SAMANTHA IVE MIYASHIRO

Caracterização fenotípica do camundongo BALB/c mutante anêmico

São Paulo

2012

SAMANTHA IVE MIYASHIRO

Caracterização fenotípica do camundongo BALB/c mutante anêmico

Tese apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2012

VERSÃO CORRIGIDA

Nº CLASSIFICAÇÃO

Nº TOMBO
032640

Obs.: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2643
FMVZ

Miyashiro, Samantha Ive
Caracterização fenotípica do camundongo Balb/c mutante anêmico / Samantha Ive Miyashiro. -- 2012.
123 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

1. Camundongo. 2. Mutação. 3. Anemia hemolítica. 4. Hemoglobina instável. 5. Hemoglobina Santa Ana. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização fenotípica do camundongo Balb/c mutante anêmico", protocolado sob o nº 2641/2012, utilizando 80 (oitenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Maiorka, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/5/2012.

We certify that the Research "Phenotype characterization of anemic mutant Balb/c mouse", protocol number 2641/2012, utilizing 80 (eighty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Paulo César Maiorka, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 5/16/2012.

São Paulo, 31 de maio de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MIYASHIRO, Samantha Ive

Título: Caracterização fenotípica do camundongo BALB/c mutante anêmico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data:____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

AGRADECIMENTOS

Não cabe em palavras o que recebi de ajuda neste trabalho...

muito obrigada pela torcida de todos!

À Sílvia Massironi, pessoa e pesquisadora incrível, que me deu esta oportunidade de contribuir com este trabalho com os camundongos de anos e anos.

À Cláudia Madalena Cabrera Mori, mais uma pessoa incrível, com quem aprendi muito e que quase me fez entender os camundongos...

À toda equipe incrível do laboratório da Clínica Médica: Maria Helena, Maú, Clara, Cláudia, Creide, Marli, Dinha e Carmem que me apoiaram até o fim deste processo.

Ao Fernando, meu personal doceiro, que também aguentou estes momentos turbulentos...

À minha incrível família, de sangue e de alma, porque sem eles nada valeria a pena.

Aos meus amigos Paulo Eduardo Brandão e Luciana Neves Torres – vocês sabem.

À animada turma do VPT, que certamente alegrou esta etapa da minha vida.

À todos no VCM, pelo apoio na reta final para a conclusão desta tese.

À professora Mitika, que muito ajudou na reta final, com seu estilo peculiar.

Ao pessoal da biblioteca, que me deixaram entrar sempre no final do expediente para uma consultinha básica...

Ao Paulo Maiorka, que comprou a “briga”...

Aos incríveis camundongos, que irão nos surpreender sempre.

Obrigada, obrigada, obrigada

Aquele que conhece os outros é sábio.
Aquele que conhece a si mesmo é iluminado.
Aquele que vence os outros é forte.
Aquele que vence a si mesmo é poderoso.
Aquele que conhece a alegria é rico.
Aquele que conserva o seu caminho tem vontade.

Seja humilde, e permanecerás íntegro.
Curva-te, e permanecerás ereto.
Esvazia-te, e permanecerás repleto.
Gasta-te, e permanecerás novo.

O sábio não se exibe, e por isso brilha.
Ele não se faz notar, e por isso é notado.
Ele não se elogia, e por isso tem mérito.
E, porque não está competindo, ninguém no mundo
pode competir com ele.

Tao Te Ching
(Lao Tsé)

RESUMO

MIYASHIRO, S. I. **Caracterização fenotípica do camundongo BALB/c mutante anêmico.** [Phenotype characterization of anemic mutant BALB/c mouse]. 2012. 123 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Várias linhagens de camundongos resultam de mutações genéticas pontuais espontâneas ou induzidas e estas alterações podem apresentar fenótipos relevantes semelhantes a doenças hereditárias humanas. Massironi et al. (2006) desenvolveram vários camundongos BALB/c mutantes com o agente mutagênico etil-nitroso-uréia (ENU) no Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Destes, o mutante chamado *anêmico* foi objeto de estudo desta pesquisa, que tem como objetivo a sua fenotipagem. A avaliação hematológica revelou moderada anemia com intensa policromasia e reticulocitose, acompanhada de anisocitose, macrocitose, hipocromia, inclusões intraeritrocíticas e corpúsculos de Heinz, do nascimento até 18 meses de idade. Apresentaram também hemoglobinúria, bilirrubinemia, hiperfosfatemia e populações eritrocíticas com diferentes resistências à lise osmótica. No estudo da hemoglobina, não foi possível distinguir Hb anormal pela eletroforese em acetato-celulose em pH alcalino, ou cadeia globínica diferente pela eletroforese de cadeias globínicas em pH alcalino, mas constatou-se precipitação da hemoglobina no teste de estabilidade térmica e no teste de isopropanol. Na necrópsia, observou-se intensa esplenomegalia, especialmente nas fêmeas de 12 a 18 meses de idade, discreta hepatomegalia, moderada cardiomegalia e icterícia subcutânea. No exame histopatológico, observou-se intenso aumento da hematopoiese e hemossiderose nos órgãos hematopoiéticos e nas células tubulares renais notou-se deposição de ferro intracitoplasmático e houve aumento da concentração de creatinina plasmática animais mais idosos. Estes dados permitem classificar o quadro como anemia hemolítica congênita regenerativa crônica, semelhante a quadros de anemia por hemoglobina instável, descritos para humanos. Massironi (dados não publicados) concluiu o mapeamento genético deste mutante, que revelou a troca de aminoácidos na posição 88 da cadeia beta da hemoglobina (leucina por prolina), devido à troca de T por C no gene da globina β

Hbb-b1 no cromossomo 7, que corresponde à mutação da hemoglobina de Santa Ana descrita em humanos. A Hb Santa Ana é uma hemoglobina instável rara, com descrição de casos no Brasil, EUA, França, Hungria e Japão e que resulta em importante anemia hemolítica congênita crônica com evidente esplenomegalia. Este camundongo BALB/c mutante anêmico apresenta fenótipo e genótipo muito similares ao quadro de hemoglobina instável de Santa Ana e, considerando-se a importância dos modelos animais para o avanço dos estudos de doenças humanas, este modelo seria o primeiro camundongo mutante descrito para o estudo desta doença.

Palavras-chave: Camundongo. Mutação. Anemia hemolítica. Hemoglobina instável. Hemoglobina Santa Ana.

ABSTRACT

MIYASHIRO, S. I. **Phenotype characterization of anemic mutant BALB/c mouse.** [Caracterização fenotípica do camundongo BALB/c mutante anêmico]. 2012. 123 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Many strains of mice result from spontaneous or induced punctual genetic mutations and these changes may present relevant and similar phenotypes to inherited human diseases. Massironi et al. (2006) developed some BALB/c mice mutants with the mutagen ethyl-nitroso-urea (ENU) in the Biotério de Experimentação, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) of Universidade de São Paulo. From these, the mutant called *anemic* is the object of this research, which aims to characterize its phenotype. The hematologic evaluation revealed moderate anemia with intense reticulocytosis and polychromasia, followed by anisocytosis, macrocytosis, hypochromia and intraerythrocytic inclusion and Heinz bodies, presented from birth to 18 months of age. They also presented hemoglobinuria, bilirrubinaemia, hyperfosfatemia, and erythrocytic populations with different resistance to osmotic lysis. In the hemoglobin study, it was not possible to distinguish an abnormal Hb by cellulose acetate electrophoresis at alkaline pH nor a different globin chain with globin chains electrophoresis at alkaline pH, but there was hemoglobin precipitation at heat stability test and isopropanol test. At necropsy, there was evident splenomegaly - especially within the 12 to 18 months old mutant female group, discrete hepatomegaly, moderate cardiomegaly, and subcutaneous jaundice. On histopathologic examination, there was dramatic increase in the hematopoiesis and hemosiderosis in hematopoietic organs and intracellular iron deposition on tubular renal cells with elevated plasma creatinin concentration in the oldest animals. These data indicate a congenital hemolytic regenerative anemia, similar to human unstable hemoglobin anemia. By genetic mapping concluded by Massironi (data not published), it has been detected an amino acid exchange (leucine to proline) at position 88 in the beta globin protein, because of a T to C change in β globin gene Hbb-b1 on chromosome7, which corresponds to the Santa Ana hemoglobin mutation described in humans. Hb Santa Ana is a rare unstable hemoglobin reported in Brazil, USA, France, Hungary and Japan, that presents cronic congenital hemolytic anemia

with evident splenomegaly. This BALB/c mutant mouse presents similar genotype and phenotype to the human Santa Ana unstable hemoglobin. Considering the importance of animal models for human diseases studies advance, this model would be the first mutant mouse described for study of Hb Santa Ana.

Keywords: Mouse. Mutation. Hemolytic anemia. Unstable hemoglobin. Santa Ana hemoglobin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Clonagem posicional do alelo Hbb-b1 Santa Ana 30

Figura 2 - Estrutura genômica dos clusters dos genes das globinas do tipo α e do tipo β, nos cromossomos 16 e 11, em seres humanos 34

Figura 3 - Estruturas secundária e terciária de cadeias globínicas 36

Figura 4 - Esquema da estrutura da molécula de hemoglobina 39

Figura 5 - Estrutura esquemática da desoxi e oxihemoglobina 42

Figura 6 - Curvas de dissociação do oxigênio da hemoglobina humana.....42

Figura 7 - Ilustração do bolsão do heme e algumas cadeias laterais de amino ácidos em contato com o heme e várias hemoglobinas instáveis que envolvem substituições destes resíduos. Observar a indicação da mutação da Hb Santa Ana na posição helicoidal F4, originalmente ocupada por uma leucina (Leu) 51

Figura 8 - Preparado de reticulócitos de camundongos BALB/c, controle e mutante. Contra-coloração de May-Grünwald – Giemsa, x 1000 - São Paulo – 2010.....72

Figura 9 - Esfregaço sanguíneo de camundongos BALB/c, controle e mutante anêmico. Coloração de May Grümwald – Giemsa, x1000 - São Paulo – 2010 72

Figura 10 - Perfil eletroforético de hemoglobina em acetato de celulose em pH 8,6 de camundongos BALB/c controle, BALB/c anêmico, ambos machos do grupo G2 (11 semanas a 8 meses de idade) e controle humano. Coloração Ponceau S - São Paulo – 2010 82

Figura 11 - Perfil eletroforético de cadeias polipeptídicas em pH 8,6 de hemolisados de camundongo BALB/c controle, BALB/c mutante anêmico e de humano. Coloração Ponceau S - São Paulo – 2010.....85

Figura 12 – Teste de estabilidade da hemoglobina de desnaturação pelo calor - São Paulo – 2011 86

Figura 13 – Teste de estabilidade da hemoglobina de precipitação em isopropanol - São Paulo – 2011 87

Figura 14 – Exame necroscópico. Camundongo BALB/c controle (A) e BALB/c mutante anêmico (B), G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade). Note o aumento de volume e da intensidade de coloração de fígado e baço e a icterícia em tecido subcutâneo - São Paulo – 2010.....93

Figura 15 - Baço. (A) Camundongo BALB/c controle, G2 e (B) BALB/c mutante anêmico, G2 - São Paulo – 2010.....93

Figura 16 - Fotomicrografia de cortes histológicos de baço de camundongos BALB/c controle e anêmico. Coloração de hematoxilina e eosina (HE) e Perls – São Paulo – 2011 96

Figura 17 - Corte histológico do fígado de camundongos BALB/c, fêmeas, anêmico e controle, Grupo 2 (de 11 semanas a 8 meses de idade), coloração HE - São Paulo – 2011.....97

Figura 18 – Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c controle e BALB/c anêmicos, de G1 (até 10 semanas de idade) e G2 (11 semanas a 9 meses de idade), coloração de Perls – São Paulo – 2011 98

Figura 19 - Fotomicrografia de cortes histológicos de rim de camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante, G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade), coloração HE - São Paulo – 2011 99

Figura 20 - Fotomicrografia de cortes histológicos de rim de camundongos BALB/c controle (G1 - até 10 semanas de idade) e BALB/c mutantes anêmicos (G1 e G2 - de 11 semanas a 8 meses de idade), coloração de Perls – São Paulo – 2011 100

Figura 21 - Fotomicrografia de citologia de medula óssea de camundongo BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade), coloração May Grünwald-Giemsa modificado, aumento de 100x – São Paulo – 2011 101

Figura 22 – Árvore geneológica da família estudada por Biserte et al. (1964) 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação de dados entre os relatos de casos de Hb Santa Ana descritos na literatura 52

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão do eritrograma de camundongos BALB/c do grupo G1 (de até 10 semanas de idade), anêmicos e respectivos controles, fêmeas e machos - São Paulo – 2011 67

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão do eritrograma de camundongos BALB/c do grupo G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade), anêmicos e respectivos controles, fêmeas e machos - São Paulo – 2011 67

Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão do eritrograma de camundongos BALB/c do grupo G3 (de 12 a 18 meses de idade), anêmicos e respectivos controles, fêmeas e machos - São Paulo – 2011....67

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão da amplitude de variação das hemácias (RDW - %) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 70

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão dos valores relativos (%) e absolutos (x103/mL) de reticulócitos dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 71

Tabela 7 - Alterações morfológicas eritrocitárias observadas em camundongos BALB/c controle e BALB/c anêmicos dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) e classificação quanto à intensidade da alteração em escala de cruzes – São Paulo – 2011 73

Tabela 8 - Valores medianos, primeiro e terceiro quartis, do leucograma de camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, do grupo G1 (de até 10 semanas de idade) - São Paulo – 2011 74

Tabela 9 - Valores medianos, primeiro e terceiro quartis, do leucograma de camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, do grupo G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade) - São Paulo – 2011 75

Tabela 10 - Valores medianos, primeiro e terceiro quartis, do leucograma de camundongos BALB/c controles e anêmicos, fêmeas e machos, do grupo G3 (de 12 a 18 meses de idade) - São Paulo – 2011 75

Tabela 11 - Valores medianos, primeiro e terceiro quartis, da contagem de plaquetas (x103/mL) de camundongos BALB/c controles e anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) - São Paulo – 2011 78

Tabela 12 - Porcentagem média das bandas observadas na eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose em pH alcalino de hemolisado de BALB/c controle e mutante anêmico – São Paulo – 2010....83

Tabela 13 - Valor porcentual das bandas observadas na eletroforese de cadeias polipeptídicas em acetato de celulose em pH 8,6 de hemolisado de BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico – São Paulo – 2010....86

Tabela 14 - Resultados da análise físico-química do pool de urinas de camundongos BALB/c mutantes anêmicos – São Paulo – 2011 89

Tabela 15 – Perfil bioquímico hepático de camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, machos e fêmeas, dos Grupos G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 90

Tabela 16 - Perfil bioquímico renal de camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, machos e fêmeas, dos Grupos G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 91

Tabela 17 - Perfil bioquímico cardíaco de camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, machos e fêmeas, dos Grupos G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 91

Tabela 18 - Perfil bioquímico de camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, machos e fêmeas, dos Grupos G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 92

Tabela 19 - Peso dos camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, fêmeas, G1 (de até 10 semanas de idade) e de seus respectivos órgãos (baço, fígado e coração), com a porcentagem do órgão em relação ao peso do camundongo e o aumento relativo dos órgãos no mutante em relação ao controle - São Paulo – 2010 94

Tabela 20 - Peso dos camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, fêmeas e machos, G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade), e de seus respectivos órgãos (baço, fígado e coração), com a porcentagem do órgão em relação ao peso do camundongo e o aumento relativo dos órgãos no mutante em relação ao controle - São Paulo – 2010 94

Tabela 21 - Peso dos camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, fêmeas e machos, G3 (de 12 a 18 meses de idade), e de seus respectivos órgãos (baço, fígado e coração), com a porcentagem do órgão em relação ao peso do camundongo e o aumento relativo dos órgãos no mutante em relação ao controle - São Paulo – 2010 95

Tabela 22 - Contagem média de células nucleadas em lavado femoral de camundongos BALB/c controle e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, do grupo G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade) – São Paulo – 2011 101

Tabela 23 – Dados comparativos entre dados da literatura sobre a manifestação clínica da Hb de Santa Ana em humanos e achados no fenótipo do camundongo BALB/c mutante anêmico – São Paulo – 2012 105

Tabela 24 – Dados comparativos entre dados da literatura sobre o estudo da hemoglobina da Hb de Santa Ana em humanos e achados no fenótipo do camundongo BALB/c mutante anêmico – São Paulo – 2012 109

Tabela 25 - Dados dos pacientes acompanhados por Opfell et al. (1968) em Santa Ana, Califórnia, EUA 119

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão do número de hemácias ($x10^6/\mu L$) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 68

Gráfico 2 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão da concentração de hemoglobina (g/dL) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) - São Paulo – 2011 68

Gráfico 3 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão do hematócrito (%) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 69

Gráfico 4 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão do volume corpuscular médio (VCM - fL) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 69

Gráfico 5 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM - %) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 70

Gráfico 6 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão da amplitude de variação das hemácias (RDW - %) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 71

Gráfico 7 - Distribuição em boxplot dos valores medianos, quartis, máximo e mínimo, de leucócitos totais de camundongos BALB/c controle e mutante anêmico, fêmeas e machos, nas diferentes faixa etárias G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 76

Gráfico 8 - Distribuição em boxplot dos valores medianos, quartis, máximo e mínimo, de neutrófilos de camundongos BALB/c controle e mutante anêmico, fêmeas e machos, nas diferentes faixa etárias G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 76

Gráfico 9 - Distribuição em boxplot dos valores medianos, quartis, máximo e mínimo de linfócitos de camundongos BALB/c controle e mutante anêmico, fêmeas e machos, nas diferentes faixa etárias G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 77

Gráfico 10 - Distribuição em boxplot dos valores medianos, quartis, máximo e mínimo, de

monócitos de camundongos BALB/c controle e mutante anêmico, fêmeas e machos, nas diferentes faixa etárias G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011 77

Gráfico 11 - Representação gráfica da fragilidade osmótica eritrocitária média de camundongos BALB/c controles e mutantes anêmicos – São Paulo - 2010 80

Gráfico 12 - Curva da eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose em pH 8,6 de hemolisado de BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico. Análise em software VisionWorksLS, UVP - São Paulo – 2010 82

Gráfico 13 - Curva eletroforética de cadeias polipeptídicas em pH 8,6 de hemolisados de camundongo BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico. Análise em software VisionWorks, UVP - São Paulo - 2010 85

Gráfico 14 – Curva de metahemoglobina de camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, fêmeas, G1 (até 10 semanas de idade) - São Paulo – 2010.....88

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Amino ácido
CH	Corpúsculos de Heinz
CHJ	Corpúsculos de Howell-Jolly
CHCM	Concentração corpuscular hemoglobínica média (%)
CO	Monóxido de carbono
CO_2	Dióxido de carbono
ENU	Etil-nitroso-uréia, *N-ethyl-N-nitrosourea*
HCM	Hemoglobina corpuscular média (pg)
Hb	Hemoglobina ou a concentração de hemoglobina (g/dL)
He	Contagem de hemácias (células x $10^6/\mu L$)
Ht	Hematócrito ou volume globular (%)
O_2	Oxigênio
metaHb	Metahemoglobina
NO	Óxido nítrico
VCM	Volume corpuscular médio (fL)
2,3 BPG	2,3 bifosfoglicerato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

2 REVISÃO DE LITERATURA 25

2.1 O CAMUNDONGO E A GENÉTICA 25

2.2 ESTUDO DE PROTOCOLO MUTAGÊNICO MURINO 27

2.3 A PROTEÍNA HEMOGLOBINA 31

2.3.1 Síntese de globinas 32

2.3.2 Heme 37

2.3.3 Heme + globina 38

2.3.4 A hemácia 43

2.4 HEMOGLOBINAS INSTÁVEIS 44

2.4.1 Oxidação e precipitação da Hb 47

2.4.2 Detecção e caracterização de hemoglobinas instáveis 49

2.4.3 Hemoglobina de Santa Ana 50

3 MATERIAIS E MÉTODOS 55

3.1 ANIMAIS 55

3.2 MÉTODOS 56

3.2.1 Coleta de amostra sanguínea 56

3.2.2 Hematimetria 56

3.2.3 Contagem de reticulócitos 57

3.2.4 Fragilidade osmótica eritrocitária 57

3.2.5 Eletroforese de hemoglobina 58

3.2.6 Eletroforese das cadeias polipeptídicas da hemoglobina em pH alcalino 59

3.2.7 Teste de estabilidade da hemoglobina 60

3.2.7.1 Teste de desnaturação pelo calor 60

3.2.7.2 Teste de precipitação por isopropanol 61

3.2.8 Curva de metahemoglobina 62

3.2.9 Exame físico – químico da urina 62

3.2.10 Bioquímica sanguínea 63

3.2.11 Avaliação anátomo-patológica e histológica de órgãos 63

3.2.12 Análise estatística 64

4 RESULTADOS 66

4.1 HEMATIMETRIA 66

4.1.1 Eritrograma 66

4.1.2 Leucograma e plaquetograma 74

4.2 FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA 79
4.3 ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA EM ACETATO DE CELULOSE EM PH ALCALINO 81
4.4 ELETROFORESE DE CADEIAS POLIPEPTÍDICAS DA HEMOGLOBINA 84
4.5 TESTE DE ESTABILIDADE DA HEMOGLOBINA 86
4.5.1 Teste de desnaturação pelo calor 86
4.5.2 Teste de precipitação em isopropanol 87
4.6 CURVA DE METAHEMOGLOBINA 87
4.7 URINA TIPO I 89
4.8 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA 90
4.9 AVALIAÇÃO ANATOMO-PATOLÓGICA 93
5 DISCUSSÃO 103
6 CONCLUSÕES 113
REFERÊNCIAS 115
ANEXO 119

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A genética teve seu primeiro e grande impulso com o estudo de Mendel sobre hereditariedade em ervilhas, publicado em 1866 em um jornal de botânica. Embora Mendel tivesse iniciado seus experimentos de transmissão de características em camundongos, este estudo foi interrompido e a aplicação de suas leis em camundongos só foi retomada por volta de 1905 com Lucien Cuenot e em 1910 com Clarence Cook Little, sob orientação de William E. Castle (GUÉNET, BONHOMME, 2004; MORSE III, 2007; NGUYEN; XU, 2008).

