



Paulo Roberto Moura Lima

**ALTERAÇÕES MOLECULARES NO GENE DA BANDA 3 (AEI) NA
ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA E A PARTICIPAÇÃO DA ISOFORMA
RENAL NO EQUILÍBRIO ÁCIDO-BÁSICO**

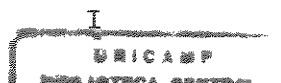
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Paulo Roberto Moura Lima</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.
<i>3/108/2000</i>

Guadalupe

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para a obtenção do Título de Doutor em
Biologia Funcional e Molecular na área
de BIOQUÍMICA.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Orientadora: Profa Dra Sara Teresinha Olalla Saad



200018843

UNIDADE	3C
N.º CHAMADA:	TIUNICAMP
	L628a
V.	Ex.
TOMBO BC/	43189
PROC.	16-278100
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13/12/00
N.º CPD.	

CM-00153992-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Lima, Paulo Roberto Moura

L628a

Alterações moleculares no gene da banda 3 (*AEI*) na esferocitose hereditária e a participação da isoforma renal no equilíbrio ácido-básico/Paulo Roberto Moura Lima. - - Campinas, SP. [s.n.],

2000.

162f. illus.

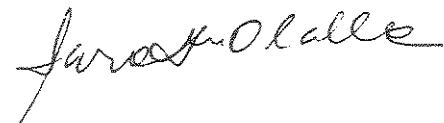
Orientadora: Sara Teresinha Olalla Saad

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Membranas. 2. Anemia. 3. Acidose. I. Saad, Sara Teresinha Olalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

Campinas, 31 de agosto de agosto

Banca Examinadora

Profª. Dra. SARA TERESINHA OLLALA SAAD (Orientadora) 

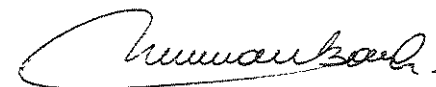
Profª. Dra. MARIA STTELA FIGUEIREDO 

Prof. Dr. JOSÉ BUTORI LOPES DE FARIA 

Prof. Dr. PAULO AUGUSTO ACHUCARRO SILVEIRA

Prof. Dr. JOSÉ ANTÔNIO ROCHA CONTIJO 

Profª. Dra. JOYCE MARIA ANNICHINO-BIZZACCHI

Profª. Dra. MIRIAM APARECIDA BOIM 



**Para as minhas filhas Esther e Alice, que em meu lugar,
continuarão deixando suas marcas pela TERRA...**

Para minha esposa Simone que me tornou mais completo...

**Para os meus pais Ana e João que na simplicidade
nos criaram, e possibilitaram tudo isso...**

À todos os pacientes e controles, por terem doado o material mais valioso desta tese,
À Dra. Nelci F. Hoehr, por ter guiado meus primeiros passos na UNICAMP,
À Teresa S. I. Sales, pela orientação na bancada e grande amizade,
A meu irmão Sergio, pela ajuda nos cálculos do efluxo de sulfato,
Ao Dr. José B. Lopes de Faria, pelo Na^+/Li^+ e ao Dr. José A. R. Gontijo, pela avaliação da capacidade de acidificação tubular distal,
À Dra. Vera M.S. Belangero, pela casuística de acidose renal tubular distal, e por cuidar das crianças,
Ao Marcelo A. Morgano (ITAL) pelas dosagens de lítio no espectrofotômetro de emissão atômica em plasma de argônio,
À Dilmara L. Vicentim, pela quantificação das proteínas da membrana eritrocitária,
Ao Dr. Hani Hassoun (St. Elizabeth's Medical Center), pela orientação no exterior, e à Mohini e Sabine pela ajuda na bancada,
À Raquel, pelas revisões do inglês nos artigos publicados, e pela amizade,
Às amigas da comunicação social Sandra e Rosana, por todo capricho nas apresentações de slides e formatação da tese,
Ao Sr. Gerino, pelos xerox de última hora,
Ao amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Hemocentro: Dr. Fernando F. Costa, Daniela, Edna, Natasha, Simone Gilli, Adriana, Heloísa, Tais (Tutti), Luciana, Roberta, Alexandra, Simone Celestino, Mônica, Maria Helena, Teresa (médica), Angela Assis, Arno, Elaine, Marcelo, Rodrigo, Damião, Patrícia, Carlos, Jordana, Elizabeth, Manoela, Ártemis, Maria Paula, Vagner, Fernando Lopes, pelas contribuições, amizade e cafezinhos,
Aos membros da banca examinadora, pela revisão da tese,

Às minhas tias Clarice (*em memória*), Lourdes e Antônia, por todo carinho,

À Sarita, por orientar este trabalho com entusiasmo,

À FAPESP e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

Lista de abreviaturas.....	XI
Lista de tabelas e figuras.....	XIII
Resumo	XV
Summary	XVII
Introdução	19
Objetivos.....	35
Casuística.....	39
Materiais e Métodos	47
Resultados.....	63
Discussão.....	81
Conclusões	89
 Fosfolípide scramblase e a possível relação com a banda 3 eritrocitária	 93
Introdução	95
Objetivo.....	99
Materiais e Métodos.....	101
Resultados	107
Discussão e Conclusões	113
 Referências Bibliográficas.....	 117
Apêndice I- Trabalhos publicados	
A) Banda 3 ^{Campinas}	139
B) Banda 3 ^{Pinhal}	149
Apêndice II- Resumos apresentados em congressos	151

- AD:** domínio de ativação da transcrição
- AE:** família de genes de trocadores de ânions “anion exchanger”
- AEI:** gene que codifica as isoformas eritróide e renal da banda 3
- AF:** antecedentes familiares
- AP:** antecedentes pessoais
- B3:** banda 3
- cDNA:** DNA complementar ao mRNA
- creat:** creatinina
- CT Na⁺/Li⁺:** contratransporte de sódio e lítio
- DNA:** ácido desoxiribonucléico
- DNA-BD:** domínio de ligação ao DNA
- DIDS:** ácido di-isotiociano-diidrostilbene disulfônico
- DTT:** ditionitrito
- EDTA:** ácido etilenodiaminotetraacético
- EPB3:** proteína banda 3 do eritrócito
- EsH:** esferocitose hereditária
- FA:** fosfatase alcalina
- FC:** frequência cardíaca
- FEB:** fração de excreção de bicarbonato
- FR:** frequência respiratória
- G3PDH:** gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- Hb:** hemoglobina
- IRC:** insuficiência renal crônica

MCV: volume corpuscular médio

mRNA: RNA mensageiro

ND: não determinado

Nt: nucleotídeo

P: fosfato

PA: pressão arterial

PCR: reação em cadeia da polimerase “polymerase chain reaction”

pHu: pH urinário

PL: fosfolípide

PMSF: fluoreto fenilmetilsulfônico

PS: fosfatidilserina

RN: recém nascido

RNA: ácido ribonucleico

Scr: “scramblase”

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Sp: espectrina

SSCP: análise de polimorfismo de conformação em fita simples “single strand conformation polymorphysm”

Ttm: tratamento

U: uréia

VO: via oral

Tabela 1- Mutações no gene da banda 3 associadas a esferocitose hereditária	
a) Domínio citoplasmático	28
b) Domínio transmembrana.....	29
Tabela 2- Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com EsH e dos familiares	42
Tabela 3- Dados clínicos dos pacientes com acidose	44
Tabela 4- Caracterização laboratorial da acidose.....	45
Tabela 5- Iniciadores utilizados para amplificar a banda 3	54
Tabela 6- Mutações caracterizadas.....	65
Tabela 7- Efluxo de sulfato X pH.....	74
Tabela 8- Efluxo de sulfato X DIDS	74
Tabela 9- Efluxo de sulfato DIDS-sensível em hemácias deficientes de banda 3	75
Tabela 10- Contra-transporte de sódio e lítio.....	75
 Figura 1- A membrana da hemácia.....	 22
Figura 2- A célula α-intercalada.....	31
Figura 3- A estrutura do gene da banda 3 humana.....	32
Figura 4- Padrão normal do SSCP	65
Figura 5- Banda 3^{Montefiore}	66
Figura 6- Estudo familiar da Banda 3^{Montefiore}	67
Figura 7- Detecção da Banda 3^{Campinas} em pacientes com esferocitose hereditária.....	68
Figura 8- Subclonagem e sequenciamento do cDNA.....	69
Figura 9- Polimorfismo Leu 441→Leu.....	70

Figura 10- Pedigree da família portadora da Banda 3 ^{Campinas}	70
Figura 11- Polimorfismo Leu 417→Leu	71
Figura 12- Banda 3 ^{Pinhal}	72
Figura 13- Pedigree da família com a mutação Arg490→His	73
Figura 14- Teste de acidificação urinária distal	76
Figura 15- Mutação na região promotora da isoforma renal da banda 3.....	78
Figura 16- Polimorfismo no intron 3 da banda 3	79
Figura 17- Polimorfismo ASP 38→ALA (Darmstad)	79
Figura 18- Possível promotor renal da banda 3	88
Figura 19-Preparação da isca para o ensaio duplo-híbrido.....	103
Figura 20- PCR de cDNA de cérebro humano	107
Figura 21- Subclonagem da PCR no vetor pCR2.1 em <i>E. coli</i>	107
Figura 22- Isolamento da scramblase, extração e comprovação po digestão.....	108
Figura 23- Subclonagem da scramblase no vetor do ensaio duplo-híbrido	108
Figura 24- Mutação no codon 273 da scramblase	108
Figura 25- PCR de cDNA de baço, testículos e cérebro	109
Figura 26- Subclonagem das PCRs no vetor pCR2.1 em <i>E. coli</i>	109
Figura 27- Isolamento e transferência da scramblase de cérebro	110
Figura 28- Mutação no codon 27 da scramblase	110
Figura 29- Transferência da scramblase (baço) para o vetor pGBKT7.....	111

A esferocitose é um tipo comum de anemia hemolítica hereditária cujo primeiro defeito molecular foi caracterizado em 1992. A proteína banda 3, codificada pelo gene *AE1*, foi a primeira isoforma clonada de uma família de genes de trocadores de ânions "*Anion Exchanger-AE gene family*" e é a mais abundante das proteínas integrais da membrana eritrocitária. Alterações moleculares neste polipeptídeo estão associadas à formação de esferócitos. Hemácias esferocíticas são osmoticamente frágeis, estando mais sujeitas à lise e ao sequestro pelo baço, o que encurta seu tempo de vida. A proteína banda 3 também é expressa nos rins, na membrana basolateral de células alfa intercaladas do tubo coletor cortical, onde é responsável pela reabsorção de bicarbonato, compensando a secreção de ácidos pela H^+ ATPase vacuolar apical, e participando da regulação fina do equilíbrio ácido-básico. Tanto a banda 3 eritrocitária como a renal são isoformas de um mesmo gene que através de um promotor tecido específico, diferem quanto à transcrição. O mRNA da banda 3 renal não apresenta os três primeiros exons observados na forma eritróide. O presente estudo teve o objetivo de investigar as alterações moleculares e regulação do gene da banda 3 na esferocitose hereditária em 5 pacientes com deficiência de banda 3, e investigar possíveis alterações neste gene em cinco pacientes com acidose renal tubular distal. Este estudo foi baseado no rastreamento de mutações e polimorfismos no gene mencionado, incluindo a região promotora, que também pode estar envolvida na fisiopatologia da doença. Para detecção das alterações moleculares foram utilizadas as técnicas de PCR, análise de polimorfismo de conformação em fita simples, subclonagem e sequenciamento. O estudo do cDNA foi realizado após a transcrição reversa do mRNA extraído de reticulócitos por RT-PCR. Outro objetivo foi investigar as alterações renais de pacientes com esferocitose hereditária e deficiência de banda 3, uma vez que esta proteína também é expressa nos rins. Os estudos renais foram realizados através da avaliação da capacidade de acidificação tubular distal e obtenção de medidas de bicarbonatúria, pH urinário, acidez titulável e excreção de amônia no período basal e após estímulo com furosemida. Também foi avaliado o contratransporte de sódio e lítio em hemácias de pacientes com esferocitose hereditária, uma vez que esta é uma medida indireta do contra-transporte Na^+/H^+ , envolvido na regulação do pH intracelular do eritrócito e na homeostase ácido-básica do organismo, por secretar ácido e reabsorver Na^+ em epitélio renal.

