois domínios que são estruturalmente e funcionalmente distinto. O domínio N-terminal de 40 kDa localiza-se no citoplasma e atua como ponto de ligação entre anquirina e a membrana eritrocitária.

O domínio C- terminal ou carboxiterminal tem peso molecular de 55 kDa tem como principal função, direcionar o fluxo de ânions bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) através da membrana eritrocitária, permitindo a eliminação de  $\text{CO}_2$  dos tecidos (POOLE, 1999).

A banda 3 é provavelmente uma proteína de transporte multifuncional responsável pelo transporte de glicose, ânions e água ( LANGDON e HOLMAN 1988).

A banda 3 Memphis ocasionado por polimorfismos silenciosos ocorre em todas as populações humanas com diferentes frequências variando de uma população para outra. Yannoukakos et al. (1991) demonstraram que esta variante eletroforética é devido à substituição de ácido glutâmico por lisina na posição 56, ou seja, uma substituição de A para G na primeira base do códon 56 é responsável pela mudança.

Outras alterações gênicas também estão associadas com a acidose tubular distal que secretam prótons e outros polimorfismos resultam em novos antígenos sanguíneos como o sistema Diego.

O sistema Diego, possui antígenos eritrocitários que são codificados pelo gene *SLC4A1* (Solute Carrier Family 4, Anion Exchanger Member 1) e dentre os 22 antígenos, dois pares independentes e antitéticos são conhecidos Dia/Dib e Wra/Wrb (BRECHER, 2002).

O antígeno Diego A (Dia) é de baixa incidência entre caucasianos, mas frequente entre índios e em populações orientais, sendo considerado um marcador para estudo antropológico (LAYRISSE et al., 1955; KOMATSU et al., 2004; PARK et al., 2003; LEE et al., 2007).

Em 1994 Bruce descreveu que o polimorfismo  $\text{Di}^a/\text{Di}^b$  era caracterizado por troca única de aminoácido na posição 854, uma prolina, no caso do  $\text{Di}^b$ , ou a presença de leucina na mesma posição, no caso do antígeno  $\text{Di}^a$ .

O fenótipo Di (a+b-) é encontrado raramente, predominando em asiáticos e índios. Alguns indivíduos com este fenótipo são geneticamente heterozigotos para a mutação

Pro854Leu, sugerindo a presença de uma nova mutação na banda 3, no alelo que codifica a prolina 854, a qual inibe a expressão do Di<sup>b</sup> (JAROLIM et al, 1994; JAROLIM & RUBIN, 1996; ISSIT & ANSTEE, 1998).

Polimorfismos no gene *SLC4A1*, podem resultar em eritrócitos com forma e estrutura anormais gerando a anormalidades estruturais e desestabilização da membrana das hemácias, levando a esferocitose e ovalocitose hereditária (MOHANDAS e CHASIS, 1993; WALENSKY et al., 2003).

Este estudo se propõe a detectar polimorfismos no gene *SLC4A1* que possam estar associados com alterações nas membranas dos eritrócitos resultando em anemia crônica. Este diagnóstico é fundamental para esclarecer a razão do estado anêmico do pacientes direcionando a conduta médica evitando danos ao indivíduo e ao sistema de saúde.



# 1. FUNDAMENTO TEÓRICO

## 1.1 Gene *SLC4A1*

O gene *SLC4A1* está localizado no cromossomo 17q12.31 e é composto de 20 *exons* e 19 *introns* sendo constituído de 18 kb no total, sua sequência de DNA do gene codifica a Banda 3 (*anion exchanger 1- AE1*) (ZELINSKI et al., 1993)(Tabela. 1). Composto de duas regiões promotoras tecido específico, uma eritróide localizada acima do *exon 1* e uma nas células renais localizada no *intron 3* (SAHR et al., 1994)( Tabela 1) . O gene da banda 3 era denominado de *AE1 (anion exchanger 1)*, mas foi renomeado como *SLC4A1(Solute Carrier Family 4, Anion Exchanger Member 1)*, pelo comitê de nomenclatura do mapeamento genético humano (*Humam Gene Mapping – HGM*) (ZELINSKI, 1993).

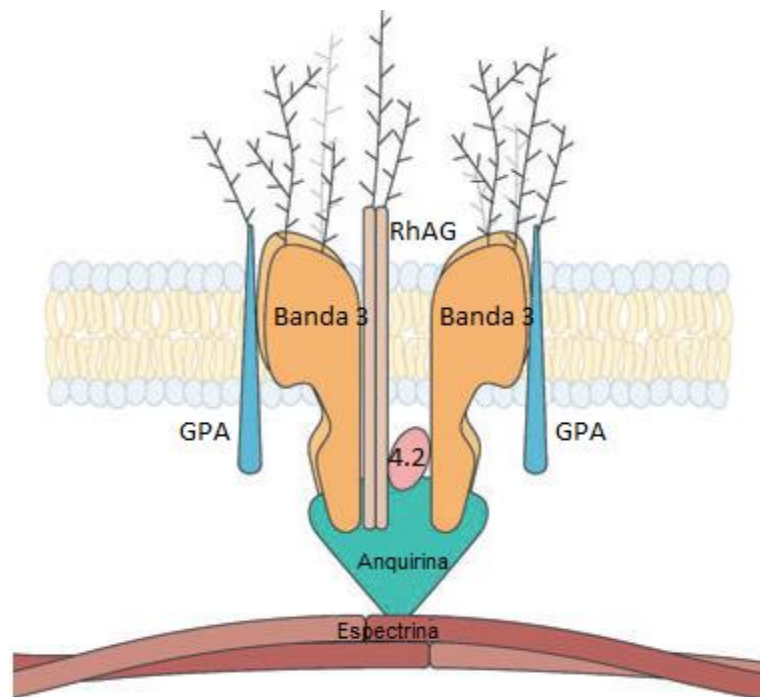
**Tabela 1:** Organização do gene *SLC4A1* que expressa a proteína banda 3. Adaptado. Schofield et al, 1994

Exon	Tamanho (bp)	Aminoácidos	Introns Tamanho (kb)
1	582	-	>3
2	83	1-5	0.125
3	91	6-36	0.998
4	62	36-56	0.757
5	181	57-117	0.095
6	136	117-162	0.472
7	124	162-203	0.227
8	85	204-232	0.152
9	182	232-292	0.539
10	211	293-363	0.232
11	195	363-428	0.178
12	149	428-477	0.144
13	195	478-542	1.503
14	174	543-600	0.377
15	90	601-630	0.543
16	167	631-686	1.126
17	254	686-771	1.527
18	170	771-827	0.086
19	174	828-885	0.620
20	2146	886-911	-

## 1.2 Banda 3

A banda 3 é considerada a principal glicoproteína integral da membrana e seu peso molecular é de 95kD. Representa 25%-30% de todas as proteínas da membrana e possui em torno de  $10^6$  cópias por hemácia (**Figura. 1**).

É expressa somente nos eritrócitos e nas células dos tubos distais coletores dos rins, sendo composta de 911 aminoácidos com dois domínios funcionalmente independentes (POOLE, 1999) (**Quadro. 1**).



**Figura 1:** Estrutura da proteína banda 3 associada as proteínas glicoforina A (GPA), banda 4.2 e a glicoproteína associada ao Rh (RhAG) demonstrando a ligação à espectrina através da anquirina . Adaptado: Xiuli e Mohandas, 2008.

O domínio N- terminal tem peso molecular de 40 kDa, possui uma função estrutural devido ser uma proteína citoplasmática e está conectado com a membrana à espectrina, e fazendo a ligação da anquirina e proteína 4.1 e 4.2 sendo mediadora da ligação com enzimas glicolíticas, à hemoglobina e ao hemicromo (POOLE, 1999).

O domínio amino- terminal conhecido também como N-terminal, possui de 6 a 7 alças extracelulares, devido a proteína atravessar a membrana eritrocitária 12 a 14 vezes. As alças possuem estrutura flexível que permite uma conformação tridimensional e desempenha

função importante na expressão antigênica. Zelinski et al., 1998 descreve que a estrutura N-terminal são constituídas de mais de 90 aminoácidos que em tese poderiam representar potenciais sítios antigênicos.

Em 2003, estudos descreveram aspectos da porção N-terminal da banda 3 ou AE1(CDB3) de hemácias humanas que é o substrato executor da apoptose induzida pela caspase 3. A ação da caspase 3 é observada em hemácias adultas, mas não em neócitos ou hemácias jovens. Esta descoberta esclarece a eluição de alguns antígenos eritrocitários durante o tempo de conservação das hemácias *in vitro*.

O domínio C- terminal ou carboxiterminal tem peso molecular de 55 kDa tem como principal função, direcionar o fluxo de ânions bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) através da membrana eritrocitária, permitindo a eliminação de  $\text{CO}_2$  dos tecidos (POOLE, 1999).

Antígeno de células senescentes (SCA) é uma proteína que aparece em células velhas e são responsáveis pela marcação e remoção do sistema imunológico, gerado pela degradação da proteína da banda 3 e envolvido na remoção de eritrócitos nas anemias hemolíticas e na remoção de eritrócitos infectados com a malária utilizaram peptídeos sintéticos para identificar os locais antigênicos na banda 3 reconhecidos pela IgG que se liga a células velhas (KAY, 1993).

Bruce et al, 2003, propôs um modelo onde proteína banda 3 divide-se em 3 domínios: 1. Domínio de membrana, responsável pela troca iônica, 2. Domínio citoplasmático C-terminal, o qual se liga à anidrase carbônica II (CAII), formando um canal de liberação de  $\text{HCO}_3^-$  localizado na face citoplasmática da banda 3 e 3.

Domínio citoplasmático N-terminal que se liga a enzimas glicolíticas, hemoglobina e hemicromos que por sua vez pode induzir a agregação da banda 3 levando assim ao *turn over* celular. A principal função deste domínio é a de ancorar a banda 3 ao citoesqueleto.

Bruce et al., 2004 sugeriram que em eritrócitos a banda 3 pode ter dois tipos de atividades iônicas de sulfeto, iodeto e cloreto: um com alta atividade de transporte de ânion quando a Glicoforina A (GPA) está presente e uma menor atividade no transporte de ânion quando GPA está ausente.

A banda 3 e o complexo Rh estão associados na membrana eritrocitária, formando o denominado macro complexo da banda 3. Esta teoria pôde ser demonstrada pela constatação de que na ausência da banda 3, em camundongos e humanos, ocorre, simultaneamente, deficiência do complexo Rh, além do fato, de ocorrer coimunoprecipitação do complexo Rh (RhAG e Rh) e da banda 3 de eritrócitos de indivíduos saudáveis, utilizando-se anticorpo monoclonal de camundongo (antibanda 3 BRIC169).

Outro motivo que corrobora com esta hipótese consiste na similaridade do número de tetrâmeros de complexo Rh e de tetrâmeros da banda 3. Por último, os antígenos do sistema Rh encontram-se ligados ao esqueleto da membrana eritrocitária.

Este conjunto de dados sugere que o macro complexo banda 3 seja formado ao redor da fração tetramérica da banda 3 que se encontra ligada à anquirina a qual se liga ao esqueleto via espectrina-actina (BRUCE LJ, BECKMANN R, RIBEIRO ML, et al., 2003; PETERS LL, SHIVDASANI RA, LIU SC, et al., 1996 ; INABA M, YAWATA A, KOSHINO I, et al., 1996).

---

MEELQDDYED	MMEENLEQEE	YEDPDIPESQ	MEEPAAHDTE	ATATDYHTTS	50
HPGTHKVYVE	LQELVMDEKN	QELRWMEAR	WVQLEENLGE	NGAWGRPHLS	100
HLTFWSLLEL	RRVFTKGTVL	LDLQETSLAG	VANQLLDRFI	FEDQIRPQDR	150
EELLRALLLK	HSHAGELEAL	GGVKPAVLTR	SGDPSQPLLP	QHSSLETQLF	200
CEQGDGGTEG	HSPSGILEKI	PPDSEATLVL	VGRADFLEQP	VLGFVRLQEA	250
AELEAVELPV	PIRFLFVLLG	PEAPHIDYTQ	LGRAAATLMS	ERVFRIDAYM	300
AQSRGELLHS	LEGFLDCSLV	LPPTDAPSEQ	ALLSLVPVQR	ELLRRRYQSS	350
PAKPDSSFYK	GLDLNGGPDD	PLQQTGQLFG	GLVRDIRRRY	PYYLSDITDA	400
FSPQVLAIVI	FIYFAALSPA	ITFGLLGK	TRNQMGVSEL	LISTAVQGIL	450
FALLGAQPLL	VVGFSGPLL	FEEAFFSFCE	TNGLEYIVGR	VWIGFWLILL	500
VVLVVFEGS	FLVRFISRYT	QEIFSFLISL	IFIYETFSKL	IKIFQDHPLQ	550
KTYNYNVLV	PKPQGPLPNT	ALLSLVLMAG	TFFFAMMLRK	FKNSSYFPGK	600
LRRVIGDFGV	PISILIMVLV	DDFIQDITYTQ	KLSVPDGFVK	SNSSARGWVI	650
HPLGLRSEFP	IWMFASALP	ALLVFILIFL	ESQITTLIVS	KPERKMKVGS	700
GFHLDLLLV	GMGGVAALFG	MPWLSATTVR	SVTHANALTV	MGKASTPGAA	750
AQIQEVKEQR	ISGLLVAVLV	GLSILMEPIL	SRIPLAVLFG	IFLYMGVTSL	800
SGIQLFDRIL	LLFKPPKYHP	DVPYVKRVKT	WRMHLFTGIQ	IICLAVLWV	850
KSTPASLALP	FVLILTVPRL	RVLLPLIFRN	VELQCLDADD	AKATFDEEEG	900
RDEYDEVAMP	V				911

---

**Quadro 1:** Sequência dos aminoácidos que constituem a proteína banda 3.

### 1.2.1 Banda 3-Memphis

A banda 3- Memphis se caracteriza por sua mobilidade eletroforética reduzida por haver substituição de um aminoácido no domínio citoplasmático da banda 3, Lys 56–Glu (AAG>GAG) codificada no *exon* 4, este polimorfismo é conhecido como banda 3-Memphis (YANWOUKAKOS et al., 1991; JAROLIM et al., 1992).

Existe outra variante conhecida como banda 3-Memphis II, apresenta, além de mobilidade eletroforética anormal, aumenta a capacidade de ligação ao inibidor do fluxo de ânions, deidrodiisotiocianatodissulfonato (H<sub>2</sub>DIDS/DIDS). A variante II apresenta a troca Lys 56-Glu e se caracteriza por estar associada ao antígeno Di<sup>a</sup>, leucina na posição 854 na proteína (SPRING et al., 1992 ; BRUCE et al., 1994).

Um novo alelo foi descrito e caracterizado pela presença do alelo *DIA* na ausência da banda Memphis. O aminoácido lisina nas posições 539 e 851 são os sítios responsáveis pela ligação covalente de H<sub>2</sub>DIDS (BALEOTTI et al., 2003).

O polimorfismo *DI\*A/DI\*B*, localizado na posição 854, encontra-se próximo à lisina 851, fato este responsável pela alteração conformacional entre as lisinas 539 e 851 modificando a estrutura que se liga ao H<sub>2</sub>DIDS e, assim, o aumentando a susceptibilidade da lisina 539 à ligação covalente ao H<sub>2</sub>DIDS (BRUCE et al., 1994).