Em estudos conjuntos de transplante de tumores entre camundongos, Little ficou convencido de que a uniformidade genética dos camundongos, cuja homozigose em todos os loci havia sido induzida pelos acasalamentos consanguíneos ao longo de anos, era necessária para o entendimento da genética da suscetibilidade do câncer. Foi o início do desenvolvimento de linhagens de camundongos, que adiante, leva Little a fundar The Jackson Laboratory em 1929, uma instituição dedicada à pesquisa em genética de mamíferos e câncer, importante centro de referência de pesquisa e desenvolvimento. Atualmente, centenas de linhagens de camundongos foram estabelecidas e centenas de mutações espontâneas foram isoladas. Esta coleção representa uma rica fonte de diversidade e alterações genéticas naturais, que trouxeram conhecimento sobre a biologia mamífera e sobre as doenças humanas (MORSE III, 2007; NGUYEN; XU, 2008).

As inovações tecnológicas de sequenciamento e mapeamento genéticos permitiram a identificação de genes associados a doenças em humanos, mas pouco se sabe quanto ao funcionamento destes genes, quais as vias e processos eles regulam e como se interagem, fisiologicamente. Por isso, atualmente, os estudos genéticos focam no funcionamento destas sequências genéticas, de forma que o modelo do camundongo pode vir a fornecer o primeiro mapa funcional do genoma de mamíferos, além de possibilitar a determinação do mecanismo molecular de doenças humanas e de esclarecer suas patogêneses, podendo auxiliar na identificação de marcadores precoces que possam dar suporte ao diagnóstico das doenças associadas e novos alvos moleculares para a terapia (ANGELIS et al., 2007; NGUYEN; XU, 2008).

A princípio, a análise funcional dos genes estava limitada a mutações espontâneas e problemas advindos da consanguinidade, retardando avanços nos estudos em comparação a organismos mais simples como a *Drosophila*. Mas a descoberta de que o genoma mamífero contém cerca de 25.000 genes codificadores de proteínas incentivou a criação de estratégias complementares para identificação da função destes genes: a mutagênese em alvo e a mutagênese randômica ou aleatória (ADAMS, 2007; NGUYEN; XU, 2008).

A estratégia de mutagênese aleatória emprega o uso de agentes mutagênicos, como o agente químico etil-nitroso-uréia (ENU), capaz de induzir mutações pontuais randômicas, o que permite obter uma grande quantidade de animais mutantes a partir de um único macho que tenha passado pelo processo mutagênico. Vários esquemas de cruzamento foram desenvolvidos para permitir a triagem de mutações dominantes e recessivas. Nos últimos anos, uma grande quantidade de programas de mutagênese química randômica foi estabelecida para triar sistematicamente camundongos que sofreram mutação por ENU quanto a fenótipos de interesse. E a partir destes programas, centenas de camundongos mutantes foram disponibilizados, com fenótipos variados, apresentando desde defeitos de desenvolvimento a fenótipos com alterações comportamentais, abrangendo uma ampla variedade de dados fisiológicos quantitativos. Estes estudos colaborativos levaram à catalogação destes dados no *Mouse Phenome Database* (http://phenome.jax.org/), onde dados sobre fisiologia, estado metabólico, suscetibilidade a doenças, morfologia e traços de comportamento, assim como perfis de expressão genética, estão listados (ADAMS, 2007; NGUYEN; XU, 2008).

Atualmente, o desafio associado a estas mutações induzidas é a determinação dos fenótipos de forma rápida e eficiente. A comunidade científica internacional faz estudo de protocolos de fenotipagem para avaliar os fenótipos de interesse. Um deles é o protocolo de Munich, elaborado pela GSF National Research Center for Enviroment and Health and University of Munich - Alemanha, que emprega os testes de rotina para exame médico humano e os aplica em camundongos. São protocolos que procuram avaliar os mutantes quanto à presença de anormalidades pós-natais específicas, compreendendo má formação congênita, bioquímica clínica, hematologia, defeitos imunológicos, e quadros mais complexos como alergia e comportamento. Estes projetos já revelaram cerca de 1000 novas mutações e este número vem aumentando a cada dia (ANGELIS et al., 2007;

MORSE III, 2007). Massironi et al. (2006) desenvolveram vários camundongos BALB/c mutantes com o agente mutagênico etil-nitroso-uréia (ENU) no Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Destes, o mutante chamado *anêmico* é de particular interesse devido à sua similaridade a um quadro de hemoglobina instável descrita em humanos, especificamente a hemoglobina instável de Santa Ana, doença rara com descrição de casos no Brasil, EUA, França, Hungria e Japão, que se manifesta com uma importante anemia hemolítica congênita crônica e evidente esplenomegalia.

A caracterização do fenótipo deste camundongo mutante - por meio da avaliação hematológica, estudos de sua hemoglobina, avaliação bioquímica, da anátomo-patologia e sua correlação com o quadro clínico da hemoglobina instável de Santa Ana descrita em humanos pode potencialmente indicá-lo como modelo animal para estudo desta doença humana congênita hereditária rara.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CAMUNDONGO E A GENÉTICA

O camundongo tem feito parte do imaginário humano, na literatura e na arte, com participações em lendas, mitos e mágicas há cerca de 6000 anos. Sempre teve grande empatia dos humanos, com o auge na criação do personagem Mickey Mouse de Walt Disney. Desde o século XIX, foram criados e colecionados como animais de estimação e foram sendo selecionados quanto a cor da pelagem, cor dos olhos e comportamento, por meio de cruzamentos consanguíneos. Além disso, os colecionadores de camundongos da Ásia, Europa ou América do Norte faziam trocas entre si. Não imaginavam, naquela época, que já estavam aplicando a seleção genética nestas populações (GUÉNET; BONHOMME, 2004; MORSE III, 2007; NGUYEN; XU, 2008).

Mendel impulsionou a genética com seus experimentos de transmissão de características, que foram iniciados em animais, especificamente camundongos, utilizando a cor da pelagem como característica a ser separada. Mas estes experimentos foram interrompidos devido ao questionamento de seus superiores quanto ao uso destes animais, fazendo com que ele terminasse o estudo com plantas. E até que se voltasse atrás e percebesse que suas leis poderiam ser aplicadas também a mamíferos, demorou cerca de 40 anos (GUÉNET; BONHOMME, 2004).

A família de roedores *Muridae* é composta por mais de 1326 espécies agrupadas em 281 gêneros. A maioria das linhagens de camundongos de laboratório tem contribuições genéticas das subespécies *Mus musculus musculus* e *Mus musculus domesticus*, com algumas pequenas contribuições de *Mus musculus molossinus* e *Mus musculus castaneus* (EPPIG, 2007; MORSE III, 2007).

O camundongo de laboratório pode ser especificado por sua linhagem ou nome do criatório, ao invés do nome da subespécie. No final dos anos 70, foi considerado o modelo de escolha para o estudo e compreensão da biologia de mamíferos de

forma geral e da biologia humana em particular, pois apresenta várias semelhanças ao ser humano quanto a fisiologia, desenvolvimento, anatomia e genética. O genoma de ambos apresenta aproximadamente o mesmo tamanho, o mesmo número de genes e a mesma ordem dos mesmos – a similaridade é de 99%. A maioria dos genes humanos tem sua contraparte no genoma do camundongo e suas funções também são muito semelhantes (BEDELL et al., 1997; EPPIG, 2007; NGUYEN; XU, 2008).

O estudo funcional dos genes estava limitado a mutações espontâneas e problemas advindos da consanguinidade, mas logo surgiram estratégias complementares para produzir mutações e auxiliar na identificação da função destes genes: a mutagênese em alvo e a mutagênese randômica ou aleatória (ADAMS, 2007; NGUYEN; XU, 2008).

Na mutagênese aleatória, após a indução da mutação, utiliza-se a técnica chamada de genética prospectiva (*"forward-genetic"*), que trata-se de uma abordagem direcionada ao fenótipo, para identificação e seleção de mutações que levem a um fenótipo específico e de interesse. O ENU (etil-nitroso-uréia), um dos agentes mais empregados nesta técnica, induz mutações pontuais randômicas, sem marcadores moleculares que possam facilitar a identificação das mesmas. Mas por outro lado, a mutagênese causada pelo ENU tem o potencial de produzir um painel de alelos mutantes para cada gene e, além disso, alguns estudiosos argumentam que estas mutações pontuais mimetizam melhor as condições de doenças hereditárias humanas do que os alelos suprimidos resultantes das mutagêneses por inserção. Assim como ocorre com as mutações espontâneas, a identificação do alelo mutante por ENU deve ser facilitado com o aumento da disponibilidade de recursos para estudos genômicos (BRAYTON et al., 2001; ADAMS, 2007; NGUYEN; XU, 2008).

2.2 ESTUDO DE PROTOCOLO MUTAGÊNICO MURINO

A frequência das mutações espontâneas nas células germinativas masculinas varia entre 0,008 e 1,8 x 10^{-5} mutações *per locus* e gameta, dependendo do ensaio fenotípico. Estas mutações compreendem vários tipos de lesão de DNA, incluindo mutações pontuais, pequenas deleções ou rearranjo cromossomal. Foram coletados mais de 1200 tipos de fenótipos mutantes de camundongos desta forma. Mas ficou claro que a quantidade de variantes era limitada devido à baixa frequência de mutação espontânea nos gametas. Novos métodos mutagênicos, fossem físicos ou químicos, se faziam necessários para ampliar o número de linhagens mutantes (ANGELIS et al., 2007).

As células germinativas reprodutivas são alvos muito suscetíveis à ação de agentes mutagênicos, e esta suscetibilidade é diferente conforme o estágio de maturação da célula, devido às alterações de várias vias metabólicas e seus efeitos sobre sua estrutura e bioquímica que ocorrem durante o desenvolvimento da célula germinativa. O emprego de machos ocorre por duas razões: 1) grande quantidade de ninhadas pode ser produzida por uma pequena quantidade de machos tratados ou expostos; 2) apenas alguns poucos agentes ambientais esterilizam permanentemente os machos, embora um período de esterilidade possa ser induzido com vários agentes químicos (ANGELIS et al., 2007).

Existem alguns pré-requisitos idealizados para as substâncias mutagênicas: facilidade de compra e preparo, toxicidade moderada e, se possível, que tenha ação em células germinativas pré-meióticas para que a mutação seja permanente. Alguns agentes apresentavam algumas destas virtudes, mas nenhum havia sido eleito como agente mutagênico de escolha, até que Russel e colaboradores, em 1979, descrevem a intensa atividade mutagênica do ENU, criando um marco na história da genética em camundongos (GUÉNET, 2004).

ENU, etil-nitroso-uréia, é o agente mutagênico mais poderoso conhecido. Induz mutações predominantemente em célula tronco de espermatogônia, por isso produz lesões mais graves como deleções intragênicas e intergênicas e aberrações cromossômicas estruturais. Apresenta altíssima frequência de mutação, de 150 a 600 mutações *per locus* (x10^{-5}), numa exposição de 250mg/kg, que equivale a uma mutação por gene a cada 175 a 655 gametas. É classificado como agente alquilante,

capaz de transferir seu grupo etil para o oxigênio ou nitrogênio de vários sítios reativos nas bases de DNA – geralmente os átomos de nitrogênio alquilados por ENU são eficientemente reparados, enquanto que os átomos de oxigênio alquilados são reparados com baixa eficiência, e não necessita de ativação metabólica. Se os sítios alquilados não forem reparados, resultarão em um mal pareamento das duas fitas de DNA e em substituição de pares de base durante a replicação do DNA. Induz principalmente mutações pontuais, como substituições de pares de base como transversão A/T → T/A e transição A/T para G/C, que compreendem cerca de 82% de todas as mutações induzidas, além de pequenas deleções de 20 a 50 pares de bases. As substituições de pares de base nos sítios A/T resultam em alterações na tradução da proteína (ANGELIS et al., 2007; GUÉNET, 2004).

Para conduzir experimentos mutagênicos, alguns fatores devem ser levados em conta, como a escolha da linhagem de camundongo; a predisposição genética definida da linhagem - já que algumas linhagens apresentam tendência a algum fenótipo sob determinados estímulos e a mutação pode ser acobertada; resposta ao tratamento com ENU, pois cada linhagem apresenta uma dose ótima de ENU estabelecida para que a mutação seja efetiva, considerando-se o período de esterilidade, a porcentagem de machos que readquirem a fertilidade, a taxa de mortalidade antes e depois de voltarem a ser férteis, e a frequência de mutação nas gerações seguintes (BRAYTON et al., 2001; ANGELIS et al., 2007).

Massironi e colaboradores (MASSIRONI et al., 2006) desenvolveram vários camundongos mutantes da linhagem BALB/c com ENU no Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, que toleram o tratamento com ENU, apresenta características fenotípicas conhecidas e seu polimorfismo genético está bem testado com microssatélites. Foram utilizados machos de 8 a 10 semanas de idade, que receberam quatro diferentes protocolos de exposição. Recuperaram a fertilidade após 7 meses, foram cruzados com fêmeas BALB/c normais e a primeira geração (G1) foi triada para detectar variações diferentes do fenótipo clássico (mutações dominantes). Para detecção das mutações recessivas, os machos G1 foram cruzados com fêmeas normais e cruzados novamente com as filhas (G2), para observação de mutações recessivas em G3.

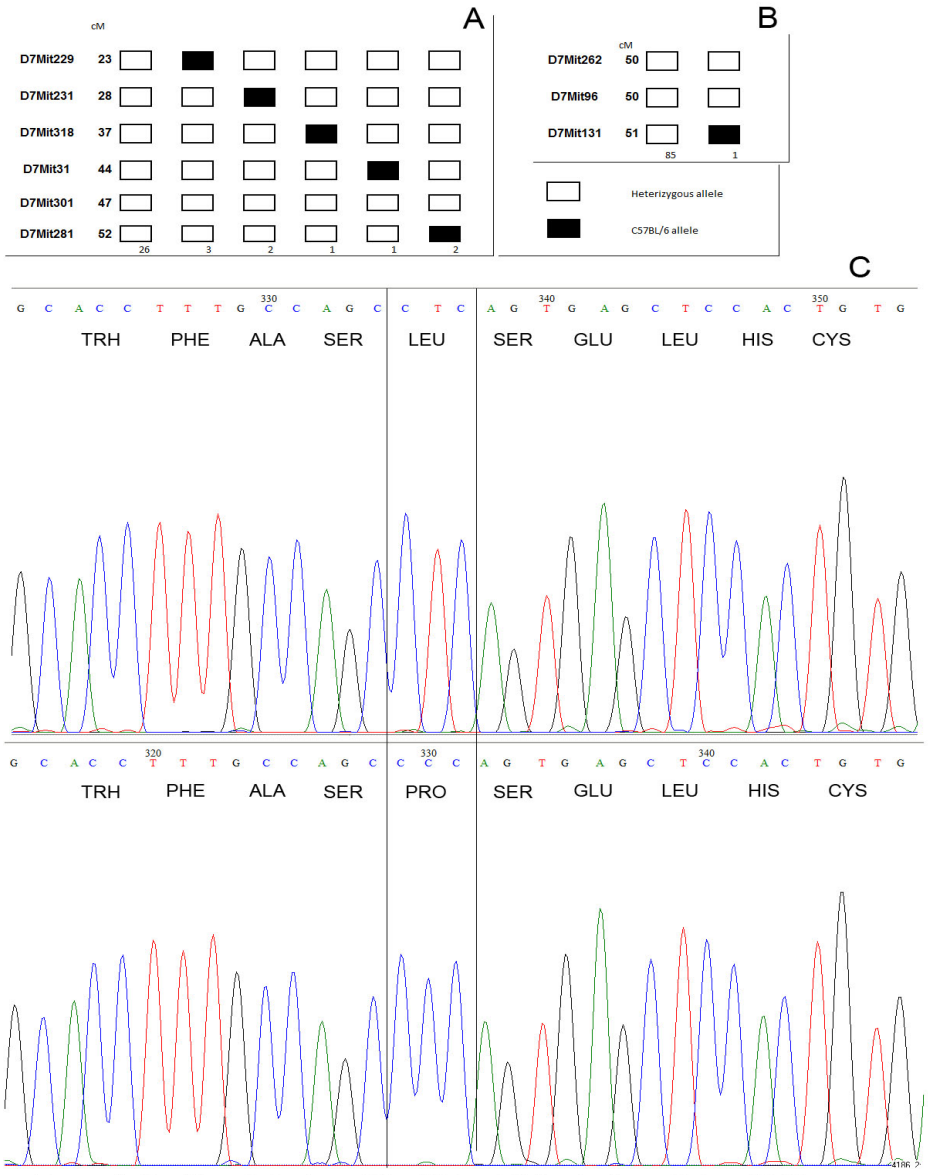
Onze mutações foram fixadas na linhagem BALB/c co-isogênica. As mutações

foram denominadas conforme o fenótipo apresentado: *sacudidor de cabeça* (mutação dominante)*, careca, equilíbrio, fraqueza, mergulhador, rodador, sem pelo* (todas mutações recessivas); *anêmico, bate palmas, cruza as pernas, nervoso*, estas quatro últimas mutações não haviam sido geneticamente mapeadas no momento da publicação.

Destes, o mutante chamado *anêmico*, é caracterizado por uma cor amarelada no nascimento, facilmente identificável na ninhada de BALB/c entre os animais normais. Os adultos apresentam orelhas e cauda extremamente pálidas, além de diminuição de hemácias e aumento de reticulócitos e leucócitos em relação aos animais normais. A fertilidade é ligeiramente reduzida em machos e fêmeas (MASSIRONI et al., 2006).

O estudo inicial de Cruz (2009) sobre este mutante apontava para uma mutação no cromossomo 7 no gene da cadeia globínica β da hemoglobina associado a um quadro de anemia e levantou a possibilidade de se tratar de um quadro de talassemia. O mapeamento genético teve continuidade por Massironi (2011, dados não publicados) (Figura 1) com uso de marcadores polimórficos entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c denominados SSLP (microssatélites), revelando a troca de aminoácidos (leucina por prolina) na posição 88 da globina, devido à troca T por C no gene da globina β Hbb-b1 no cromossomo 7, cujo genótipo corresponde à mutação da hemoglobina de Santa Ana, uma hemoglobina instável rara descrita em humanos.