Nossos resultados caracterizaram duas novas mutações no gene *AE1*. O estudo da Banda 3 ^{Campinas}, uma mutação no sítio doador de clivagem no intron 8, demonstrou a perda de bicarbonato pela urina dos pacientes afetados e um aumento na atividade de contra-transporte de sódio e lítio nas hemácias. A Banda 3 ^{Pinhal}, uma substituição de um resíduo de arginina altamente conservado, por histidina no domínio transmembrana, é a segunda mutação afetando o codon 490 da banda 3, e pode ser um “hot spot” para mutações no gene *AE1*. As hemácias destes pacientes apresentaram menor número de sítios para o inibidor DIDS. Outra mutação caracterizada foi a Banda 3 ^{Montefiore}, previamente descrita. O estudo dos pacientes com acidose renal tubular distal revelou uma nova mutação na região promotora renal em um paciente com acidose renal tubular distal incompleta, que pode estar associada com o defeito na reabsorção de bicarbonato pelos rins. O estudo da acidose também caracterizou um novo polimorfismo no intron 3, a deleção da adenina 1233, com frequência alélica de 0,34 em 120 cromossomos analisados. Um conflito de sequência (quatro guaninas no lugar de três nt. 1272-1274) também foi verificado em todos indivíduos estudados. O polimorfismo Asp38→Ala (Darmstad) foi encontrado em uma paciente com acidose, mas parece não estar relacionado com a doença. Finalmente concluímos que mutações no gene da banda 3 podem estar associadas com a esferocitose hereditária e com a acidose renal tubular distal incompleta, pois isoformas da proteína são expressas nas hemácias e nas células α -intercaladas. Sugerimos que em casos onde há perda de ânions pelos rins, mecanismos de compensação podem estar ativados, como o aumento da atividade excretora de prótons pela Na^+/H^+ , ou pela H^+ -ATPase vacuolar apical.

A fim de realizar estudos de interações protéicas, foi subclonado o domínio citoplasmático completo da fosfolípide scramblase dos seguintes tecidos humanos: cérebro, testículos e baço. A sequência do cDNA da enzima scramblase usada no ensaio duplo-híbrido resultou no fenômeno de auto-ativação, que é uma razão comum da falha do rastreamento pelo método duplo-híbrido.

Hereditary spherocytosis is a common type of hemolytic anemia. The first molecular defect in the band 3 gene associated with spherocytosis was characterized in 1992. Band 3, codified by the *AE1* gene, was the first isoform to be cloned of a family of genes of anion exchangers (Anion Exchanger-AE gene family) and is the most abundant of the integral proteins of the erythrocyte membrane. The molecular alterations in this polypeptide are associated to spherocyte formation. Spherocytic red cells have osmotic fragility, and are more liable to undergo lysis and splenic sequestration, which decreases their life span. Band 3 protein is also expressed in the kidney, in the basolateral membrane of the cortical collecting duct intercalated alpha cells, where it is responsible for the bicarbonate reabsorption, compensating the acid secretion at apical membrane by the H^+ ATPase vacuolar, and taking part in the fine regulation of the acid-base equilibrium. Both erythrocyte and renal band 3 are isoforms of the same gene, which differ in transcription due to a tissue-specific promoter. The first three exons are not present in the erythroid form of renal band 3 mRNA. The aim of this study was to investigate the molecular alterations and gene regulation, of band 3 in hereditary spherocytosis in 5 families with band 3 deficiency. This study was based on the screening of mutations and polymorphisms of the gene formerly mentioned, including the promoter region, which might be involved in the pathophysiology of the disease. In order to detect the molecular alterations, PCR technique, single strand conformation polymorphism analysis, subcloning and sequencing were used. The cDNA study was performed after the reverse transcription of the mRNA extracted from the reticulocytes using RT-PCR. Another aim was to investigate the renal alterations of patients with hereditary spherocytosis and band 3 deficiency, as this protein is also expressed in the kidneys. Renal studies were performed using urinary acidification tests and measures of bicarbonate, urinary pH, acid titration and ammonia excretion during the basal period and after furosemide stimulation. The sodium/lithium countertransport activity in the red blood cells of patients with hereditary spherocytosis was also assessed, as it is an indirect measure of the Na^+/H^+ countertransport, which is involved in the intracellular pH regulation of the erythrocyte and in the acid-base homeostasis of the organism, secreting acid and reabsorbing Na^+ in the renal epithelium.

Our results characterized two novel mutations in the *AE1* gene. The study of Band 3^{Campinas}, a mutation at the splice donor site in the intron 8, revealed a bicarbonate loss by the urine from patients and an increase in the sodium/lithium countertransport activity of their red blood cells. The Band 3^{Pinhal} is a highly conserved arginine to histidine substitution in the transmembrane domain. This is the second mutation affecting the codon 490 of band 3, and could represent a hot spot for mutations in the *AE1* gene. The red blood cells of these patients showed a reduced number of sites for DIDS, the band 3 anion exchange inhibitor. Another mutation found was the Band 3^{Montefiore}, previously described. The study of the patient's tubular acidosis revealed a new mutation neighboring the kidney promoter in a child presenting incomplete distal renal tubular acidosis, which might be associated with the kidney bicarbonate reabsorption defect. The acidosis study also characterized a novel polymorphism in intron 3, the adenine 1233 deletion, with an allele frequency of 0.34 in the 120 chromosomes analyzed. A sequence conflict (four guanines in the place of three nt.1272-1274) was also verified in all subjects studied. The polymorphism Asp38→Ala (Darmstad) was found in one patient with acidosis, but was not related with the disease. Finally, we concluded that mutations in the band 3 gene may be associated with hereditary spherocytosis and with incomplete distal renal tubular acidosis, as the band 3 isoforms are expressed in the red cells and in the renal α -intercalated cells. We suggest that the proton excretion mechanisms, as the Na^+/H^+ exchanger or the vacuolar H^+ -ATPase, might be activated to compensate the basal bicarbonate loss by the kidney.

In order to perform protein interaction studies, we have subcloned the entire cytoplasmic domain including part of the transmembrane segment of phospholipid scramblase from the following human cDNA tissues: brain, testis and spleen. The cDNA sequence of phospholipid scramblase used in the two-hybrids system caused auto-activation, a common reason for failure of two-hybrid screens.

INTRODUÇÃO

A membrana plasmática do eritrócito

A membrana plasmática de eucariontes é composta predominantemente por duas classes de fosfolípidos: fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina são derivados de aminoácidos e se dispõem essencialmente na camada voltada para o interior da célula, e a fosfatidilcolina e esfingomiéline, derivados da colina, estão mais presentes na camada voltada para o meio extracelular (ZWAAL & SCHROIT, 1997). Esta localização seletiva torna as biomembranas assimétricas e este estado é estabelecido e mantido por mecanismos que controlam o movimento dos fosfolípidos através da bicamada lipídica, também chamado “flip-flop”.

As proteínas presentes nas membranas ditam o quanto estas são especializadas, sendo que à medida que aumenta a quantidade de proteínas em relação aos lípidos, as membranas tornam-se mais especializadas, devido às proteínas exercerem funções biológicas.

Entre as membranas plasmáticas ou celulares, uma das mais estudadas é a da célula vermelha sanguínea (eritrócito, hemácia ou glóbulo vermelho) que transporta oxigênio dos pulmões para os tecidos, e retorna dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões. O eritrócito de mamíferos não tem núcleo nem membranas internas e portanto, é uma “bolsa” que contém essencialmente hemoglobina e relativamente poucas outras proteínas intracelulares. Geralmente a célula adota a forma de um disco bicôncavo com 7 μm de diâmetro que é muito flexível, podendo passar por capilares com diâmetros muito menores (DARNELL e col, 1995).

Em 1971, todas as proteínas da membrana da hemácia foram separadas e analisadas num sistema de eletroforese em gel com gradiente de poliacrilamida, descrito por FAIRBANKS, STECK e WALLACH.

Nas décadas de 1970 e 1980 as proteínas de membrana foram caracterizadas bioquimicamente, e na última década, com a difusão das técnicas de biologia molecular, a maioria delas teve seus genes clonados.

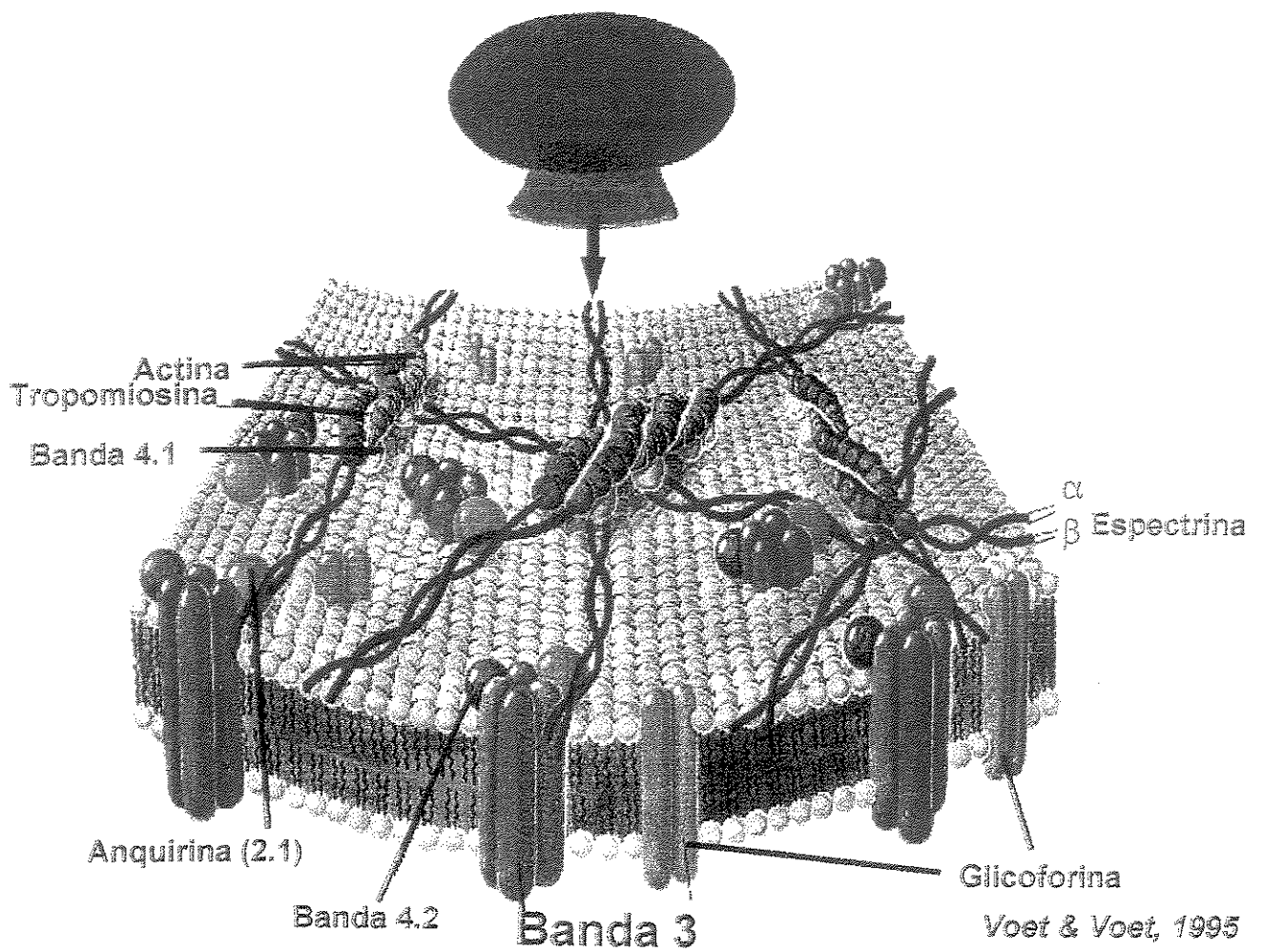


Figura 1- A membrana da hemácia: a proteína banda 3, através de ligações com a anquirina e outras proteínas da membrana, ancora o citoesqueleto na bicamada lipídica.

A proteína banda 3

O transporte de CO_2 ocorre dissolvido no plasma e no interior do eritrócito ligado à hemoglobina, na forma de carboxihemoglobina, ou convertido pela enzima anidrase carbônica a ácido carbônico (H_2CO_3), que por sua vez se dissocia em íons H^+ e bicarbonato (HCO_3^-). Aproximadamente 1/3 do transporte de CO_2 ocorre na forma de bicarbonato que é trocado pelo ânion cloreto (Cl^-) através da isoforma eritrocitária da proteína banda 3 da família de genes de trocadores de ânions (Anion Exchanger -*AE1*) (TANNER, 1993).

A proteína banda 3 do eritrócito (*EPB3*), assim chamada por ser a terceira proteína a migrar no gel de Fairbanks, é a principal glicoproteína integral da membrana, totalizando de 25 a 30% da massa protéica da membrana purificada (LOW, 1986; JAY & CANTLEY, 1986; TANNER, 1993).

A banda 3 possui 911 aminoácidos e consiste de um domínio citosólico N-terminal de 43 kDa e um domínio transmembrana C-terminal de 52 kDa, que atravessa a membrana até 14 vezes (JAY & CANTLEY, 1986; TANNER, 1993; POPOV, LI & REITHMEIER, 1999).