Em 1955, o sistema Diego foi descoberto, quando Layrisse e colaboradores estudaram uma família venezuelana com ascendência indígena (família Diego), na qual nasceu uma criança que apresentou doença hemolítica do recém-nascido (LEVINE et al., 1956).

Esse sistema de grupo sanguíneo é constituído principalmente por dois pares independentes de antígenos Di<sup>a</sup> / Di<sup>b</sup> e Wr<sup>a</sup> / Wr<sup>b</sup>, cada par contendo um antígeno de baixa incidência e um determinante antitético de alta incidência respectivamente, e por outros 17 antígenos menos expressivos (BRECHER, 1994; BRUCE et al., 1999).

Para o par de antígenos Diego existe a possibilidade de três fenótipos: Di (a- b+), Di (a+ b+) e Di (a+ b-) (DANIELS et al., 1999).

O polimorfismo do antígeno Di<sup>a</sup> ocorre em populações de origem mongólica, sendo sua frequência alta em índios venezuelanos, nos quais podem chegar a 36%, e também em japoneses, nos quais pode variar entre 8% e 12% e em chineses, nos quais são estimadas entre 2,5% e 3,2% mas surpreendentemente, esses antígenos não são encontrados em esquimós (KUSNIERZ-ALEJSKA et al., 1992 ; LAYRISSE et al., 1995; MOLLISON et al., 1997; SOUTHGATE et al., 1996).

Em contraste, o antígeno  $Di^a$  é raro em caucasóides e em populações africanas (DANIELS et al., 1999). Assim, em 9.661 doadores de sangue poloneses, apenas 45 apresentaram esse antígeno (KUSNIERZ-ALEJSKA et al., 1992).

De acordo com Zelinski et al., 1993 o locus do sistema Diego está localizado no braço inferior (q) do cromossomo 17, sabendo-se ainda, que o antígeno  $DI^a$ , é uma mutação de seu alelo mais frequente  $DI^*B$ , que resulta da substituição de um único aminoácido expresso a partir do gene *SLC4A1*, que codifica a proteína banda-3 da superfície do eritrócitos.

Nunca se observou um indivíduo  $Di(a-b-)$  porque isso resultaria de uma deficiência da banda-3, a qual seria letal (DANIELS et al., 1999). Em 1994 Bruce descreveu que o polimorfismo  $DI^*A/DI^*B$  era caracterizado por troca única de aminoácido na posição 854, uma prolina, no caso do  $Di^b$ , ou a presença de leucina na mesma posição, no caso do antígeno  $Di^a$ .

A Banda 3 é produto do locus Diego (*DI*). Alguns dos antígenos do sistema Diego ( $Wd^a$ ,  $Rb^a$ ,  $Bp^a$ , Warr, Wu,  $Vg^a$ ,  $Tr^a$ ), têm localização extracelular em locais cujas as sequências estão envolvidas no processo do envelhecimento celular e na cito-aderência do eritrócito infectado pelo *Plasmodium falciparum* ao endotélio vascular.

Neste último caso, levando ao sequestro dos eritrócitos infectados na microcirculação, um mecanismo implicado nas suas complicações cerebrais, responsável pela elevada morbidade e mortalidade associada a esta doença (PENG et al., 1996).

### 1.2.2 Membrana Eritrocitária

A membrana eritrocitária é essencialmente constituída de lipídeos e proteínas dispostos na superfície dos eritrócitos de forma extremamente complexa (WAJCMAN et al., 1984). Esta membrana consiste em uma bicamada fosfolipídica, que representa aproximadamente 50% de sua massa total e forma a barreira entre dois compartimentos líquidos, intra e extracelular (COOPER, 1997).

As trocas entre estes compartimentos são realizadas através de bombas, canais de trocas de íons e transporte molecular como o da glicose (WAJCMAN et al., 1984).

Além disso, a deformabilidade da membrana, fluidez de seu citoplasma e a complexidade de sua superfície membrana em relação ao seu volume interno asseguram as funções de transporte de  $O_2$  dos pulmões e remoção do  $CO_2$  dos tecidos para os pulmões.

Esta capacidade de transporte depende das condições de adaptação circulatória e também da hemoglobina citosólica e de um polipeptídeo maior da membrana: a banda 3 ou proteína de troca de íons (*anion exchanger 1*, AE1).

A organização química estrutural da membrana dos eritrócitos é responsável pela capacidade de sofrer extensas deformações reversíveis, mantendo a sua integridade estrutural durante sua longa vida útil em circulação. A membrana celular dos eritrócitos apresenta um complexo comportamento mecânico e é altamente elástica que responde rapidamente a tensões aplicadas.

Sua característica química e física foi adquirida de uma lenta evolução impulsionando uma eficaz engenharia composta de fosfolipídios anfifílicos e proteínas ancoradas a uma rede elástica protéica do citoesqueleto, através de pontos de amarração incorporados na bicamada lipídica denominados de proteínas transmembranares (MOHANDAS e EVANS, 1994; MOHANDAS e REID, 2006). (Figura 3.)

Mais de 50 proteínas transmembranares diferentes ocorrem em abundância variando de algumas centenas a cerca de um milhão de cópias por eritrócitos. No entanto uma grande fração destas proteínas são antígenos de grupos sanguíneos (REID e MOHANDAS, 2004).

Assim, proteínas de membrana eritrocitária são expressas por diferentes genes e apresentam uma heterogeneidade funcional como: transporte de água, cátion, sinalização celular e outras funções não definidas (REID e MOHANDAS, 2004).

A integridade estrutural da membrana está relacionada com suas proteínas tais como: a banda 3, a glicoforina C e a glicoproteína associada ao Rh (RHAG) interligadas a proteína do citoesqueleto espectrina (BENNETT, 1983; NICOLAS et al., 2003).

Perda de ligações resulta em perda de lipídios e diminuição da área de superfície da membrana, o que comprometeria a capacidade dos glóbulos vermelhos para deformar em circulação. No entanto, perda de membrana e diminuição da área de superfície é um fator chave para a sobrevivência da célula com vários distúrbios eritrocitários (MOHANDAS e CHASIS, 1993; WALENSKY et al., 2003). Em contraste, o aumento do número de ligações conduz uma maior coesão da membrana e conseqüentemente uma maior rigidez (MOHANDAS et al., 1992; KNOWLES et al., 1994).

A proteína 4.2 são polipeptídios periféricos de membrana, expressos pelo gene *EPB42*, possui peso molecular de 72-kDa, localizado no cromossomo 15q15-q21, compreende aproximadamente 5% da proteína total da membrana e está presente em  $2.10^5$  por eritrócito.(COHEN, C. M., DOTIMAS, E. e KORSGEN, C. 1993 ; YAWATA, Y. 1994 e BRANTON, D., COHEN, C. M. e TYLER, J, 1981).

A importância desta proteína foi reconhecida através de estudos que demonstraram que a deficiência da proteína 4.2 resulta em hemólise evidente e anemia cursada com esferocitose hereditária (GHANEM, A et al., 1990; YAWATA, A., SUGIHARA, T. e

YAMADA, O. 1994).

A glicoforina C é uma glicoproteína integral de membrana eritrocitária, expressa pelo gene *GYPC*, localizado no cromossomo 2q14-q21, possui um papel importante na regulação da estabilidade mecânica dos eritrócitos sendo responsável pelos antígenos eritrocitários Gerbich e Yus, expressos devido uma deleção no *exon 3* e *2* respectivamente.

No entanto antígenos Webb e Duch, conhecidos também como glicoforina D, resulta de mutações pontuais no gene *GYPC*, assim a glicoforina C tem pouca homologia com a glicoforina A e B, resultando de múltiplos *splicing* alternados induzindo variantes de transcrição (RefSeq, Feb 2012).

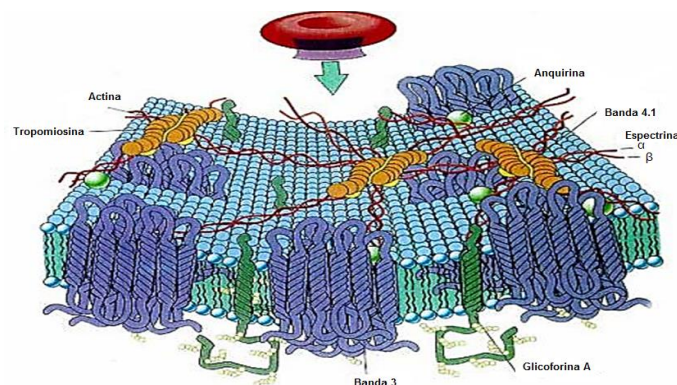
A proteína RHAG é específica da membrana eritrocitária, codificada pelo gene *RHAG*, possui 10 exons sendo localizado no cromossomo 6p12.3. Faz parte de um canal de membrana que transporta amônia e dióxido de carbono e interagi com antígenos do grupo Rh, mais especificamente com polipeptídeos RH30.

Polimorfismos nesse gene está ligado com a expressão Rh nulo ou síndrome de Rh-deficiente, gerando uma anemia hemolítica ( RefSeq, Mar 2009).

Assim, estudos relatam que alterações de membrana eritrocitária como estomatocitose e esferocitose estão associados a polimorfismos nos genes *SLC4A1* e *RHAG* (BRUCE, L. J. et al. 2005 ; BRUCE LJ et al.2009 ; GALLAGHER e JAROLIM, 2005).

A banda 3 se associa ao citoesqueleto através da interação de seus domínios citoplasmáticos com a anquirina. Assegurando papel fundamental na regulação da coesão entre a bicamada e o citoesqueleto da membrana.

Porém as alterações nesta ligação podem resultar em diminuição da área de superfície da membrana, gerando a anormalidade da membrana como esferocitose e ovalocitose comprometendo o desempenho funcional da célula (MOHANDAS e CHASIS, 1993; WALENSKY et al., 2003) .





**Figura 2.** Membrana eritrocitária e sua composição química, formadas por fosfolipídios, proteínas intermembranares como: banda 3, banda 4.1, glicoforina A, associados com o citoesqueleto: a espectrina, anquirina, tropomiosina e actina. Adaptado: *Biología Celular y Molecular*,. Karp.Editorial McGraw-Hill Interamericana.

### 1.2.3 Anemias de Doenças Crônicas

São anemias decorrentes de estado infecciosos crônicos, doenças inflamatórias ou neoplásicas, que interferem no metabolismo do ferro, na produção de eritropoietina e/ou na resposta medular a este hormônio.

A anemia em geral se manifesta 1 a 2 meses após doenças de base . Caracteriza-se pela baixa produção de eritropoietina ( EPO) em relação à anemia, menor resposta dos precursores eritróides medulares à EPO e desvio cinético do ferro que fica retido nos macrófagos com conseqüente diminuição do ferro sérico e da saturação de transferrina.

### 1.2.4 Anemia Sideroblásticas

São desordens caracterizadas pela inadequada formação do heme e acúmulo excessivo de ferro na mitocôndria dos eritroblasto. Decorrem diversos tipos de defeitos intramitocondriais, que acarretam a presença de numerosos sideroblastos em anel (ferro mitocondrial) na medula óssea, que se apresenta hiperplástica na série vermelha.

Entretanto, o número de reticulócitos é normal ou diminuído, por causa da Eritropoiese ineficaz que é seu principal mecanismo de anemia. Em razão da incapacidade de utilização do ferro, seus níveis séricos encontram-se elevados e a transferrinas saturadas. Sua grande característica no sangue periférico é a exuberância no grau de anisocitose.

Histograma com base bastante elevado, independentemente se anemia é microcítica, normo ou macrocítica.

Segundo Hilman e Finch, 1974, são classificadas com alterações apenas na síntese do heme. Em geral, são microcítico – hipocrômicas com elevadas anisocitose e aquelas que apresentam alterações tanto citoplasmáticas ( hemoglobinação) quanto nucleares (displasias) em seus precursores (eritroblastos). São normo ou macrocíticas, também apresentam grande polimorfismo dos eritrócitos.

### 1.2.5 Alteração de Membrana Eritrocitária

Normalmente as hemácias possui um tamanho padrão de cerca de 6-8 mm de diâmetro. Certas doenças, no entanto, provocar uma grande variação no tamanho da célula. Valores de RDW (Variabilidade Normal das Hemácias) mais elevados indicam maior

variação de tamanho e o intervalo de referência normal dos glóbulos vermelhos humanos é 11,5-14,5%. [1]

Uma contagem baixa significa que as hemácias não variam muito em tamanho enquanto que uma alta contagem significa que as células variam muito, com algumas células muito pequenas e outras muito grandes. Uma descoberta de níveis baixos ou altos indicaria a necessidade de testes adicionais para identificar a causa dos resultados.

Em casos de anemia os resultados dos testes de RDW são muitas vezes utilizados em conjunto com o volume corpuscular médio (VCM) resultados médios para determinar as possíveis causas da anemia. É usado principalmente para diferenciar uma anemia de causas mistas a partir de uma anemia de uma única causa

Os eritrócitos humanos são caracterizados pela sua forma discoide e a sua capacidade para obter deformação extensa e passiva, durante a passagem através dos capilares estreitos, no período de vida de 120 dias na circulação.

Estudos moleculares permitiram o desenvolvimento de descobertas da estrutura da membrana eritrocitária e conseqüentemente das funções de várias doenças hereditárias de membranas dos eritrócitos (MOHANDAS et al, 1983; MOHANDAS & CHASIS, 1993; MOHANDAS & EVANS, 1994; DISCHER, 2000; DELAUNAY, 2007).

Estes estudos facilitam o atual entendimento da base estrutural molecular de vários distúrbios da membrana dos eritrócitos e discute como essas novas idéias contribuíram para a melhor compreensão de sua fisiopatologia e também de diferentes gravidades das manifestações clínicas entre indivíduos afetados.

### **1.2.6 Ovalocitose Hereditária (SAO)**

Esta alteração de membrana é caracterizada pela presença de células vermelhas em forma oval. É uma herança autossômica dominante e heterozigótica, identificada com alta prevalência em algumas regiões. Herança em homozigose pode levar à letalidade fetal, mas parece fornecer alguma proteção contra todas as formas de malária. Ovalocitose é muito comum nas áreas endêmicas de malária na Melanésia, Malásia, Filipinas, Indonésia e sul da Tailândia e a prevalência 5-25% (BOOTH et al., 1977).

Em todos os casos de ovalocitose estudados, apenas uma deleção genômica de 27 pb foi identificada, codificando os aminoácidos 400-408 localizadas na fronteira do domínio transmembranar e citoplasmática da proteína banda 3 (JAROLIM et al, 1991; MOHANDAS et al, 1992; SCHOFIELD et al, 1992).

Assim, ovalocitose hereditária é única com distúrbio de membrana que gerado pela mesma mutação num único gene e responsável pelo fenótipo morfológico.

Várias hipóteses têm sido propostas a respeito de como mutação na banda 3 pode levar a um aumento na rigidez da membrana. Estes incluem a hipótese de uma mudança conformacional induzida pela mutação no domínio citoplasmático da banda 3, formando ligações adicionais com esqueleto da membrana, interferindo com o rearranjo estrutural da espectrina, conseqüentemente induzindo a deformação da membrana eritrocitária (XIULI e NARLA MOHANDAS, 2008).