Figura 1 - Clonagem posicional do alelo Hbb-b1 Santa Ana



Legenda: (A) Os haplótipos para o cromossomo 7 de 35 camundongos *backcross* estão indicados. (B) O haplótipo de 86 camundongos dos mesmos *backcross* estão indicados. As Figuras A e B apresentam, respectivamente, dois e um camundongos recombinantes que foram cruciais para a determinação da região mínima para o gene Hbb-b1. (C) A mutação pontual no gene Hbb-b1 no camundongo anêmico. A transição do nucleotídeo T para C causa uma alteração de amino ácido de leucina (LEU) para prolina (PRO) no amino ácido 88. Esta mutação pontual é localizada no segundo exon do gene Hbb-b1 no camundongo anêmico Fonte: Massironi, 2011 (dados não publicados)

2.3 A PROTEÍNA HEMOGLOBINA

Um animal pode apresentar mais de 100.000 tipos diferentes de proteínas (polipeptídeos com mais de 50 amino ácidos), que são classificadas em pelo menos quatro níveis de organização estrutural:

a) estrutura primária: ou sequência linear de amino ácidos;
b) estrutura secundária: que descreve como os aas estão espacialmente organizados, dentro dos segmentos da proteína (por exemplo, em forma de α–hélice ou folha-β);
c) estrutura terciária: refere-se às relações estereoquímicas dos domínios da sequência que se afastam uns dos outros quando analisados como parte da sequência linear da proteína;
d) estrutura quaternária: ou a forma como várias cadeias polipeptídicas se juntam para formar uma única molécula (ENGELKING, 2004; TELEN, 2009).

As proteínas globínicas apresentam estrutura secundária predominantemente do tipo α-hélice, que é a estrutura secundária mais comum encontrada em proteínas, com 3,6 resíduos de amino ácidos por volta. A estrutura secundária α–hélice é encerrada quando uma prolina é encontrada na estrutura primária, por causa de sua estrutura rígida e seus ângulos de ligação (WILLIAMSON, 1993; ENGELKING, 2004).

Proteínas que consistem de mais de uma cadeia polipeptídica geralmente apresentam estrutura quaternária, estabelecida por interações hidrofílicas externas (como o hidrogênio polar hidrofílico e ligações iônicas) e hidrofóbicas internas entre as cadeias laterais dos aa não-polares, ocasionalmente incluindo as pontes dissulfeto. Um exemplo seria a hemoglobina, que combina duas cadeias α, duas cadeias β e quatro grupos heme (ENGELKING, 2004).

As hemoproteínas têm sido utilizadas na natureza para diversos processos, desde a transferência de elétrons em gradientes eletroquímicos na cadeia respiratória até a captação de energia luminosa na fotosíntese (TELEN, 2009).

As hemoglobinas são algumas das hemoproteínas mais especializadas e difundidas existentes na natureza, encontradas em procariotos, fungos, plantas e animais. Permitem a ligação reversível do oxigênio ao heme, enquanto mantém o

ferro no estado 2+. Facilitam a troca do dióxido de carbono entre o pulmão e os tecidos e atuam no controle do tônus vascular mediado por óxido nítrico (TELEN, 2009).

Tal especialização se deve à necessidade de oxigenação extremamente eficiente dos tecidos, o que exige um mecanismo complexo e preciso, cujos principais pré-requisitos seriam: a) produção adequada de eritrócitos ou hemácias; b) preenchimento satisfatório destas células por moléculas de hemoglobina (300 x 10^6 ou 30pg por hemácia); c) estrutura muito precisa de suas respectivas cadeias globínicas (LOUKOPOULOS, 2002).

No eritrócito ou hemácia, a hemoglobina corresponde a cerca de 1/3 do peso da célula e a aproximadamente 90% do peso seco da hemácia; sua biossíntese está intimamente relacionada à eritropoiese (ENGELKING, 2004; TELEN, 2009).

Nos vertebrados, a hemoglobina pesa cerca de 64.500 daltons, com diâmetro molecular máximo de 6,4 nm. Para sua síntese, são necessárias três vias metabólicas complexas, que correspondem aos seus três componentes estruturais: a proteína (globina), a protoporfirina e o ferro (TELEN, 2009).

2.3.1 Síntese de globinas

Existem diferentes sítios genéticos estruturais para cada uma das cadeias polipeptídicas normais conhecidas que compõem a hemoglobina, em humanos, existem os genes α, β, γ, δ, ε. Na maioria da população humana, o sítio genético para a cadeia α é duplicado, de forma a termos quatro genes α idênticos (dois pares). Existem também pelo menos dois pares diferentes de genes γ, um deles codificando para uma cadeia γ com glicina ($^{G}\gamma$) na posição 136 (H14) e outro gene codificando para uma cadeia γ com alanina ($^{A}\gamma$) nesta mesma posição, embora sejam funcionalmente idênticas. Mas para as cadeias β e δ, existe apenas um par de genes para codificação de cada um deles (SCHECHTER et al., 2008; DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

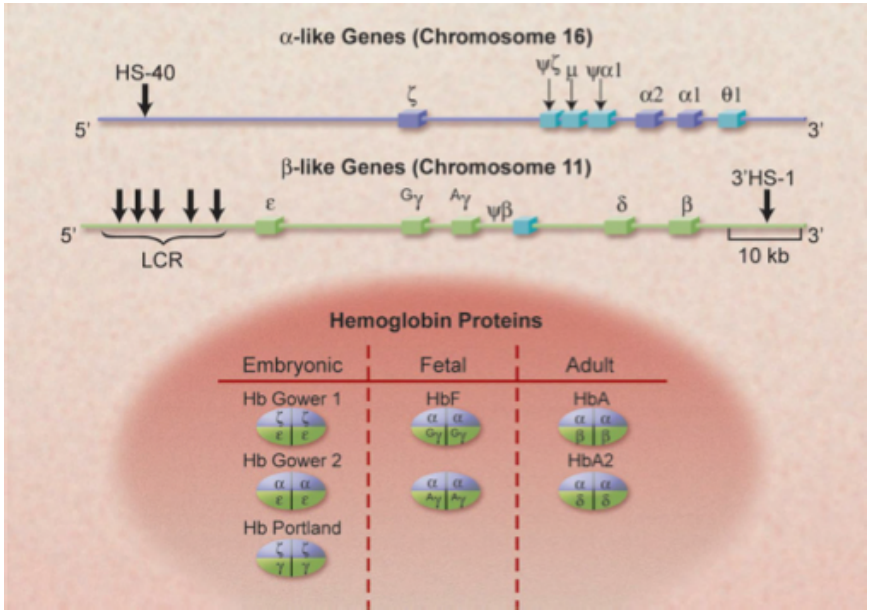
Os genes do grupo de cadeias α e do grupo de cadeias não α, ou grupo de cadeias β, estão localizados em cromossomos diferentes. Em humanos, o grupo dos

genes tipo α (cerca de 30kb) está localizado no braço curto do cromossomo 16 e contém também os sítios codificadores para a cadeia ζ. O grupo de genes da cadeia tipo β (cerca de 50kb) está localizado no cromossomo 11 e inclui os genes das cadeias globínicas γ ($^{G}\gamma$ e $^{A}\gamma$), δ e ε. A quantidade de genes, suas localizações cromossômicas, e seu controle ao longo do desenvolvimento variam bastante entre as espécies, mas a estrutura básica do gene da globina e as formas proteicas básicas estão conservadas entre todos os mamíferos ao longo da evolução (SCHECHTER et al., 2008; DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

A expressão da hemoglobina humana durante a ontogenia é caracterizada por três períodos de desenvolvimento: embrionário, fetal e adulto. Em cada uma destas fases, as necessidades de distribuição de oxigênio são diferentes e o desenvolvimento eritróide evolui para satisfazer estas necessidades. A transição de um período de desenvolvimento para outro é acompanhada pela expressão sequencial e coordenada dos genes de cada família, levando a produção de diferentes pares de globinas – o que leva a produção de diferentes hemoglobinas, permitindo sua expressão adequada durante os diferentes períodos de desenvolvimento. Os genes do grupo das globinas tipo α são capazes de produzir dois tipos de globinas: ζ e α, ambas de 141 aa. A cadeia ζ é uma globina embrionária produzida durante as 8 primeiras semanas do desenvolvimento, enquanto a α é produzida durante os períodos seguintes. Os membros da família do gene da globina β, todos com 146 resíduos de aa, incluem a globina embrionária ε, a globina fetal γ e as duas globinas expressas durante a fase adulta, δ e β (Figura 2) (SCHECHTER et al., 2008; DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

Associando-se estas cadeias, as diferentes hemoglobinas são expressas. No início da fase embrionária, são produzidas as hemoglobinas Gower-1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower-2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$) no saco vitelínico, região para-aórtica e no fígado. Estas Hb embrionárias apresentam cooperatividade entre as subunidades e atuam como carreadores de oxigênio nas células eritróides derivadas das células progenitoras do saco vitelínico. Apresentam afinidade pelo oxigênio similar ao sangue fetal.

Figura 2 - Estrutura genômica dos *clusters* dos genes das globinas do tipo α e do tipo β, nos cromossomos 16 e 11, em seres humanos



Legenda: Os genes funcionais do tipo α estão em azul escuro e os pseudogenes, em azul claro; dois destes (μ e θ-1) codificam pequenas quantidades de RNA. Os genes tipo β funcionais estão em verde claro. Os elementos controladores, HS-40 e LCR (locuscontrolregion), estão em suas localizações aproximadas. O *cluster* do gene α é aproximadamente 2/3 do comprimento do *cluster* do gene β; é transcrito do a partir do telômero no sentido do centrômero, o contrário do *cluster* β. Vários tipos de hemoglobina são feitos a partir destes genes, conforme o estágio de desenvolvimento, como mostra o esquema na parte inferior da figura. Fonte: (SCHECHTER et al., 2008)

Nos humanos, após 8 semanas de desenvolvimento do embrião, a eritropoiese muda do saco vitelínico para o fígado do feto e as hemoglobinas embrionárias são substituídas pela hemoglobina fetal F ($\alpha_2\gamma_2$), que é a hemoglobina predominante até o nascimento, de forma que 75% das cadeias γ desta Hb é composta pela $^{G}\gamma$. As hemácias com Hb F tem maior afinidade por oxigênio do que as hemácias de adultos. Isto permite ao feto competir efetivamente pelo oxigênio no sangue materno e esta propriedade da Hb F se deve a diferenças nos amino ácidos no terminal amino das cadeias γ, que impedem a ligação do 2,3 BPG, que é um modificador alostérico da ligação com o oxigênio. A Hb F também tem um efeito Bohr alcalino aumentado, pelo qual a afinidade por oxigênio é aumentada conforme a hemoglobina passa pela vasculatura pulmonar (SCHECHTER et al., 2008; DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

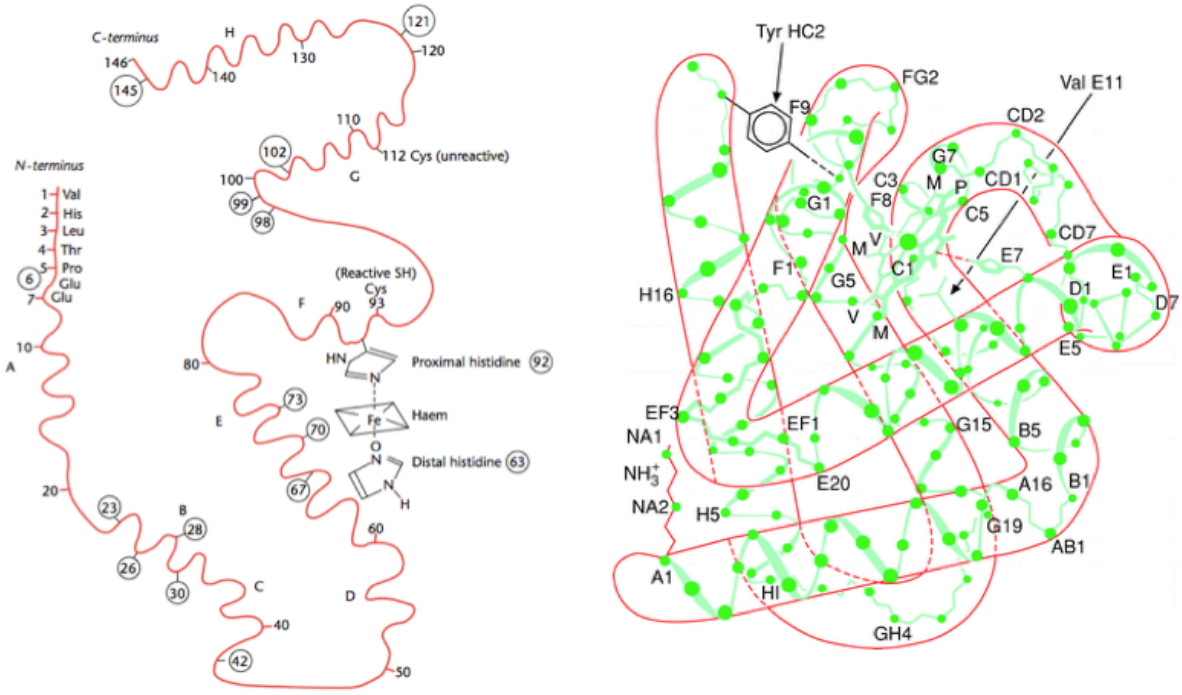
Com aproximadamente 20 semanas de desenvolvimento fetal, o sítio de eritropoiese começa a mudar do fígado e baço para a medula óssea, onde as células progenitoras apresentam aumento da expressão de globinas adultas, α e β, de forma que a Hb A ($\alpha_2\beta_2$) adulta vai progressivamente aumentando ao longo da gestação até que corresponda a quase 20% no momento do nascimento. Depois de 25 a 30 semanas após o nascimento, a Hb F diminui cerca de 10% a cada duas semanas, até atingir a quantidade normal para adultos de 2%.

A Hb A, $\alpha_2\beta_2$, é a Hb adulta predominante, constituindo cerca de 96% de hemoglobina adulta total. A Hb A_2 adulta ($\alpha_2\delta_2$) tem produção iniciada ao redor da 35^a semana de gestação e constitui menos de 3,5% da hemoglobina total adulta. Em adultos, a Hb F corresponde a cerca de 1% da hemoglobina total adulta, sendo que cerca de 60% das cadeias γ desta Hb F é $^A\gamma$ (DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

A partir destes genes, são transcritos os RNA mensageiros (mRNA) que enfim, são traduzidos nos ribossomos em cadeias polipeptídicas, sob estímulos de pelo menos oito fatores (dentre eles, eIF, erythrocyte initiation factor, fator de iniciação eritróide). Assim que estas cadeias polipeptídicas são liberadas dos ribossomos, elas rapidamente e espontaneamente formam os dímeros $\alpha\beta$ e os tetrâmeros $\alpha_2\beta_2$, aparentemente sem participação de enzimas ou cofatores neste processo (DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

Apesar das diferenças entre as estruturas primárias das cadeias globínicas α e não-α, suas estruturas secundárias são muito semelhantes. Todas as cadeias globínicas apresentam oito segmentos helicais designados por letras de A a H. As hélices correspondem a cerca de 75% da molécula e entre elas, existem sete segmentos não-helicais: NA, AB, CD, EF, FG, GH e HC. Este arranjo é importante estruturalmente porque as hélices são relativamente rígidas e lineares, enquanto os segmentos não-helicais conferem a flexibilidade da molécula. Apresentam ainda uma terminação N- e outra C- (Figura 3) (LOUKOPOULOS, 2002; DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

Figura 3 - Estruturas secundária e terciária de cadeias globínicas



Legenda: À esquerda, estrutura secundária da cadeia globínica β humana. O bolsão do heme é formado entre a histidina 92 (proximal) e a histidina 63 (distal). À direita, estrutura terciária da globina α humana. O anel plano tetrapirrólico do heme fica entre a histidina F8 e a histidina E7, o ponto central corresponde à molécula de ferro. Fonte: (LOUKOPOULOS, 2002)

Um dado aa na cadeia polipeptídica da Hb pode ser indicado pelo seu número sequencial ou pelo número na hélice. No sistema sequencial, o aa terminal-*N* é considerado o número 1 e cada aa que o sucede recebe a próxima numeração até atingir o terminal-C. Desta forma, nas cadeias α, os aas são numerados de 1 a 141 e nas cadeias β, γ e δ, de 1 a 146. No sistema de hélices, cada aa é designado por uma letra e um número que indicam em que hélice este aa está e a sua posição na hélice, respectivamente. Este sistema tem sido cada vez mais utilizado porque mostra a homologia entre as cadeias e tem maior significado estrutural. Por exemplo, a histidina à qual o heme se liga é o aa 87 da cadeia α e 92 nas cadeias β, γ e δ; a designação helical para esta mesma histidina é F8, que é a mesma designação para todas as cadeias (DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

As propriedades funcionais da hemoglobina são primariamente determinadas pelos moldes característicos das cadeias de aa das proteínas globínicas. E a globina

é dobrada de tal forma que as cadeias laterais ionizáveis dos aa fiquem distribuídas ao longo da superfície externa da estrutura, onde possam formar pontes de hidrogênio com as moléculas de água - o que lhe confere solubilidade, enquanto os resíduos hidrofóbicos ficam internalizados, formando um estrutura estável e precisa, que exclui água de seu interior (WILLIAMSON, 1993; SCHECHTER et al., 2008; DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

2.3.2 Heme

A produção das globinas envolve várias etapas que sofrem interferências de fatores estimulantes e inibidores. O heme, por exemplo, estimula a transcrição e o processamento do mRNA e inativa um fator inibidor que fosforila o fator de inicialização eritróide 1 (eIF-1), promotor da ligação do RNA transportador iniciador ($tRNA^{met}_{F}$) aos ribossomos. Na ausência do heme, além da diminuição da estimulação, ocorre acúmulo de inibidor de síntese de globina (DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

O grupo heme é o complexo ferroso da protoporfirina IX, mas o termo heme também é empregado de forma genérica para indicar o ferro da protoporfirina IX, sem considerar o estado de oxidação do ferro. Portanto, a hemoglobina, a peroxidase e o citocromo c são todos proteínas heme, mesmo que o ferro esteja na forma ferrosa na Hb, férrica na peroxidase e em qualquer uma das formas no citocromo c (DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

A protoporfirina IX é um tetrapirrole, uma estrutura complexa macrociclo composta por quatro anéis pirrólicos unidos, designados A, B, C e D. Do lado externo do complexo, cada anel apresenta duas cadeias laterais às quais podem se ligar íons de H^+ ou seus substitutos, e as pontes de carbono que ligam os anéis são chamados α,β,γ e δ, daí a molécula ser descrita como 1,3,5,8 metil,2,4-vinil-6,7, ácido propiônico-porfirina ou simplesmente, porfirina. A designação protoporfirina IX vem do fato de serem possíveis 15 isômeros de protoporfirina, mas apenas o isômero IX é encontrado na natureza. A inserção do ferro ferroso na protoporfirina IX é catalisada pela enzima heme sintetase, presente na membrana interna

mitocondrial. Entre eles e outros componentes deste ciclo, há um complexo mecanismo de regulação (DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

2.3.3 Heme + globina

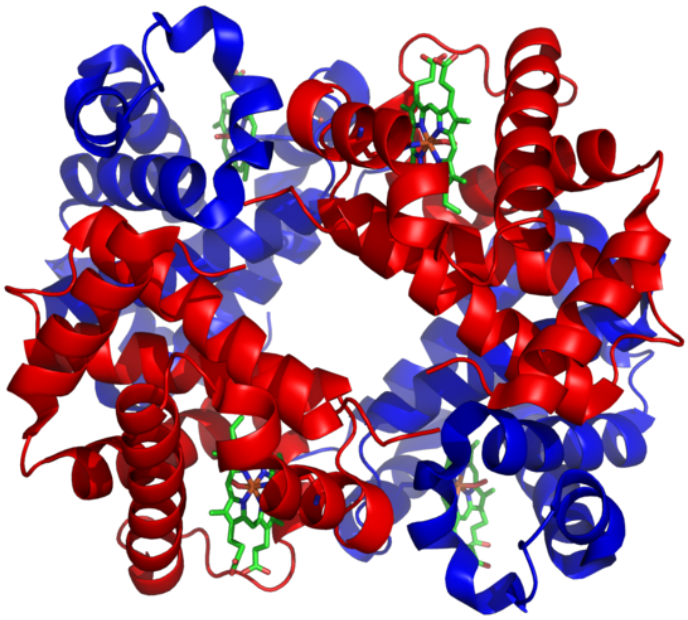
Após a tradução do mRNA da globina e da síntese de globina, o heme se associa às globinas e as cadeias α prontamente formam pares com os membros da família da globina β. Esta ligação se deve em grande parte pela diferença de cargas: as cadeias α são positivamente carregadas (pI = 8,1) e as cadeias tipo β são negativamente carregadas (pI = 6,6), de forma que quanto maior a diferença de carga, maior a atração eletrostática (DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

A associação do grupo heme com a globina é essencial para conferir solubilidade ao heme e para permitir sua ligação de forma reversível com o oxigênio molecular, protegendo-o da oxidação. O grupo heme está localizado num bolsão hidrofóbico dentro da subunidade globínica, onde as principais forças estabilizantes envolvem as interações hidrofóbicas entre o grupo heme e as cadeias laterais dos aas que margeiam este bolsão. Os grupos proprionatos do heme, que estão voltados para o exterior do bolsão do heme, formam pontes de hidrogênio estabilizadoras adicionais. As interações diretas heme-globina envolvem resíduos de aas nas regiões E e F da hélice e nas dobras CD e FG da estrutura da globina, composto principalmente por cadeias invariáveis de aas conservadas em todas as hemoglobinas de vertebrados. Estas forças não apenas estabilizam o grupo heme, mas são as principais forças contribuintes para a estabilidade da globina em si (WILLIAMSON, 1993).