O domínio citoplasmático possui sítios de ligação para várias proteínas, algumas citoplasmáticas e outras associadas à membrana. Estas proteínas incluem (1) catalase, (2) hemoglobina, (3) enzimas glicolíticas (G3PDH, aldolase e fosfofrutoquinase) cuja atividade é modulada através da fosforilação do aminoácido tirosina 8, (4) hemicromos que são produzidos pela oxidação e denaturação da hemoglobina, (5) anquirina cuja ligação com a banda 3 ancora o citoesqueleto na bicamada lipídica, e (6) proteína 4.2 e proteína 4.1 cujas associações com o domínio citoplasmático da banda 3 têm implicações na estabilidade da membrana do eritrócito (LOW, 1986; RYBICKI, MUSTO & SCHWARTZ, 1995; HASSOUN e col., 1998).

O domínio transmembrana é capaz de mediar a troca de ânions, permitindo o efluxo de bicarbonato da célula na troca pelo cloreto (JENNINGS, 1992). Participa na regulação de pH e volume intracelulares (HOFFMANN, 1986; JENNINGS, 1992; WANG e col., 1994; FIÉVET e col., 1995), e pode ser canal de água e uréia (TOON & SOLOMON, 1994). Este domínio também possui

aminoácidos capazes de gerar antígenos de senescência celular (KAY, 1984; GIGER e col., 1995).

A banda 3 apresenta cerca de $1,2 \times 10^6$ cópias por célula (FAIRBANKS, STECK & WALLACH, 1971). O gene da banda 3 (Anion Exchanger -*AE1*, *SLC4A1*, *EPB3*) está localizado no cromossomo 17q21-qter, e possui 20 exons e 19 introns (SCHOFIELD e col., 1994; SAHR e col., 1994; N° de Acesso ao GenBank: X77738).

Mutações em proteínas da membrana eritrocitária têm sido associadas a várias alterações morfológicas, entre elas a esferocitose hereditária, que decorre de alterações nas interações entre as proteínas da membrana (IOLASCON e col., 1998).

A família de genes de trocadores de ânions $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

A banda 3 pertence a uma família de trocadores de ânions presentes em membranas plasmáticas distribuídas em vários tecidos de mamíferos (KOPITO, 1990 & ALPER, 1991). O trocador de ânions tipo I ou *AE1* é expresso nas hemácias, rins (SCHOFIELD e col., 1994), e possivelmente no coração (RICHARDS e col., 1999). Nos rins, a banda 3 está presente na membrana basolateral das células α -intercaladas do tubo coletor cortical onde participa da reabsorção de bicarbonato, compensando a secreção de H^+ na membrana apical (KOLLERT-JONS e col., 1993).

O trocador de ânions tipo 2 (*AE2*) teve seu cDNA clonado de rins humano por Gehrig e col, em 1992. Variantes do mRNA são expressas em todos os tecidos, sugerindo um papel basal "housekeeping" como a regulação do pH intracelular ou volume celular. Porém, em ratos, a super-expressão de isoformas truncadas em alguns tecidos indica que a proteína pode servir também para funções mais especializadas em células polarizadas (WANG, SCHULTHEIS & SHULL, 1996), e no órgão de Corti (NEGRINI, 1995).

O gene que codifica a isoforma *AE2* humana foi mapeado por hibridização "in situ" no cromossomo 7q35-7q36 (KOPITO, 1990). Nos rins de rato, o mRNA *AE2* está presente no córtex, medula interna e externa, compatível com o papel postulado da *AE2* na manutenção de pH intracelular e concentração de Cl^- e sua participação no transporte transepitelial (BROSIUS, 1995).

O gene *AE3* é expresso em cérebro e em coração (KOPITO e col., 1989). Em ratos, as duas isoformas também divergem na região N-terminal, sendo que a proteína cardíaca contém uma sequência N-terminal única de 73 aminoácidos que substitui os primeiros 270 aminoácidos da isoforma cerebral (LINN, KUDRYCKI & SHULL, 1992). O gene *AE3* de coração humano foi o último membro da família AE a ser clonado (YANNOUKAKOS e col., 1994).

A associação $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Na^+/H^+

A manutenção do pH intracelular pode ser considerada como o resultado da atividade de trocadores de cátions (Na^+/H^+) e trocadores de ânions ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) operando nas células (HOFFMANN, 1986). O contratransporte de sódio e lítio apresenta similaridade com o transportador Na^+/H^+ (MAHNENSMITH & ARONSON, 1985; SEMPLICINI e col., 1989), sendo utilizado como um método de avaliação indireta da troca sódio/hidrogênio (IVES, 1989), e estudado como marcador de predisposição à hipertensão essencial (CANESSA e col., 1980; MAHNENSMITH & ARONSON, 1985; IVES, 1989 e HUOT & ARONSON, 1991) e nefropatia diabética, principalmente em pacientes com mau controle glicêmico (KROLEWSKI e col., 1988; MANGILI e col., 1988; LOPES DE FARIA, 1992).

A banda 3 em diferentes espécies

A banda 3 isolada de rato (KOPITO & LODISH, 1985; KUDRYCKI E SCHULL, 1989), camundongo (KOPITO, ANDRESSON & LODISH, 1987), galinha (COX & LAZARIDES, 1988), e humano (TANNER, MARTIN & HIGH, 1988; LUX e col., 1989) apresenta 85 a 90% de homologia no domínio transmembrana, embora o domínio citoplasmático seja menos conservado.

Em resumo, a banda 3 é a proteína mais estudada entre os membros da família de trocadores de ânions, em consequência da sua rápida caracterização bioquímica (FAIRBANKS, STECK & WALLACH, 1971; JAY & CANTLEY, 1986; LOW, 1986) e determinação da sua sequência (KOPITO & LODISH, 1985).

A partir de 1992 começaram a ser caracterizadas mutações no gene *AE1* associadas a

esferocitose hereditária (tabela 1) e em 1996 outro grupo de mutações foi associada a acidose tubular distal renal familiar. Isto fez da banda 3 um excelente modelo de estudo da estrutura e função de proteínas de membrana (JAY, 1996).

Esferocitose hereditária (EsH)

Sob a denominação de esferocitose hereditária define-se um grande grupo de anemias hemolíticas caracterizadas pela forma esférica do eritrócito. A EsH foi descrita pela primeira vez por Minkowski em 1900 e Chauffard e colaboradores em 1907 e rapidamente foi identificada como uma doença com transmissão hereditária (PALEK & LAMBERT, 1990; LUX & PALEK, 1995 e DELAUNEY, 1995).

Gradualmente, várias linhas de evidência indicaram que o defeito primário estaria na membrana da hemácia. A frequência da EsH na população geral é estimada em 1/2000-1/5000 nascimentos, sendo mais frequente em caucasóides que em negróides. Além das manifestações típicas de hemólise, estes pacientes podem desenvolver ainda complicações como colelitíase, crises aplástica ou megaloblástica, úlceras de perna, hemopoese extramedular e sobrecarga de ferro (PALEK & LAMBERT, 1990; LUX & PALEK, 1995).

Vários graus de deficiência de espectrina são detectados na maioria dos pacientes com EsH (AGRE e col., 1986), mas o defeito molecular é heterogêneo e não envolve apenas a espectrina, mas também a anquirina, a banda 3 e a proteína 4.2. A análise da composição das proteínas de membrana através de SDS-PAGE evidencia, em cerca de 60 % das EsH, anormalidades bioquímicas que podem ser divididas em 4 categorias: 1) deficiência de banda 3; 2) deficiência combinada de espectrina e anquirina; 3) deficiência isolada de espectrina; 4) deficiência de proteína 4.2 (SAAD e col., 1994; LUX & PALEK, 1995 e DELAUNEY, 1995).

Defeitos moleculares da banda 3

A deficiência parcial da banda 3 têm sido descrita num subgrupo de pacientes com EsH de transmissão dominante (SAAD e col., 1991; LUX & PALEK, 1995; DELAUNEY, 1995), entretanto defeitos na banda 3 são 2 a 3 vezes menos frequentes do que no gene da anquirina. Até

recentemente, todas as mutações demonstravam fenótipo de pequena gravidade e herança dominante.

A primeira alteração molecular observada no gene da banda 3 foi um polimorfismo Lys 56 → Glu, denominado Banda 3^{Memphis} (MUELLER & MORRISON, 1977 e JAROLIM, RUBIN & ZHAI e col., 1992). Este polimorfismo também foi encontrado no primeiro defeito da banda 3 associado à EsH, descrito em 1992, a Banda 3^{Tuscaloosa}, Pro 327→Arg. Curiosamente, este defeito foi encontrado em um caso de deficiência de proteína 4.2, secundária à perda do sítio de ligação da proteína banda 3 anormal (JAROLIM, PALEK, RUBIN e col., 1992).

Mutações graves com criação de codons de terminação prematuros ou desvios de leitura podem ocorrer em qualquer região do gene, causando completa ausência da expressão da proteína mutante.

Em 1994, Jarolim e col., descreveram uma duplicação de 10 nucleotídeos (2.455-2.464), que produziu um C-terminal alterado na proteína que possivelmente não é inserida na membrana plasmática denominada Banda 3^{Prague}, em uma família com EsH autossômica dominante.

Em seguida, o mesmo grupo de estudo mostrou que mutações no domínio da membrana em argininas conservadas evolutivamente (Banda 3^{Hradec Kralove} R760→W, Banda 3^{Prague II} R760→Q, Banda 3^{Jablonec} R808→C, e Banda 3^{Prague III} R870→W), também estavam associadas ao fenótipo de EsH. Estes achados sugerem que estes aminoácidos são importantes para inserção da proteína na membrana ou para a manutenção da conformação da estrutura protéica (JAROLIM e col., 1995).

Foram ainda caracterizadas outras mutações tanto no domínio citoplasmático (tabela 1a) como no domínio transmembrana (tabela 1b).

Tabela 1a- Mutações no gene da banda 3 associadas a esferocitose hereditária

Domínio Citoplasmático

Banda 3	Posição	MUTAÇÃO	Referências
Banda 3 ^{Genas}	Exon 2	Nucleotídeo -89 G → A	Alloisio e col., 1996
Banda 3 ^{Montefiore}	Exon 4	Glu 40 → Lys	Rybicki e col., 1993
Banda 3 ^{Foggia}	Exon 4	Nt. 311 deleção de C (codon de terminação prematuro)	Miraglia del Giudice e col., 1997
Banda 3 ^{Bobain}	Exon 5	Nt. 355 deleção de T	Dhermy e col., 1997
Banda 3 ^{Hodonin}	Exon 5	Trp 81 → Stop codon	Jarolim e col., 1996
Banda 3 ^{Napoli I}	Exon 5	Nt.447 inserção de T (codon de terminação prematuro)	Miraglia del Giudice e col., 1997
Banda 3 ^{Fukuoka}	Exon 6	Gly 130 → Arg	Inoue e col., 1998
Banda 3 ^{Lyon}	Exon 6	Arg 150 → Stop codon	Alloisio e col., 1996
Banda 3 ^{Nachod}	Exon 6	Deleção dos codons 117-121	Jarolim e col., 1996
Banda 3 ^{Worcester}	Exon 7	Inserção de um G nos codons 170-172	Jarolim e col., 1996
Banda 3 ^{Campinas}	Intron 8	G+1 → T Deleção do exon 8	Lima e col., 1997
Banda 3 ^{Boston}	Exon 9	Ala 285 → Asp	Jarolim e col., 1996
Banda 3 ^{Princeton}	Exon 9	Inserção de um C nos codons 273-275	Jarolim e col., 1996
Banda 3 ^{Tuscaloosa}	Exon 10	Pro 327 → Arg	Jarolim e col., 1992
Banda 3 ^{Noirterre}	Exon 10	Gln 330 → Stop codon	Jenkins e col., 1996