### **1.2.7 Eliptocitose Hereditária (EIH)**

Eliptocitose hereditária (EIH) é uma desordem genética heterogênea, caracterizada por presença de eritrócitos em forma elíptica no sangue periférico (GALLAGHER, 2004).

A herança de EIH é autossômica dominante e clinicamente os portadores da EIH são assintomáticos, mas com casos relatados com anemia severa correndo risco de vida e outros casos com hidropisia fetal. (GALLAGHER, 2004).

Uma característica comum a todas as formas de membrana mecanicamente instável que resulta na transformação progressiva da forma discocitos e em casos graves a fragmentação da membrana gera células com área de superfície de membrana reduzida e morfologia anormal resultando na dissociação da membrana com o citoesqueleto (espectrina-actina) e o complexo juncional levando à diminuição e estabilidade mecânica da membrana (GALLAGHER, 2004).

A piropoiquilocitose hereditária (PPH), quando originalmente descrita, foi pensada para ser uma entidade distinta, devido ao aumento da sensibilidade térmica dos eritrócitos e a morfologia anormal (ZARKOWSKY et al., 1975). No entanto, estudos moleculares estabeleceram claramente que a PPH é um subconjunto de EH, devido a um conjunto de mutações levando a uma ruptura grave da espectrina com a membrana celular (GALLAGHER, 2004).

### **1.2.8 Esferocitose Hereditária**

A esferocitose hereditária (EH) é uma anemia hemolítica hereditária comum em indivíduos de ascendência européia do norte, (EBER e LUX, 2004; GALLAGHER e JAROLIM, 2005).

As manifestações clínicas da EH são amplamente variadas e consistem em anemia com hemólise, icterícia, reticulocitose, cálculos biliares, esplenomegalia e presença de esferócitos. Sua área de membrana de superfície reduzida e em 75% dos casos estão associado com herança dominante, embora 25% são recessivo. (XIULI e NARLA MOHANDAS, 2008)

A gravidade da doença de EH é classificada como: portador silencioso, leve, moderada e severa de acordo com os parâmetros hematológicos incluindo a hemoglobina e as contagens de reticulócitos.

Segundo Lux e Palek, modificado por Glader e Lukens, portador silencioso possui hemoglobina (Hb) normal; reticulócitos de 1 a 3%, morfologia aparentemente normal; curva de fragilidade osmótica normal a fresco e alteração pós-incubação (24h); seu conteúdo de espectrina de 80 a 100%.

Esferocitose hereditária leve: 20 a 30% dos casos. Hb de 11 a 15g/ DL; reticulócitos 3 a 8%; poucos esferócitos à morfologia; curva de fragilidade osmótica normal a levemente alterada a fresco e alterada pós- incubação (24h); conteúdo de espectrina de 80 a 100%.

Esferocitose hereditária moderada: 60 a 75% dos casos. Hb de 8 a 12g/ dL; reticulócitos >8%; moderada esferocitose à morfologia; curva de fragilidade osmótica alterada tanto a fresco quanto pós-incubação; conteúdo de espectrina de 50 a 80%.

Esferocitose hereditária grave: 5 a 10% dos casos. Hb < 6g/dL; reticulócitos >10% acentuada esferocitose e Poiquilocitose à morfologia eritrocitária; curva de fragilidade osmótica bastante alterada tanto a fresco quanto pós-incubação (24h); conteúdo de espectrina de 20 a 55%.

Vinte por cento dos casos de EH leve frequentemente apresentam, esferocitose mínima, níveis normais de hemoglobina, ligeira reticulocitose e leve esplenomegalia. Porém, muitos destes indivíduos não são diagnosticados até a idade adulta, quando ocorrem complicações relacionadas, tais como: hemólise crônica e cálculos biliares.

Os pacientes EH moderados são o maior grupo, compreendendo cerca de 60% dos casos e apresentam níveis de hemoglobina entre 80-110 g / l e reticulócitos acima de 8%. A incidência de esplenomegalia varia de cerca 50% em crianças e 75-95% em adolescentes e adultos (XIULI e NARLA MOHANDAS, 2008).

A perda estrutural de membrana em EH é resultado do defeito da rede de ancoragem esquelética da membrana, com defeitos em várias proteínas, tais como: a redução na ancoragem e deficiências de proteínas transmembranares (Banda 3 ou RHAG) que ligam a bicamada ao citoesqueleto associadas a anquirina, proteína 4.2 ou de espectrina que leva à diminuição da membrana, resultando na coesão, levando a diminuição na área de superfície membranar (GALLAGHER e JAROLIM, 2005).

A EH é o resultado de defeitos em qualquer um dos componentes protéicos, envolvidos em ligações verticais entre a rede do esqueleto e membrana. Possivelmente essas alterações podem estar relacionadas com possíveis polimorfismos no gene *SLC4A1* que codifica a banda 3 da membrana plasmática.

#### 1.6 *SLC4A1* Associado com Alteração de Membrana

As anemias com alteração de membrana são classificadas de acordo com o fenótipo, nível de hidratação e vazamento de cátion. As bases genéticas para essas condições há muito tempo permanece desconhecida. Recentemente investigações descobriram defeitos de genes por trás de algumas das variantes, que oferecem novas percepções sobre os mecanismos subjacentes à doença.

Entretanto, as mutações em *SLC4A1*, que codifica proteína permutadora de ânion em eritrócitos (AE1, a banda 3), são responsáveis por alguns tipos de ovalocitose (SAO), esferocitose (EH) e estomatocitose hereditária (ETH).

Mutações no gene *SLC4A1* que expressa a banda 3 têm sido associadas à esferocitose hereditária e acidose tubular renal. Outras mutações foram identificadas no sudoeste da Ásia determinando aumento da rigidez do eritrócito e resistência à infecção por malária associados à ovalocitose. Um caso registrado na literatura relata ausência da banda 3 com esferocitose hereditária e nefrocalcinose (JAROLIM et al., 1998).

Em casos de ovalocitose estudados, apenas uma deleção genômica de 27 pb foi identificada, codificando os aminoácidos 400-408 localizadas na fronteira do domínio transmembranar e citoplasmático da proteína banda 3 (JAROLIM, 1991; MOHANDAS et al., 1992; SCHOFIELD et al., 1992).

Bruce et al., 2005 identificou 11 linhagens humanas com herança dominante de anemias hemolíticas tanto em estomatocitose hereditária e em classes de esferocitoses.

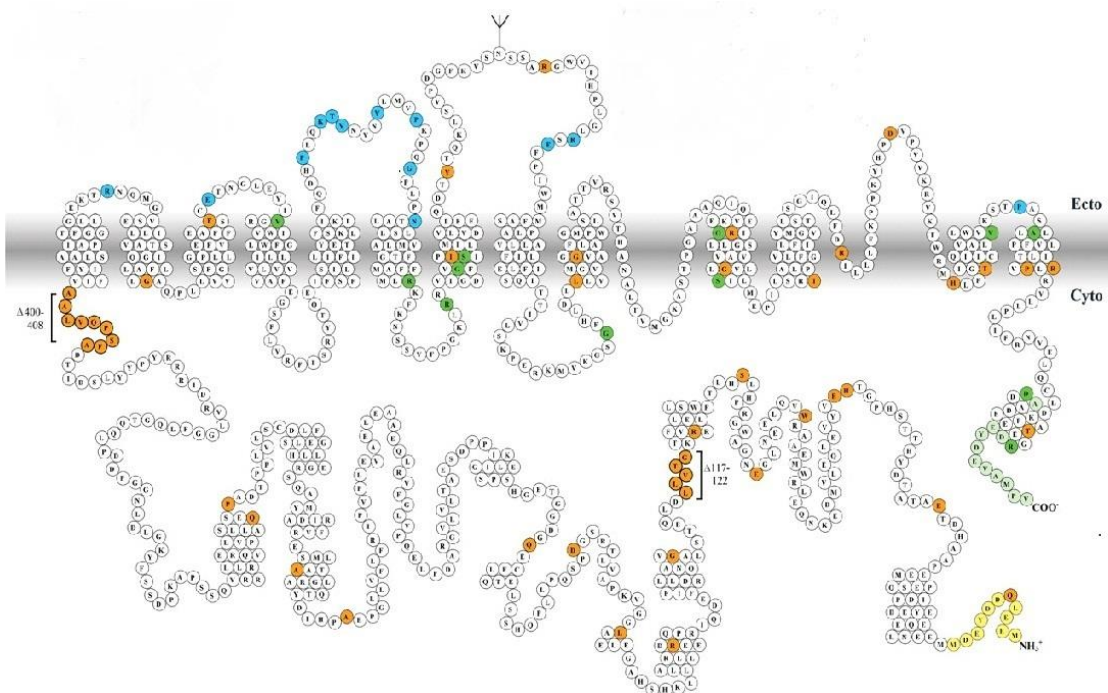
Os indivíduos afetados destas famílias tiveram um aumento na permeabilidade da membrana aos íons de sódio e de potássio que foram marcadas na temperatura de zero graus centígrados onde foi detectado uma associação com a doença há uma série de substituições de um único aminoácido no domínio intramembranar do permutador de ânions da banda 3.

influenciando na redução do transporte de ânions nas células vermelhas anormais.

Sánchez-López et al., 2010 relatou novas mutações no gene que expressa a proteína banda 3 em três pacientes mexicanos com esferocitose hereditária onde foi encontrado polimorfismos conhecido como menphis 1 e uma nova modificação gênica em heterozigose resultando em uma proteína truncada e instável com funções anormais.

X. G. Xu et al., 2011 encontrou nas regiões sequenciadas do gene *SLC4A1* em indivíduos da população chinesa, seis novos polimorfismos no único aminoácido sendo quatro novos *snps* no *exon* 19 e mutações no *intron* 18 e 19.

Zwieten et al., 2012 estudou em pacientes, 15 novos polimorfismos no gene *SLC41* que não foram previamente relatado na literatura. Estas mudanças gênicas, não foram detectadas entre 100 alelos controles normais. Curiosamente, cerca de um terço das mutações encontradas neste estudo eram susceptíveis de afetar a transcrição do pré – RNAm



**Figura 3:** Esquema da proteína Banda 3 demonstrando os polimorfismos encontrados; em azul polimorfismos relacionados com os sistemas eritrocitário, em laranja mutações gênicas como deleção ligadas à alteração de membrana, em verde mutações associadas com acidose tubular renal e em verde claro e amarelo deleções terminais. Adaptado: Shayakul e Alper (2004).

## 2. JUSTIFICATIVA

A detecção de alterações gênicas em proteínas como a hemoglobina e a banda 3, são de grande importância para o diagnóstico de anemias crônicas de pacientes que procuram os serviços de saúde.

Em grande parte dos serviços, os exames realizados para diagnóstico detectam as anemias geralmente através de um hemograma, podendo ser resultado da deficiência de ferro, vitamina B12 ou ácido fólico, sendo estas as carencias, as hemoglobinopatias como a anemia falciforme, hemoglobinas anormais C e D, instáveis e talassemias alfa e beta, assim como as anemias imunes com a detecção de auto anticorpos hemolíticos dirigidos contra sequências peptídicas da membrana eritrocitária do próprio indivíduo.

No entanto, outras anemias crônicas que podem estar associadas ou não a alterações de membrana, como por exemplo a ausência da proteína Rh ( fenótipo Rh null), polimorfismos na banda 3 entre outros, não são detectadas no dia a dia de um laboratório de hematologia, fazendo com que tratamentos não sejam eficazes, levando ao uso desnecessário de medicamentos e com isto a perda de recursos sem que a recuperação do estado anêmico do paciente seja alcançada.

Este estudo se propõe a detectar polimorfismos no gene *SLC4A1* que possam estar associados com alterações nas membranas dos eritrócitos resultando em anemia crônica. Este diagnóstico é fundamental para esclarecer a razão do estado anêmico do pacientes direcionando a conduta médica evitando danos ao indivíduo e ao sistema de saúde.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Investigar polimorfismo nos *exon* 4, 5, 6, 18 e 19 do gene *SLC4A1*, em pacientes com alterações na membrana eritrocitária.

#### 3.2 Objetivo Específico

- Descrever a frequência do polimorfismo do gene *SLC4A1* na população de pacientes com alteração de membrana ou não atendidos na Fundação HEMOAM.
- Investigar a presença da Banda 3 Memphis, através da mutação A 166 G, codificada no *exon* 4.
- Descrever a frequência genotípica do sistema Diego nos indivíduos estudados.



## 4.CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1 Área do Estudo

O estudo foi realizado na cidade de Manaus (AM), Brasil onde foi coletado amostras na Fundação de Hemoterapia e Hematologia do Amazonas (FHEMOAM).

### 4.2 Indivíduo do Estudo

Pacientes hematológicos que foram encaminhados para o Laboratório de Análises Clínicas da HEMOAM.

Indivíduos saudáveis: Doadores de sangue que forem aprovados na triagem clínica e liberadas pela triagem sorológicas da HEMOAM.

### 4.3 Critérios de Elegibilidade

#### 4.3.1 Inclusão

Elegemos para participar desta pesquisa, indivíduos saudáveis e pacientes anêmicos que não possuíam diagnóstico de hemoglobinopatias, anemias carenciais, anemia hemolítica auto imune, dengue, hepatite, HIV, HTLV, sífilis, malária, assim como os que utilizavam medicamentos que poderiam influenciar na deformação de membrana eritrocitária, sendo a anemia dos pacientes que atendiam os critérios de elegibilidade, determinada pelo seguintes parâmetros:

Homem: eritrócitos  $< 4,30$  milhões /  $\text{mm}^3$  hemoglobina  $< 13,5$  g / L e hematócrito  $< 41\%$

Mulher: eritrócito  $< 3,9$  milhões /  $\text{mm}^3$  hemoglobina  $< 12,0$  g / L e hematócrito  $< 36\%$

E os agrupamos de acordo com os seguintes critérios

1. pacientes anêmicos com poiquilocitose e/ou anisocitose.
2. pacientes anêmicos sem poiquilocitose e/ou anisocitose.
3. pacientes sem anemia com poiquilocitose e/ou anisocitose.