O bolsão do heme é local de muitas interações dinâmicas, envolvendo a ligação do oxigênio com a hemoglobina. O heme fica suspenso em uma fenda não polar entre as hélices E e F, enquanto as hélices B, G e H constituem o fundo ou o “chão” do bolsão. O ferro do heme forma uma ligação covalente com o nitrogênio da histidina proximal em F8. Além disso, o heme forma ligações de van der Walls com outras partes da molécula, contribuindo de forma importante com a estrutura terciária. Sem o heme, as regiões helicais centrais C, D, E e F se desdobram,

acarretando em diminuição da solubilidade, como ocorre eventualmente em algumas hemoglobinas instáveis com substituição de aas (WILLIAMSON, 1993; DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

Figura 4 - Esquema da estrutura da molécula de hemoglobina



Legenda: Observe o arranjo das α-hélices (representadas em forma de fitas) em cada unidade $\alpha\beta$ (vermelho e azul, respectivamente) e os quatro grupos heme (em verde) com seus átomos de ferro nos centros, nos quais se ligam as moléculas de gases.
Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:1GZX_Haemoglobin.png>, acesso em: 10 jun. 2012.

A função da hemoglobina (Figura 4) é principalmente fazer o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos, mas também interage especificamente com outros três gases: o dióxido de carbono (CO_2), monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO), que tem importantes papéis biológicos. O CO_2 na verdade não é transportado ligado aos átomos de ferro, é dissolvido no sangue por interações com os resíduos amino-terminais da Hb como um complexo carbamino fraco. Para tanto, deve contemplar os quatro quesitos delineados por Sir Joseph Barcroft, famoso

fisiologista britânico que estudou a oxigenação sanguínea e a hemoglobina: deve ser capaz de transportar grandes quantidades de oxigênio, deve ser altamente solúvel, deve captar e liberar o oxigênio em “pressões adequadas” e deve ser um bom tampão; papéis que a hemoglobina normal cumpre bem (SCHECHTER et al., 2008; DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

O oxigênio molecular liga-se entre o ferro do heme e o resíduo da histidina distal (E7). A histidina E7, juntamente com a valina E11 da cadeia β são aas cruciais, guardiões do acesso ao heme. A ligação do oxigênio à molécula de ferro faz com que a hemoglobina sofra alterações conformacionais que afetam a ligação do oxigênio aos outros sítios de heme. Parte disso se deve às interações no bolsão do heme. As duas histidinas da globina (E7, F8) estão localizadas exatamente sobre e abaixo do ferro, no plano do anel pirrólico no estado de oxihemoglobina. No estado desoxi, a ligação entre o nitrogênio da histidina proximal e o ferro sofre considerável tensão, deslocando o ferro do plano do anel. Esta tensão é transmitida para as outras partes da molécula e é, em parte, responsável pelo estado tenso da desoxihemoglobina (T). A adição de duas moléculas de oxigênio, que se liga ao átomo de ferro no anel do heme, resulta na formação de uma ponte de hidrogênio entre o átomo de oxigênio não diretamente ligado ao ferro e o nitrogênio imidazol da histidina em E7 (a histidina distal) (WILLIAMSON, 1993; DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

Quando o oxigênio se liga ao ferro, ocorre uma mudança no estado de spin dos elétrons do ferro, relaxando a ligação covalente com a histidina proximal, permitindo que o ferro se mova para o plano do anel pirrólico, relaxando a molécula, contribuindo com o estado relaxado (R). As alterações conformacionais da Hb parecem ser maiores após a adição de três moléculas de O_2. De forma geral, proteínas que passam por alterações alostéricas do estado tenso para o relaxado interagem de forma melhor com o substrato no estado relaxado (R) (DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

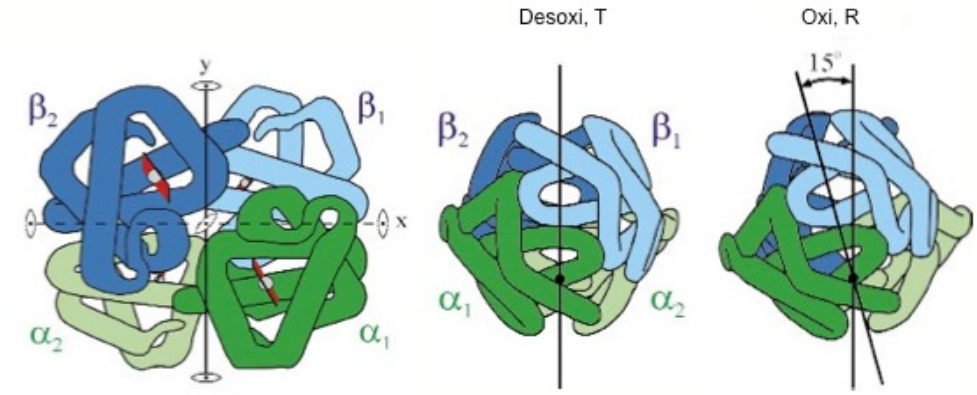
A subunidades do tetrâmero de hemoglobina apresentam dois tipos de contato: entre os dois dímeros de $\alpha\beta$, que são o contato $\alpha_1\beta_2$ (e seu correspondente $\alpha_2\beta_1$); e entre as subunidades α e β de cada dímero, os contatos $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$. Os contatos entre as cadeias iguais ($\alpha_1\alpha_2$ e $\beta_1\beta_2$) são limitadas e de pouca importância. O primeiro tipo é chamado de contato deslizante, pois ocorre um rearranjo estrutural

considerável entre a interface $\alpha_1\beta_2$ na transição entre as conformações desoxi e oxi da hemoglobina. Em contraste, a interface entre as subunidades α e β de cada dímero é relativamente rígida. O número de contatos na interface $\alpha_1\beta_2$ ($\alpha_2\beta_1$) muda durante a oxigenação e desoxigenação da hemoglobina, mas em termos gerais, apresenta menos contatos envolvidos do que na interface relativamente fixa $\alpha_1\beta_1$ ($\alpha_2\beta_2$). Por conta destas modificações da molécula, existem duas estruturas quaternárias para Hb: uma para a forma desoxigenada e outra para a forma oxigenada, sendo a principal diferença entre elas a natureza do contato $\alpha_1\beta_2$. A configuração da desoxihemoglobina de baixa afinidade do tetrâmero é a estrutura mais organizada de todas, envolvendo mais interações estabilizadoras do que a configuração oxihemoglobina de alta afinidade, que é menos contida e mais semelhante à estrutura da mioglobina. Esta é a base dos termos T (tenso) da forma desoxigenada e R (relaxada) da forma oxigenada (Figura 5) (WILLIAMSON, 1993; DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

Quando a Hb está completamente saturada, cada grama de Hb carrega 1,39 mL de oxigênio. O grau de saturação depende da PO_2, que geralmente vai de 100 mmHg no sangue arterial a aproximadamente 35 mmHg no sangue venoso. A relação entre PO_2 e a saturação de oxigênio da hemoglobina é descrita pela curva de dissociação de oxigênio da hemoglobina (Figura 6). As características desta curva estão relacionadas com as propriedades da própria Hb e com o ambiente em que está a hemácia, principalmente quanto ao pH, temperatura e concentração de 2,3 BPG, os fatores de maior influência sobre a afinidade pelo oxigênio (DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

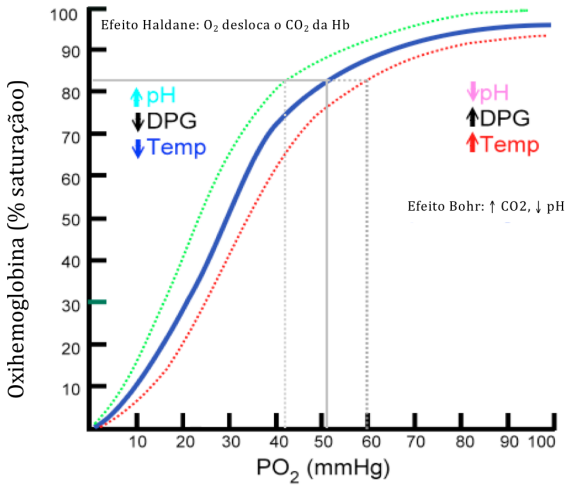
O fato da Hb ser composta por quatro subunidades permite que ela apresente uma característica chamada cooperatividade de subunidades, que descreve o processo em que a ligação de oxigênio com uma subunidade aumenta a afinidade por oxigênio das outras subunidades, sem interação direta entre os hemes. Esta propriedade alostérica da Hb permite uma rápida mudança de afinidade pelo oxigênio durante o tempo que a hemácia passa pelo leito capilar (DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

Figura 5 - Estrutura esquemática da desoxi e oxihemoglobina



Legenda: Nos esquemas à direita, observa-se as pseudo-conformações em torno do eixo x. Esta alteração conformacional quaternária consiste na rotação do dímeros $\alpha\beta$ simetricamente relacionados num ângulo aproximado de 15° de um em relação ao outro e uma translação de cerca de 0,1 nm ao longo do eixo de rotação. Fonte: (EATON et al., 1999)

Figura 6 - Curvas de dissociação do oxigênio da hemoglobina humana



Legenda: Curva de dissociação do oxigênio da hemoglobina humana normal (azul) em comparação com a curva de Hb com alta afinidade por oxigênio (verde) e com baixa afinidade por oxigênio (vermelho)A curva de dissociação normal é ligeiramente desviada para a esquerda quando o pH do sangue aumenta e quando a há diminuição da temperatura e da concentração de 2,3 BPG. O desvio contrário, ou seja, à direita, ocorre quando o pH diminui ou quando há aumento de temperatura ou de concentração de 2,3 BPG. Adaptado de http://en.wikipedia.org/wiki/File:Oxyhaemoglobin_dissociation_curve.png, acesso em: 17 jun.12

2.3.4 A hemácia

A hemácia é uma célula anucleada altamente diferenciada com altíssimas concentrações de hemoglobina, resultando num mecanismo de transporte extremamente eficiente. Sem organelas citoplasmáticas como o núcleo, mitocôndrias ou ribossomos, a hemácia é incapaz de sintetizar novas proteínas, realizar as reações oxidativas associadas à mitocôndria ou sofrer mitose. Mais de 95% de suas proteínas citoplasmáticas corresponde à Hb, o restante inclui principalmente enzimas necessárias para a produção de energia e para a manutenção do estado reduzido funcional da Hb. Mas ainda expressa proteínas de associação a outras células, dentre elas várias proteínas transportadoras, moléculas de adesão, receptores e vias sinalizadoras, tornando-a reconhecida por realizar várias funções cruciais e complexas no corpo (SCHECHTER et al., 2008; DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

A Hb, se estivesse livre no plasma, exerceria uma pressão osmótica aproximadamente cinco vezes maior do que a pressão produzida pelas proteínas plasmáticas. Ao ser incluída em hemácias, a viscosidade do sangue pode ser mantida em um baixo grau, a água não é removida dos tecidos e o fluxo sanguíneo é possível, mesmo com esta enorme quantidade de proteína. Além disso, livre no plasma, a hemoglobina estaria sujeita a desnaturação oxidativa (DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

Na maioria das espécies, a hemácia tem o formato de esfera achatada bilateralmente endentada, classicamente descrita como formato discoide bicôncavo. É notável sua habilidade de manter a integridade da membrana, enquanto por outro lado apresenta extrema deformabilidade sob circunstâncias fisiológicas normais, garantida pela elasticidade e viscosidade da membrana (DESSYPRIS; SAWYER, 2009).

2.4 HEMOGLOBINAS INSTÁVEIS

As anomalias hereditárias na síntese de hemoglobina de humanos podem ser divididas em dois grupos: aquelas caracterizadas por variantes de hemoglobina estruturalmente anormais, quadros este chamados de hemoglobinopatias; e o grupo em que uma ou mais cadeias polipeptídicas normais são sintetizadas em quantidade reduzida, quadro este denominado talassemia (LUKENS, 2004).

Os métodos de determinação da sequência proteica e cristalografia por raio X desenvolvidos nos anos 50 permitiram o sequenciamento de amino ácidos de várias hemoglobinas e o arranjo espacial de seus átomos. Estes estudos, dentre os primeiros a serem realizados para qualquer proteína, conduzidos por Max Perutz, ganhador do Prêmio Nobel, e seus colegas no fim dos anos 60, logo forneceu explicações detalhadas da relação entre a função da hemoglobina como transportadora de oxigênio e sua estrutura molecular. Adiante, esta informação permitiu explicar os fenótipos clínicos da maioria das centenas de mutações dos genes das globinas e das proteínas, que causam alterações na estrutura da molécula e, consequentemente, na sua função, compondo as hemoglobinopatias (SCHECHTER et al., 2008).

As hemoglobinopatias podem ser divididas conforme a funcionalidade da variante: Hb funcionalmente normais – são clinicamente silenciosas; variantes com formação de polímeros (Hb S) ou cristais (Hb C), que levam a doenças hemolíticas; variantes instáveis, caracterizadas por quadros de hemólise intermitente ou crônica; alterações estruturais com aumento da afinidade da Hb por oxigênio, com quadro clínico de eritrocitose; alterações estruturais com diminuição da afinidade da Hb por oxigênio, com quadro clínico associado a cianose; mutações que mantém o ferro da Hb no estado férrico , cujo quadro é de metahemoglobinemia (LUKENS, 2004).

Atualmente, existem mais de 900 variantes estruturais descritas, a maioria ocasionada por substituição de um ou dois amino ácidos e, ocasionalmente, com inserção ou deleção de aa (ou ambos), truncamento de aa ou extensão da cadeia de aa na proteína hemoglobina. A maior parte dos casos ocorre na cadeia β da globina (cerca de 400 variantes descritas), mas alterações nas cadeias α (cerca de 200 variantes), γ (cerca de 70 variantes) e δ (cerca de 30 variantes) também são

relativamente comuns. As mutações na cadeia globínica β tem efeitos muito mais graves do que as mutações na cadeia α por causa da diferença da quantidade de genes presentes – dois para a cadeia β e quatro para a cadeia α, e a consequente proporção de hemoglobina total anormal resultante. Consequentemente, a maioria das hemoglobinas instáveis clinicamente significantes envolvem as alterações em cadeia β, com apresentação de anemia hemolítica no começo da infância, quando a HbF é substituída pela HbA como a principal hemoglobina na hemácia. A expressão clínica das variantes de Hb instável é bastante variável. Em alguns casos, pode ocorrer anemia crônica grave persistente, enquanto em outros quadros pode ocorrer uma discreta hemólise, que pode ser agravada apenas se houver exposição a drogas oxidantes ou infecções (WILLIAMSON, 1993; LUKENS, 2004; KIMURA et al., 2008).

Alguns mutantes podem apresentar instabilidade molecular da Hb suficiente para causar uma anemia hemolítica congênita com corpúsculos de Heinz (CHBA – congenital Heinz body haemolytic anaemia); a hemoglobina precipita dentro das hemácias circulantes na forma de corpúsculos de Heinz, geralmente levando a uma destruição prematura das hemácias e anemia. Além disso, ocorre um rompimento das interações estabilizadoras na molécula de Hb e tende a ocorrer desvio do equilíbrio existente entre os estados desoxi (T) e oxi (R) em direção à estrutura mais relaxada, de alta afinidade por oxigênio. As CHBA apresentam um padrão autossômico dominante de hereditariedade. Acometem quase que exclusivamente indivíduos heterozigotos, sendo a homozigose excepcionalmente rara (WILLIAMSON, 1993).

Estas mutações geralmente acometem interações críticas que conferem estabilidade à subunidade globínica e ao tetrâmero de hemoglobina, por exemplo: rompimento das ligações nas interfaces das subunidades, alterações estéricas acometendo a fração hidrofóbica no interior da subunidade globínica de forma a expor e/ou perder o heme e romper a homeostase do bolsão do heme; podem ocorrer perturbações na estrutura secundária da globina, como por exemplo, a introdução de uma prolina em uma hélice ou pela inserção ou deleção de aa (WILLIAMSON, 1993).

A única ligação covalente entre o grupo heme e a proteína globina ocorre entre o ferro do heme e o resíduo da histidina proximal (F8). Existem várias

variantes de hemoglobina com mutações neste resíduo e, na maioria dos casos, eles apresentam ligação com o heme extremamente fraca, com tendência a rápida perda de heme da subunidade anormal, levando a uma grande proporção de hemoglobina depletada de heme (WILLIAMSON, 1993).

As mutações que alteram os contatos entre as subunidades, principalmente na interface $\alpha_1\beta_1$, provavelmente causam mais instabilidade da hemoglobina, ao passo que alterações na interface $\alpha_1\beta_2$ estão geralmente associadas a mudanças na afinidade da hemoglobina por oxigênio (WILLIAMSON, 1993).

Várias Hb instáveis apresentam mutações que não envolvem diretamente o contato entre heme e aa ou resíduos nas interfaces das subunidades, mas podem ser mutações que causem um desmembramento do molde da estrutura da subunidade globínica. A globina é dobrada de tal forma que as cadeias laterais ionizáveis dos aa fiquem distribuídas ao longo da superfície externa da estrutura, onde elas possam formar pontes de hidrogênio com as moléculas de água, enquanto os resíduos hidrofóbicos ficam enterrados no lado interno, formando um estrutura estável e precisa, que exclui água de seu interior. Consequentemente, mutações que introduzam um aa ionizável no interior da molécula são altamente rompentes. Cerca de 1/3 das Hb instáveis envolve este tipo de substituição de resíduo sem carga por outro com carga (WILLIAMSON, 1993).

Existem ainda resíduos anti-hélice ou que quebram a hélice, particularmente a glicina e a prolina. A prolina é tolerada quando for um dos três primeiros aa de uma hélice, mas em qualquer outra posição, ela causará interrupção da hélice. Até 1984, existiam 25 Hb mutantes com diminuição da estabilidade por introdução de um resíduo de prolina em uma cadeia α hélice (WILLIAMSON, 1993).

Outras hemoglobinas instáveis podem ocorrer devido a grandes alterações estruturais resultantes de deleções de aa. Estes mutantes podem ter 1 a 5 resíduos deletados e incluem a deleção de aa das regiões de dentro da hélice assim como de sequências inter-hélices. Consequentemente, podem ter efeitos principalmente na estrutura secundária, no molde terciário das subunidades e nas interações intersubunidades no tetrâmero de hemoglobina (WILLIAMSON, 1993).

A maioria das Hb instáveis também apresenta alguma alteração quanto a sua afinidade por oxigênio. Algumas apresentam diminuição da afinidade, mas a maioria apresenta aumento de afinidade por oxigênio. O aumento da afinidade por oxigênio

talvez seja mais previsível, já que a configuração da desoxihemoglobina de baixa afinidade do tetrâmero é a estrutura mais organizada de todas, envolvendo mais interações estabilizadoras do que a configuração oxihemoglobina de alta afinidade que é menos contida (WILLIAMSON, 1993).