Tabela 1b- Mutações no gene da banda 3 associadas a esferocitose hereditária

Domínio Transmembrana

Banda 3	Posição	MUTAÇÃO	Referências
Banda 3 ^{Pribram}	Intron 12	G+1 → A	Jarolim e col., 1996
Banda 3 ^{BicêtreII}	Exon 12	Nt. 1475 deleção de G	Dhermy e col., 1997
Banda 3 ^{Benesov}	Exon 12	Gly 455 → Glu	Jarolim e col., 1996
Banda 3 ^{Coimbra}	Exon 13	Val 488 → Met (GTG → ATG)	Alloisio e col., 1993
Banda 3 ^{Bicêtre I}	Exon 13	Arg 490 → Cys	Dhermy e col., 1997
Banda 3 ^{Pinhal}	Exon 13	Arg 490 → His	Lima e col., 1999
Banda 3 ^{Evry}	Exon 13	Nt. 1600 deleção de T	Dhermy e col., 1997
Banda 3 ^{Smichov}	Exon 15	Deleção no codon 616 ATC → AT	Jarolim e col., 1996
Banda 3 ^{Trutnov}	Exon 15	Tyr 628 → Stop codon	Jarolim e col., 1996
Banda 3 ^{Hobart}	Exon 16	Deleção de G dos codons 646-647	Jarolim e col., 1996
Banda 3 ^{Most}	Exon 17	Leu 707 → Pro	Jarolim e col., 1996
Banda 3 ^{Okinawa}	Exon 17	Gly 714 → Arg	Kanzaki e col., 1997
Banda 3 ^{Prague II}	Exon 17	Arg 760 → Q	Jarolim e col., 1995
B3 ^{Hradec Kralove}	Exon 17	Arg 760 → Trp	Jarolim e col., 1995
Banda 3 ^{Prague}	Exon 18	Duplicação Nt. 2455-2464	Jarolim e col., 1994
Banda 3 ^{Chur}	Exon 18	Gly 771 → Asp	Maillet e col., 1995
Banda 3 ^{Napoli II}	Exon 18	Ile 783 → Asn	Miraglia del Giudice e col., 1997
Banda 3 ^{Jablonec}	Exon 18	Arg 808 → Cys	Jarolim e col., 1995
B3 ^{Birmingham}	Exon 19	His 834 → Pro	Jarolim e col., 1996
B3 ^{Philadelphia}	Exon 19	Thr 837 → Met	Jarolim e col., 1996
Banda 3 ^{Tokyo}	Exon 19	Thr 837 → Ala	Iwase e col., 1998
Banda 3 ^{PragueIII}	Exon 19	Arg 870 → Trp	Jarolim e col., 1995

O quadro clínico e hematológico dos pacientes com EsH e deficiência de banda 3 é homogêneo porém, em algumas famílias, alguns indivíduos apresentam discreta piora das manifestações clínicas e deficiência de banda 3 mais pronunciada. Um exemplo é o polimorfismo na posição -89 (G→A) do sítio cap, na região 5 UT do gene da banda 3, que ocasiona menor expressão do alelo polimórfico. Este alelo, descoberto em 1996 por ALLOISIO e col., foi denominado Genas e se ocorrer em *trans* a uma mutação que determine EsH, leva à piora da expressão do defeito.

Até há pouco tempo postulava-se que mutações em homozigose no gene *AE1* seriam letais, no entanto, Inaba e colaboradores, em 1996, descreveram a deficiência total da proteína banda 3 em gado com esferocitose hereditária e acidose leve mas eficiente secreção de H^+ pelos rins. Entretanto, até o momento há poucos estudos de função renal em humanos com EsH e deficiência de banda 3 (JAROLIM e col, 1996; LIMA e col, 1997).

Recentemente, Ribeiro e colaboradores, em 1997, descreveram uma paciente homozigota para Banda 3^{Coimbra}. A criança, nascida em 1996, tem acidose tubular renal, esferocitose hereditária grave, mas está bem, recebendo transfusões regulares e bicarbonato de sódio diariamente.

Em 1998, Perrotta e colaboradores descreveram outra mutação em homozigose no segundo filho de um casal consanguíneo. Esta mutação, localizada na posição +2 do sítio doador de clivagem do intron 2, foi denominada Banda 3^{Neapolis} e produz anemia grave em homozigose. De acordo com a posição desta mutação, isto é, no intron 2, a acidificação urinária distal da criança era normal (PERROTTA e col., 1998). Estas observações confirmam que a homozigose para o tipo dominante de esferocitose hereditária associada com deficiência de banda 3 pode ser compatível com a vida.

A expressão clínica mais grave da doença está associada a substituições de aminoácidos conservados ou essenciais para a manutenção da conformação da estrutura protéica, a mutações em homozigose (RIBEIRO e col., 1997 e PERROTTA e col., 1998) ou à associação de mais de uma mutação em *trans* no mesmo gene (ALLOISIO e col., 1996; KANZAKI e col., 1997). Por outro lado, duas mutações em homozigose foram associadas à anemia hemolítica leve (RYBICKI e col., 1993 e INOUE e col., 1998). Ambas são substituições de ponto localizadas no domínio citoplasmático da banda 3 e parecem alterar a ligação da banda 3 com a proteína 4.2.

A isoforma renal da banda 3

Um interessante aspecto da banda 3 é a sua presença na membrana basolateral de células alfa intercaladas do tubo coletor cortical, conferindo a estas células a capacidade de reabsorver HCO_3^- , participando da regulação do volume celular e do ajuste fino do equilíbrio ácido-básico pelos rins (TANNER, 1996).

A Célula α intercalada

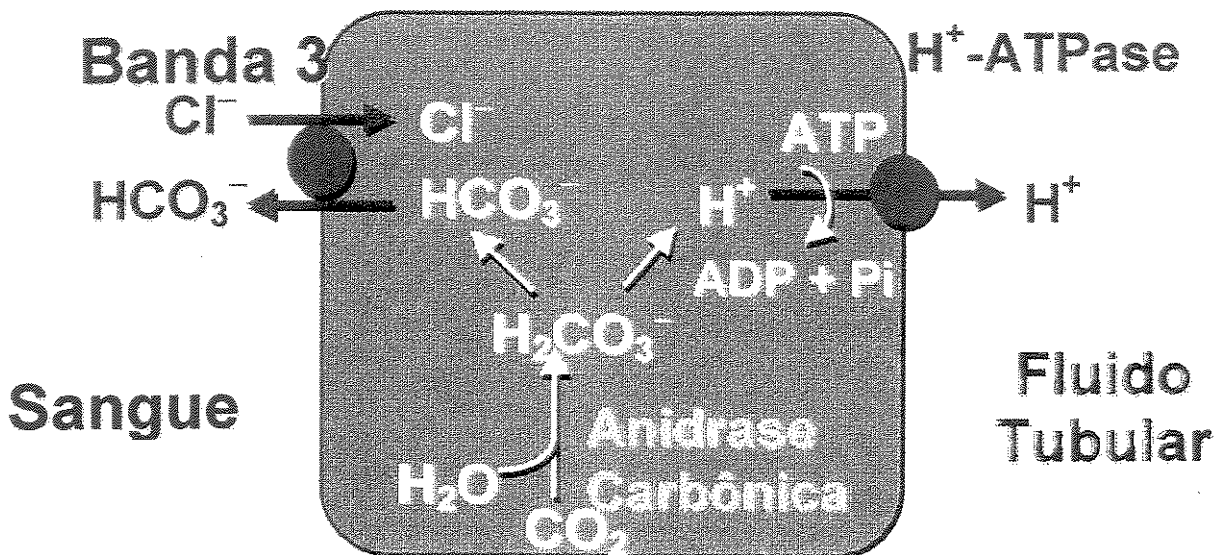


Figura 2- A Célula α -intercalada: a figura ilustra o papel fisiológico da proteína banda 3 na reabsorção do bicarbonato para o plasma, compensando a secreção de prótons para o fluido tubular. A proteína banda 3 e a H^+ -ATPase vacuolar apical participam do ajuste fino da homeostase ácido-básica.

A banda 3 nos rins difere da isoforma eritróide por ser truncada na região N-terminal, referente aos exons 1, 2 e 3. Atribui-se esta diferença à presença, no intron 3, de um potencial promotor alternativo que possivelmente atua nos rins (SAHR e col., 1994).

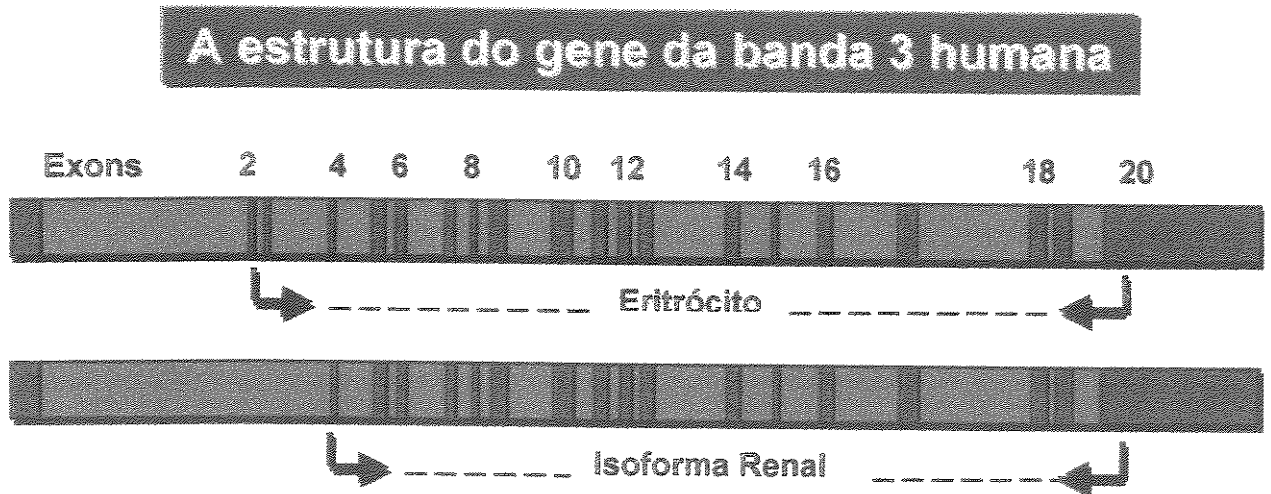


Figura 3- A estrutura do gene da banda 3: A banda 3 eritrocitária é constituída por 20 exons enquanto que a isoforma renal é truncada na região N-terminal devido à presença de um promotor tecido específico localizado no intron 3.

Outra diferença é que a isoforma renal da banda 3 não se liga à anquirina, em ensaios “in vitro” (DING, CASEY & KOPITO, 1995; WANG e col., 1995). Por outro lado, o domínio citoplasmático da isoforma renal se liga a “kanadaptin”, uma proteína provavelmente envolvida no direcionamento das vesículas contendo banda 3 para seu destino final, enquanto a isoforma eritróide não se liga a esta proteína (CHEN e col., 1998).

A sequência de DNA derivada da clonagem da extremidade 5' do mRNA da isoforma *AE1* de rim humano mostrou claramente que a região 5' não traduzida compreende parte do intron 3, o exon 4 completo, seguido pelo exon 5 que contém a metionina- 66 como o sítio de iniciação da tradução (KOLLERT-JONS e col., 1993). Esta isoforma N-terminal truncada presente na membrana basolateral das células alfa intercaladas também é expressa em oncocitoma renal, sendo um marcador específico com potencial para aplicação diagnóstica do oncocitoma (BONSIB & BROMLEY, 1994).

Sua expressão em túbulo distal está associada com a função de compensar a secreção de ácidos na membrana apical das células alfa intercaladas, reabsorvendo o HCO_3^- para o sangue. Em condições normais, para manter o equilíbrio ácido-básico, os rins devem reabsorver todo o HCO_3^- filtrado no glomérulo, e excretar uma quantia de ácido igual à produzida pela geração metabólica de prótons. Cerca de 90% da reabsorção de HCO_3^- ocorrerá em túbulos proximais, 5% em alça ascendente e 5% em túbulo distal onde há o ajuste fino do pH sanguíneo e urinário (GLUCK, 1992).

DeFranco e col., em 1995, relataram a depleção total da H^+ -ATPase vacuolar, concomitante com a ausência da banda 3 em túbulo coletor de um paciente com acidose tubular distal hipocalêmica e síndrome de Sjogren.

Resultados preliminares deste estudo (LIMA e col., 1996) levantaram a hipótese de que a deficiência de banda 3 nos rins levaria à menor reabsorção de HCO_3^- em células alfa intercaladas, causando perda de ânions. De fato, Cope e colaboradores, no mesmo ano, relataram pela primeira vez uma mutação no gene da banda 3 associada com acidose tubular distal renal familiar. A descrição completa deste caso foi publicada posteriormente (BRUCE e col., 1997). Ainda em 1996, Inaba e colaboradores descreveram um tipo de gado bovino com total deficiência de banda 3, apresentando também acidose leve mas eficiente secreção de H^+ pelos rins.

A descrição de excreção anormal do bicarbonato pelos rins em pacientes com esferocitose hereditária com a mutação Banda 3 ^{Campinas} (LIMA e col., 1997), e de acidose tubular renal distal incompleta co-herdada com a mutação Banda 3 ^{Pribram} (RYSAVÁ e col., 1997) implicaram pela primeira vez, a banda 3 em alterações na homeostase ácido-base em seres humanos.

Finalmente, em 1998, Karet e colaboradores associaram mutações no gene *AE1* com acidose tubular renal distal autossômica dominante, e descartaram defeitos neste gene na doença recessiva, mas em seguida foram descritas novas mutações no gene *AE1* em acidose tubular renal distal recessiva (TANPHAICHITR, e col., 1998).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho foi analisar o envolvimento da banda 3 na esferocitose hereditária através do rastreamento do gene *AE1* em pacientes com esferocitose e deficiência de banda 3, avaliar a participação da isoforma renal da banda 3 em indivíduos com esferocitose hereditária e defeitos na banda 3 pela investigação das alterações renais destes pacientes.