#### 4. Indivíduos saudáveis.

##### 4.3.2 Exclusão

##### 4.4 Tamanho Amostral

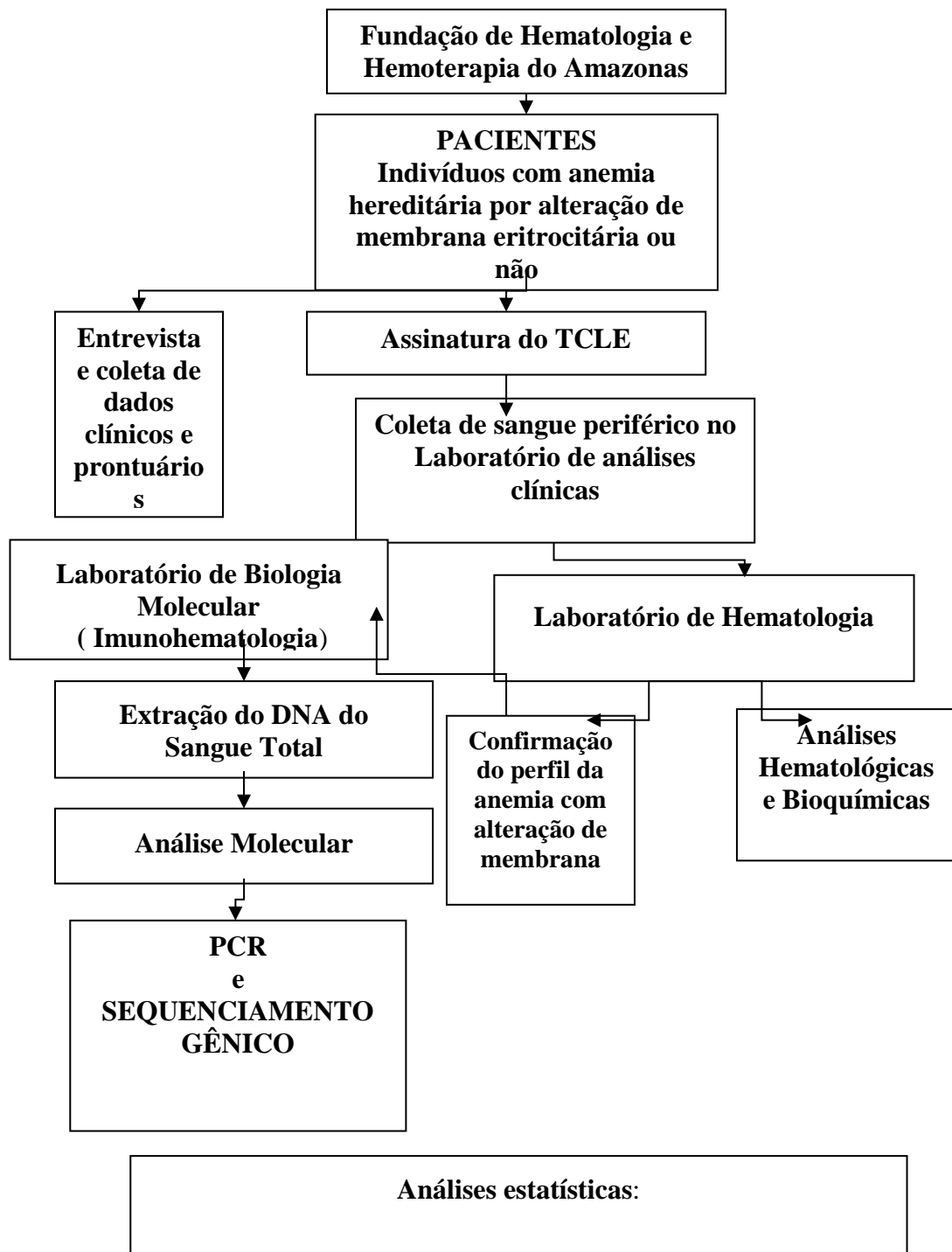
##### **Análise de Variáveis Qualitativas ou Categóricas**

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Nas análises inferiores a 4 foram realizados o Odds ratio. ( *Chi Square Test* = não existe associação P-value > 0,05 e existe associação P-value < 0,05 ) e (*Odds ratio* quando P- vale é < 0,05 que determina o fator de proteção à anemia (odds < 1) ou a associação ao fator de risco da anemia (odds >1).

Definimos uma prevalência de 2% do total de indivíduos atendidos durante 1mês, dando um total de 300 indivíduos.

##### 4.5 Aspectos Éticos

As amostras utilizadas no estudo serão obtidas por meio do projeto “*Estudo do Impacto nas Rejeições Imune em Terapia Celular dos Sistemas Kell, Kidd, Duffy, MNS, Diego, Dombrock, Colton e Gerbich*”, aprovado pela Comissão Ética em Pesquisa da FHEMOAM em 08 de fevereiro de 2013, pelo parecer n° 213.167, CAAE: 01193312.4.0000.0009 (**Apendice-A**).



**Figura 4:** Fluxograma do desenho do estudo

## **4.6 Metodologia do Estudo**

Foram analisados transversalmente as amostras coletadas e encaminhadas ao laboratório de biologia molecular da Imunohematologia do HEMOAM onde foram realizados testes moleculares em pacientes para caracterização de polimorfismos no gene *SLC4A1* relacionados em alterações de membrana eritrocitárias.

Foram Consideradas as análises clínicas e laboratoriais realizadas no laboratório de hematologia do HEMOAM para estabelecermos as associações com os polimorfismos no gene e os casos identificados com alteração de membrana.

Foi também realizada uma busca ativa nos exames dos pacientes que apresentarem anemia hereditária por deformação de membrana no laboratório de hematologia no HEMOAM.

### **4.6.1 Procedimentos de Inclusão dos Participantes no Estudo.**

#### **4.6.1.1 Pacientes Encaminhados do laboratório de Hematologia do HEMOAM**

Foi feito uma busca ativa nos exames dos pacientes e selecionados de acordo com o critério de elegibilidade do estudo, em seguida foi feito contato convidando o paciente participar do estudo, quando foi explicado por um membro de nossa equipe de pesquisa sobre as justificativas e os objetivos do trabalho, bem como os benefícios que foram obtidos após conclusão do estudo. Em alguns casos membros de nossa equipe se encaminharam a residência de alguns pacientes para explicação e assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE). O candidato também foi informado que os resultados estarão a sua disposição e que seu anonimato foi preservado. Com o consentimento do paciente foi feito uma ficha de dados e aplicado o TCLE. Quando se tratar de pacientes menores de idade, o TCLE foi assinado pelos pais.

#### **4.6.2 Coleta Material**

Para as determinações hematológicas foram coletados 5 mL de sangue venoso em anticoagulante (EDTA - Ácido etilenodiaminotetrácico di-sódico), na concentração de 1,5 mg/mL (DACIE e LEWIS, 1984). Também foram coletados 5 mL de sangue venoso sem aditivos para a obtenção do soro destinado as análises bioquímicas e sorológicas. No momento da coleta de sangue foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo para a análise morfológica das células sanguíneas.

Todas as análises hematológicas e sorológicas foram realizadas no Laboratório de Hematologia da Fundação HEMOAM

#### 4.6.3 Análises Hematológicas

As determinações hematológicas foram realizadas em contador automatizado - ABX Pentra 80 (HORIBA DIAGNOSTICS, Montpellier, FR), a avaliação morfológica realizada pela análise dos esfregaços sanguíneos corados pelo Wright e a contagem de reticulócitos pelos esfregaços corados pelo azul de cresil brilhante e posteriormente analisados por microscopia óptica. (DACIE e LEWIS, 1984).

##### 4.6.3.1 Coloração hematológica

Foram utilizadas lâminas com amostras de sangue periférico de pacientes com anemias com alteração de membrana, as quais não continham anticoagulante. As extensões sanguíneas foram cobertas com a solução May-Grunwald, deixando o corante agir por um minuto, acrescentou-se a água tamponada em quantidades equivalentes e ambas com o pH neutro para que não houvesse o favorecimento de nenhuma coloração.

Em seguida desprezou-se a solução May-Grunwald e a água tamponada, acrescentado uma gota do corante GIEMSA para cada 1 ml de água tamponada, adicionado em toda extensão sanguínea, agindo por 20 minutos, lavando em água corrente e secando em temperatura ambiente.

A leitura das lâminas coradas com o corante GIEMSA, foi realizada no microscópio óptico trinocular Bioval, no aumento 1000x em luz branca e captura das fotos no sistema Genial ( Figura 6, Figura 7, Figura 8, Figura 9 ).

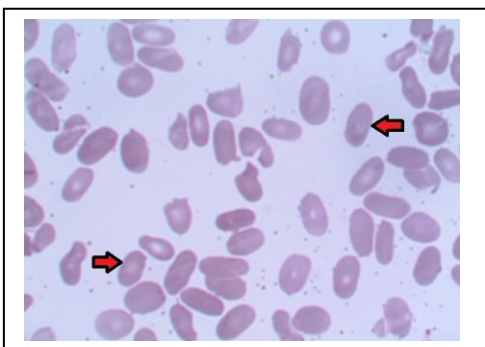


Figura 5. Eliptocitose

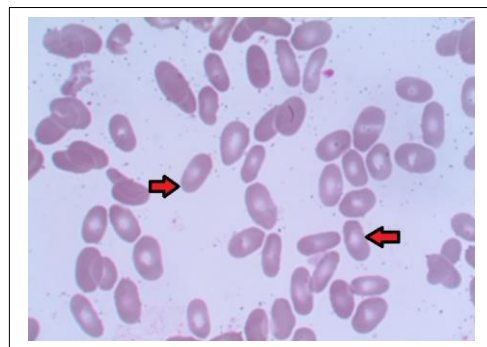


Figura 6. Eliptocitose

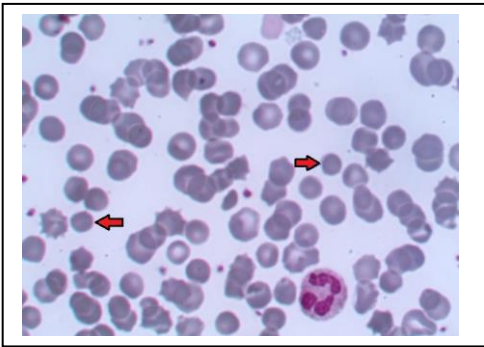


Figura 7. Esferocitose

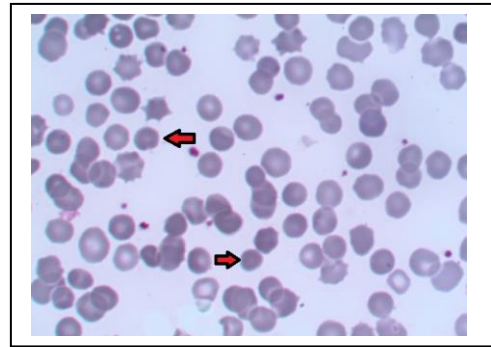


Figura 8. Esferocitose

#### 4.6.4 Análises Sorológicas

Os testes sorológicos utilizados para as análises foram Hemaglutinação Indireta (HAI), Ensaio Imunoenzimático (EIE ou ELISA), Imunofluorescência indireta (IFI) e teste de microaglutinação (VDRL). Para o vírus da hepatite C, os resultados foram confirmados pelo aparelho *ARCHITECT i 2000SR e Freedom evolyzer (TECAN)*

#### 4.6.5 Análise Molecular

##### 4.6.5.1 Extração do DNA

DNA foi extraído do sangue total periférico utilizando a técnica de fenol-clorofórmio (Brazol), o DNA extraído foi homogeneizado e após dissolução completa diluído em água para injeção. As amostras de DNA genômico foram armazenadas -20° C no Laboratório de Biologia Molecular da Imunohematologia FHEMOAM.

##### 4.6.5.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para a realização do sequenciamento gênico do gene *SLC4A1* referentes aos *exons* 4, 5, 6 18 e 19, foi customizados os oligonucleotídeos iniciadores (primers) específico para cada região no endereço [www. Bioinformatics.nl](http://www.Bioinformatics.nl) através do *sowfater ( Primer 3 plus) Fest PCR*.  
6.3. (Tabela 2).

Para as reações de PCR, utilizamos tampão contendo 50mM de solução de Tris-HCl; 50mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>); 10mM de mistura de desoxinucleosídeos trifosfatados (dNTPs); 0,5U da enzima Taq DNA polimerase recombinante (*Fermentas LIFE SCIENCES*) e 50 a 200 ng de DNA, em volume final de 50µL.

Para cada *exon*, a etapa de hibridização durante a termociclagem foi testada em diferentes temperaturas como: 58°C, 60°C, 62°C e 63°C, determinando assim a temperatura ideal de 62°C para as reações com os *primers* 18, 19, sendo de 63°C para as reações com os *primers* 4, 5, 6 .

Foi testado também os volumes de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) na concentração de 50mM por microlitro, determinando o volume ideal de 1,0 ul a 08 ul para as reações dos *primers* descritos respectivamente.

Os ciclos da PCR dos *exons* 4, 5, e 6 compreenderam uma etapa inicial de desnaturação do DNA de 15 minutos a 95°C e 35 ciclos a 94°C por 50 segundos, 63°C por 50 segundos e 72°C por 1 minutos, com etapa final de 72°C por 10 minutos e os ciclos do *exons* 18 e 19 compreenderam uma etapa inicial de desnaturação do DNA de 5 minutos a 94°C e 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 62°C ou 63°C por 45 segundos e 72°C por 1 minutos, com etapa final de 72°C por 10 minutos.

#### 4.6.5.3 Purificação dos fragmentos amplificados

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1% com brometo de etídio, visualizados e fotodocumetados no transluminador Gel Doc<sup>TM</sup> XR *BIO-RAD*, os quais apresentaram um fragmento de 1429 pb do *exon* 4, 5, e 6 e um fragmento de 480 pb do *exon* 18 e 19, foram utilizados também marcadores de pares de bases DNA Ladder 100bp–10 kb (**Figura 10 e 11**).

Para cada poço contendo 50ul de reação foram adicionados 10ul de acetato de amônia 1M, selado a placa com a tampa de silicone.

Em seguida misturado por inversão. Após homogeneização, foi adicionado 100ul de isopropanol P.A e incubada por 30 minutos, centrifugadas por 30 minutos a 3500rpm a temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante em papel absorvente e realizando-se *spin* invertido a 200 rpm.

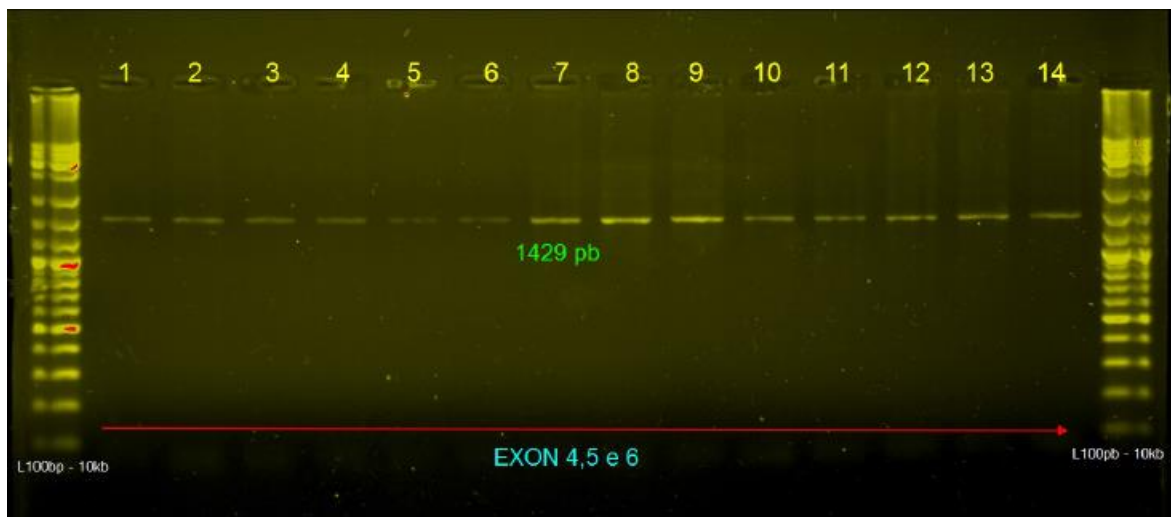
Após a centrifugação, foram adicionados 200 ul de etanol a 80%. Em seguida as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 15 minutos a 3500 rpm à temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante em papel absorvente e realizando-se *spin* invertido a 200 rpm, esse processo foi repetido mais uma vez.