2.4.1 Oxidação e precipitação da Hb

A oxidação da Hb ($HbFe^{2+}$) a metahemoglobina ($HbFe^{3+}$) ocorre normalmente nas hemácias, em cerca de 3% da hemoglobina por dia. Nas hemácias, existem processos de redução para evitar o acúmulo de metahemoglobina e, consequentemente, diminuir a capacidade de carrear o oxigênio. Dentre eles, o principal mecanismo anti-oxidante envolve a enzima NADH-metahemoglobina redutase.

Uma característica comum entre as Hb instáveis é o aumento da tendência de auto-oxidação para formar metahemoglobina, tanto in vitro quanto in vivo. Este é o primeiro passo do processo que leva à precipitação intracelular de Hb na forma de corpúsculos de Heinz; embora a metahemoglobina normal não precipite prontamente.

A diferença entre a metaHb normal e a metaHb formada pela oxidação das Hbs instáveis é a formação de hemicromos. Podem derivar de metaHb quando o sítio de ligação do heme se liga a um átomo de nitrogênio que pode ser de uma cadeia lateral do resíduo distal da histidina (E7), formando o hemicromo reversível, ou o nitrogênio pode vir de outro aa próximo formando o hemicromo irreversível. A formação destes elementos requer uma flexibilidade da estrutura da molécula de Hb, como o que ocorre nas Hbs instáveis com distorção da estrutura interna, particularmente ao redor do ambiente do heme, o que permite o contato entre o ferro do heme com as cadeias lateriais dos aa internos e, desta forma, a ligação direta. A conversão de metaHb a hemicromo é fator determinante na precipitação de Hbs instáveis, pois sabe-se que os hemicromos são os principais constituintes dos corpúsculos de Heinz (WILLIAMSON, 1993).

Algumas Hbs instáveis apresentam uma particular tendência a perder o

heme, deixando para trás uma estrutura de globina mais instável ainda, que rapidamente sofrerá desnaturação e precipitação. O estado de oxidação do ferro do heme é um fator importante na perda do heme: na forma Hb ferrosa, o grupo se mantém firmemente ligado a globina; na forma Hb férrica, o grupo heme tem uma afinidade pela globina muito menor. Associado ao fato de que algumas Hbs instáveis tem mais tendência a formar metaHb, estas também tendem a ter perda de heme, sendo este um importante mecanismo de desnaturação da Hb e formação de corpúsculo de Heinz nas principais Hbs instáveis (WILLIAMSON, 1993).

A anemia hemolítica da hemoglobina instável tem com principal causa de hemólise a formação de corpúsculos de Heinz. Os corpúsculos de Heinz (CH) se aderem a membrana da célula provavelmente por interações hidrofóbicas, mas existem também evidências de interações iônicas entre os hemicromos e a proteína banda 3 da membrana das hemácias, formando agregados. As hemácias com CH apresentam menor flexibilidade, levando à destruição celular no baço e menor permeabilidade (WILLIAMSON, 1993).

O mecanismo de destruição no baço se deve à retirada dos CH e a membrana celular ao seu redor, formando uma célula cada vez mais rígida. Além disso, CH muito grandes podem resultar em aprisionamento da célula em leito capilar. Existem também evidências de um mecanismo imunológico envolvendo anticorpos que se depositam sobre as hemácias com CH, fazendo com que sejam reconhecidas por macrófagos no fígado e no baço, devido a modificação de proteínas da membrana que passam a ser reconhecidas por anticorpos autólogos. (WILLIAMSON, 1993).

Além disso, a oxidação da Hb leva à formação de oxidantes como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil, que podem levar a lesão de outros constituintes da hemácia, particularmente a peroxidação de lipídeos da membrana e as ligações cruzadas de proteínas de membrana, alterando a deformabilidade celular (WILLIAMSON, 1993).

A quantidade de Hb instável nas hemácias circulantes é invariavelmente menor do que teoricamente se esperaria, mas algumas explicações poderiam ser: a degradação proteolítica da cadeia globínica instável, que ocorre primariamente na medula óssea, antes que o reticulócito seja liberado para a circulação; e a perda seletiva subsequente da Hb instável pelas células circulantes devido a formação e remoção de CH. Mutações que tenham efeito sobre o molde da cadeia globínica

provavelmente apresentarão destruição das células principalmente pelo mecanismo de degradação proteolítica e terão menor quantidade de Hb instável na circulação. Por outro lado, mutações que tenham efeito na estabilidade da Hb serão menos suscetíveis à degradação proteolítica e apresentarão maior quantidade de Hb instável circulante e mais evidências de hemólise. Para cada variante, o grau de comprometimento de cada um destes aspectos determinará a expressão clínica da mutação (WILLIAMSON, 1993).

2.4.2 Detecção e caracterização de hemoglobinas instáveis

Para a detecção de variantes de hemoglobina, testes de triagem e outros testes específicos são preconizados.

Para triagem, em protocolos sugeridos por Naoum (1997) e Kimura et al (2008), realiza-se a eletroforese de hemoglobinas em acetato de celulose em pH alcalino e cromatografia líquida de alta performance (HPLC – high performance liquid chromatography) de troca catiônica, que permite a quantificação da fração anômala e das Hb A2 e Fetal.

Depois de detectadas, são submetidas à eletroforese em gel de ágar em pH ácido; aos testes de solubilidade e estabilidade: térmica, em n-butanol e em isopropanol; análise de cadeias globínicas por eletroforese ou HPLC de fase reversa – RP-HPLC; investigação de corpúsculos de Heinz e de inclusão (NAOUM, 1997; KIMURA et al., 2008).

Uma vez identificada a cadeia mutante, o gene correspondente é então seletivamente amplificado (por PCR – reação em cadeia da polimerase) e sequenciado. Associa-se ainda, à análise familial (KIMURA et al., 2008).

As propriedades funcionais da Hb anormal também podem ser avaliadas pelo método de cinética química de Rossi-Fanelli e Antonini de 1958 pela curva de dissociação da hemoglobina com o O_2, pela determinação da cooperatividade entre as cadeias globínicas e efeito Bohr; todos os testes feitos na ausência e na presença de fosfatos orgânicos (KIMURA et al., 2008).

2.4.3 Hemoglobina de Santa Ana

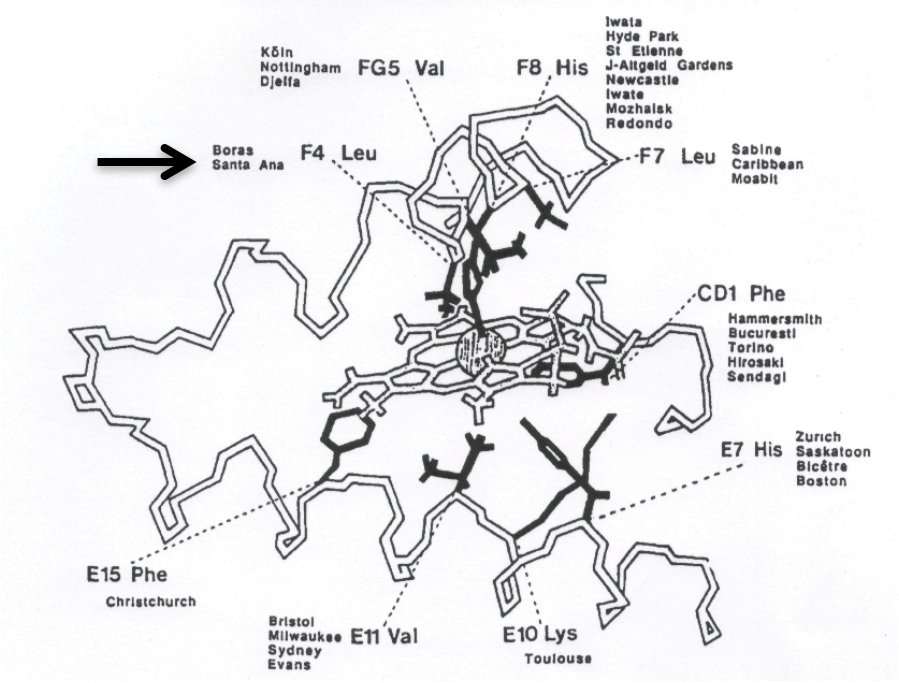
A primeira descrição da Hb Santa Ana foi feita por Opfell et al. (1968), observada em uma família na cidade de Santa Ana, na Califórnia, nos Estados Unidos, dando nome à variante.

A Hb Santa Ana (β88 Leu → Pro) é uma hemoglobina instável, cuja mutação T → C no códon 88 do gene da β globina, leva à expressão de hemoglobina instável, comprometendo tanto o contato com o grupo heme como a também a integridade da hélice F, dentro do bolsão heme, devido à troca da leucina pela prolina na posição 88 da cadeia β, que corresponde ao quarto resíduo da hélice F (F4) (Figura 7). Esta mutação elimina a interação normalmente existente entre a β-globina cadeia lateral hidrofóbica da leucina e o protoheme, além de interromper a F-hélice. Isto desloca o grupo heme e permite a entrada de água no bolsão do heme, facilitando a perda do heme ou permitindo sua oxidação. Testes realizados em diferentes estudos sugerem a perda de dois hemes por molécula de Hb (OPFELL et al., 1968; TANAKA et al., 1985; GONÇALVES et al., 1994; MIYAZAKI et al., 1997).

Além deste relato nos EUA, vários outros pacientes com esta hemoglobina foram relatados na França, Hungria, Brasil e Japão (Tabela 1) (BISERTE et al., 1970; TANAKA et al., 1985; GONÇALVES et al., 1994; MIYAZAKI et al., 1997).

Os sinais descritos nos pacientes são: anemia hemolítica congênita compensada, com presença de inclusões intraeritrocitárias, corpúsculos de Heinz e corpúsculos de Howell-Jolly, anemia não-esferocítica, com urina escurecida e esplenomegalia. Os casos acompanhados relatam crescimento e desenvolvimento normais dos pacientes. A esplenectomia promove discreta melhora do quadro anêmico, mas não há melhora total da hemólise e da icterícia. Goudemand et al. (1964) relatam hiperplasia de série eritróide em medula óssea; em estudo químico da urina escurecida, observaram a presença de traços de urobilinogênio (GOUDEMAND et al., 1964; OPFELL et al., 1968; TANAKA et al., 1985).

Figura 7 - Ilustração do bolsão do heme e algumas cadeias laterais de amino ácidos em contato com o heme e várias hemoglobinas instáveis que envolvem substituições destes resíduos. Observar a indicação da mutação da Hb Santa Ana na posição helicoidal F4, originalmente ocupada por uma leucina (Leu)



Fonte: (WILLIAMSON, 1993)

Nos estudos conduzidos por Tanaka et al. (1985), observou-se que a Hb Santa Ana apresenta afinidade extremamente alta por oxigênio e grande perda de heme (cerca de metade da Hb Santa Ana circulante apresenta-se sem o grupo heme). Foram realizados também testes para avaliação da estabilidade da Hb como:

a) o teste de estabilidade no calor: a Hb Santa apresentou rápida e precipitação total em relação a Hb A e HbS;
b) estabilidade no isopropanol: Hb Santa Ana apresentou precipitação ligeiramente maior do que a Hb S e ambas apresentaram precipitação maior que Hb A;
c) estabilidade mecânica por agitação: observou-se que a Hb Santa Ana é 100 vezes mais instável do que a Hb A e 10 vezes mais instável do que a Hb S, quando analisada na forma oxi. Na forma desoxi, ao contrário do que se observa na Hb S - que nesta forma é altamente estável por causa da alteração conformacional R para T, a Hb Santa continua muito instável.

Tabela 1 - Comparação de dados entre os relatos de casos de Hb Santa Ana descritos na literatura

Autor e data	Opfell et al., 1968	Goudemand et al., 1964; Biserte et al., 1970	Tanaka et al., 1985	Gonçalves et al., 1994	Miyazaki et al., 1997		Valores de referência (Geaghan, 2009)	
Localização geográfica	Santa Ana, EUA	Lille, França	Filadélfia, EUA	Porto Alegre, Brasil	Osaka, Japão	Osaka, Japão		
Paciente (sexo, idade, raça)	Familiar, Caucasiana Pai, filha e dois filhos	Masc, caucasiano, 30 anos	Masc, 4 anos, caucasiano	Fem, 10 anos, caucasiana	Fem, 18 anos, japonesa	Fem, 42 anos, japonesa	Mulheres 18-49 anos	Homens 18-49 anos
He (x $10^6/\mu L$)	2,7 a 4,4	3,7 a 4	-	3,87	3,12	2,64	4,0-4,6	4,5-5,2
Ht (%)	30 a 49	44	33,8	39	37,7	33,7	36-41	41-47
Hb (g/dL)	8 a 14	13,6	10,1	10,0	11,8	10,4	12-14	13,5-15,5
VCM (fL)		110	92	102,0	120,8	127,7	80-90	80-90
CHCM (%)		34			31,3	30,9	31-34	31-34
Reticulócitos (%)	3 a 25%	20	34,4	16	65,6	58,8	1,32 - 4,91% 58.600 - 146.200/uL	
Morfologia eritrocitária	Anisocitose, policromasia, ponteado basofílico, cHeinz, CHJ	Anisopoiqui-locitose ++-, ponteado basofílico, inclusões intraeritroci-tárias e cHeinz		Ponteado basofílico	CHJ	CHJ		
Eletroforese em acetato de celulose pH 8,6	Banda entre Hb A e Hb A_2	A e outra banda		Pequena banda (15%) mais rápida do que Hb A_2				
Espleno megalia	Sim	Sim, e hepato megalia	Sim	Sim	Sim, com esplenec-tomia prévia			
Outras mutações associadas	Não	Não	Não	Sim, Hb Porto Alegre	Não	Não		
Manifestação da Hb Santa Ana em parentes	Sim, pai e filhos	Sim, mãe, avó materna, dois irmãos e sobrinha	Não	Não, Irmão com Hb Porto Alegre	Sim, mãe*	Sim, filha*		

Abreviaturas: He = hemácias (x$10^6/\mu L$); Ht = hematócrito (%); Hb = concentração de hemoglobina (g/dL); VCM = volume corpuscular médio (fL); CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%); CHJ = corpúsculos de Howell-Jolly; cHeinz = corpúsculos de Heinz

Fontes: (BISERTE et al., 1970; GONÇALVES et al., 1994; GOUDEMAND et al., 1964; MIYAZAKI et al., 1997; OPFELL et al., 1968; TANAKA et al., 1985;GEAGHAN, 2009; adaptado por MIYASHIRO, 2012)

O estudo sobre a curva de equilíbrio de oxigênio (OEC) das suspensões de hemácias do paciente com Hb Santa Ana e amostra controle, mostrou um desvio da curva à esquerda da Hb Santa Ana, sem cooperatividade. A curva OEC de Hb Santa Ana não foi influenciada por alterações de pH ou adição de fosfatos orgânicos, propriedades que parecem ser comuns a todas as hemoglobinas anormais com mutações próximas do bolsão heme (TANAKA et al., 1985).

Os métodos empregados para a detecção da Hb Santa Ana foram variáveis, mas sempre envolvendo o sequenciamento genético ou proteico para identificação da mutação (OPFELL et al., 1968; BISERTE et al., 1970; TANAKA et al., 1985; GONÇALVES et al., 1994; MIYAZAKI et al., 1997).

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Camundongos BALB/c anêmicos e BALB/c controles foram criados e mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, em condições sanitárias livres de patógenos específicos (Specific Pathogen Free, SPF), com temperatura entre 21 $\pm$ 2^{o} C, umidade relativa de 55 a 60%, em ciclo de claro/escuro de 12 horas e mantidos em unidades micro-isoladoras, forradas com maravalha esterilizada, com ração e água *ad libitum*. Foram constituídos 3 grupos experimentais, de acordo com a faixa etária, sendo o Grupo 1 (G1) com animais de até 10 semanas de idade; o Grupo 2 (G2) composto por animais de 11 semanas a 8 meses de idade e o Grupo 3 (G3) formado por animais de 12 a 18 meses de idade.

O número de camundongos de cada grupo variou segundo a disponibilidade de animais. Os animais mutantes foram identificados dentre os camundongos controle por inspeção do esfregaço sanguíneo, de forma que G1 foi composto por 8 controles (4 fêmeas e 4 machos) e 5 anêmicos (3 fêmeas e 2 machos); G2, continha 13 controles (5 fêmeas e 8 machos) e 12 anêmicos (5 fêmeas, 7 machos); e G3 era formado por 11 controles (6 fêmeas e 5 machos) e 11 anêmicos (5 fêmeas e 6 machos). Os camundongos controle fêmeas foram identificados por Cf, os machos, por Cm; os mutantes anêmicos fêmeas foram identificados como Af e os machos, Am.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais – FMVZ/USP com o número 2641/2012.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta de amostra sanguínea

As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca após prévia anestesia dos animais, tendo a indução anestésica sido realizada em câmara fechada com agente anestésico volatizado (isofluorano) e a manutenção da anestesia feita com máscara inalatória (isofluorano). Após a coleta do volume sanguíneo total, os animais vinham a óbito por hipovolemia sob anestesia geral, procedimento este denominado cardiocentese terminal.

A amostra de sangue foi acondicionada em tubos comerciais contendo anticoagulante (EDTA 10% para contagens celulares, eletroforese de hemoglobina e de cadeias polipeptídicas e fragilidade osmótica eritrocitária; ou heparina lítica, para testes de estabilidade da hemoglobina, análises bioquímicas; conforme exigência da técnica) para a realização de testes laboratoriais.

3.2.2 Hematimetria

Os parâmetros hematológicos, constituído pelas contagens de células sanguíneas (número de hemácias (he x $10^6/\mu L$), leucócitos e plaquetas ($/\mu L$)), concentração de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), RDW (%) (*red cell distribution width* ou amplitude de distribuição de hemácias) e índices hematimétricos relativos (VCM – volume corpuscular médio (fL); HCM – hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM – concentração hemoglobínica corpuscular média (%)), foram obtidos no contador hematológico BC2800-Vet Mindray, no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Clínica Médica - Hospital Veterinário, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As contagens de leucócitos totais dos camundongos anêmicos foram realizadas por contagem manual devido a

grande quantidade de reticulócitos na amostra, que interferia na contagem automatizada.

Para a realização da contagem diferencial de leucócitos e avaliação morfológica das células foram preparadas extensões sanguíneas secas ao ar e coradas com o corante de May Grünwald-Giemsa modificado (corante de Rosenfeld), avaliadas por microscopia.

3.2.3 Contagem de reticulócitos

Os reticulócitos foram contados em extensões sanguíneas preparadas a partir de uma mistura de 20µL de sangue total com EDTA e 20µL do corante supra-vital azul de cresil brilhante (Newprov®), incubada por 15 minutos em banho-maria a 37^{o} C. As extensões sanguíneas foram contra-coradas com corante de May Grünwald-Giemsa. Os valores relativos dos reticulócitos foram obtidos pela contagem desses elementos em 1.000 hemácias, sendo o resultado expresso em % e, os valores absolutos, multiplicando-se o percentual obtido pelo número total de hemácias e dividido por 100. O valor absoluto de reticulócitos foi expresso em número de reticulócitos x 10^3 /µL de sangue.

3.2.4 Fragilidade osmótica eritrocitária

A fragilidade osmótica eritrocitária foi avaliada por meio da técnica descrita por Jain (1986) e Lewis (2006). Resumidamente, 20 µL de sangue foi adicionado em cada um dos 16 tubos contendo 5,0 mL de solução salina tamponada com concentrações de cloreto de sódio variando de 8,5 a 0,0 g/L. Os tubos foram homogeneizados por inversão e mantidos em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e a seguir, centrifugados a 800g por 10 minutos. A densidade ótica do sobrenadante foi lida em comprimento de onda de 540 nm, em espectrofotômetro CELM E-225 D (CELM®, Brasil).

Considerando-se a DO obtida na leitura do tubo 16 como 100% de hemólise, os percentuais de hemólise dos demais tubos foram calculados a partir de suas DOs. A curva derivativa de hemólise foi construída, colocando-se no eixo das abscissas as concentrações de NaCl e no eixo das ordenadas, os percentuais médios de hemólise para os animais anêmicos e os animais controle.