Avaliar a participação da banda 3 na fisiopatologia da acidose tubular renal distal através da inclusão, no rastreamento, de um segundo grupo de pacientes, sem defeitos na hemácia, mas com dificuldade para acidificar a urina mesmo em condições de acidose metabólica, classificados como portadores de acidose tubular renal distal.

Foi também objetivo padronizar o ensaio duplo-híbrido usando o cDNA da enzima “scramblase” como isca para buscar novas proteínas da membrana eritrocitária. Este estudo foi realizado em colaboração com o “Department of Biomedical Research, St. Elizabeth's Medical Center, Tufts University School of Medicine, Boston, MA”, sob supervisão do Dr. Hani Hassoun, MD.

Objetivos Específicos

Assim, o primeiro objetivo foi investigar as alterações funcionais e moleculares da membrana eritrocitária em pacientes deficientes de banda 3 não relacionados, através da:

1. Caracterização do defeito molecular envolvido na deficiência de banda 3 em pacientes com esferocitose hereditária;
2. Investigação de possíveis defeitos no promotor eritróide do gene da banda 3;
3. Avaliação da capacidade de acidificação tubular distal de pacientes com EsH e deficiência de banda 3;
4. Estudo do contra-transporte de sódio e lítio em hemácias de pacientes com EsH, uma vez que este estudo é uma medida indireta do contra-transporte fisiológico de Na^+/H^+ .

O segundo objetivo deste trabalho foi analisar o envolvimento da isoforma renal da banda 3 no equilíbrio ácido-básico através de:

1. Rastreamento de mutações no gene da banda 3 em pacientes com acidose renal tubular distal;
2. Investigação de defeitos no promotor renal do gene da banda 3, localizado no intron 3;
3. Investigação das alterações renais de pacientes com acidose renal tubular distal.

CASUÍSTICA

ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA

Foram selecionados pacientes com EsH e deficiência de banda 3, atendidos no hemocentro da UNICAMP. O diagnóstico de EsH foi baseado na história familiar de hemólise, caracterizada por presença de esferócitos em sangue periférico, aumento do número de reticulócitos, da bilirrubina indireta e esplenomegalia, aumento da fragilidade osmótica das hemácias (relação superfície/volume diminuída) e teste de Coombs direto negativo.

O diagnóstico de deficiência de banda 3 foi realizada após a caracterização bioquímica das proteínas da membrana eritrocitária através de SDS-PAGE corado pelo azul de Coomassie. Cinco pacientes, sendo quatro não relacionados, foram incluídos no estudo.

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes e familiares estão apresentados na tabela 2, sendo que, os cinco pacientes incluídos no início do estudo estão apresentados em negrito. Foi também incluído no estudo, uma paciente com EsH e deficiência de anquirina. A caracterização clínica e laboratorial deste paciente também está apresentada na tabela 2.

Aspectos Éticos: O estudo molecular foi realizado em amostras de sangue estocadas por ocasião da coleta para investigação diagnóstica. O estudo renal só foi realizado com o consentimento do paciente, após ampla explicação do procedimento a ser realizado e não apresentava risco para os pacientes. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Tabela 2— Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com esferocitose hereditária e dos familiares estudados

Indivíduo	Idade	Hb g/dL	MCV fL	MCHC g/dL	Retic. x10 ⁹ /L	Conteúdo Relativo da Proteína	pHu
1	67	10,1	100	31,1	247	71% Banda 3	ND
2	22	14,1	84	32,2	57,4	100% Banda 3	ND
3	21	14,4	87	32,7	35,5	100% Banda 3	ND
4	21	12,9	89	31,5	41,3	93% Banda 3	ND
I.1	58	13,4	87	32,9	416,5	78% Banda 3	ND
II.1	36	12,4	91	32,5	544,70	75% Banda 3	6,8
II.2	32	12,7	87	33,3	543,12	79% Banda 3	6,5
A-1[§]	41	14,9	90,1	37,0	137,80	70% Banda 3	7,0
A-2	20	13,1	90	34,8	178,9	79% Banda 3	ND
A-3	16	11,5	90	35	186,1	80% Banda 3	ND
B	28	12,2	96,5	37,2	338,3	67% Banda 3	5,7
C	66	13,7	84	34	126,9	76% Banda 3	ND
C-1	38	15,2	89,9	33,8	46,8	100% Banda 3	6,3
C-2	40	14,3	88	37,2	222,4	74% Banda 3	5,4
C-3[§]	34	16,1	92	36	50,3	79% Banda 3	5,3
Ank[§]	20	13,7	78	35,6	59.28	70% Anquirina	ND

[§] Esplenectomizados

Ank- Paciente com esferocitose hereditária e deficiência de anquirina incluído apenas no estudo do contratransporte de sódio e lítio.

ACIDOSE RENAL TUBULAR DISTAL

Foram selecionados pacientes com acidose renal tubular distal atendidos no ambulatório de Nefropediatria do HC da UNICAMP.

O diagnóstico de acidose renal tubular distal foi baseado em dados clínicos apresentados na tabela 3, em dados laboratoriais apresentados na tabela 4 e em exames de imagens.

Foram estudados 5 pacientes, sendo um paciente portador de acidose tubular distal tipo IV (R.A.C.), 3 portadores de acidose tubular distal clássica ou tipo I (A.F., L.I.S. e R.D.E.A.) e um portador de acidose tubular distal incompleta (R.N.C.).

Na acidose renal tubular distal tipo I e na acidose renal tubular distal incompleta, o defeito pode estar na secreção de prótons pela proteína H^+ -ATPase vacuolar das células alfa intercaladas, ou na banda 3 presente neste subtipo de células renais. A acidose tubular renal distal tipo IV é causada pela falta de efeito da aldosterona a nível do receptor ou pela falta de eletronegatividade adequada do túbulo renal.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Tabela 3- Dados clínicos dos pacientes com acidose

Paciente	Sexo	Idade	Histórico	Z score
A.F.	F	10a	Anúria há 2 dias associada a dor abdominal. AP.- com 2 anos internada por pneumonia; 5 anos - pneumonia + nefrite (dispnéia sem febre) ttm. c/ homeopatia. A.F.- pais saudáveis, irmão (16a) sadio. Paciente c/ bom desenv. intelectual. Exame de entrada: Estatura=127 cm, Peso=20Kg, PA=130/70, FC=110, FR=32, mau estado geral, moderadamente descorado (++/4). Respiração acidótica, hidratado s/ outras anormalidades clínicas. Diurese 24hs= 270ml. Evolução: Instalação de diálise peritonial intermitente e na evolução para diálise peritonial ambulatorial contínua (CAPD)	P/I- -2,35 E/I- -1,6 P/E- -2,28
L.I.S.	F	1a 2m	Encaminhada para investigação de baixo ganho ponderal. Bom nível sócio-econômico. Parto normal P=3150g Tem trocado tipo de leite visto que desde os 6 meses não ganha peso. Parece que tem muita sede. Desenvolvimento motor- fica em pé mas não anda. P=6310g, Estatura=63cm, FC=110, FR=30, PA=10/7. Bom estado geral, corada e hidratada. Sequência de investigação: Refluxo gástrico esofágico/ endoscopia digestiva alta/ dosagens hormonais/ idade óssea - sugestão de raquitismo → suspeita de acidose metabólica	P/I- -3,58 E/I- -4,69 P/E- -0,42
R.N.C.	M	10m	RN pré-termo c/ peso adequado à idade gestacional (P=1620g) e artéria umbelical única. Ganhou peso no berçário e teve alta c/ 35 dias de vida (P=2210g). Retornou c/ 10 meses c/ queixa de falta de ganho de peso. Criança apresentou durante o período 3 internações (pneumonia, diarreia), mora na creche e segundo informante, tem boa oferta alimentar. Mãe usuária de drogas. Peso atual=4130g, Estatura=58,3 cm	P/I- -5,54 E/I- -4,0 P/E- -3,5
R.A.C.	M	2m	Há 15 dias c/ vômitos e perda de peso. Na investigação Urina I c/ glicosúria e ultra-som c/ malformações do trato urinário. AP-gemelar 2, Peso ao nasc. 2780g, AF-nada digno de nota, P3550g, Estatura=54cm, FR=38. Bom estado geral, hidratado, corado, s/ outras anormalidades. Em vista dos valores de uréia/creatinina e sódio/potássio foi pensado em acidose tubular renal tipo IV, associada à malformações do trato urinário (esta acidose é causada por falta de efeito da aldosterona-receptor, ou por falta de eletronegatividade adequada do túbulo renal)	P/I- -2,6 E/I- -2,12 P/E- -1,65
R.D.E.A	M	3a 10m	Há 3 anos apresentou infecção dentária, c/ formação de abscessos. Septicemia c/ foco inicial imputado à infecção dentária. Nesta época, entre outros dados foi constatada hipertensão arterial, insuficiência renal aguda c/ acidose metabólica. Mesmo após alta manteve acidose metabólica, calcemia ↓ e P↓.	P/I- -2,08 E/I- -2,2 P/E- -0,5

Z score- intensidade de desvio (+ quando maior que a média e – quando menor que a média) dos valores médios das relações do peso com a idade (P/I), estatura com a idade (E/I) e do peso com a estatura (P/E). Os valores médios são definidos a partir de curvas de crescimento consideradas como ideais (NCHS-padrão americano ou da curva de crescimento de Santo André- padrão nacional).

Tabela 4- Caracterização laboratorial da acidose

Paciente	Gasometria	Eletrólitos	Outros	Interpretação Final
AF	pH=7,28 pCO ₂ =23,0 HCO ₃ =11,0 BE=-13,6	Na ⁺ - 132 K ⁺ - 6,1 Ca ⁺⁺ - 5,4 P- 6,0	Uréia- 423 Creat- 12,4 Urina I- pH-8,0 Dens.- 1020 Glicose- 3,4 g/L Proteína- 6,3 g/L	Paciente chegou ao serviço em IRC, fase terminal (clearance de creatinina de 4,0 ml/min/1,73m ²). Nestas situações o diagnóstico etiológico da IRC somente pode ser de suposição. Devido a presença de desenv. pondero-estatural intensamente diminuído e nefrocalcinose bilateral, foi feita a suspeita de acidose tubular distal tipo I ou displasia renal. A hipótese de doença glomerular é pouco provável pois não há antecedentes de envolvimento renal no paciente, nem na família, sendo pouco frequente o encontro de nefrocalcinose.
LIS	pH=7,21 pCO ₂ =27,7 HCO ₃ =11,3 BE=-12,2	Na ⁺ - 142 K ⁺ - 2,7 Ca ⁺⁺ - 8,3 P- 3,0	Uréia- 33 Creat-0,44 Urina I- pH-7,0 Dens.- 1010 Proteína- 0,3 g/L FA-2033	Caso típico de acidose tubular distal tipo I (clássico). Retardo de ganho de peso, acidose metabólica, hipopotassemia, hipercaliúria e nefrocalcinose. Raio X com anormalidades semelhantes a raquitismo. Ótima evolução com ttm com bicarbonato.
RNC	pH=7,34 pCO ₂ =27,4 HCO ₃ =15,7 BE=-9,2	Na ⁺ - 140 K ⁺ - 4,3 Ca ⁺⁺ - 10 P- 5,1	Uréia- 20 Creat- 0,2 Urina I- pH-6,0 Dens.- 1020 FEB=1% *FEB=2,8 % FA- 263	Paciente c/ baixo ganho ponderal, condição social desfavorável, apresentando acidose metabólica recorrente (quando suspende alcalinizante), c/ pH urinário que chegou a ser ácido (pHu-5,5), descartando acidose tubular renal distal clássica, não sugerindo também acidose tubular renal proximal (fração de excreção de bicarbonato normal). É fato no entanto que apresentou durante o acompanhamento do 1º p/ o 2º ano de vida, acidose metabólica c/ boa resposta a alcalinizante (6,0mEq/Kg/dia). Bateria de erros metabólicos negativa. Depois do 3º ano de vida não apresentou mais acidose metabólica, melhorando significativamente o ganho de peso.
RAC	pH=7,39 pCO ₂ =25,6 HCO ₃ =15,7 BE=-7	Na ⁺ - 132 K ⁺ - 7,6 Ca ⁺⁺ - 11 P- 6,8	Uréia- 66 Creat- 0,9 Urina I- pH-6,0 Dens.- 1010 FEB=5,1% Aldosterona >1200 pg/ml	Caso típico de acidose tubular distal tipo IV, ou seja, quadro de acidose, associado à malformação do trato urinário, hiperpotassemia e estimulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Melhora c/ a retirada da obstrução e com o crescimento renal (aumento do comprimento dos túbulos distais e coletores). Nefrocalcinose bilateral (elevação grosseira da aldosterona)
RDEA	pH=7,1 pCO ₂ =25,3 HCO ₃ =9,1 BE=-17,2	Na ⁺ - 132 K ⁺ - 4,5 Ca ⁺⁺ - 9,3	Uréia- 64 Creat- 1,6 FA- 1357	Acidose tubular distal tipo I