Em seguida as amostras foram incubadas à 37°C durante 10 minutos, após as quais foram adicionados 50ul de água.

Foi usado também a enzima ExoSAP para purificação dos fragmentos, principalmente para os *exons* 4, 5 e 6, devido problemas de contaminação com os oligonucleotídeos iniciadores.

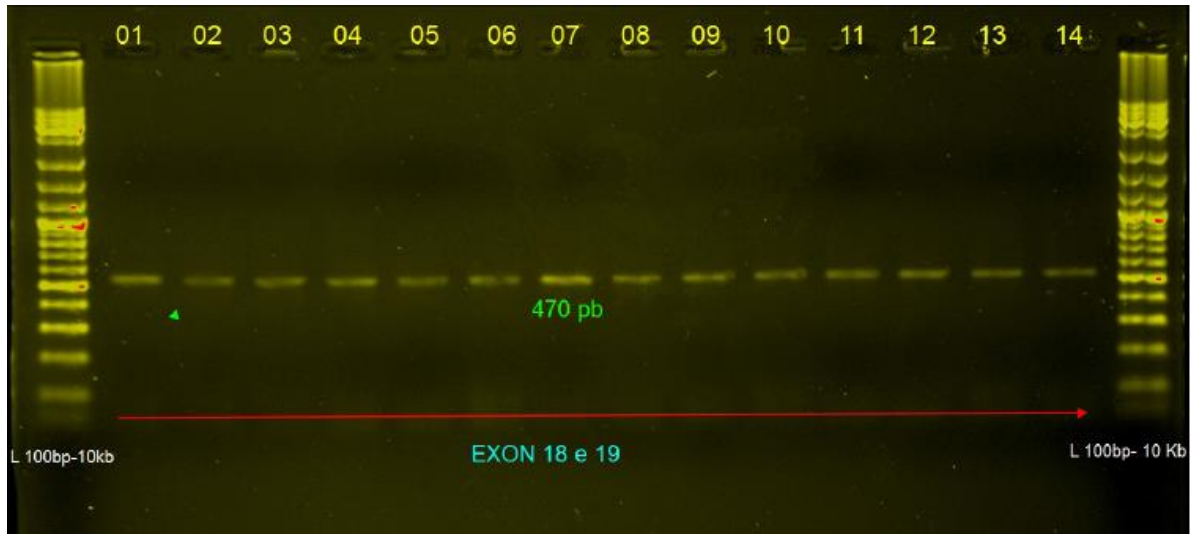
A solução para 100 reações foi preparada adicionando-se 60ul fosfatase alcalina, 40ul de Exonuclease I (20u/ul) e 300ul de água ultrapura (ddH<sub>2</sub>O).

Em seguida foi adicionado 4ul da solução preparada (ExoSap) para cada 10ul do produto da PCR sendo incubado no termociclador com as temperaturas de 37°C durante 30 minutos para ativação e trabalho da enzima, 80°C durante 15 minutos para inativação do ExoSap e 10°C durante 10 minutos para esfriamento do bloco.



**Figura 9:** Amplificação do fragmento do *exon* 4, 5 e 6 do gene *SLC4A1*, utilizando os *primers* 4,5,6a direto e reverso, determinando a temperatura de anelamento ideal de 63°C e usando DNA Ladder 100 bp – 10 kb como marcador molecular.





**Figura 10:** Amplificação do fragmento do *exon* 18 e 19 do gene *SLC4A1*, utilizando os *primers* 18,19 direto e reverso, determinando a temperatura de anelamento ideal de 62°C e usando DNA Ladder 100 bp – 10 kb como marcador molecular.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos iniciadores da reação (*primers*) específico.

Exon	Primer	5' → 3
4, 5 e 6	Direto	gCT CAC gAC ACC gAg gCA ACA g
	Reverso	CCC AAC TCT gAg CAT Agg AC
18 e 19	Direto	AAC CTg ggC TgA gAg TgT gCg
	Reverso	CCT CgC ATg CTC CCA gCT C

#### 4.6.5.4 Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados Para Análise do Gene *SLC4A1*

O sequenciamento gênico foi realizado pelo método de SANGER (SANGER et al., 1977), utilizando os didesoxinucleosídeos trifosfatados (ddNTPs), que quando incorporados a fita de DNA sintetizada proporcionam paradas aleatórias na polimerização.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático *Applied Biosystems 3130*, utilizando-se o *Kit BigDye 03™ Terminator Sequencing Standard (Applied Biosystems)*

de 16 capilares. A reação de sequenciamento foi realizada em placas de fundo em V (*MicroAmp 96-well Reaction Plate - Applied Biosystems*), utilizando-se , *Big Dye Terminator, primer* (1,5 pmol), tampão (Tris-Cl 200mM pH 9,0: 5 mM MgCl<sub>2</sub>), 200 ng de DNA e H<sub>2</sub>O (Ultra Pura – GIBCO, Invitrogen, CA) .As reações foram incubadas em termociclador (*Eppendorf Mastercycler® gradient, Canada*), na temperatura inicial de 96°C durante 1 minutos, seguida por 30 ciclos de 96 °C por 15 segundos; 52 °C por 15 segundos, e 60 °C por 4 minutos para os *exon* 18 e 19 e para os *exons* 4, 5 e 6 o ciclo semelhante mudando só a temperatura de anelamento para 53°C.

Para cada poço contendo 10ul de reação foram adicionados 40ul de Isopropanol 65% e selado a placa com a tampa de silicone. Em seguida misturado gentilmente por inversão. Após homogeneização, a reação foi incubada por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente, centrifugadas por 45 minutos a 3600rpm a temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante em papel absorvente e realizando-se *spin* invertido a 200 rpm . Após a centrifugação, foram adicionados 200 ul de etanol a 70%.

Em seguida as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos a 3600 rpm à temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante em papel absorvente e realizando-se *spin* invertido a 200 rpm . As amostras obtidas foram incubadas em ambiente escuro por período mínimo de 2 horas, após as quais se acrescentará 10 ul da mistura de parada da reação (*Hi-Di<sup>TM</sup> Formamide - Applied Biosystems*) e procedendo a análise no sequenciador.

## 5. RESULTADOS

Foram coletadas 391 amostras de pacientes sendo formados 4 grupos, o critério de classificação esclarecidas na metodologia descrita acima e demonstrados na tabela abaixo (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Grupos dos pacientes estudados

<b>Grupos</b>	<b>N° de Indivíduos</b>	<b>%</b>
<b>A</b> Pacientes ANÊMICOS com POIQUILOCITOSE e/ou ANISOCITOSE.	111	28,39
<b>B</b> Pacientes ANÊMICOS sem POIQUILOCITOSE e/ou ANISOCITOSE.	85	21,74
<b>C</b> Pacientes sem ANEMIA com POIQUILOCITOSE e/ou ANISOCITOSE.	12	3,07
<b>*D</b> Indivíduos SAUDÁVEIS.	183	46,80
<b>Total</b>	<b>391</b>	<b>100</b>

\*Pacientes sem anemia e sem poiquilocitose e/ou anisocitose e doadores sangue aptos nas triagens clínica, sorológica e hematológica.

Dos pacientes analisados, 111 indivíduos anêmicos com poiquilocitose e/ou anisocitose e 12 indivíduos sem anemia com poiquilocitose e/ou anisocitose estão citados nas tabelas abaixo (**Tabela 4. e Tabela 5.**).

**Tabela 4.** Tipos de alteração de membrana e seus respectivos números de indivíduos analisados do grupo A - Pacientes anêmicos com poiquilocitose e/ou anisocitose.

<b>Alteração de Membrana</b>	<b>N° de Indivíduos</b>	<b>%</b>
Eliptócitos	32	28,57
Eliptócitos e Codócitos	14	3,57
Eliptócitos e Dacriócitos	11	9,82
Eliptócitos e Esferócitos	2	1,79
Eliptócitos e Estomatócitos	2	1,79
Eliptócitos e Esquizócitos	5	0,89
Esferócitos	8	7,14
Dacriócitos	12	1,79
Esquizócitos	14	3,57
Codócitos	11	0,90
<b>Total</b>	<b>111</b>	<b>100</b>

**Tabela 5.** Tipos de alteração de membrana e seus respectivos números de indivíduos analisados do grupo C – Pacientes sem anêmicos com poiquilocitose e/ou anisocitose.

<b>Alteração de Membrana</b>	<b>N° de Indivíduos</b>	<b>%</b>
Eliptócitos	7	58,34
Eliptócitos e Codócitos	1	8,33
Poiquilocitose	1	8,33
Dacriócitos	2	16,67
Esquizócitos	1	8,33
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>100</b>

### 5.1 Frequência dos *Exon 4, 5, 6 e Íntrons 5, 6 e 7*

Foram encontrados 41 polimorfismos nas amostras estudadas conforme demonstrado nas tabelas ( **Tabela 6, Tabela 7, Tabela 8, Tabela 9.**).

**Tabela 6.** Frequência dos polimorfismos encontrados nos *exons* 4, 5, e 6 e nos *íntrons* 5, 6 e 7 no grupo A.

Grupo A							
Polimorfismos	SP	%	HT	%	HM	%	Total
E4_A166G	81	72,97	25	22,53	5	4,50	111
E5_A257G	110	99,10	1	0,90	0	0,0	111
E6_G405A	110	99,10	1	0,90	0	0,0	111
E6_A426G	109	98,20	2	1,80	0	0,0	111
E6_C457A	110	99,10	1	0,90	0	0,0	111
E6_G459T	107	96,40	4	3,60	0	0,0	111
E6_G474A	109	98,20	2	1,80	0	0,0	111
E6_A482G	110	99,10	1	0,90	0	0,0	111
IN5_45	110	99,10	1	0,90	0	0,0	111
IN5_60	108	97,30	3	2,70	0	0,0	111
IN5_410	110	99,10	1	0,90	0	0,0	111
IN5_449	100	90,10	11	9,90	0	0,0	111
IN5_461	102	91,90	8	7,20	1	0,90	111
IN5_490	105	94,60	5	4,50	1	0,90	111
IN5_591	101	91,00	9	8,10	1	0,90	111
IN5_695	70	63,07	37	33,33	4	3,60	111
IN5_del 163	109	98,20	2	1,80	0	0,0	111
IN6_27	82	73,88	27	24,32	2	1,80	111
IN6_31	110	99,10	1	0,90	0	0,0	111
IN6_47	110	99,10	1	0,90	0	0,0	111
IN7_6	110	99,10	1	0,90	0	0,0	111
IN7_36	110	99,10	1	0,90	0	0,0	111
IN7_59	110	99,10	1	0,90	0	0,0	111

Das alterações nucleotídicas investigadas no grupo A, nos *exons* 4, 5 e 6 foram encontrados com maior frequência: *exon 4-166A/G* em heterozigose 22,53% e homozigose 4,50% e no *ítron 5- IN5\_695* em heterozigose 33,33% e homozigose 3,60%.

**Tabela 7.** Frequência dos polimorfismos encontrados nos *exons* 4, 5, e 6 e nos *íntrons* 5, 6 e 7 no grupo B.

<b>Grupo B</b>							
<b>Polimorfismo</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>HT</b>	<b>%</b>	<b>HM</b>	<b>%</b>	<b>Total</b>
<b>E4_A166G</b>	70	82,36	15	17,64	0	0,0	85
<b>E6_C457A</b>	84	98,83	1	1,17	0	0,0	85
<b>IN5_60</b>	83	97,65	2	2,35	0	0,0	85
<b>IN5_449</b>	74	87,06	10	11,77	1	1,17	85
<b>IN5_461</b>	74	87,06	11	12,94	0	0,0	85
<b>IN5_490</b>	77	90,59	8	9,41	0	0,0	85
<b>IN5_591</b>	74	87,06	11	12,94	0	0,0	85
<b>IN5_695</b>	60	70,59	22	25,89	3	3,52	85
<b>IN6_27</b>	60	70,59	23	27,06	2	2,35	85

Das alterações nucleotídicas investigadas no grupo B, nos *exons* 4, 5 e 6 foram encontrados com maior frequência: *íntrons* 5- IN5\_695 em heterozigose com 25,89% e homozigose com 3,52% e no *íntron* 6- IN6\_27 em heterozigose com 27,06% e homozigose com 2,35%.

**Tabela 8.** Frequência dos polimorfismos encontrados nos *exons* 4, 5, e 6 e nos *íntrons* 5, 6 e 7 no grupo C.

<b>Grupo C</b>							
<b>Polimorfismo</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>HT</b>	<b>%</b>	<b>HM</b>	<b>%</b>	<b>Total</b>
<b>E4_A166G</b>	9	75,00	2	16,67	1	8,33	12
<b>IN5_449</b>	11	91,67	1	8,33	0	0,0	12
<b>IN5_461</b>	7	58,34	5	41,66	0	0,0	12
<b>IN5_490</b>	10	83,34	2	16,66	0	0,0	12
<b>IN5_591</b>	8	66,67	4	33,33	0	0,0	12
<b>IN5_695</b>	6	50,00	6	50,00	0	0,0	12
<b>IN6_27</b>	9	75,00	3	25,00	0	0,0	12

Das alterações nucleotídicas investigadas no grupo C, nos *exons* 4, 5 e 6 foram encontrados com maior frequência: *íntrons* 5- IN5\_461 em heterozigose 41,66% e IN5\_695 em heterozigose 50,00%.

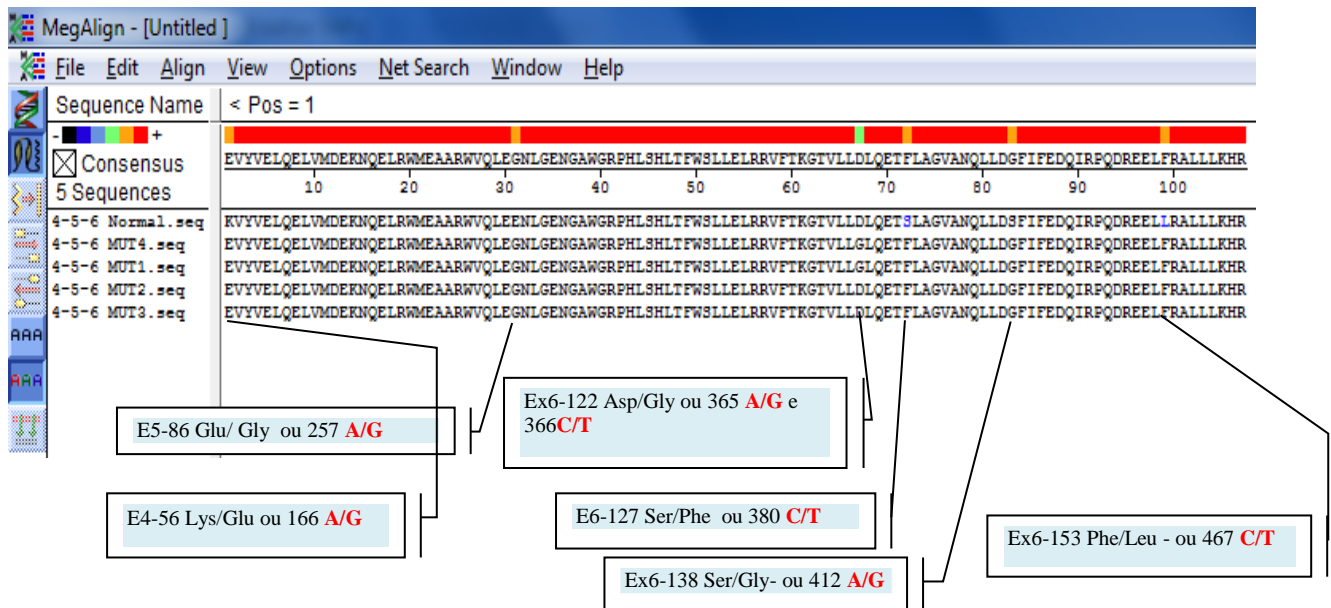
**Tabela 9.** Frequência dos polimorfismos encontrados nos *exons* 4, 5, e 6 e nos *íntrons* 5, 6 e 7 no grupo D.