A curva cumulativa de hemólise, que representa graficamente o incremento hemolítico dos tubos, foi construída considerando-se o tubo 1 como 0% de hemólise e a partir do tubo 2, o incremento hemolítico foi calculado subtraindo-se o percentual de hemólise do tubo 3 do valor do percentual de hemólise do tubo 2 e assim sucessivamente até o último tubo. Os valores médios obtidos para os animais do grupo controle e nos animais anêmicos foram apresentados sob a forma de gráficos.

3.2.5 Eletroforese de hemoglobina

Para a identificação e quantificação de hemoglobinas anormais que apresentem alterações de carga elétrica secundárias a substituições de aminoácidos na composição da molécula foi utilizada a técnica de eletroforese da hemoglobina em acetato de celulose em pH alcalino, conforme foi descrito por Naoum (1997) e por Lewis et al. (2006). Um mL de sangue fresco com anticoagulante foi colocado em tubo de ensaio de vidro, centrifugado a 400g durante 5 minutos; o sobrenadante removido e o sedimento, constituído por hemácias, foi ressuspendido com solução salina fisiológica (NaCl 0,85%), centrifugado e o sobrenadante removido; o procedimento de lavagem das hemácias foi repetido por mais duas vezes. Ao volume de eritrócitos lavados foi adicionado igual volume de água destilada sendo a mistura homogeneizada vigorosamente e a seguir, adicionado clorofórmio (Synth®) na proporção de 1:1. O tubo foi novamente submetido a vigorosa agitação e submetido a centrifugação de 1200g, por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi refrigerado a 4^{o} C até o momento do uso.

As fitas de acetato de celulose (Cellogel®, Itália) utilizadas para a eletroforese da hemoglobina foram previamente imersas no tampão tris-EDTA-borato (TEB - tris hidroximetil aminometano Merck® 10,2 g; ácido etilenodiaminotetracético Synth®

0,6g; ácido bórico Amresco® 3,2 g; água destilada qsp 1.000mL, pH 8,6) por no mínimo 15 minutos e no máximo 6 horas e secas em papel de filtro, identificadas e presas no suporte da cuba de eletroforese horizontal (Biosystems®, Espanha). Alíquotas do hemolisado foram aplicadas com o auxílio do aplicador (Biosystems®, Espanha) na extremidade da fita de acetato de celulose em contato com o anôdo. A seguir, foram submetidas a corrente elétrica de 300 Volts (Fonte BTS 100 Biosystems®, Espanha) durante 30 minutos, possibilitando a migração da hemoglobina do polo negativo para o polo positivo. Após a corrida eletroforética, a fonte foi desligada, as fitas removidas e imersas em recipiente contendo o corante Ponceaus S (Ponceau S Merck® 0,5 g; ácido tricloroacético Synth® 5,0 g; água destilada qsp 100 mL) durante 20 minutos e a seguir, lavadas alternadamente com água destilada e ácido acético 5% (ácido acético p.a. Synth® 5mL; água destilada 100 mL) por duas vezes, sendo a última lavagem realizada com água destilada. Em seguida, as fitas foram imersas em metanol p.a. (Synth®) por dois minutos e na sequência, imersas na solução diafanizadora (metanol p.a. Synth® 42 mL; ácido acético glacial Synth® 8mL e glicerina Synth® 0,2 mL ; preparar no momento do uso) durante três minutos e colocadas em placa de vidro limpa e desengordura e mantidas em estufa a 65^{o} C por 7 a 10 minutos. Uma vez secas, as fitas foram destacadas da placa de vidro e submetidas a análise densitométrica em densitômetro (escâner Epson Expression 1680 associado a software de análise VisionWorksLS®, marca UVP, California, USA).

3.2.6 Eletroforese das cadeias polipeptídicas da hemoglobina em pH alcalino

Esta técnica baseia-se na separação eletroforética das cadeias globínicas, permitindo sua quantificação. A 30 µL de hemolisado foram adicionados 30 µL de tampão tris – uréia (Tampão TEB pH 8,6, 70 mL; uréia Amresco® 36 g, preparado na véspera e mantido sob homogeneização em agitador magnético em temperatura ambiente até o momento do uso) e 30 µL de 2-mercaptoetanol Sigma®. A mistura foi deixada em repouso por 1 hora, em temperatura ambiente. O tampão tris-uréia-mercaptoetanol utilizado para o preenchimento dos compartimentos eletrolíticos da

cuba de eletroforese foi preparado, adicionando-se 6,4mL de 2-mercaptoetanol ao tampão Tris-uréia restante, procedendo-se a cuidadosa homogeneização. As fitas de acetato de celulose foram imersas por 60 minutos em tampão tris-uréia-mercaptoetanol em um recipiente separado, secas entre duas folhas de papel filtro e posicionadas no suporte da cuba de eletroforese. Com o auxílio de um aplicador, as amostras foram aplicadas nas fitas de eletroforese, no polo positivo da cuba e submetidas a carga elétrica de 110 volts por 40 minutos e depois, reprogramou-se a carga elétrica para 220 volts, por mais 20 minutos. Após a corrida eletroforética, a fonte foi desligada e as fitas foram retiradas do suporte, coradas com o corante Ponceau S e lavadas alternadamente com água destilada e ácido acético 5 % por duas vezes. A útlima lavagem foi com água destilada. Em seguida, as fitas foram submersas em metanol p.a. por dois minutos, e depois imersas em solução diafanizadora (conforme mencionado anteriormente) por três minutos. Com auxílio de pinça, as fitas foram colocadas em placa de vidro limpa e desengordurada e levadas à estufa a aproximadamente 65^{o} C por 7 a 10 minutos. A análise do perfil eletroforético foi realizada em densitômetro conforme foi descrito no ítem 3.2.5.

3.2.7 Teste de estabilidade da hemoglobina

3.2.7.1 Teste de desnaturação pelo calor

A estabilidade da molécula de hemoglobina foi avaliada de acordo com a técnica descrita por Naoum (1997). Quando submetidas a condições de altas temperaturas em pH fisiológico, as pontes hidrofóbicas de van der Waals são enfraquecidas, perdendo-se a estabilidade das moléculas de hemoglobina e ocorrendo a precipitação apenas das hemoglobinas instáveis enquanto a hemoglobinas estáveis permanecem em solução.

Um volume de 200µL de sangue fresco com anticoagulante (EDTA K_2 10%) foram submetidos a centrifugação (600g) em um tubo de ensaio por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em solução de NaCl

0,85% e submetido novamente a centrifugação, repetindo-se o processo por duas vezes. Após a última lavagem acrescentou-se ao sedimento 1 mL de água destilada e a mistura foi homogeneizada por inversão do tubo por seis vezes. Ao hemolisado, foi acrescido 1mL de tampão fosfato pH 7,4 (composto de 19,2 mL de solução de fosfato monobásico de sódio 0,1 M [$NaH_2PO_4.H_2O$ Sytnh® 13,8 g; água destilada q.s.p. 1.000mL] e 80,8 mL de solução de hidrogeno-fosfato de di-sódio 0,1 M [Na_2HPO_4 p.a. Synth® 14,2 g; água destilada q.s.p. 1.000 mL], previamente preparadas e mantidas sob refrigeração). A mistura foi novamente homogeneizada por inversão do tubo, por seis vezes e centrifugada a 600g por 10 minutos. Dois mL da mistura foram transferidos para outro tubo de ensaio e incubados em banho maria a 60^o C, durante 30 minutos. Os tubos foram observados em intervalos de 10 minutos quanto a presença de precipitação, em até 60 minutos. O resultado foi considerado positivo, caso houvesse a formação de precipitados em flocos após 20 minutos de incubação.

3.2.7.2 Teste de precipitação por isopropanol

Esta técnica desafia a estabilidade da molécula de Hb quimicamente em um tampão Tris/isopropanol pH 7,4 (Tris-hidroximetil-aminometano Merck® 12,11g; isopropanol Amresco® 170mL; água destilada q.s.p. 1000mL). Em um mL do tampão previamente incubado a 37^{o}C, foi adicionado 100μL dos hemolisados murinos e humano preparado com clorofórmio. Os tubos foram vedados e agitados por inversão, sendo incubados a 37^o C por uma hora, com observação a cada 10 minutos para verificar se houve precipitação. Para amostra de humanos, a presença da Hb instável causa floculação nos primeiros 10 minutos, seguida de precipitação. Espera-se que as Hb normais permaneçam estáveis durante o processo ou com discreta precipitação após 30-45 minutos.

3.2.8 Curva de metahemoglobina

Quantidades mínimas de metahemoglobina podem ser observadas em condições normais em amostras de sangue dos animais sadios As metahemoglobinas formadas por defeitos na globina, quando diluídas em determinado tampão e lidas em um espectro de comprimentos de onda, apresentam pico de absorção diferente da metahemoglobina usual (NAOUM, 1997). Para a construção da curva de metahemoglobina, 100µL do hemolisado de cada camundongo (anêmico e não anêmico) foram adicionados a 10mL do tampão fosfato M/15 pH 6,6 ($Na_2HPO_4.12H_2O$ Synth® 9,0 g; KH_2PO_4 Sytnh® 5,7g; água destilada q.s.p. 1.000mL) em um tubo de ensaio. Após agitação do tubo por inversão, acrescentou-se 50µL de ferricianeto de potássio Merck® (solução aquosa a 5%, preparada no momento do uso), procedendo-se novamente a homogeinização por inversão. A mistura foi deixada em repouso por 10 minutos, procedendo-se a leitura da densidade óptica em comprimentos de onda variando de 480 a 630 nm, com intervalos de 10nm, considerando-se como branco o tampão fosfato M/15 e acertando-se o zero da absorbância a cada comprimento de onda. A curva para análise foi preparada com os valores dos comprimentos de onda na abscissa e as absorbâncias na ordenada para avaliação do pico de absorção.

3.2.9 Exame físico – químico da urina

A coloração e o aspecto da urina foram avaliados visualmente e a densidade urinária foi obtida por refratometria. Um *pool* de urinas de camundongos mutantes anêmicos foi avaliado quimicamente com emprego de tiras reagentes (Combur test®, Roche Diagnostics) para mensuração do pH urinário, estimativa da presença de proteína, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina e hemoglobina. O pequeno volume de urina não permitiu a realização da sedimentoscopia, que requer volume maior para se obter uma avaliação fidedigna dos elementos celulares e outras estruturas microscópicas conforme preconizado por (HENDRIX; SIROIS, 2007).

Não foi possível obter volume suficiente de amostras de urina de camundongos controle para análise.

3.2.10 Bioquímica sanguínea

As análises bioquímicas foram realizadas em analisador bioquímico automático Labmax 240 (marca Labtest®), pelo método de química úmida, conforme protocolos estabelecidos no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Clínica Médica, FMVZ – USP. Para a obtenção de volume adequado para a análise bioquímica, foram preparados *pools* de plasmas heparinizados dos camundongos - do grupo G2, foram analisadas duas amostras de mutantes fêmeas e um controle fêmea; de G3, um controle macho e outro fêmea, um mutante macho e outro fêmea). Foram realizados testes para avaliação do perfil hepático (proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gama glutamil transferase, fosfatase alcalina, bilirrubinas), perfil renal (uréia e creatinina), perfil metabólico (glicose, colesterol, triglicérides), eletrólitos (cálcio total, fósforo inorgânico, sódio, potássio, cloreto) e a atividade enzimática de creatino quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) (QUIMBY; LUONG, 2007).

3.2.11 Avaliação anátomo-patológica e histológica de órgãos

Os camundongos foram submetidos a eutanásia por cardiocentese terminal, sob anestesia geral conforme recomendação (SIROIS, 2008). A necrópsia foi realizada imediatamente após a confirmação da morte, para observação da topografia e avaliação morfológica dos órgãos.

Os órgãos (baço, fígado, esterno, coração e rim) foram coletados, pesados (BRAYTON et al., 2001), fixados em solução de formalina a 10%, emblocados em parafina e processados conforme as técnicas histológicas do laboratório de histotécnica do Departamento de Patologia e Toxicologia – VPT, da Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, coradas em hematoxilina-eosina (HE), para avaliação morfológica tecidual, e azul da Prússia ou colração de Perls, para avaliação dos depósitos de ferro.

Para avaliação de medula óssea, um dos membros posteriores do camundongo foi separado com a finalidade de dissecar o fêmur e lavagem do canal medular. Ambas as extremidades do fêmur foram cortadas e uma agulha descartável de 24 gauge foi inserida no canal medular do fêmur, acoplada a uma seringa com 0,5 mL de meio de cultivo celular RPMI (Sigma®). Com o osso na posição vertical e o bisel da agulha na extremidade superior, o meio de cultivo foi injetado no canal medular ("*flushing*"), o material foi recolhido em um microtubo e acondicionado em gelo até o momento da contagem das células em câmara de Neubauer.

Para contagem em câmara, o material foi diluído a 1:5 em solução fisiológica. A área de contagem determinada foram os quatro quadrados de $1mm^2$ externos. O valor contado foi então multiplicado por 12,5 para obtenção do resultado de células nucleadas/mm^3 no lavado femural. O material restante no microtubo foi centrifugado a 240g por 6 minutos a 4^o C. O sobrenadante foi desprezado e com o sedimento preparou-se lâminas de esfregaço com concentração linear para análise citológica, corados com May-Grunwald Giemsa modificado (EVERDS, 2007; MCGARRY et al., 2010).

3.2.12 Análise estatística

Em todos os parâmetros aplicou-se estatística descritiva.

Os valores referentes à série eritróide estão apresentados como média, desvio padrão e valor de p segundo teste t pareado de amostras independentes unicaudal, com apresentação de gráfico e barra de erros preparados em software Microsoft Excel.

Os valores referentes às séries branca e plaquetária estão apresentados como mediana, primeiro quartil (Q1) e terceiro quartil (Q3), com preparação de gráficos *boxplot* em *software* de análise estatística Minitab 16.0.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 HEMATIMETRIA

Os resultados obtidos para a hematimetria estão apresentados separadamente como eritrograma, leucograma e plaquetograma.

4.1.1 Eritrograma

Os parâmetros referentes a série vermelha (número de hemácias, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração hemoglobínica corpuscular média, reticulócitos e amplitude de variação do tamanho das hemácias (RDW, *red cell distribution width*)) obtidos para cada um dos grupos de camundongos mutantes de diferentes faixas etárias (G1, G2 e G3), de ambos os sexos, bem como dos respectivos controles, têm sua média e desvio padrão apresentados nas tabelas 2, 3 e 4.

Os valores da contagem de hemácias, hematócrito e concentração de hemoglobina, obtidos para todos os camundongos mutantes foram menores que os respectivos controles do mesmo sexo e da mesma faixa etária, caracterizando o quadro de anemia nos camundongos anêmicos. Em relação aos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM), a maior diferença foi observada no volume corpuscular médio dos camundongos anêmicos, indicando a existência de hemácias maiores quando comparados aos controles e tendência à hipocromia, indicada pelo CHCM menor nos camundongos mutantes. Para fins de comparação, os valores da média dos grupos e o desvio padrão de cada um dos parâmetros do eritrograma dos camundongos anêmicos e respectivos controles dos grupos G1, G2 e G3 estão apresentados nos gráficos 1, 2, 3, 4 e 5.

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão do eritrograma de camundongos BALB/c do grupo G1 (de até 10 semanas de idade), anêmicos e respectivos controles, fêmeas e machos - São Paulo – 2011

G1	He ($x10^6/\mu L$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCMC (%)	n
Cf	9,5 ± 0,4	14 ± 1,0	47,0 ± 2,6	50 ± 0,8	14,6 ± 0,5	29 ± 1,0	4
Af	6,2 ± 0,8	10 ± 1,2	38,0 ± 1,2	61 ± 6,0	16,3 ± 0,1	27 ± 2,4	3
p	*0,004*	*0,037*	*0,004*	*0,037*	*0,004*	*0,037*	
Cm	10,0 ± 0,2	14 ± 0,2	48,2 ± 1,3	48 ± 0,4	14,5 ± 0,5	30 ± 1,2	4
Am	5,8 ± 0,3	10 ± 0,5	39,8 ± 1,0	69 ± 1,7	17,9 ± 0,0	26 ± 0,6	2
p	*0,007*	*0,018*	*0,007*	*0,018*	*0,007*	*0,018*	

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrão do eritrograma de camundongos BALB/c do grupo G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade), anêmicos e respectivos controles, fêmeas e machos - São Paulo – 2011

G2	He ($x10^6/\mu L$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCMC (%)	n
Cf	9,6 ± 0,5	15 ± 0,8	43,9 ± 2,4	45 ± 0,5	15,9 ± 0,3	35 ± 1,0	5
Af	6,2 ± 0,3	11 ± 0,3	35,8 ± 1,0	58 ± 2,3	18,0 ± 0,7	31 ± 0,3	5
p	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	
Cm	9,9 ± 0,7	14 ± 0,9	43,3 ± 2,6	44 ± 1,5	14,6 ± 0,6	33 ± 1,1	8
Am	6,6 ± 0,4	11 ± 0,6	34,5 ± 1,5	53 ± 2,7	16,6 ± 0,8	32 ± 1,0	7
p	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	

Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão do eritrograma de camundongos BALB/c do grupo G3 (de 12 a 18 meses de idade), anêmicos e respectivos controles, fêmeas e machos - São Paulo – 2011

G3	He ($x10^6/\mu L$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCMC (%)	n
Cf	9,7 ± 0,3	15 ± 0,6	45,1 ± 1,6	47 ± 0,4	15,4 ± 0,2	33 ± 0,4	6
Af	6,2 ± 0,2	11 ± 0,4	37,5 ± 1,1	60 ± 1,5	17,5 ± 1,0	29 ± 1,7	5
p	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	
Cm	10,4 ± 0,5	16 ± 0,3	47,5 ± 1,5	46 ± 1,6	15,0 ± 0,6	33 ± 0,6	5
Am	6,3 ± 0,5	11 ± 0,4	37,5 ± 2,8	59 ± 1,5	17,9 ± 0,7	30 ± 1,4	6
p	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	*< 0,001*	

Gráfico 1 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão do número de hemácias ($x10^6/\mu L$) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

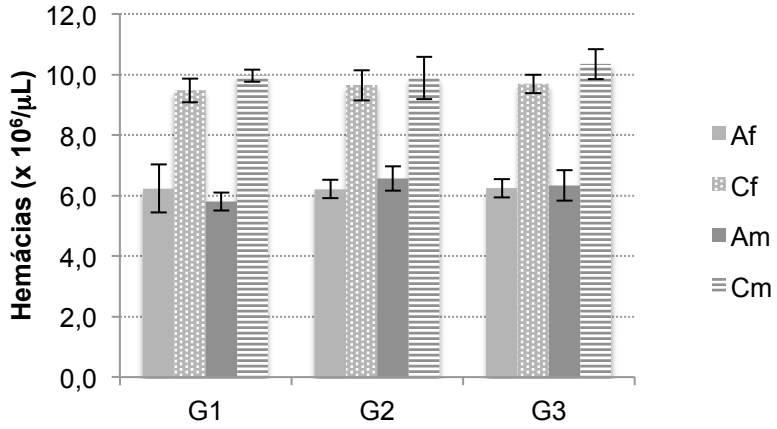


Gráfico 2 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão da concentração de hemoglobina (g/dL) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) - São Paulo – 2011

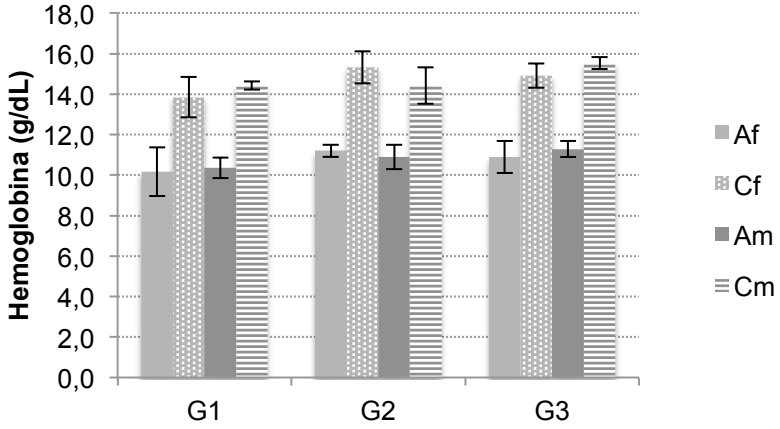


Gráfico 3 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão do hematócrito (%) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