Ca⁺⁺, P, Uréia, Creat- Valores plasmáticos expressos em mg %; Na⁺/K⁺, HCO₃ e “Base excess”- valores em mEq/L; FA- unidades; FEB- fração de excreção de bicarbonato; *realizado quando bicarbonato sérico = 22,0. Aldosterona (normal- 40-310pg/ml)

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização das proteínas da membrana na esferocitose hereditária

Extração das proteínas da membrana:

A extração de proteínas da membrana eritrocitária foi realizada de acordo com Dodge e col., 1963, com pequenas modificações:

Após coleta de 20 ml de sangue venoso em 25% do anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato de sódio, dextrose), e conservação a 4°C por no máximo 3 dias (Wolfe, 1985), 5 ml do material foi centrifugado a 400 x g, por 10 min., a 4°C. O plasma e a camada de leucócitos foram removidos por aspiração e as hemácias ressuspensas em 10 volumes de PBS a 4°C (5 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 1 mM azida sódica; pH 7,5), para posterior centrifugação a 400 x g, por 10 min., a 4°C. Esta etapa foi repetida pelo menos 3 vezes. As hemácias foram lisadas com 30 volumes de tampão de lise a 4°C (3 mM Na₂HPO₄, 0,2 mM NaH₂PO₄, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF; pH 8,0) e centrifugadas a 16.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante contendo hemoglobina e o agregado de leucócitos formado sobre o "pellet" de membrana foram removidos por aspiração e a operação foi repetida até a obtenção de "pellet" de cor branco leitosa.

As proteínas foram determinadas através de espectrofotometria, utilizando-se curva padrão de soro albumina bovina em comprimento de onda de 595 nm (*Bio-Rad Protein Assay* baseado no método de Bradford). As membranas contidas no "pellet" foram solubilizadas em aproximadamente o mesmo volume da solução: 10 mM EDTA; pH 8,0; 0,25 M tris-base; 5% SDS; 1,25 M sacarose; 0,1 M DTT e 0,05 % de azul de bromofenol e fervidas por 2 a 3 min.

Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

As proteínas de membrana foram fracionadas em gel de poliacrilamida contendo SDS: 30 µg de proteínas de membrana solubilizadas foram aplicadas em gel de gradiente exponencial de poliacrilamida 3,5 a 17% (FAIRBANKS, STECK E WALLACH, 1971), preenchido com tampão de corrida contendo 40 mM tris-base, 20 mM acetato de sódio, 2 mM EDTA, pH 7,4, 0,2% SDS, 0,008% de 2- mercaptoetanol e submetido à tensão de 40 V por 16 horas. Foi

utilizado aparato Hoefer modelo SE 400 e fonte Bio Rad modelo 1000/500. As proteínas foram visualizadas através de coloração com 0,25 % de azul de Coomassie em 10% de ácido acético e 45% de metanol e descoloração com solução contendo 30% de metanol e 7% de ácido acético. Os géis foram secos em aparato Hoefer após tratamento em solução contendo 1% de glicerol, 7% de ácido acético e 5% de metanol.

Densitometria das proteínas

A quantificação das proteínas de membrana foi realizada por densitometria (Hoefer modelo GS 300). O cálculo das diferentes áreas sob os picos de alfa e beta-espectrina, 2.1 ou anquirina, banda 3, e proteínas 4.1 e 4.2, foi levado a efeito pelo programa de computador GS 365 W - versão 3.01 - Hoefer. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e na maioria dos pacientes foram obtidas 2 amostras de sangue independentes. Para identificação de eventual deficiência das proteínas da membrana utilizamos a banda 3 como razão através do cálculo: *área total da proteína / área total da Banda 3*.

Para detecção de deficiência de proteína 4.1 ou 4.2, utilizamos o cálculo: *área total proteína 4.1 / área total proteína 4.2*. A padronização destas técnicas foi realizada previamente ao estudo dos pacientes, através da análise de 30 indivíduos normais.

Caracterização de mutações no gene da banda 3

Para identificação das mutações, o gene *AEI* foi rastreado através da amplificação do DNA genômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR), exon por exon, respeitando-se as regiões limítrofes dos introns (Tabela 5). Estes produtos foram submetidos a análise de polimorfismo de conformação em fita simples (SSCP). Quando houve desvios de banda, em 2 experimentos independentes, com diferentes PCRs, foi realizado o sequenciamento direto do produto de PCR ou após subclonagem em plasmídeo. No caso da detecção de mutações em sítios de clivagem, o mRNA da região também foi subclonado e sequenciado.

Extração do DNA Genômico

O DNA foi isolado de células nucleadas a partir de 10-20 ml de sangue venoso coletado em EDTA 10% (MANIATIS e col., 1989). O sangue foi inicialmente centrifugado a 450 x g por 15 min. Para a lise de hemácias foi adicionada solução 0,144 M de NH_4Cl na proporção de 5 vezes o volume de células e solução 0,01 M de NH_4HCO_3 na proporção de 0,5 vezes o volume de células. A solução foi incubada em temperatura ambiente por 20 min. e seguida de centrifugação por 15 min. a 450 x g, a 4°C. Esta etapa foi repetida até a obtenção de um precipitado nuclear de leucócitos livre de hemácias.

Os leucócitos foram dissolvidos em 10 ml de tampão contendo 7 M de uréia, 0,3 M de NaCl, 10 mM de EDTA, 10 mM de Tris/HCl, pH 7,5 e 0,5 % de SDS e incubado a 37°C por aproximadamente 16 hs.

Após a incubação foram realizadas três extrações com igual volume da mistura contendo fenol (redesilado e saturado em 0,2 mM de Tris/HCl pH-8, contendo 0,1% de hidroxiquinolina) clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. Cada extração foi seguida por centrifugação a 5.000 rpm durante 15 minutos. Ao final, a camada superior contendo o DNA foi transferida para um novo tubo e realizada nova extração apenas com clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1. Para a precipitação do DNA foi utilizado etanol absoluto gelado (2,5 vezes o volume) e acetato de sódio 3 M (10% do volume).

O DNA precipitado foi lavado em etanol a 70% para eliminar resíduos de fenol e sais e posteriormente diluído em água estéril ou solução de TE (10 mM de Tris pH-8,0; 0,1 mM de EDTA pH 7,4). A concentração do DNA foi determinada em espectrofotômetro pela leitura da densidade óptica em 260 nm (MANIATIS e col., 1989).

Extração do RNA de reticulócitos (GOOSENS & KAN, 1981)

As hemácias foram lisadas com 5 vezes o seu volume em solução de 0,144 M de NH_4Cl e 0,01 M de NH_4HCO_3 . Após repouso de 30 min. em banho de gelo, foram submetidas à

centrifugação a 2.500 rpm por 20 min. a 4°C. O sobrenadante foi reservado e o "pellet" de leucócitos congelados à - 70°C até a extração do DNA. Foi adicionado ao sobrenadante 1/10 do volume de uma solução de 1,5 M de sacarose e 0,15 M de KCl gelada e centrifugados a 3500 rpm por 30 min., a 4°C. Foi então adicionado ao sobrenadante 1ml de ácido acético 10%, seguido da centrifugação a 3500 rpm por 35 min., a 4°C. O RNA foi extraído com igual volume da mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e submetido à centrifugação a 2500 rpm, por 20 min., a 4°C. A fase aquosa superior foi separada e as demais descartadas. Este processo foi repetido até a obtenção de sobrenadante limpo. O RNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto gelado e 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH5,2 por 16 horas a -20°C, centrifugados a 17000 rpm por 30 min., a 4°C e o precipitado ressuspendido com 1ml de etanol 70% gelado, seguido da centrifugação a 10000 rpm por 10 min. a 4°C. A solubilização do precipitado de RNA foi realizada com 30 µl de água destilada, deionizada e estéril e estocagem a -80°C. A estimativa da concentração de RNA foi feita em espectrofotômetro, através do valor da densidade óptica à 260 nm. O "pellet" foi ressuspendido com 2ml do seguinte tampão: 0,1 M de Tris-HCl (pH 9,0), 0,1 M de NaCl, 0,5% de SDS e 0,1 mM de EDTA.

Síntese de cDNA pelo processo de transcrição reversa

O processo de transcrição reversa consistiu da incubação de uma alíquota da amostra de RNA (aproximadamente 8µg) à 42°C por 2 horas em uma reação contendo 1,6 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 50 mM de NaCl, 34 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 6 mM de MgCl₂, 5 mM de DTT, 0,5µg de oligo dT, 20 unidades de inibidor de RNases (RNasin - Promega Corporation, Madison, WI) e 2 unidades de transcriptase reversa (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD).

Amplificação de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (SAIKI e col.,1988)

As amostras de DNA estudadas foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações foram realizadas num volume final de 50 µl contendo 500 ng de DNA genômico, 10 mM Tris-HCl pH 8,5, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1,0 mM de cada deoxi-nucleotídeo trifosfato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 50 ng de cada iniciador (Tabela 5) e 2 unidades de Taq DNA polimerase. As amostras foram desnaturadas inicialmente por 5 min. a 94°C e em seguida submetidas a 35 ciclos de amplificação com desnaturação de 1 min. a 94°C, anelamento de 1 min. a 55°C e alongamento a 72°C por 30 segundos a 2 min., dependendo do tamanho do fragmento a ser amplificado. A reação foi realizada em um ciclador automático de temperatura (Perkin Elmer-Cetus, Cetus Corp, Boston, MA, USA). Os iniciadores utilizados para as reações em cadeia pela polimerase foram obtidos através de sequências gênicas já publicadas (SCHOFIELD e col., 1994). Os iniciadores foram desenhados nas regiões de transição intron-exon dos genes em estudo, de modo a possibilitar o análise de pelo menos 6 pares de bases nos introns. Os primers A+B e C+D amplificaram a região promotora renal localizada no intron 3 (tabela 5). O material amplificado foi separado em gel de agarose (1 a 3 %) e então visualizado sob a luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio.

Tabela 5- Iniciadores utilizados para amplificar a banda 3

Exon	Sense	Antisense	PB
1a*	Q- 5'taccaagagagacgagagga 3'	R- 5'ggtgcccagtaaacagagtt 3'	302
1b*	S- 5'actcacagctgtccagatgt 3'	T- 5'aggetgggcacctgtagaa 3'	325
2	5'atgcectgtgceccactcag 3'	5'tccaggtgggagcaactgctg 3'	160
3	‡ 5'gggtggaagagcccectcaca 3'	5'tcagcagctcatcccagctg 3'	179
Intron 3	A- 5'ecgttctcccctcaattctg 3'	B- 5'ctcaatgagcccgtcagcac 3'	495
Intron 3	C- 5'ectggtgectcagctcagtg 3'	D- 5'ggtagtctgtggtctgttgc 3'	464
4	5'ggtcagggtcaataactaaccg 3'	5'agcatgggaaagaacggagg 3'	133
5	5'tgatgaactaactcaggcg 3'	5'atctgcaggggggtccagaag 3'	249
6	5'agectaccagctcactctc 3'	5'ctgggatatggaatccagcg 3'	206
7	5'atgtccctgtacgtctgc 3'	5'tgacctgttaactgactcac 3'	166
8	5'gtcaccaccctccttccac 3'	5'gagggtagagatgcectgttc 3'	131
9	5'ctggectgatcttctcctac 3'	5'ectctccggcccttcttctac 3'	230
10	5'tctgacctgtctctctgccc 3'	5'cagctgggaaggcgaggctac 3'	255
11	5'getcttatcctccaccacag 3'	5'ggagacagggtattggcactg 3'	237
12	5'actgtgacctctacccacag 3'	5'tggggcaaggacagaactac 3'	189
13	5'ttctctgaccacctgcag 3'	5'aacctcccgtgtgcattaac 3'	273
14	5'gctgggagagaacagaatgc 3'	5'gcagtgttggaaggacagg 3'	250
15	5'tgactgggcaactgaccactg 3'	5'atcatggtctgagggtctggg 3'	162
16	5'ctgcecttggcattcttacc 3'	5'tcccacctcccaggccacag 3'	204
17	5'gagaacctgcttaccctc 3'	5'gcaggaggatggtgaagacg 3'	330
18	5'caacctgggctgagagtgtg 3'	5'taccacctcaggctgggcag 3'	243
19	5'tgataggcactgacccacg 3'	5'tcccagctcttgtgccccag 3'	244
20	5'ggtctctcaccctgtctctc 3'	5'cgcttcttccccaccac 3'	268

*De acordo com Alloisio e col., 1996; ‡ Jarolim e col., 1996

Análise de Polimorfismo de Conformação em Hélice Simples (SSCP)

A análise de polimorfismo de conformação em hélice simples foi realizada de acordo com Orita e col., 1989, com algumas modificações. SSCP não-radioativo foi utilizado para o rastreamento das mutações. As amostras do PCR foram diluídas em uma solução de formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05 % e xilenocianol 0,05 %, na proporção 1:4, e posteriormente desnaturadas a 80-100°C por 5 min. Desta solução 1 µl foi aplicado em gel com auxílio de um aparato apropriado. A análise do SSCP foi realizada no sistema de eletroforese *PhastSystem® Pharmacia (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia)*. As condições de eletroforese foram 1 watt, 250 a 500 volts/hora, a 4 ou 15°C. Os fragmentos de DNA foram visualizados pela coloração do gel com a prata que consistiu em banhos consecutivos em 20% de ácido tricloroacético (5 min. a 20°C), 5% glutaraldeído (5 min. a 50°C), água (duas lavagens de dois min. a 50°C), AgNO₃ 0,4 % (8 min. a 40°C), água (duas lavagens de 30 segundos a 30°C), 2,5% Na₂CO₃, 0,013% formaldeído (4 min. a 30°C), 5% ácido acético (2 min. a 50°C) e glicerol 15% (3 min. a 35°C).