Polimorfismo	N	%	Grupo D				Total
			HT	%	HM	%	
E4_A166G	153	83,61	25	13,66	5	2,73	183
E5_C217T	174	95,09	9	4,91	0	0,0	183
E5_A257G	177	96,73	6	3,27	0	0,0	183
E6_C366T	165	90,17	18	9,83	0	0,0	183
E6_C367T	182	99,46	1	0,54	0	0,0	183
E6_C380T	179	97,82	3	1,63	1	0,54	183
E6_G405A	181	98,91	2	1,09	0	0,0	183
E6_A412G	178	97,27	5	2,73	0	0,0	183
E6_A426G	169	92,35	14	7,75	0	0,0	183
E6_A450G	182	99,46	1	0,54	0	0,0	183
E6_G453A	180	98,37	3	1,63	0	0,0	183
E6_C457A	182	99,46	1	0,54	0	0,0	183
E6_G459T	161	87,88	22	12,02	0	0,0	183
E6_C460T	176	96,18	7	3,82	0	0,0	183
E6_C467T	182	99,45	1	0,54	0	0,0	183
E6_G474A	176	96,18	7	3,82	0	0,0	183
E6_C475T	179	97,82	4	2,18	0	0,0	183
E6_A482G	182	99,46	1	0,54	0	0,0	183
IN5_60	182	99,46	1	0,54	0	0,0	183
IN5_410	182	99,46	1	0,54	0	0,0	183
IN5_449	179	97,82	4	2,18	0	0,0	183
IN5_461	156	85,25	26	14,20	1	0,54	183
IN5_490	176	96,18	7	3,82	0	0,0	183
IN5_591	159	86,89	23	12,57	1	0,54	183
IN5_695	144	78,69	38	20,77	1	0,54	183
IN6_10	181	98,91	2	1,09	0	0,0	183
IN6_27	156	85,25	25	13,66	2	1,09	183
IN6_29	182	99,46	1	0,54	0	0,0	183
IN6_31	178	97,27	5	2,73	0	0,0	183
IN6_35	182	99,46	1	0,54	0	0,0	183
IN6_47	179	97,82	4	2,18	0	0,0	183
IN7_6	181	98,91	2	1,09	0	0,0	183
IN7_7	180	98,37	3	1,63	0	0,0	183
IN7_36	182	99,46	1	0,54	0	0,0	183
IN7_42	181	98,91	2	1,09	0	0,0	183
IN7_46	182	99,46	1	0,54	0	0,0	183
IN7_50	182	99,46	1	0,54	0	0,0	183
IN7_59	181	98,91	2	1,09	0	0,0	183

Das alterações nucleotídicas investigadas no grupo D, nos *exons* 4, 5 e 6 foram encontrados com maior frequência: *exon* 4 - A166G em heterozigose 13,66% e homozigose 2,73%







**Figura 12.** Variação de 6 mudanças de aminoácido na proteína.

Variação de 6 mudanças de aminoácidos demonstrada na figura acima onde está descrita a numeração de identificação das alterações nucleotídicas.

## 5.2 Análises Estatísticas

Em todos os polimorfismos encontrados nos grupos formados neste estudo foram realizadas as análises estatísticas ( *Chi Square* e *Odds ratio* ).

Dos polimorfismos analisados, os que tiveram resultados relevantes foram: *exon 6*. 426A/G e 459G/T, *intron 5*. IN5\_449 e IN5\_695 (Tabela 10, Tabela 11, Tabela 12 e Tabela 13)

**Tabela 10.** Correlação entre o SNP no *exon 6*-426A/G em paciente com e sem anemia.

	426A/G			P-Value
Exposição	Mutação	Sem Mutação	Total	
Anemia	2	194	196	0,004
Sem Anemia	14	181	195	
<b>Total</b>	16	375	391	
<b>LI</b>	<b>Odds</b>	<b>LS</b>		
0,02	0,13	0,63		



**Tabela 12.** - Correlação entre o SNP no *íntron 5* - IN5\_449 em paciente com e sem anemia.

IN5_449				P-Value
Exposição	Mutação	Sem Mutação	Total	
Anemia	22	174	196	0,001
Sem Anemia	5	190	195	
<b>Total</b>	27	364	391	
<b>LI</b>	<b>Odds</b>	<b>LS</b>		
1,68	4,80	14,82		

O polimorfismo no *íntron 5* - IN5\_449 demonstrou fator de risco (P = 0,001) para anemia com OD= 4,80.

**Tabela 13.** Correlação entre o SNP no *íntron 5* - IN5\_695 em paciente com e sem anemia.

IN5_695				P-Value
Exposição	Mutação	Sem Mutação	Total	
Anemia	66	130	196	0,027
Sem Anemia	45	150	195	
<b>Total</b>	111	280	391	
<b>LI</b>	<b>Odds</b>	<b>LS</b>		
1,06	1,69	2,71		

O polimorfismo no *íntron 5* - E6\_695 demonstrou fator de risco (P = 0,027) para anemia com OD= 1,69

### 5.3 Sequenciamento do *Exon 19*

Das 302 amostras utilizadas para o estudo do *exon 19*, três indivíduos do Grupo A. apresentaram o polimorfismo: G>A na posição 2587. (**Tabela 14**).

**Tabela 14.** Polimorfismo no *exon* 19- 2587G/A no *exon* 19 evidenciados em 3 amostras do Grupo A.

Grupo A.	G2587A	
	N	%
111	2 heterozigoses	1,80

As amostras dos grupos apresentaram uma distribuição genotípica variada em relação aos genótipos *DI A/DI A*, *DI A/DI B* e *DI B/DI B*, correlacionada com o alelo *166 A/G* (Banda 3- Memphis) variando a genotipagem de 19,82% para o grupo A, de 3,53% para o grupo B, de 8,33% e para grupo C de 4,25% para o grupo D para o genótipo *DI A/DI B* e o genótipo *DI A/DI A* com 0,90% para o grupo A e 0,0% para o grupo B, C e D (.tabela 15.).

**Tabela 15.** Frequência genotípica do sistema eritrocitário do sistema Diego correlacionado com o alelo A166G (Banda 3 - Memphis)

Grupo	Alelos	166A n(%)	166A/G n (%)	166G n (%)	Total n(%)
<b>A</b> n= 111	<i>DI*A/DI*A</i>	1 (0,90)	0	0	1(0,90)
	<i>DI*A/DI*B</i>	6 (5,40)	14 (12,62)	2(1,80)	22(19,82)
	<i>DI*B/DI*B</i>	74 (66,66)	11( 9,91)	3(2,71)	88(79,28)
<b>B</b> n= 85	<i>DI*A/D*A</i>	0	0	0	0
	<i>DI*A/DI*B</i>	1(1,17)	2(2,36)	0	3(3,53)
	<i>DI*B/DI*B</i>	69(81,17)	13(15,30)	0	82(96,47)
<b>C</b> n= 12	<i>DI*A/DI*A</i>	0	0	0	0
	<i>DI*A/DI*B</i>	1(8,33)	0	0	1(8,33)
	<i>DI*B/DI*B</i>	8(66,66)	2(16,67)	1(8,33)	11(91,67)
<b>D</b> n= 94	<i>DI*A/DI*A</i>	0	0	0	0
	<i>DI*A/D*B</i>	4(4,25)	0	0	4(4,25)
	<i>DI*B/D*B</i>	75(79,79)	12(12,77)	3(3,19)	90(95,75)
<b>Total</b>		239(79,13)	54(17,88)	9(2,98)	302

## 6. DISCUSSÃO

### Frequência dos polimorfismos

Os resultados encontrados neste estudo são de grande relevância pelo fato de se tratar de dados inéditos para Amazonas e ainda pela grande maioria dos polimorfismos encontrados neste estudo, não estarem descritos na literatura pesquisada. Este estudo relata as alterações nucleotídicas sequenciadas no gene *SLC4A1*, nos *exons* 4, 5, 6 e *íntrons* 5, 6 e 7 em quatro grupos distintos: sendo o único realizado até o presente momento.

Das 391 amostras sequenciadas para *exons* 4, 5, 6 e os *íntrons* 5, 6 e 7, foram encontrados 41 polimorfismos, sendo que três estão presentes em todos os grupos previamente formados e designados como A, B, C e D. No *íntron* 5 foram encontrados SNPs nas posições 591 e 695 com três homozigoses apresentadas nos grupos A e B, ao passo que no *íntron* 6, foram encontradas alterações na posição 27 apresentando-se como três homozigoses nos grupos A, B e C.

No grupo A, formado por 111 pacientes anêmicos com alteração de membrana eritrocitária, foram encontrados a maior parte das alterações nucleotídicas detectados também nos outros quatro grupos estudados, como demonstrados na tabela 6. No entanto, destaca-se neste grupo, os SNPs nas posições 45 e 490 do *íntron* 5, além de uma deleção na base nitrogenada (C-citosina) na posição 163, neste mesmo *íntron*, o SNP, sendo que estas alterações nucleotídica não foram encontradas na literatura pesquisada.

As alterações nucleotídicas em *íntrons*, podem interferir no processo de *splicing* que consiste na retirada dos *íntrons* de um RNA precursor, de forma a produzir um mRNA maduro funcional. Essa excisão dos *íntrons* do mRNA é um evento muito importante e requer uma extrema precisão das enzimas envolvidas no processo. A falta ou o acréscimo de um único nucleotídeo em um *exon* pode levar a uma alteração da fase de leitura e a produção de uma proteína.

No entanto deve-se notar ainda que formas de algumas doenças, como a talassemia, podem ser causadas pela mutação em regiões intrônicas, nesse caso a mutação criou um novo local de corte para o *íntron*, produzindo um sinal de parada precoce da proteína, completamente diferente da original.

No grupo B, formado por pacientes com anemia sem alteração de membrana com 85 amostras coletadas, foram observadas nove alterações nucleotídicas conforme a tabela 7, mostrando que não houve correlação das alterações nucleotídicas encontradas no grupo em

questão, devido os SNPs estarem presente na maior parte dos grupos estudados.

No grupo C, formado por pacientes sem anemia com alteração de membrana com 12 amostras coletadas, foram estudadas sete alterações nucleotídicas, conforme a tabela 8, mostrando também que não houve correlação das alterações nucleotídicas encontradas no grupo em questão, devido os polimorfismos estarem presente na maior parte dos grupos estudados.

No grupo D, formados por pacientes saudáveis e doadores de sangue foi o que mais apresentou alterações nucleotídicas, com exceção do SNP no *íntron 5*, na posição 45 conforme a tabela 9, mostrando também alterações nucleotídicas que são característicos desse grupo, e o caso dos polimorfismos encontrados no *íntron 6*, na posição 10 e no *íntron 7*, nas posições 42 e 46.

Esses resultados demonstram que possivelmente pode estar ocorrendo uma barreira de proteção à anemia, formado pelas alterações nucleotídicas encontradas, mas só sendo constatada estatisticamente em alguns casos polimórficos descritos nesse estudo, provavelmente esse fato pode estar relacionado com o a quantidade de amostral definida nesse estudo que provavelmente não foi suficiente para demonstrar essa teoria.

Em nosso estudo analisamos por sequenciamento os *exon 4, 5, 6* e os *íntrons 5, 6 e 7* mais de 40 alterações nucleotídicas e até o presente momento não encontramos nenhuma descrição na literatura dos polimorfismos aqui encontrados com exceção do *166A/G* localizado no *exon 4* que expressa a Banda 3-Memphis.

Assim sendo, consideramos o número de polimorfismos encontrados bastante elevados e o motivo para várias alterações, pode ser que código genético é degenerado, devido uma trinca originar um aminoácido, porem um aminoácido pode ser derivado de mais de uma trinca, como exemplo temos a leucina que é traduzida por varias trincas nucleotídicas como: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA e CUG, assim acontecem às combinações entre os nucleotídeos para todos os aminoácidos traduzidos.

### **Modificação na Proteína Banda 3**

Conseguimos alinhar através do programa ( *MegAlign (DNASTAR Lasergene 8.0 - Madison, Wisconsin-USA e BLAST)* as sequências dos *exons 4, 5 e 6*, demonstrando mais 15 variações de sequências nucleotídicas que foram estudadas e descritas, dentre elas apenas seis causam alteração na tradução do aminoácidos incluindo o *166 A/G* no *exon 4* (Banda 3-Memphis), ou seja, cinco alterações nucleotídicas estudadas causam modificação na estrutura

da proteína banda 3 na membrana eritrocitária, assim as alterações nucleotídicas descritas são do tipo (*missense*).

As variações nucleotídicas encontradas que causam modificação na tradução dos aminoácidos que formam a proteína banda 3 são:

*Exon 4-* posição 166 A- Adenina modificado para uma base nitrogenada G – guanina induzindo a mudança do aminoácido lisina ( Lys) na posição 56 para um ácido glutâmico (Glu), que expressa a Banda 3-Memphis.

*Exon 5-* posição 257 A – Adenina modificado para uma base nitrogenada G – guanina induzindo a mudança do aminoácido ácido glutâmico (Glu) na posição 86 para uma glicina (Gly).

*Exon 6-* posição 365 A — Adenina modificado para uma base nitrogenada G – guanina, induzindo a mudança do aminoácido ácido aspártico (Asp) na posição 122 para uma glicina ( Gly).

*Exon 6-* posição 366 C – Citosina modificado para uma base nitrogenada T – timina, induzindo a mudança do aminoácido ácido aspártico (Asp) na posição 122 para uma glicina ( Gly).

*Exon 6-* posição 380 C – Citosina modificado para uma base nitrogenada T – timina, induzindo a mudança do aminoácido serina (Ser) na posição 127 para uma fenilalanina ( Phe).

*Exon 6-* posição 412 A Adenina modificado para uma base nitrogenada G – guanina, induzindo a mudança do aminoácido serina (Ser) na posição 138 para uma glicina ( Gly).