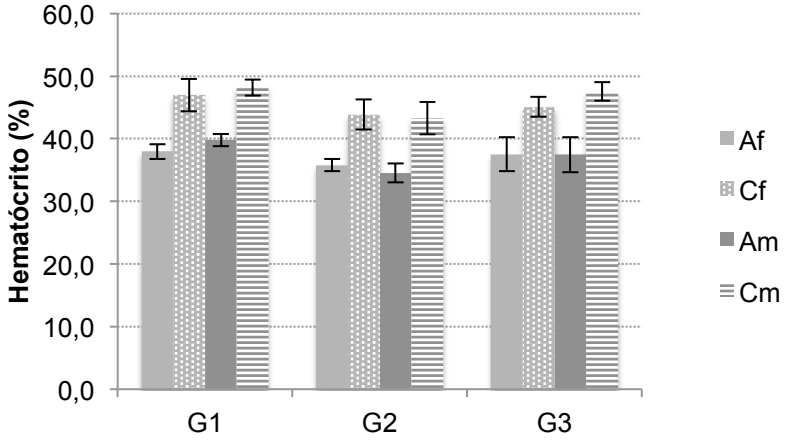


Gráfico 4 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão do volume corpuscular médio (VCM - fL) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

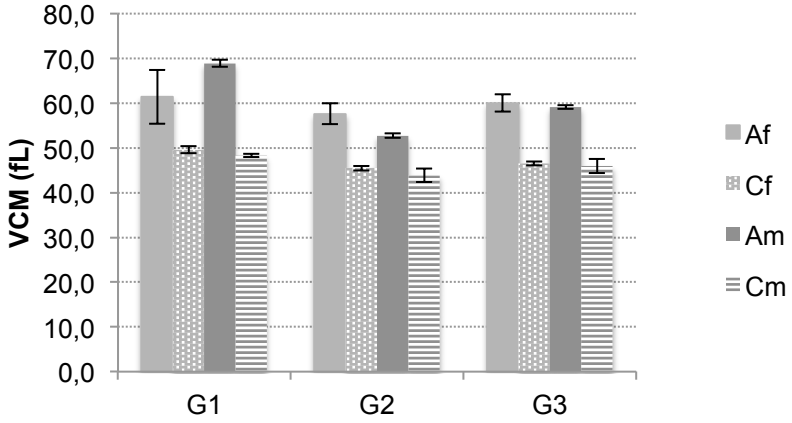
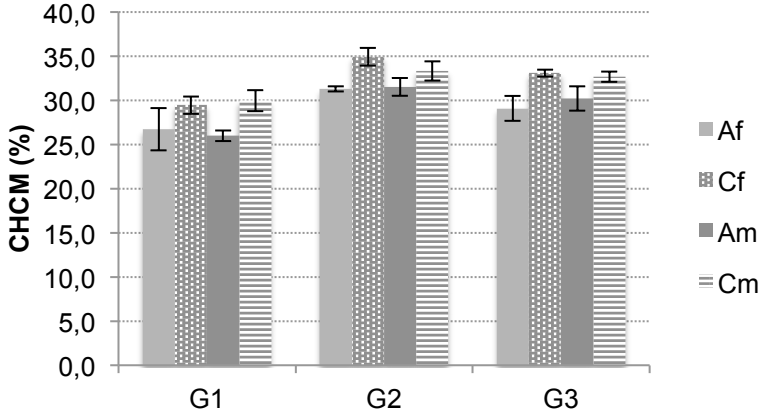


Gráfico 5 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM - %) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

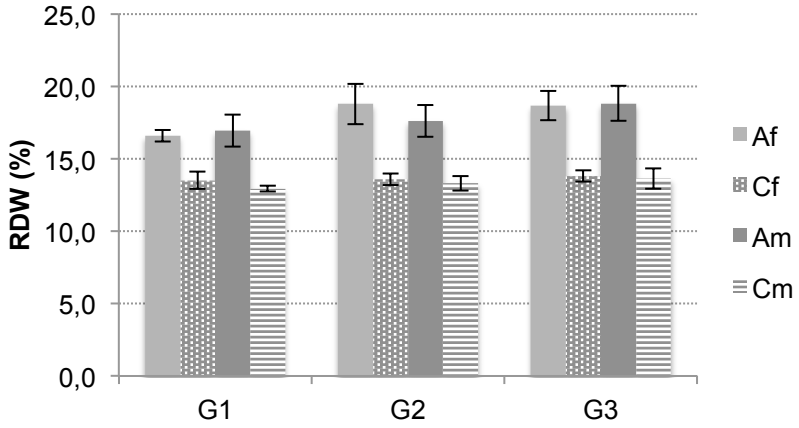


Os valores médios da amplitude de variação do tamanho das hemácias (RDW) estão apresentados na Tabela 4 e Gráfico 6. O índice foi maior nos anêmicos dos grupos G2 e G3 ($p < 0,001$) e pelo menos para as fêmeas do grupo G1 ($p < 0,001$), indicando maior variação entre os diâmetros das hemácias dos mutantes, ou seja, maior anisocitose. Além disto, o RDW aumentou ligeiramente com a idade dos animais mutantes.

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão da amplitude de variação das hemácias (RDW - %) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

RDW (%)	G1	G2	G3
Af	16,6 ± 0,4	18,8 ± 1,4	18,7 ± 1,0
Cf	13,5 ± 0,6	13,6 ± 0,4	13,8 ± 0,4
p	*< 0,001*	*< 0,001*	*0,001*
Am	17,0 ± 1,1	17,6 ± 1,1	18,8 ± 1,2
Cm	13,0 ± 0,2	13,3 ± 0,5	13,6 ± 0,7
p	*0,057*	*< 0,001*	*< 0,001*

Gráfico 6 - Gráfico representativo das médias e desvio padrão da amplitude de variação das hemácias (RDW - %) dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

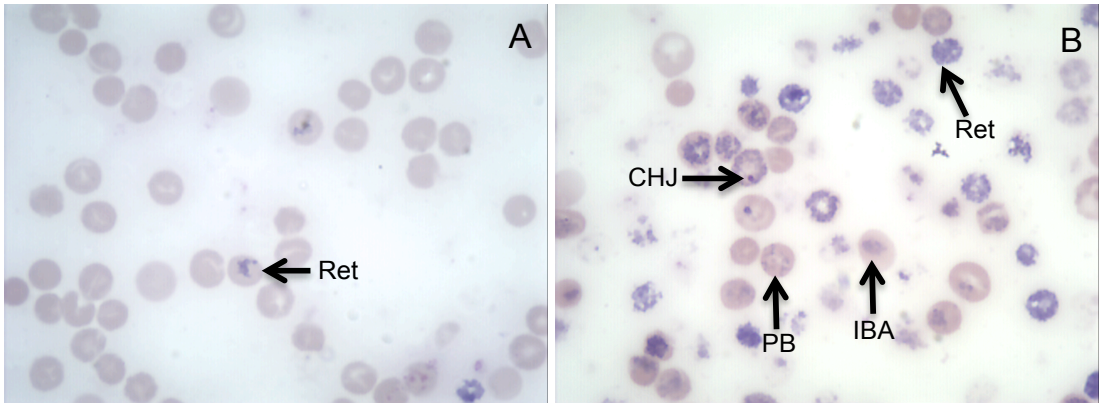


Na Tabela 6, estão apresentados os valores médios e desvios padrões dos valores relativos e absolutos de reticulócitos dos camundongos BALB/c controles e anêmicos das diferentes faixas etárias. A intensa reticulocitose pode ser observada na Figura 8.

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão dos valores relativos (%) e absolutos ($x10^3/\mu L$) de reticulócitos dos camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

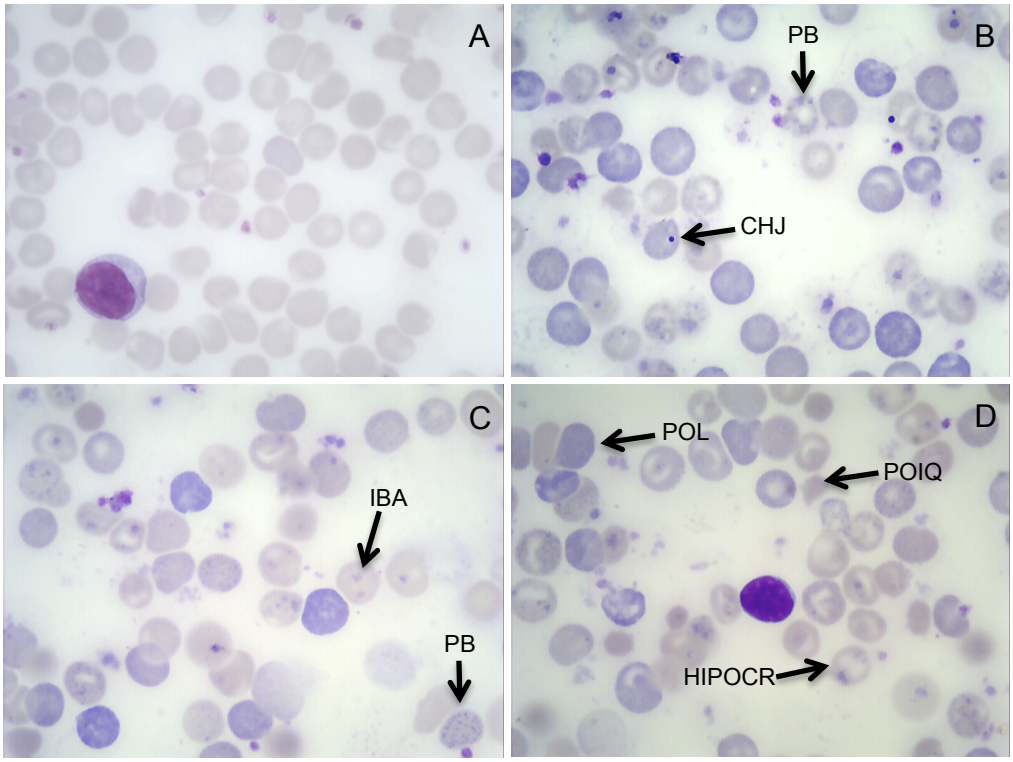
Reticulócitos	G1		G2		G3	
	rel (%)	abs ($x10^3/\mu L$)	rel (%)	abs ($x10^3/\mu L$)	rel (%)	abs ($x10^3/\mu L$)
Cf	2,2 ± 0,3	203 ± 26,6	2,0 ± 0,8	196 ± 88,8	1,7 ± 1,0	168 ± 99,5
Af	78,3 ± 9,4	4.833 ± 173,0	64,1 ± 11,2	3.978 ± 632,8	55,1 ± 5,9	3.449 ± 508,3
Cm	2,0 ± 0,3	199 ± 32,0	1,9 ± 2,1	184 ± 198,5	3,2 ± 1,5	326 ± 146,4
Am	87,8 ± 0,8	5.094 ± 215,6	58,5 ± 13,0	3.837 ± 858,5	51,6 ± 5,3	3.286 ± 528,3

Figura 8 - Preparado de reticulócitos de camundongos BALB/c, controle e mutante. Contra-coloração de May-Grünwald – Giemsa, x 1000 - São Paulo – 2010



Legenda: (A) Controle. Pequena quantidade de reticulócitos, como indicado na seta (Ret). (B) Anêmico. Grande quantidade de reticulócitos (Ret) e presença inclusão basofílica amorfa em hemácia (IBA), corpúsculo de Howell Jolly (CHJ) e ponteado basofílico (PB).

Figura 9 - Esfregaço sanguíneo de camundongos BALB/c, controle e mutante anêmico. Coloração de May Grümwald – Giemsa, x1000 - São Paulo – 2010



Legenda: (A) Controle. População de hemácias predominantemente madura, apresentando uniformidade de tamanho, forma e coloração (B), (C) e (D) Anêmico. Anisocitose de hemácias, policromasia (POL), hipocromia (HIPOCR), poiquilocitose (POIQ), ponteado basofílico (PB) presença de corpúsculos de Howell Jolly (CHJ) e inclusões intraeritrocitárias amorfas basofílicas (IBA).

Na avaliação do esfregaço sanguíneo, foram observadas diversas alterações na morfologia das hemácias dos camundongos anêmicos, tais como anisocitose, policromasia, hipocromia, presença de corpúsculos de Howel Jolly, corpúsculos de Heinz e inclusões intraeritrocitárias basofílicas amorfas; alterações estas que não foram observadas nos controles (Figura 9). Na tabela 7, estão apresentadas as alterações morfológicas observadas em todos os grupos, sem distinção de sexo, que foram subjetivamente classificadas quanto à sua presença em escala de cruzes.

Tabela 7 - Alterações morfológicas eritrocitárias observadas em camundongos BALB/c controle e BALB/c anêmicos dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) e classificação quanto à intensidade da alteração em escala de cruzes – São Paulo – 2011

Alterações morfológicas eritrocitárias	**Controle**	**Anêmico**		
		G1	**G2**	**G3**
Policromasia	(-) / (+)	+/+++	++/+++	++
Anisocitose	(-)	+/++	+/+++	+/++
Hipocromia	(-)	(+)/+	+/++	(+)/+
Corpúsculos de Howell Jolly	(-)	(-)/+	(+)/+	(-)/+
Corpúsculos de Heinz	(-)	(-)/+	(-)/+	(-) / (+)
Inclusões basofílicas amorfas	(-)	+/++	+/++	(+)/+
Eritroblastos/100 leucócitos	0	0/2	0/3	0/3

Legenda: Classificação das alterações em escala de cruzes: (-) sem alterações; (+) = muito discreto; + = discreto; ++ = moderado; +++ = intenso.

A análise das alterações quantitativas e qualitativas observadas nos elementos da série vermelha nos camundongos anêmicos permitiu classificar o quadro hematológico como anemia macrocítica tendendo a hipocrômica, de caráter regenerativo, indicando a adequada resposta medular ao processo anêmico, com o ↑VCM e ↓CHCM, policromasia e reticulocitose. É persistente a presença de inclusão intraeritrocitária basofílica amorfa, indicando precipitação de hemoglobina na célula. Eventualmente, é possível observar a presença de corpúsculos de Heinz bem formados, remetendo à lesão oxidativa da hemoglobina.

4.1.2 Leucograma e plaquetograma

Em relação ao leucograma, os valores medianos obtidos para os camundongos anêmicos e controles, machos e fêmeas, de diferentes faixas etárias, estão apresentados nas tabelas 8, 9 e 10 . Para melhor visualização, estes valores estão apresentados em gráficos boxplot com valores da mediana, primeiro e terceiro quartis, dos leucócitos (Gráfico 7), neutrófilos (Gráfico 8), linfócitos (Gráfico 9) e monócitos (Gráfico 10).

Em relação às plaquetas, não houve variação entre os animais anêmicos e controles, machos ou fêmeas, nas diferentes faixas etárias. Os valores medianos, primeiro e terceiro quartis, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 8 - Valores medianos, primeiro e terceiro quartis, do leucograma de camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, do grupo G1 (de até 10 semanas de idade) - São Paulo – 2011

G1		Leucócitos totais (/μL)	Seg		Li		Mono		Eos		Bas	
			Relat (%)	Abs (/μL)	Relat (%)	Abs (/μL)	Relat (%)	Abs (/μL)	Relat (%)	Abs (/μL)	Relat (%)	Abs (/μL)
Cf	Q1	4050	20	929	72	3074	2	75	1	27	0	0
	mediana	4600	23	986	74	3492	3	113	1	39	0	0
	Q3	5775	26	1256	76	4230	4	196	2	69	0	0
Af	Q1	5950	15	870	79	4946	1	60	2	76	0	0
	mediana	8700	16	1131	79	7395	1	87	2	87	0	0
	Q3	9425	18	1378	82	7707	2	196	2	145	0	0
Cm	Q1	4725	16	782	76	3289	1	47	0	0	0	0
	mediana	5750	18	1094	79	4394	2	93	1	56	0	0
	Q3	6050	20	1251	82	4611	3	171	2	117	0	0
Am	Q1	4200	18	748	76	3203	4	153	1	21	0	0
	mediana	4300	19	799	77	3291	4	170	1	41	0	0
	Q3	4400	19	849	77	3378	5	188	2	62	0	0

Legenda: Q1 = primeiro quartil, Q3 = terceiro quartil. Seg = neutrófilos segmentados, Li = linfócitos; Mono = monócitos; Eos = eosinófilos; Bas = basófilos. Relat = valor relativo (%); Abs = valor absoluto (/μL).

Tabela 9 - Valores medianos, primeiro e terceiro quartis, do leucograma de camundongos BALB/c controles e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, do grupo G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade) - São Paulo – 2011

G2		Leucócitos totais (/μL)	Seg		Li		Mono		Eos		Bas	
			Relat (%)	Abs (/μL)	Relat (%)	Abs (/μL)	Relat (%)	Abs (/μL)	Relat (%)	Abs (/μL)	Relat (%)	Abs (/μL)
Cf	Q1	4700	17	846	73	1820	1	59	1	59	0	0
	mediana	5200	18	1003	76	3572	2	68	3	120	0	0
	Q3	5900	20	1156	79	4779	3	141	3	141	0	0
Af	Q1	9650	10	1235	79	7624	4	390	0	0	0	0
	mediana	9750	13	1475	82	7790	4	424	1	97	0	0
	Q3	10600	19	1834	83	9328	5	475	1	98	0	0
Cm	Q1	5375	17	1215	69	3761	2	138	1	41	0	0
	mediana	6300	22	1242	74	4522	4	220	1	71	0	0
	Q3	7150	25	1442	78	5560	5	299	1	97	0	0
Am	Q1	8400	12	1233	70	5493	1	89	0	0	0	0
	mediana	9600	16	1353	82	7200	1	122	0	0	0	0
	Q3	10900	27	1689	87	9586	2	208	1	58	0	0

Legenda: Q1 = primeiro quartil, Q3 = terceiro quartil. Seg = neutrófilos segmentados, Li = linfócitos; Mono = monócitos; Eos = eosinófilos; Bas = basófilos. Relat = valor relativo (%); Abs = valor absoluto (/μL).

Tabela 10 - Valores medianos, primeiro e terceiro quartis, do leucograma de camundongos BALB/c controles e anêmicos, fêmeas e machos, do grupo G3 (de 12 a 18 meses de idade) - São Paulo – 2011

G3		Leucócitos totais (/μL)	Seg		Li		Mono		Eos		Bas	
			Relat (%)	Abs (/μL)	Relat (%)	Abs (/μL)	Relat (%)	Abs (/μL)	Relat (%)	Abs (/μL)	Relat (%)	Abs (/μL)
Cf	Q1	1875	25	473	59	1340	1	20	2	24	0	0
	mediana	2550	30	809	66	1418	2	56	3	50	0	0
	Q3	4200	33	1187	72	2933	3	92	4	151	0	0
Af	Q1	4250	16	893	75	3188	3	128	0	0	0	0
	mediana	7100	20	1155	77	4970	3	165	1	43	0	0
	Q3	8250	21	1632	78	6930	4	284	1	102	0	0
Cm	Q1	2000	20	580	72	1460	2	60	3	87	0	0
	mediana	2900	21	627	73	2117	3	70	3	105	0	0
	Q3	3500	23	805	73	2520	4	116	3	114	0	0
Am	Q1	5775	17	1544	69	3880	3	191	0	14	0	0
	mediana	7000	23	1698	73	4967	4	280	1	87	0	0
	Q3	10700	25	1809	79	7613	4	386	3	190	0	0

Legenda: Q1 = primeiro quartil, Q3 = terceiro quartil. Seg = neutrófilos segmentados, Li = linfócitos; Mono = monócitos; Eos = eosinófilos; Bas = basófilos. Relat = valor relativo (%); Abs = valor absoluto (/μL).