Sequenciamento de DNA (SANGER e col., 1977)

Purificação de fragmentos de PCR

O fragmento de DNA presente no produto de PCR, foi purificado conforme o kit Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega).

Sequenciamento de produtos de PCR

O sequenciamento dos produtos do PCR obtidos na amplificação simétrica do DNA foi realizada utilizando-se o kit Sequenase PCR product, versão 2.0 (USB, Cleveland, OH). Inicialmente 5 µl do produto de PCR foi tratado com 10 unidades de exonuclease I e 2 unidades de fosfatase alcalina, com o objetivo de remover iniciadores residuais e dNTPs remanescentes da PCR. Ao produto do PCR tratado (0,5 pmol) foram adicionados 5 a 10 pmol do iniciador, realizada a desnaturação por aquecimento a 100°C e imediatamente resfriado por 5 min. A seguir,

foi iniciada a reação de marcação e síntese da hélice complementar, utilizando-se 5 μ Ci de 35 SdATP, 3,2 unidades de sequenase DNA polimerase, 1 μ l DTT 0,1 M, 2 μ l da Sequenase 5x concentrado e 2 μ l da mistura de marcação dGTP, dCTP e dTTP 7,5 μ M, diluída na proporção de 1:5 em água. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 5 min. Uma alíquota de 3,5 μ l foi então transferida para 4 tubos contendo quantidades limitadas de 2,3- ddNTP (2,3-ddATP; 2,3-ddCTP; 2,3-ddGTP e 2,3,-ddTTP) e 2-dNTP, previamente aquecidos a 37°C por 1 min. A adição dos dideoxinucleotídeos trifosfatos provoca a terminação das cadeias sintetizadas enquanto que o excesso de dNTP produz a polimerização das cadeias sintetizadas em que nenhum ddNTP foi incorporado. Após a transferência, a incubação foi prolongada a 37°C por 10 min. As reações foram interrompidas pela adição de 4 μ l de uma solução de formamida 95 %, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05 % e xilenocianol 0,05 %.

O gel de sequenciamento consistiu de um gel de poliacrilamida 8 % em tampão de Tris-EDTA-borato TEB (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M e EDTA 20 mM), uréia 8 M em placas de 33x38 e 33x40 cm com espessura de 0,4 mm.

Aproximadamente 4 μ l do produto da reação do sequenciamento foi desnaturado a 100°C por 5 minutos e aplicados no gel. O tampão utilizado na eletroforese foi TEB 1X, com a eletroforese realizada a 75 W por 2 a 3 horas à temperatura ambiente. O gel foi seco a 80°C, colocado em um cassete com filme de raio-X e a autorradiografia foi revelada após 16 horas de exposição à temperatura ambiente.

Sequenciamento direto de produtos subclonados

Quando houve necessidade o produto do PCR foi subclonado no vetor pMOS Blue T-vector kit (Amersham), de acordo com as instruções do fabricante. Os subclones foram rastreados por PCR e sequenciados com kit Sequenase versão 2.0 (USB - Ohio).

Medida do transporte de cátions em hemácias (CANESSA, 1989)

Para avaliar a troca Na^+/H^+ foi realizada a medida da atividade do contratransporte de Na^+/Li^+ em hemácias, pois esta apresenta grande semelhança com a troca de Na^+/H^+ e pode pertencer ao mesmo sistema de transporte.

Em resumo, foram colhidos 20 ml de sangue em 0,5 ml de heparina, e iniciado o ensaio em até 30 min. Após centrifugação a 450 g, a 4°C, por 10 min. o plasma e o tampão de leucócitos foram removidos por aspiração, e as hemácias repetidamente lavadas com uma solução isotônica (280 a 300 mosm/Kg) contendo 149mM de cloreto de colina, 1 mM de cloreto de magnésio, 10 mM de Tris-MOPS, 10 mM de glicose, pH 7,4 a 4°C. Em seguida, as hemácias foram incubadas por 3 horas em 150 mM de cloreto de lítio, 10 mM de glicose, 10 mM de Tris-MOPS, pH 7,4 a 37°C, a fim de obter-se concentração intracelular de lítio (Li^+)_i acima de 8 mM. O efluxo de lítio das células carregadas deste íon para um meio que contém sódio consiste do CT Na^+/Li^+ , o qual depende da concentração externa de sódio, e da difusão passiva. Esta última pôde ser determinada pela medida da concentração de lítio que efluiu para um meio sem sódio. O CT Na^+/Li^+ é o resultado da subtração do efluxo de lítio para um meio com sódio de um meio sem sódio. Portanto, após as células terem sido carregadas com lítio, foram novamente lavadas afim de se remover o lítio extracelular e, em seguida alíquotas de células foram transferidas para dois grupos de tubos; um contendo 150 mM de cloreto de sódio, 1 mM de cloreto de magnésio, 10 mM de Tris-MOPS, 10 mM de glicose, 0,1 mM de ouabaína, e o outro, 148 mM de cloreto de colina, 1mM de cloreto de magnésio, 10 mM de Tris-MOPS, 10 mM de glicose, 0,1 mM de ouabaína, pH 7,4 a 37°C. Após 15 e 30 min. de incubação alíquotas em duplicata foram transferidas para eppendorfs em banho de gelo, e as células foram precipitadas através de centrifugação em microcentrífuga refrigerada. As concentrações de lítio no sobrenadante foram determinadas por emissão atômica em plasma de argônio lidas em 670,78 nm.

Avaliação da capacidade de acidificação tubular distal (BATLLE, 1986; SCHLUETER & BATLLE, 1990)

Após jejum de 12 a 14 hs, foi solicitado aos pacientes o esvaziamento da bexiga e oferecido 10ml de água/kg num período de 30 minutos. Um cateter heparinizado, tipo “butterfly”, foi colocado numa veia periférica do antebraço esquerdo e após 2 horas (período basal), foi administrado 40 mg VO de furosemida. Este diurético de alça inibe o co-transportador Na/K/2Cl intra-luminal e promove acidificação distal porque bloqueia a reabsorção de NaCl na porção espessa da alça de Henle, aumentando a liberação de Na^+ no tubo coletor distal e consequentemente a voltagem transtubular. Amostras de sangue e urina foram então coletadas a cada 2 horas e 1 hora, respectivamente, durante 4 hs. Nas amostras coletadas foi medido o pH urinário, clearance de creatinina, acidez titulável, amônia e bicarbonato urinário.

Os pacientes sob dieta normal e não usando drogas que alteram a filtração glomerular, secreção renal de sódio ou a excreção de água, foram informados e conscientizados sobre a natureza e finalidade do exame que foi realizado juntamente com um voluntário saudável considerado controle do teste de acidificação. O estudo da filtração glomerular foi realizado no decorrer do exame através do clearance de creatinina.

Pacientes e voluntários foram orientados para que a prova tivesse início pela manhã, em jejum de 12 horas. Após venóclise e heparinização do acesso venoso, todos permaneceram sentados em repouso relativo, e após esvaziamento completo da bexiga vesical foi oferecido um volume de 10 ml / kg de peso corporal de água para ingestão em 30 minutos. Permaneceram nesta posição exceto durante as micções.

Alíquotas de urina foram coletadas e medidas a cada hora e armazenadas sob vaselina líquida para posteriores dosagens. Após duas horas de estabilização (período basal), procedemos a ingestão de 40 mg de furosemida, e a partir de então foram coletadas amostras de urina durante 1 hora por 4 horas e sangue a cada duas horas. No período basal também foi coletada uma

amostra de sangue. O pH urinário foi medido em pH-metro (Micronal) imediatamente após as coletas.

Eletrólitos plasmáticos, níveis séricos e urinários de bicarbonato (HCO_3^-), concentração de amônia (NH_4^+), e acidez titulável foram determinados posteriormente pelas técnicas adequadas.

Efluxo de sulfato DIDS-sensível (SCHOFIELD e col., 1992)

O ensaio foi padronizado seguindo o método original (BURSAUX e col., 1984), incluindo o estudo da inibição da banda 3 pela adição de 1,5 μM de DIDS que resultou em aproximadamente 45% do efluxo total, ou seja, sem inibidor (SCHOFIELD e col., 1992).

A composição do meio para o efluxo de $^{35}\text{SO}_4$ (meio A) era: 48,5 mM de Na_2SO_4 ; 1,5 mM de MgSO_4 ; 0,1 mM de EDTA; 25 mM de Hepes e 87 mM de KCl. Ajustar a osmolaridade para 300 Osm/Kg. O pH da solução sem ajuste foi 5,4 e o pH foi ajustado para os valores desejados com NaOH 0,5 M. Os valores de pH ajustados a 37°C e as osmolaridades das soluções prontas para o uso foram: pH 6,5 – 299mOsm/Kg; pH 7,0 – 305mOsm/Kg; pH 7,4 – 306mOsm/Kg e pH8,0 – 312mOsm/Kg.

Foram colhidos 15ml de sangue periférico em tubo heparinizado após jejum mínimo de 10 horas. O sangue foi centrifugado a 400 x g, por 10 min. a 4°C para separar o plasma e remover os leucócitos cuidadosamente por aspiração. As hemácias foram lavadas 3 vezes com o meio A, pH 7,4 mantido em banho de gelo. Durante as lavagens foram pré-aquecidos 4 tubos (para cada paciente) contendo: 9,5ml do meio A em cada pH; 700 μl glicose 165 mM (10 mM final) e 5,5 μl $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ (0,5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ final). Após a terceira lavagem, foi retirado todo o sobrenadante, as células foram homogeneizadas e adicionadas (com ponteiros cortadas) 2 x 800 μl em cada tubo Falcon pré-aquecido em banho-maria 37°C. Os tubos foram incubados por 3 horas a 37°C com agitação. Ao final da incubação os tubos foram centrifugados a 400 x g, por 6 min., a 4°C, e 100

μl do sobrenadante foram adicionados a tubos com 900 μl de H_2O (SO_4 extra-celular). Todo o sobrenadante foi removido, sem aspirar as hemácias.

As hemácias foram lavadas com o meio A no respectivo pH da incubação. Foram lisadas 2 alíquotas de 100 μl de células para determinar SO_4 intra-celular. Ao final das lavagens foram adicionados 200 μl de hemácias a tubos previamente pesados e identificados. As hemácias foram secas por 24 horas a 95°C e foi determinado o conteúdo de água e o peso seco. Foram adicionados 500 μl de TCA 30 % nos eppendorffs SO_4 intra e extra. Agitação, centrifugação e foram retirados 500 μl do extrato limpo para flaconete com 3ml de líquido de cintilação. O efluxo no tempo "Zero" foi medido em tubo Falcon contendo 4ml do meio A nos respectivos pHs, em banho de gelo. Foram adicionados 125 μl de hemácias, homogeneizado e distribuído imediatamente 1ml da suspensão em cada eppendorff mantido em banho de gelo. Spin 8000 rpm, a 4°C , e foram retirados 100 μl do sobrenadante, sem aspirar hemácias, e transferido para eppendorffs contendo 900 μl de H_2O e 500 μl de TCA 30 %. Agitação, centrifugação e foram transferidos 500 μl do sobrenadante para flaconetes contendo 3 ml de líquido de cintilação.