*Exon 6-* posição 457 C – Citosina modificado para uma base nitrogenada T – timina, induzindo a mudança do aminoácido leucina (Leu) na posição 153 para uma fenilalanina ( Phe).

As alterações nucleotídicas que causam alteração na sequência de aminoácidos alterando a proteína são consideradas mecanismo que permite a ação da seleção natural, já que insere a variação genética sobre a qual ela irá agir fornecendo as novas características vantajosas ou não para o indivíduo.

Entretanto nem todas as mutações *missense* levar a mudanças de proteína apreciáveis. Um aminoácido pode ser substituído por um aminoácido de propriedades químicas muito semelhantes, em cujo caso, a proteína pode ainda funcionar normalmente. Alternativamente, a substituição de aminoácidos pode ocorrer em uma região da proteína que não afete significativamente a estrutura secundária da proteína ou função.

Nas alterações nucleotídicas do *exon 6* – na posição *365A/G* e *366C/T* ocorrem na mesma trinca nucleotídica que traduz o mesmo aminoácido, levando a mudança da aspergina por uma glicina na mesma posição 22 do aminoácido.

No entanto a maioria das alterações nucleotídicas encontradas nos *exons 5* e *6* são silenciosas não alterando a sequência de aminoácido que forma a proteína, sendo os polimorfismos descritos abaixo:

*Exon 5- posição 217 C- citosina modificada para uma base nitrogenada T – timina*

*Exon 6- posição 367 C- citosina modificada para uma base nitrogenada T – timina*

*Exon 6- posição 405 G- guanina modificada para uma base nitrogenada A – adenina*

*Exon 6- posição 426 A- adenina modificada para uma base nitrogenada G – guanina*

*Exon 6- posição 450 A- adenina modificado para uma base nitrogenada G – guanina*

*Exon 6- posição 453 G- guanina modificada para uma base nitrogenada A – adenina*

*Exon 6- posição 467 C- citosina modificada para uma base nitrogenada A – adenina*

*Exon 6- posição 459 G- guanina modificada para uma base nitrogenada T – timina*

*Exon 6- posição 460 C- citosina modificada para uma base nitrogenada T – timina*

*Exon 6- posição 474 G- guanina modificada para uma base nitrogenada A – adenina*

*Exon 6- posição 475 C- citosina modificada para uma base nitrogenada T – timina*

*Exon 6- posição 482 A- guanina modificada para uma base nitrogenada G – guanina*

As alterações nucleotídicas cujos efeitos não influenciam a aptidão dos indivíduos podem se acumular ao longo do tempo devido à deriva genética. Acredita-se que a imensa maioria das mutações encontradas neste estudo não tem efeito significativo na aptidão dos indivíduos. Além disso, mecanismos de reparo de DNA são capazes de corrigir a maior parte das mudanças antes que elas se tornem mutações permanentes.

No grupo A, constituído por pacientes anêmicos e com alteração de membrana eritrocitária foi encontrado um polimorfismo que acarreta modificação de aminoácido na proteína: *exon 5- 257A/G* em heterozigose ( 0,90%,).

No grupo D, formados pacientes sem anemia e sem alteração de membrana eritrocitária e doadores de sangue, foram encontrados frequências de todos os polimorfismos (*missense*): *exon 5- 257A/G* em heterozigose (3,27%), *exon 6- 365A/G* em heterozigose (9,83%), *380C/T* em heterozigose (1,63%) e homozigose (0,54%), *412A/G* em heterozigose (2,73%) e o *457C/T* em heterozigose (0,54%).

A força da associação é usualmente calculada pelo Qui-quadrado e Odds ratio



(odds), que indica quão mais frequente a anemia ocorre em indivíduos portadores de uma alteração nucleotídica em relação aos indivíduos que não apresentam. Nos casos em que o (odds), é maior do que 1, a frequência do da alteração nucleotídica nos pacientes com anemia é maior do que nos pacientes sem anemia, indicando que o polimorfismo está associado com susceptibilidade à doença. Quando o (odds) é menor do que 1, tem significado inverso, isto é, o marcador está associado com proteção contra o desenvolvimento da doença.

Dos polimorfismos analisado que tiveram resultados relevantes foram: *exon 6* na posição *426A/G* e *459G/T*, *intron 5*. posição 449 e posição 695.

A alteração nucleotídicas que ocorre na posição *426A/G* no *exon 6*, apresentou uma possível associação com o fator de proteção à anemia ( $P = 0,004$  e odds= 0,13), estando significativamente presente na proporção de 7,75% dos pacientes do grupo D formado por indivíduos saudáveis.

A alteração nucleotídicas que ocorre na posição *429G/T* no *exon 6*, apresentou uma possível associação com o fator de proteção à anemia ( $P = 0,0005$  e odds= 0,16), estando presente na proporção de 3,60% dos pacientes do grupo D, formado por indivíduos saudáveis.

A alteração nucleotídicas que ocorre na posição 449 no *intron 5*, apresentou uma possível associação com o fator de risco da anemia ( $P = 0,0005$  e odds= 4,80), estando significativamente presente na proporção de 11,77% dos pacientes do grupo B e 9,90% no grupo A.

A alteração nucleotídicas que ocorre na posição 695 no *intron 5*, apresentou uma possível associação com o fator de proteção da anemia ( $P = 0,027$  e odds= 1,69), estando significativamente presente na proporção de 25,89% dos pacientes do grupo B e 33,33% no grupo A.

Assim, os resultados acima descritos demonstram estatisticamente que as alterações nucleotídicas estão possivelmente associadas tanto com o fator de proteção á anemia e com o fator de risco a anemia, não podendo provar cientificamente essa questão, precisando de mais tempo e tecnologia.

### ***Exon 18 e 19***

Das 391 amostras coletadas, 302 foram utilizadas para estudo do *exon 18*, não encontrando nenhum polimorfismo associado, porem nas 302 amostras utilizadas para o estudo do *exon 19*, dois indivíduos do Grupo A apresentaram polimorfismos descritos na

literatura: G>A na posição 2587 do gene o qual determina a troca de valina por uma isoleucina na posição 862. Este polimorfismo, ocorre na porção transmembranar da proteína da banda 3, portanto, não pode ser considerada potencial sítio antigênico.

### **Frequência do Sistema Diego**

Em um indivíduo do grupo A, foi observado o polimorfismo, C>T na posição 2.561 do gene, responsável pela expressão do antígeno Dia (Pro854Leu). Em todas as demais amostras em que o alelo *DI\*A* esteve ausente o alelo *DI\*B* esteve presente. Nenhum outro polimorfismo foi encontrado neste *exon*.

Este estudo teve como um dos objetivos específico determinar a incidência do alelo *DI\*A/DI\*B* em 4 grupos distintos.

Foram encontradas no grupo A, formado por 111 pacientes com anemia e com alteração de membrana eritrocitária evidenciada a frequências do genótipo *DI\*A/DI\*A*- de 0,90%, a frequência do genótipo *DI\*A/DI\*B* com 19,82% e a frequência genótipo *DI\*B/DI\*B* com 79,28%.

No grupo B formado por 85 pacientes anêmicos sem alteração de membrana foi encontrado a frequência do genótipo *DI\*A/DI\*B* com 3,53% e do genótipo *DI\*B/DI\*B* com 96,47%.

No grupo C formado por 12 pacientes sem anemia com alteração de membrana eritrocitária a frequência do genótipo *DI\*A/DI\*B* foi de- 8,33% e do genótipo *DI\*B/DI\*B*- foi de 91,67%.

No grupo D formado por 94 pacientes normais e doadores de sangue a frequência do genótipo *DI\*A/DI\*B* foi de 4,25% e a frequência do genótipo *DI\*B/DI\*B* foi de 95,75%.

Nos 302 pacientes previamente estudados tivemos uma frequência alélica de *DI\*A* de 5,30% e *DI\*B* de 94,70%.

).

### **A incidência do alelo $DI^*A$**

Encontramos uma porcentagem genotípica ( $DI^*A/DI^*B$ ) de 9,93% nas 302 amostras de pacientes e doadores de sangue. Incidência alta, cerca de duas vezes maior, quando comparado com estudo prévio onde a porcentagem foi de 3,2%. (BALEOTTI, 2002). A incidência de 9,93 do alelo  $DI^*A$  em doadores de sangue no nosso estudo também foi superior que o encontrado por Baleotti, já que em ambos os relatos o genótipo  $DI^*A/DI^*A$ , nessa população, não foi encontrado.

Em nossos estudos encontramos também a frequência de 10,59% do genótipo  $DI^*A$  corroborando com os dados obtidos em estudos realizados por nossa equipe de pesquisa no Homecentro do Amazonas que constatou frequência semelhante em doadores de sangue .

Em relação a ancestralidade da etnia indígena, sua representatividade na população de Manaus foi alta quando comparada às demais áreas onde sua prevalência é sabidamente baixa (regiões do Sudeste e Sul.).

Não existem dados disponíveis da região de Manaus- AM quanto à distribuição populacional por etnia, mas se considerarmos os dados referentes ao Estado do Amazonas, encontramos uma importante participação destas etnias na constituição da nossa população o que justificaria a alta porcentagem do alelo  $DI^*A$  em pacientes e doadores de sangue.

Devido à alta prevalência do alelo  $DI^*A$  na população de doadores de sangue, é importante lembrar a possibilidade de ocorrência o genótipo  $DI^*A/DI^*A$  na nossa população, tornando-se necessária a pesquisa do alelo  $DI^*B$  em pacientes politransfundidos que apresentem anticorpo contra antígeno de alta incidência.

### **Correlação entre o as alelos $DI^*A$ e $DI^*B$ com a Banda 3-Memphis**

Na correlação dos resultados dos alelos  $DI^*A$  e  $DI^*B$  e o polimorfismo da Banda Memphis mostrados na tabela 15, pode-se observa que nas 302 amostras com 604 alelos estudados, 572 eram  $DI^*B$  dos quais apenas 16(2,8%) estavam ligados à mutação  $166G$  (Banda 3-Memphis).

Em nossas amostras apenas no grupo B, formadas por pacientes anêmicos sem alteração de membrana, não foi encontrado nenhum alelo  $DI^*B$  correlacionado com  $166G$  (Banda 3-Memphis), sendo encontrado o alelo  $DI^*B$ , associado com  $166G$  nos grupos A, C e D previamente formados neste estudo, consistente com os resultados Spring et al e Black et al.

Quanto ao alelo *DI\*A*, que o esperado é estar associado à mutação *I66G*, encontramos 14(43,75%) associado a *I66A*, caracterizando o novo alelo *DI\*A* encontrado por Balleoti e colaboradores em indígenas na região amazônica, apesar de que nossos indivíduos não serem indígenas.

Em nosso estudo constatamos a existência de um paciente com o genótipo *DI\*A DI\*A* correlacionada com o *I66A* (Banda 3 normal).

A evidencia dessa nova variante em nossos estudos, confirma a discursão de Baleotti e colaboradores, 2003 sugerindo a existência do alelo *DI\*A* associada *I66A* que caracteriza a banda 3 normal e em parte corrobora com Lesley J.,1994 que afirma à associação do alelo *DI\*A* com o polimorfismo *I66G* ( Banda 3-Memphis), associação também encontrada em pacientes aqui estudado.

As análises de sequenciamento dessas amostras foram devidamente repetidas e confirmadas a interpretação de homozigose *I66A* e a alteração nucleotídicas para a homozigose *256IT DI\*A*, mesmo as amostras em heterozigose *DI\*A DI\*B*, que o esperado é estarem associadas a uma heterozigose *I66A/G*, estavam a maioria associadas com *I66A*.

## 7. CONCLUSÕES

1. *Exons* 4, 5, 6 e os *íntrons* 5, 6 e 7 do gene *SLC4A1*, são muito polimórficos, devido a alta frequência de alterações nucleotídicas encontradas neste estudo.
2. A alta frequência de alterações nucleotídicas encontradas é justificada, devido o código genético é degenerado sendo que uma trinca nucleotídica origina um aminoácido, porem um aminoácido pode ser derivado de mais de uma trinca nucleotídica.
3. Das alterações nucleotídicas encontradas, seis são polimorfismos que alteram a sequência de aminoácido que forma a proteína banda 3.
4. Das alterações nucleotídicas encontradas, estatisticamente, duas estão possivelmente associadas com o fator de proteção à anemia.
5. 6 polimorfismos encontrados no *exon* 6, não descritos na literatura pesquisada que alteram a sequência de aminoácido da proteína banda 3 e um polimorfismo encontrado no *exon* 19 já descrito na literatura.
6. Das alterações nucleotídicas encontradas, estatisticamente, duas estão possivelmente associadas com o fator de risco da anemia.
7. Nos 302 pacientes previamente estudados tivemos uma frequência alélica de *DI\*A* de 5,30% e *DI\*B* de 94,70%.
8. Constatação de uma nova variante *DI\*A* correlacionada no *exon* 4 posição 166A.

## REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

BALEOTTI, W. Estudo molecular dos alelos DI A/ DI B e da banda 3-Memphis na população brasileira. 2002. 83 (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, 2002.

BALEOTTI, W. et al. A novel DI\*A allele without the band 3-Memphis mutation in Amazonian indians. **Vox Sang.**, vol. 84, p. 326-30, 2003.

BENNETT, V. Proteins involved in membrane-cytoskeleton association in human erythrocytes: spectrin, ankyrin, and band 3. **Methods in Enzymology**, 96, 313-324, 1983.

BOOTH, P. B. et al. Selective depression of blood group antigens associated with hereditary ovalocytosis among Melanesians. **Vox Sanguinis** 32: 99, 1977.

BLACK FL, SALZANO FM, LAYRISSE Z, FRANCO MH, HARRIS NS, WEIMER :Restriction and persistence of polymorphisms of HLA and other blood genetic traits in the Parakanã Indians of Brazil. **Am J Phys Anthropol** 1980; 52:119-132

BRANTON, D., COHEN, C. M. AND TYLER, J (1981) **Cell** 24, 24-32

BRECHER, M. E. Technical Manual. 14th ed. Bethesda, Maryland, **American Association of Blood**, p.315-92, 2002.

BRECHER, M.E. Technical Manual. 14th ed. Bethesda, Maryland: **American Association of Blood**, p.315-92, 2002. Bruce, L.; Antsee, D.J.; Spring, F. A.& Tanner, M.J.A. Banda 3 Memphis variant. II. Altered stilbene disulfonate binding and the Diego (Di(a)) blood group antigen are associated with the human erythrocyte band 3 mutation prog854-to-leu. **J. Bio. Chem**, v.269, p.16155-16158, 1994

BRUCE, L.J.; ANSTEE, D.J.; SPRING, F.A.; TANNER, M.J.A.; Banda 3 Memphis Variant II, Altered Stilbene Disulfonate Binding and the Diego (Dia) Blood Group Antigen are Associated With the Human Erythrocyte Banda 3 Mutation Pro854-Leu\*. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 23, vol (269), p 16155-58, 1994.

BRUCE, L.J.; TANNER, M.J.A. Erythroid banda 3 variants and diseases. **Baillière's Best Prac Res Clin Haematol**, v.12, p.637-54, 1999.

BRUCE LJ, BECKMANN R, RIBEIRO ML, et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. **Blood**. 2003;101(10):4180-4188.

BRUCE, L. J. et al. Altered structure and anion transport properties of band 3 (AE1, SLC4A1) in human red cells lacking glycophorin A. **J. Biol. Chem**. 279: 2414-2420, 2004.

BRUCE, L. J. et al. Monovalent cation leaks in human red cells caused by single amino-acid substitutions in the transport domain of the band 3 chloride-bicarbonate exchanger, AE1. **Nature Genet**. 37: 1258-1263, 2005.

BRUCE LJ, GUIZOUARN H, BURTON NM, GABILLAT N, POOLE J, FLATT JF,

BRADY RL, BORGESSE F, DELAUNAY J, STEWART GW. The monovalent cation leak in overhydrated stomatocytic red blood cells results from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein. **Blood** 113: 1350–1357, 2009.

COHEN, C. M., DOTIMAS, E. AND KORSGEN, C. (1993) **Semin. Hematol.** 30, 119±137

COOPER, G. M. The cell surface In: The cell: A molecular approach. **Washington: ASM Press**, p.467-517, 1997.

DANIELS, G. Functional aspects of red cell antigens. **Blood Review**, v.13, p.14-35, 1999.

DACIE, J.V. and S.M. LEWIS, 1984. **Practical Hematology.** Churchill Livingstone, New York, USA., pp: 202-453.

EBER, S.; LUX, S.E. Hereditary spherocytosis—defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. **Seminars in Hematology**, 41, 118–141, 2004.

GALLAGHER, P. G.; LUX, S. E. Disorders of the erythrocyte membrane. In: Hematology of Infancy and Children. **Mosby Elsevier- Saunders, Philadelphia, PA.** (ed. by D. Nathan, S.H. Orkin & F.A. Oski), pp. 560–684, 2003.

GALLAGHER, P. G.; JAROLIM, S. Red cell membrane disorders. In: Hematology, Basis Principles and Practice. **WB Saunders, Philadelphia, PA**, 4th edn. (ed. by R. Hoffman, E.J. Benz Jr, S.J. Shattil, B. Furie, H.J. Cohen, L.E. Silverstein & P. McGlave), pp. 669–691, 2005.

GLADER, B. E.; LUKENS, J. N. Hereditary spherocytosis and other anemias due to abnormalities of the red cell membrane. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10<sup>th</sup> ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, chap. 41, p. 1132-59, 1999.

GHANEM, A., POLTHIER, B., MARESHAL, J., DUCLUZEAU, M. T., MORLE, L., ALLOISIO, N., FEO, C., BEN ABDELADHIM, A., FATTOUM, S. AND DELAUNAY, J. (1990) **Br. J. Haematol.** 75,414–420

INABA M, YAWATA A, KOSHINO I, et al. Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation. **J Clin Invest.** 1996;97(8):1804-1817.

JAROLIM, P. Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 88, 11022–11026, 1991.

JAROLIM, P. et al. Band 3 Memphis: A widespread polymorphism with abnormal electrophoretic mobility of the erythrocyte band 3 protein caused by substitution AAG-GAG (Lys-Glu) in codon 56. **Blood**, n. 6, vol. 80, p. 1592-598, September, 1992.

JAROLIM, P. et al. Characterization of seven low incidence blood group carried by erythrocyte band 3 protein. **Blood**, 92:4836-43, 1998.

LANGDON, R. G., HOLMAN, V. P. Immunological evidence that band 3 is the major

glucose transporter of the human erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 945: 23-32, 1988.

KAY, M. M. B. et al. Definition of a physiologic aging autoantigen by using synthetic peptides of membrane protein band 3: localization of the active antigenic sites. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 5734-5738, 1990.

KAY, M.M. Generation of senescent cell antigen on old cells initiates IgG binding to a neoantigen. *Cell Mol. Biol.*, vol (39), p. 131-153, 1993.

KNOWLES, D.W., CHASIS, J.A., EVANS, E.A. e MOHANDAS, N. (1994) Cooperative action between band 3 and glycophorin A in human erythrocytes: immobilization of band 3 induced by antibodies to glycophorin A. *Biophysical Journal*, 66, 1726–1732.

KOMATS, F. et al. Prevalence of diego blood group Di<sup>a</sup> antigen in Mongolians: comparison with that in Japanese. *Transfus Apher Sci*, 30(2):119-24, 2004.

KUSNIERZ- ALEJSKA G.; BOCHENEK, S. Haemolytic disease of the newborn due to anti-Di (a) and incidence of the Di (a) antigen in Poland. *Vox Sang*, v.62, p.124-126, 1992.

LAYRISSE, M.; ARENDS, T.; DOMINGUEZ-SISCO, R. Nuevo grupo sanguíneo encontrado en descendientes de índios. *Acta Med. Venezolana*, v.3, p.132-138, 1955.

LEE, S. The value of analysis for antigens of the Kell and Kx blood group systems. *Transfusion*, 47(S):32-39, 2007

LEVINE, P. et al. The Diego blood factor, *Nature*, v.177, p. 40-41, 1956.

MOHANDAS, N., WINARDI, R., KNOWLES, D., LEUNG, A., PARRA, M., GEORGE, E., CONBOY, J. & CHASIS, J. (1992) Molecular basis for membrane rigidity of hereditary ovalocytosis. A novel mechanism involving the cytoplasmic domain of band 3. *Journal of Clinical Investigation*, 89,686–692.

MOHANDAS, N.; CHASIS, J. A. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Seminars in Hematology*, 30, 171–192, 1993.

MOHANDAS, N.; EVANS, E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 23, 787–818, 1994.

MOHANDAS, N.; REID, M. E. Erythrocyte structure. **In: Clinical Hematology (ed. by N.S. Young, S.L. Gerson & K.A. High), Mosby Elsevier, Philadelphia, pp. 34–42, 2006.**

MOLLISON, PL.; ENGELFRIET, CP.; CONTRERAS, M. Transfusion in Clinical Medicine. 10th ed. Oxford: **Blackwell Science**, p. 201-2, 1997.

NICOLAS, V. et al. Rh-RhAG/ankyrin-R, anew interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 25526–25533, 2003.



PARK, T. P. S. et al. The clinical significance of antibody screening test including Di (a) panel cell in Asian-Mongoloid populations. **J Korean Med Sci**, 18:72-669, 2003.

PENG, C.S. et al. Hemolytic disease of the newborn due to anti-Di (a): report of one case. **Zhonghua Min Guo Xiao Er ke Yi Xue Hui Za Zhi**, v.37(5), p.370-2, 1996.

PETERS LL, SHIVDASANI RA, LIU SC, et al. Anion exchanger 1 (band 3) is required to prevent erythrocyte membrane surface loss but not to form the membrane skeleton. **Cell**. 1996;86(6):917-927.

POOLE, J. The Diego Blood Group System- an Update. **Immunohematology**, n. 4, vol (15), p. 135-143, 1999.

REID, M.E. e MOHANDAS, N. (2004) Red blood cell blood group antigens: structure and function. **Seminars in Hematology**, 41, 93–117.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, J. Y. et al. Analysis of the SLC4A1 gene in three Mexican patients with hereditary spherocytosis: Report of a novel mutation, **Genetics and Molecular Biology**, 33, 1, 9-11, 2010.

SANGER, F.; NICKLEN S.; COULSO; A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74: 5463-5467, 1977.

SCHOFIELD AE, MARTIN PG, SPILLET D, TANNER MJA. The structure of the human red blood cell anion exchanger (EPB3, AE1, Band 3) gene. **Blood** 1994;84:2000–12.

SOUTHGATE, C.D. et al. Targeted disruption of the murine erythroid banda 3 gene results in spherocytosis and severe haemolytic anaemia despite a normal membrane skeleton. **Nature Genet**, v.14, p.227-30, 1996.

SCHOFIELD, A. E. et al. Basis of unique red cell membrane properties in hereditary ovalocytosis, **Journal of Molecular Biology**, 223, 949–958, 1992.

SPRING, F.A. et al. A Red Cell Band 3 Variant with Altered Stilbene Disulphonate Binding is associated with the Diego (Dia) blood group antigen. **Biochem. J.** vol (288), p. 713-716, 1992.

WAJCMAN, H.; LANTZ, B.; GIROT, R. Les Maladies du globule rouge. Paris: Les editions INSERM. **Médecine-Sciences Flammarion**. cap. 3, p.31-44, 1984.

WALENSKY, L.; NARLA, M E LUX, S. EDisorders of the red blood cell membrane. In: **Blood, Principles and Practice of Hematology**, 2nd edn. (ed. by R.I. Handin, S.E. Lux e T.P. Stossel), pp. 1726–1744. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2003.

X. G. Xu, J. He, Y. M. He, S. D. Tao, Y. L. Ying, F. M. Zhu, H. J. Lv & L. X. Yan. Distribution of Diego blood group alleles and identification of four novel mutations on exon 19 of SLC4A1 gene in the Chinese Han population by polymerase chain reaction

sequence-based typing. **Vox Sanguinis**. 100, 317–321, 2011.

XIULI, A.N.; MOHANDAS, N. Disorders of red cell membrane Red Cell Physiology Laboratory, **Journal of Haematology**, 141, 367–375 First published online 13 March, 2008.

YANNOUKAKOS, D. et al. Human erythrocyte band 3 polymorfism (Band 3 Memphis): characterization of the structural modification (Lys 56 – Glu) by Protein Chemistry Methods. **Blood**, n. 4, vol (78), p 1117-1120, August, 1991.

YAWATA, Y. (1994) **Biochim. Biophys. Acta** 1204, 131±148

YAWATA, A., SUGIHARA, T. AND YAMADA, O. (1994) **Int. J. Hematol.** 60, 23–38

ZARKOWSKY, H.S.; MOHANDAS, N.; SPEAKER, C. B e SHOHET, S. B. A congenital haemolytic anaemia with thermal sensitivity of the erythrocyte membrane. **British Journal Haematology**, 29, 537– 543, 1975.

ZELINSKI, T.; COGHAN, G.; WHITE E PHILIPPS, S. The Diego blood group locus is located on chromosome 17q. **Genomics**, v.17, p. 665-666, 1993.

ZELINSKI, T.; McMANUS, K.; PUNTER, F.; MOULDS, M.; COGHLAN, G. A Gly565 - Ala substitution in human erythroid band 3 accounts for the Wu blood group polimorfism. **Transfusion**, vol (38), p. 745-748, August, 1998.

ZWIETEN, V. R. et al. V.Hereditary spherocytosis due to Band 3 deficiency: 15 novel mutations in SLC4A1, **American Journal of Hematology**, 17 November, 2012.

**APENDICE A - Parecer consubstanciado do CEP**

**APENDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)****Hemocentro do Amazonas -HEMOAM****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Estudo:** Associação do polimorfismo do gene SLC4A1 com alterações de membrana eritrocitária em pacientes hematológicos do Hemocentro do Amazonas, Brasil.

**INFORMAÇÕES PARA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA NESSE ESTUDO.**

Este estudo tem como objetivo tipar grupos sanguíneos importantes para transfusão sanguínea em doadores de sangue e pacientes hematológicos do HEMOAM. Caso você aceite participar como voluntário, necessitaremos de suas informações pessoais (nome, idade, data, local de nascimento, etc), assim como sua autorização para realizarmos tipagem sanguínea a partir do sangue que será colhido através da veia do braço que é a mesma usada para a doação de sangue. Os exames serão realizados no laboratório de tipagem sanguínea do HEMOAM. Sua participação neste estudo é voluntária, sendo estes participantes doadores áptos nas triagens clínica, hematológica e sorológica, pacientes hematológicos do HEMOAM. O procedimento da coleta do sangue será realizado por um profissional treinado, utilizando agulhas, bolsa de sangue e tubos descartáveis o que reduzirá o risco de alguma contaminação durante o processo de coleta, sendo o único desconforto a penetração da agulha na veia do braço durante o procedimento da coleta de sangue. O voluntário tem o direito de conversar com o pesquisador, Doutor Sérgio Roberto Lopes Albuquerque, diariamente nos períodos da manhã e da tarde no HEMOAM situado à Avenida Constantino Nery, nº 4.397, Chapada, esquina com a Avenida Pedro Teixeira ou pelo telefone 3655-0129, em qualquer fase do estudo, para pedir qualquer tipo de esclarecimento, ou se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética deste estudo. É garantida ao voluntário a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento, deixando assim de participar do estudo sem qualquer prejuízo ao mesmo. Neste estudo, o esperado é que não haja perdas ou danos físico ou moral por parte dos participantes, porém havendo tais ocorrências, estas devem ser comunicadas imediatamente ao pesquisador principal que deverá avaliar e tomar as devidas providências se for assim necessário. Os participantes não terão suas identidades divulgadas durante o período de execução do estudo, assim como em publicações posteriores. Os participantes deste estudo não terão nenhuma despesa ou compensação financeira, ou algum benefício adicional, por participar deste trabalho, mas estará contribuindo para o conhecimento científico. Ainda assim, se houver algum prejuízo financeiro, o pesquisador responsável poderá ressarcir-lo.

**A PARTICIPAÇÃO É VOLUNTÁRIA. ISTO QUER DIZER QUE O PACIENTE TEM TODO O DIREITO DE NÃO PARTICIPAR OU SE RETIRAR DO ESTUDO, EM QUALQUER FASE DA PESQUISA,** e isto não trará nenhum prejuízo, e que terá garantido o seu tratamento, conforme a rotina do serviço local se necessário. A

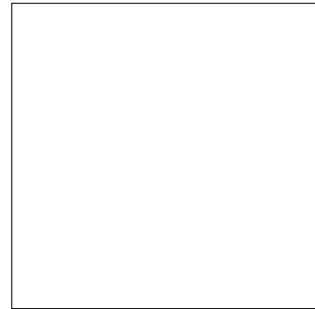
pessoa que aceitar participar da pesquisa guarda uma cópia deste documento que será assinado duas vezes, das quais uma cópia ficará com o pesquisador e a outra com o paciente.

Eu,..... recebi a explicação de que serei um(a) dos (as) participantes dessa pesquisa. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome. E por estar devidamente informado (a) e esclarecido (a) sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expressei meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

Manaus, ..... /..... /.....

.....

Assinatura do paciente ou representante legal ou  
Impressão do polegar direito do paciente,  
caso este não saiba escrever seu nome.



**PESQUISADOR:** .....

**TESTEMUNHA:**.....

**APENDICE C- Questionário Epidemiológico****FICHA DE DADOS DO PARTICIPANTE****A – Dados epidemiológicos**

Nº \_\_\_\_\_

1.Nome: \_\_\_\_\_

2. Idade: \_\_\_\_\_

2.1 Gênero: 1( )M 2( )F

2.2. Cor da pele

\_\_\_\_\_

2.3 Ascendência \_\_\_\_\_

3. Endereço: \_\_\_\_\_

4.Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

5. Medicamentos, quimioterapia, raio x: ( ) SIM ( ) NÃO

\_\_\_\_\_

6. Diagnóstico:

\_\_\_\_\_

Hemoglobina \_\_\_\_\_ Hematócrito \_\_\_\_\_

Alteração de membrana

eritrocitária: \_\_\_\_\_

Polimorfismo do gene

SLC4A1 \_\_\_\_\_

Obs: \_\_\_\_\_