A cinética foi iniciada nos 4 tubos contendo 8 ml de cada meio A:

Tempo regressivo:

35' 250 µl de células no tubo pH 6,5

34' 250 µl de células no tubo pH 7,0

33' 250 µl de células no tubo pH 7,4

32' 250 µl de células no tubo pH 8,0

Após 10 minutos:

25' 2 ml do tubo pH 6,5 para 2 eppendorffs no gelo

24' 2 ml do tubo pH 7,0 para 2 eppendorffs no gelo

23' 2 ml do tubo pH 7,4 para 2 eppendorffs no gelo

22' 2 ml do tubo pH 8,0 para 2 eppendorffs no gelo

Após 20 minutos:

15' 2 ml do tubo pH 6,5 para 2 eppendorffs no gelo

14' 2 ml do tubo pH 7,0 para 2 eppendorffs no gelo

13' 2 ml do tubo pH 7,4 para 2 eppendorffs no gelo

12' 2 ml do tubo pH 8,0 para 2 eppendorffs no gelo

Após 2 horas foram centrifugados 2ml em 2 eppendorffs e foram retirados 100 µl de cada suspensão e adicionados a eppendorffs contendo 900 µl de H₂O e 500 µl de TCA 30 %. Vortex, spin, foram transferidos 500 µl do sobrenadante para flaconetes contendo 3 ml de líquido de cintilação. Esta é a medida da radioatividade total da suspensão ou R. Todas as amostras foram processadas de maneira similar ao procedimento dos extratos.

RESULTADOS

INVESTIGAÇÃO DOS PACIENTES COM ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA

Caracterização do defeito molecular

Foi realizado o rastreamento para mutações no gene da banda 3, dos exons 1 a 20, em todos os pacientes com EsH, pelo sistema PHAST-System (Pharmacia, Uppsala, Suécia), tendo sido caracterizadas as mutações apresentadas na tabela 6.

Tabela 6- Mutações caracterizadas

Exon	Indivíduos	Mutação	Referência
4	1, 2 e 3	Banda 3 ^{Montefiore} Glu40→Lys	Rybicki e col., 1993
8	I.1, II.1 e II-2	Banda 3 ^{Campinas} Intron 8 (G+1→T)	Lima e col., 1997
*11	A1, A2, A3, B, C, C.2 e C.3	Leu 417→ Leu	Jarolim e col., 1996
*12	I-1	Leu 441→ Leu	Jarolim e col., 1996
13	A1, A2, A3, B, C, C.2 e C.3	Banda 3 ^{Pinhal} Arg490→His	Lima e col., 1999

*mutações silenciosas

A figura 4 mostra exemplos do padrão normal de alguns exons da banda 3 na análise de polimorfismo de conformação em fita simples - SSCP.

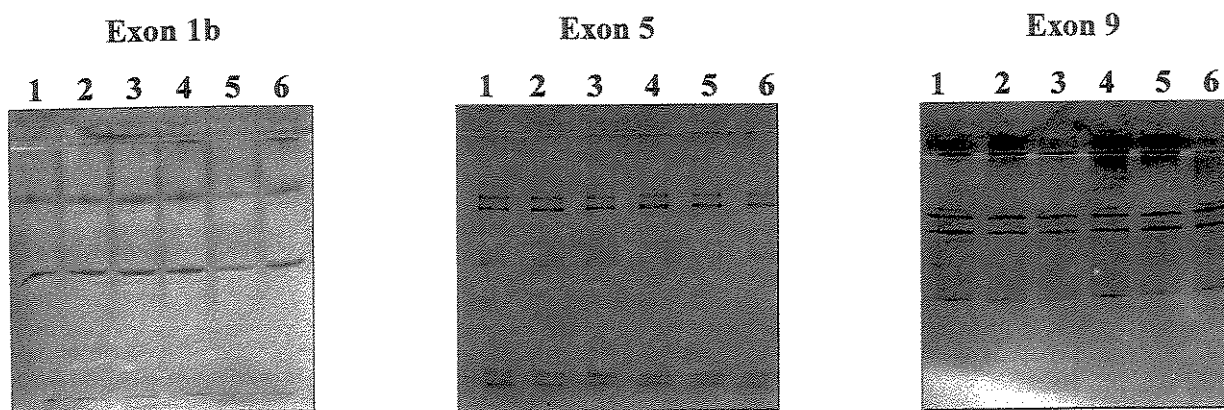
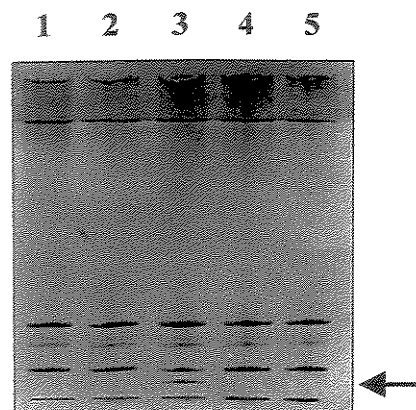


Figura 4- Padrão normal do SSCP: padrões de migração dos exons 1b, 5 e 9. A eletroforese foi realizada em PhastGel® 20% homogêneo, nas seguintes condições: 1watt, 200 a 500 volts/hora, a 15°C ou 4°C, no PhastSystem. Linhas 1, 2, 3, 4 e 5- pacientes com esferocitose hereditária e deficiência de banda 3. Linha 6- controle. Todos os pacientes e um controle apresentaram bandas com o mesmo padrão nestes exons. Através desta técnica foram detectadas bandas anômalas nos exons 4, 8, 11, 12 e 13.

O sequenciamento da PCR do paciente 1 com a banda anômala no SSCP do exon 4 (Figura 5A- linha 3), revelou a substituição do nucleotídeo G232→A, mudando o aminoácido ácido glutâmico 40 para lisina, na região N-terminal do domínio citoplasmático da banda 3, previamente descrita em 1993 por RYBICKI e col., denominada Banda 3^{Montefiore} (Figura 5B).

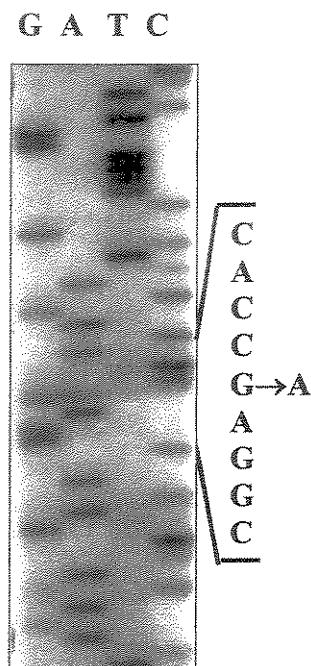
Figura 5- Banda 3^{Montefiore}

A) SSCP



Padrões de migração do exon 4. A eletroforese foi realizada em PhastGel® 20% homogêneo, nas seguintes condições: 1 watt, 250 volts/hora, a 15°C, no PhastSystem. Linha 1- controle, linha 2- paciente I-1, linha 3- paciente 1, linhas 4 e 5- pacientes B e C2. A seta indica a banda anômala na linha 3.

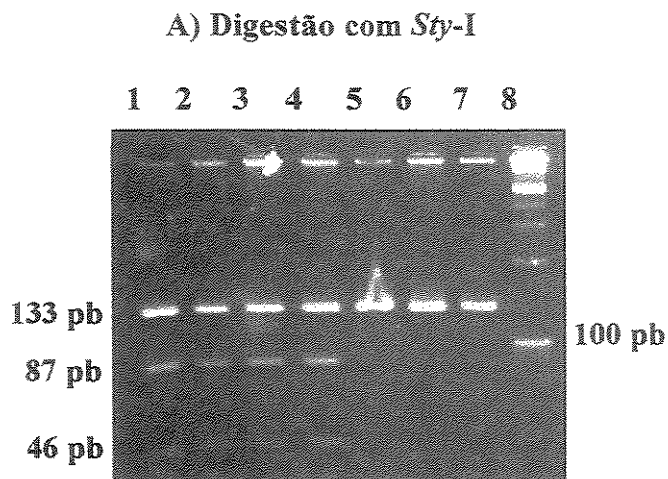
B) Sequenciamento



O sequenciamento do DNA genômico revelou a mutação G232→A no exon 4, em heterozigose no paciente 1, resultando na substituição ácido glutâmico 40 → lisina.

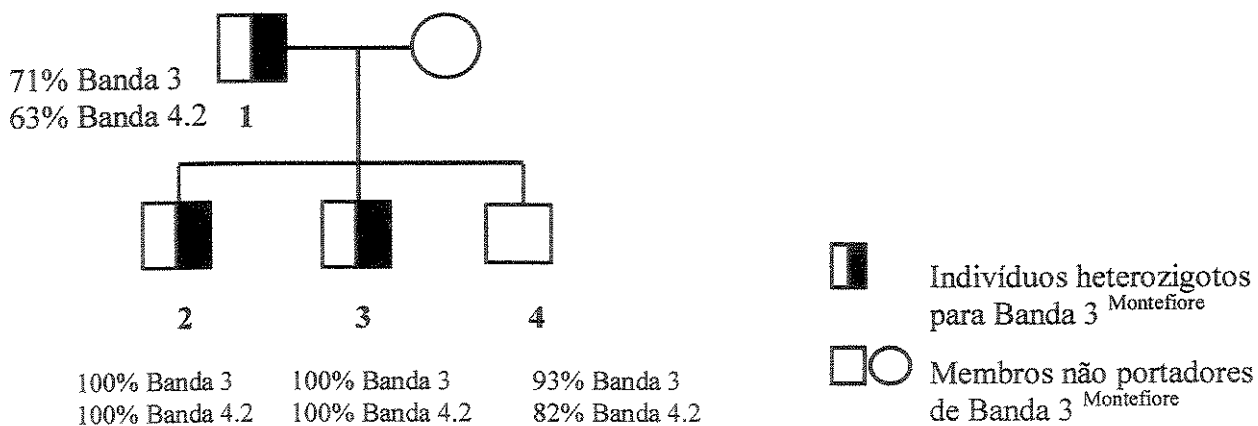
O estudo da mutação nos outros membros da família foi realizado através de digestão com a endonuclease de restrição *Sty-I*, pois esta mutação cria um sítio de restrição para a referida enzima (Figura 6A e 6B).

Figura 6- Estudo familiar da Banda 3^{Montefiore}



A mutação G232→A cria um sítio para a enzima de restrição *Sty-I*. Linhas 1 e 4- duplicatas do paciente 1, linhas 2 e 3- filhos 2 e 3, linha 5- filho 4, linha 6- controle, linha 7- PCR não-digerido, linha 8- Lader 100bp.

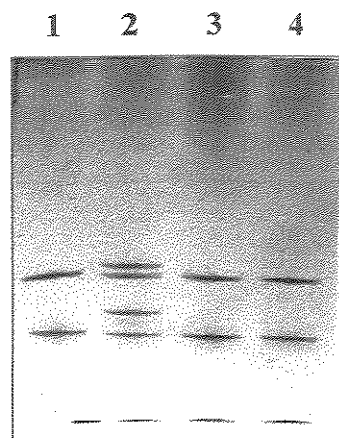
B) Pedigree - Banda 3^{Montefiore}



O sequenciamento do PCR do paciente II-2 exibindo uma banda anormal no exon 8 revelou a substituição do nucleotídeo G+1→T no sítio doador de clivagem do intron 8 (Figura 7 A e B).

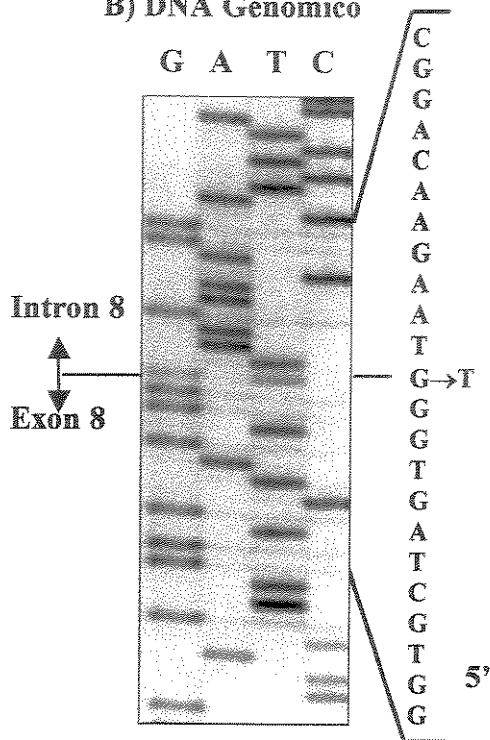
Figura 7- Detecção da mutação Banda 3^{Campinas} em pacientes com esferocitose hereditária

A) SSCP



A análise do SSCP do exon 8 e junções intron-exon mostrando uma banda anômala no paciente II-2 (linha 2) com deficiência de banda 3. Linhas 1, 3 e 4 pertencem a três pacientes c/ deficiência de B3 não relacionados.

B) DNA Genômico



Sequenciamento direto do produto da PCR exibindo uma mutação no intron 8, na posição +1G→T.