Gráfico 7 - Distribuição em boxplot dos valores medianos, quartis, máximo e mínimo, de leucócitos totais de camundongos BALB/c controle e mutante anêmico, fêmeas e machos, nas diferentes faixa etárias G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

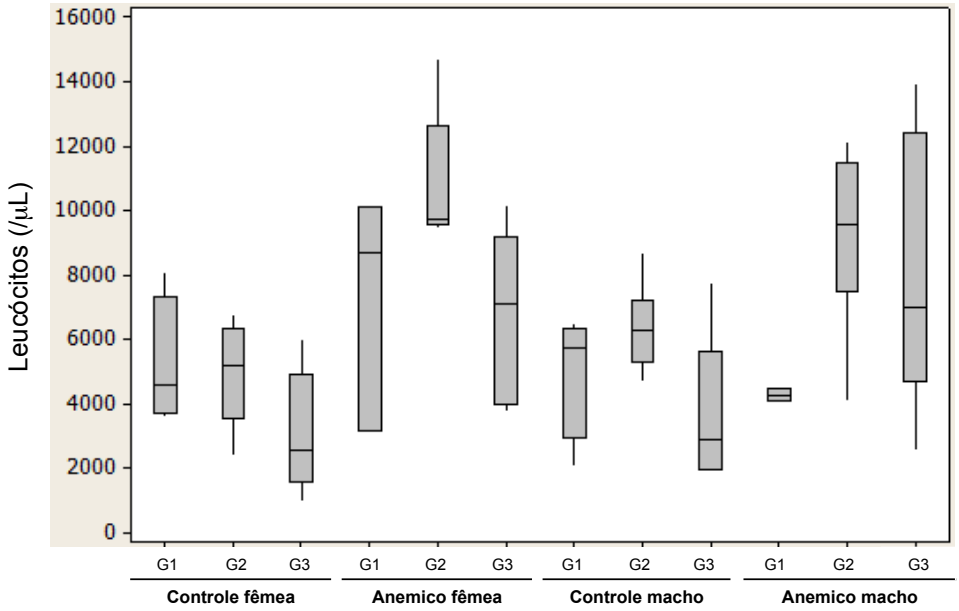
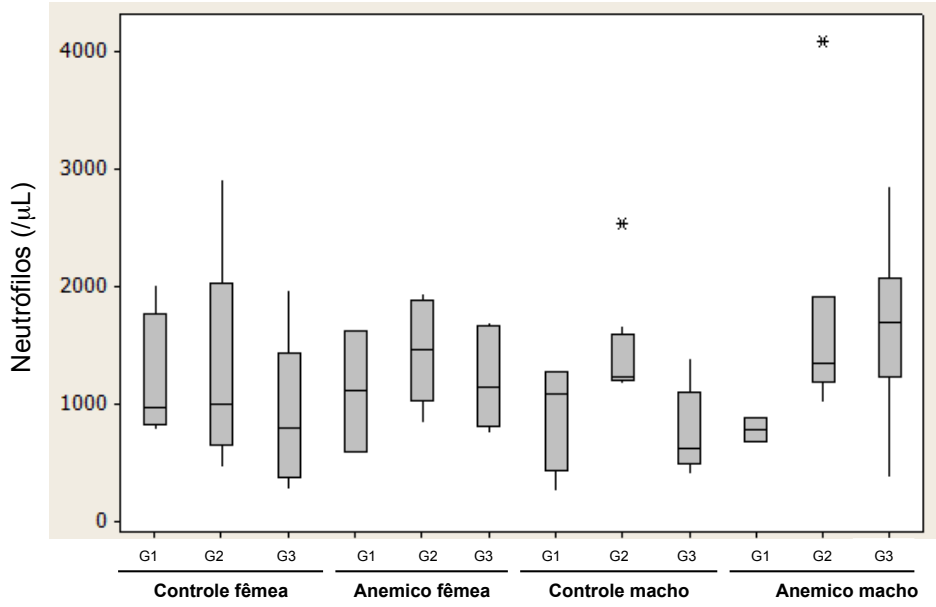


Gráfico 8 - Distribuição em boxplot dos valores medianos, quartis, máximo e mínimo, de neutrófilos de camundongos BALB/c controle e mutante anêmico, fêmeas e machos, nas diferentes faixa etárias G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011



Legenda: * = valores *outliers* ou valores atípicos para o grupo.

Gráfico 9 - Distribuição em boxplot dos valores medianos, quartis, máximo e mínimo de linfócitos de camundongos BALB/c controle e mutante anêmico, fêmeas e machos, nas diferentes faixa etárias G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

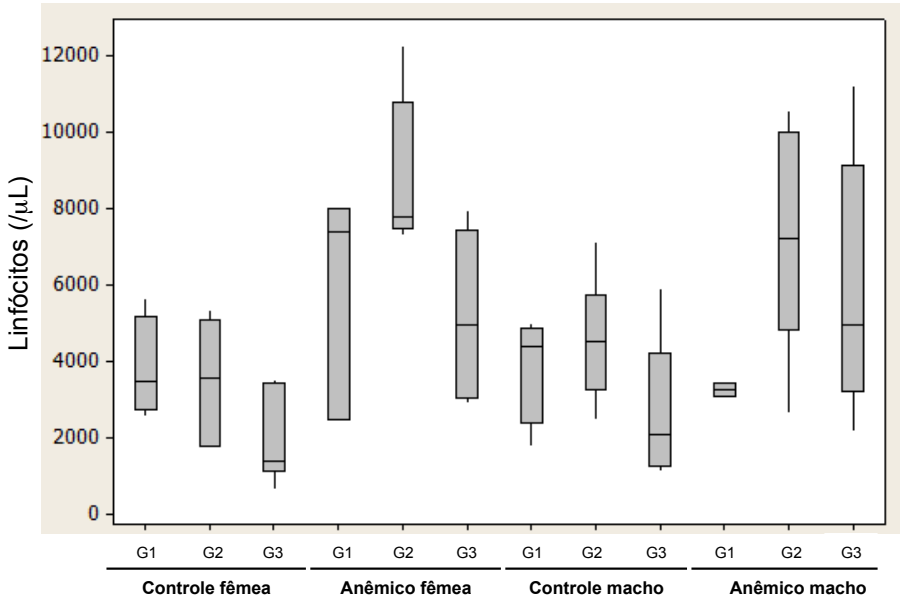
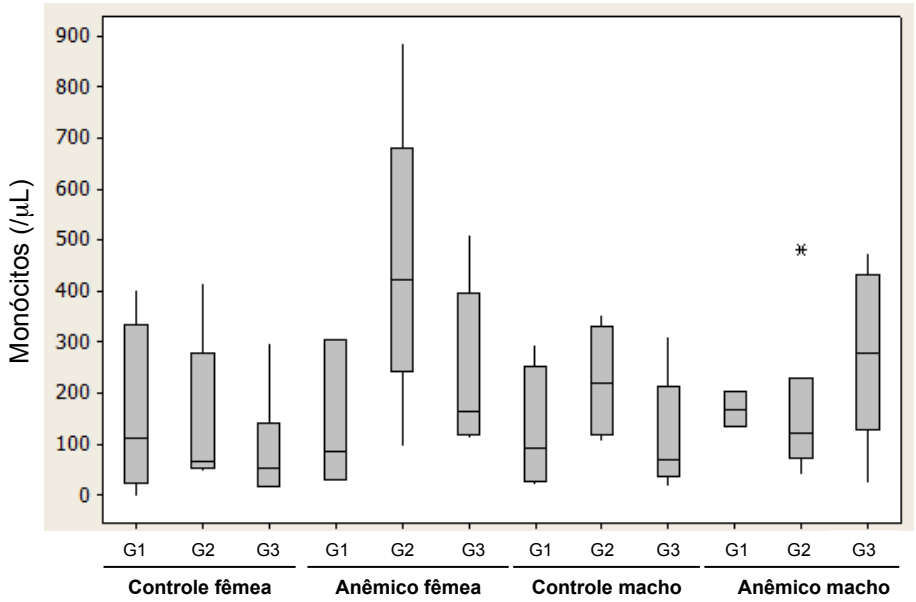


Gráfico 10 - Distribuição em boxplot dos valores medianos, quartis, máximo e mínimo, de monócitos de camundongos BALB/c controle e mutante anêmico, fêmeas e machos, nas diferentes faixa etárias G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011



Legenda: * = valores *outliers* ou valores atípicos para o grupo

Tabela 11 - Valores medianos, primeiro e terceiro quartis, da contagem de plaquetas ($x10^3/\mu L$) de camundongos BALB/c controles e anêmicos, fêmeas e machos, dos grupos G1 (de até 10 semanas), G2 (de 11 semanas a 8 meses) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) - São Paulo – 2011

Plaquetas ($x\ 10^3/\mu L$)		G1	G2	G3
Cf	Q1	384	355	588
	mediana	401	446	594
	Q3	431	453	634
Af	Q1	474	463	593
	mediana	509	483	608
	Q3	509	619	633
Cm	Q1	455	450	539
	mediana	478	470	572
	Q3	507	521	588
Am	Q1	567	299	624
	mediana	571	392	675
	Q3	575	517	725

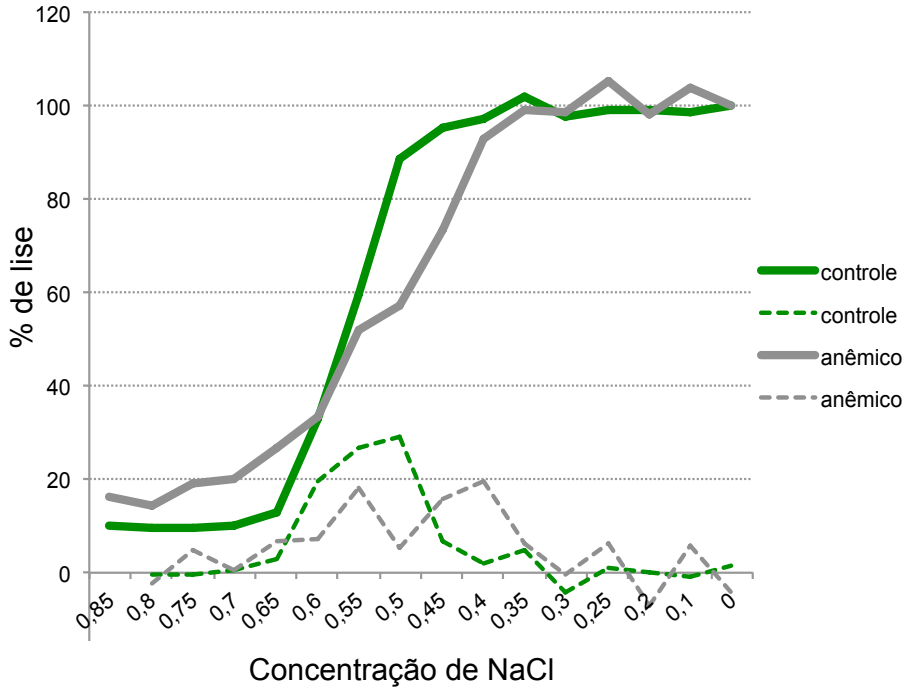
4.2 FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA

Amostras de sangue total em EDTA foram utilizadas para o teste de fragilidade osmótica eritrocitária e a densidade óptica dos tubos com diferentes concentrações de NaCl foram analisadas e transformadas em porcentagem de lise. Os dados analisados estão apresentados no gráfico 11.

Pela curva sigmoide (cumulativa) resultante do teste, a amostra de camundongo anêmico apresentou início da lise de hemácias antes do controle e a hemólise completa (100%) em concentrações mais baixas de NaCl, indicando hemácias mias resistentes à lise.

Na curva derivativa, observou-se dois picos na amostra do controle, que correspondem a duas diferentes populações de hemácias, sendo o maior pico, observado na concentração de NaCl 0,5%, referente à grande população de hemácias maduras e o menor pico (NaCl 0,35%), à pequena população de reticulócitos. Na curva da amostra de mutante, um pequeno pico foi observado na concentração de 0,75% de NaCl, indicando uma população eritrocítica muito sensível à lise osmótica, outro pico próximo ao da população de hemácias maduras do controle (NaCl 0,55%), sugerindo que trata-se da população de hemácias maduras no mutante, e outro pico grande na concentração de NaCl 0,4%, provavelmente correspondente à grande população de reticulócitos destes animais.

Gráfico 11 - Representação gráfica da fragilidade osmótica eritrocitária média de camundongos BALB/c controles e mutantes anêmicos – São Paulo - 2010



Legenda: As linhas contínuas correspondem às curvas cumulativas para camundongo controle e anêmico e representam a porcentagem de hemólise. As linhas pontilhadas correspondem às curvas derivativas que representam o incremento hemolítico, ressaltando as populações eritrocíticas nas amostras.

4.3 ELETROFORESE DE HEMOGLOBINA EM ACETATO DE CELULOSE EM PH ALCALINO

A eletroforese de hemoglobina em acetado de celulose em pH alcalino (pH 8,6) revelou duas bandas em camundongos (denominadas banda 1 e banda 2). A corrida eletroforética (Figura 10), a curva resultante da análise em densitômetro (Gráfico 12) e os valores percentuais médios das bandas para cada grupo (Tabela 12) estão apresentados a seguir.

A amostra de controle humano atuou como um padrão de migração, sendo a banda 1 referente à HbA2 e a banda 3, HbA, a principal hemoglobina em humano adulto. A HbA humana apresenta mobilidade semelhante a banda 3 dos camundongos, enquanto a HbA2, tem mobilidade similar à banda 1 dos camundongos. Não observou-se banda paralela à banda 2 dos camundongos na amostra humana.

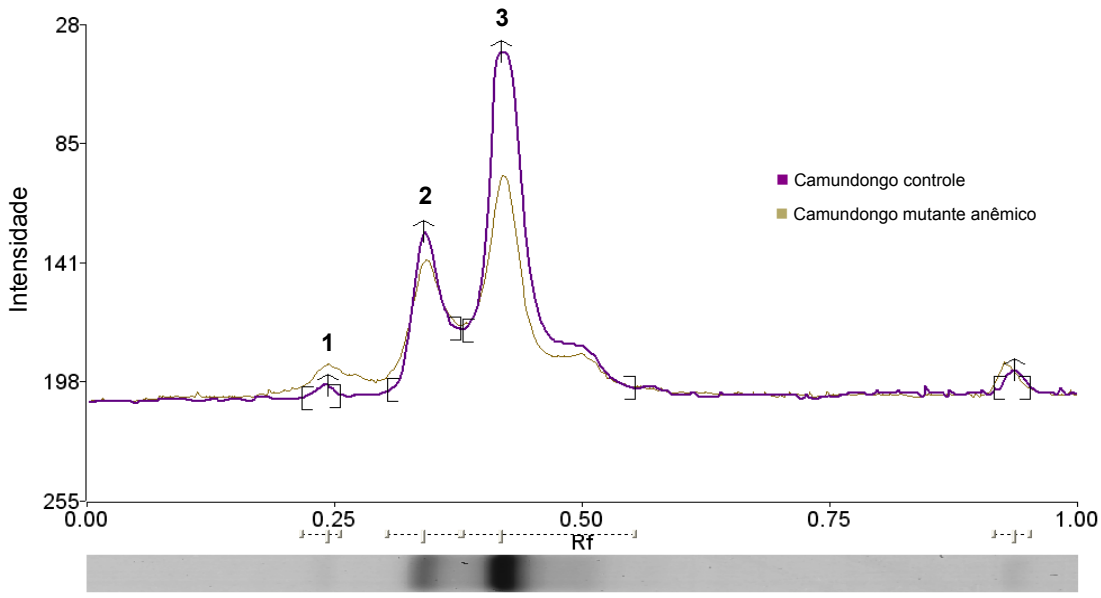
A linhagem BALB/c é portadora do alelo D do gene Hbb-b1, que leva à expressão de duas cadeias globínicas beta, as cadeias β_{dmajor} e β_{dminor}, que associadas a cadeia α, produzem diferentes hemoglobinas. Na eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose em pH alcalino estas hemoglobinas podem ser identificadas, sendo a banda 2 correspondente à hemoglobina cujas subunidades globínicas seriam $\alpha_2\beta_{dmin2}$ e a banda 3, à hemoglobina de subunidades $\alpha_2\beta_{dmaj2}$. Não foi possível correlacionar o tipo de hemoglobina que corresponderia à banda 1, mas observa-se na curva da eletroforese que a mesma aumenta sua participação em porcentagem na amostra de hemolisado do camundongo anêmico em relação ao controle.

As hemoglobinas do camundongo controle e do anêmico apresentaram padrão de migração similar, indicado pelos picos coincidentes na curva da eletroforese. A intensidade de cor das bandas do mutante é menor, indicando menor concentração de hemoglobina total no hemolisado.

Figura 10 - Perfil eletroforético de hemoglobina em acetato de celulose em pH 8,6 de camundongos BALB/c controle, BALB/c anêmico, ambos machos do grupo G2 (11 semanas a 8 meses de idade) e controle humano. Coloração Ponceau S - São Paulo – 2010

Legenda: Polo negativo à esquerda, onde é feita a aplicação da amostra. Corrida eletroforética no sentido do polo positivo. Bandas identificadas por números, conforme migração.

Gráfico 12 - Curva da eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose em pH 8,6 de hemolisado de BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico. Análise em software VisionWorksLS, UVP - São Paulo – 2010



Legenda: Os picos da curva indicam as bandas identificadas como 1, 2 e 3.

Tabela 12 - Porcentagem média das bandas observadas na eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose em pH alcalino de hemolisado de BALB/c controle e mutante anêmico – São Paulo – 2010

%	banda 1	banda 2	banda 3	rel b3:b2
Cf	9,1	25,5	65,4	2,6
Af	12,7	29,8	57,5	1,9
Cm	8,6	23,1	68,4	3,0
Am	14,7	27,9	57,5	2,1

rel b3:b2: Relação entre a banda 3 e a banda 2.

Ao comparar os valores relativos das variantes de hemoglobina dos camundongos, observa-se o predomínio do tipo correspondente à banda 3, $\alpha_2\beta_{dmaj2}$. Mas no anêmico mutante, há uma diminuição da porcentagem desta banda e aumento do valor relativo das bandas 2 ($\alpha_2\beta_{dmin2}$) e 1. Para efeitos de interpretação, a relação entre a banda 3 e a banda 2 foi calculada, demonstrando uma alteração na proporção destes tipos de hemoglobina no camundongo anêmico em relação ao controle.

4.4 ELETROFORESE DE CADEIAS POLIPEPTÍDICAS DA HEMOGLOBINA

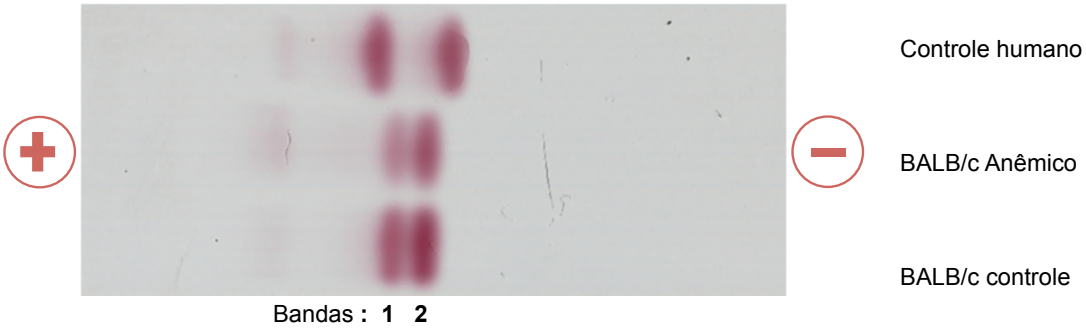
A eletroforese de cadeias peptídicas em pH alcalino (pH 8,6) em tira de acetato de celulose revelou presença de duas bandas distintas em ambos os camundongos (Figura 11). A amostra humana apresenta duas bandas evidentes compatíveis com a cadeia α e a cadeia β de humanos, que apresenta mobilidade próxima, mas não semelhante, à das bandas 2 e 1 dos camundongos, respectivamente.

Apesar a linhagem de camundongos BALB/c expressarem duas cadeias cadeias β globinas diferentes, β_{dmaj} e β_{dmin}, por esta técnica não foi possível a separação das mesmas, que provavelmente migraram juntas, formando a banda 1, como podemos observar na corrida eletroforética da amostra de camundongo BALB/c controle na Figura 11, representada graficamente no gráfico 13.

A cadeia globínica α, que compõe a banda 2, apresentou porcentagem ligeiramente aumentada nos camundongos anêmicos (Tabela 13), enquanto a porcentagem da banda 1 (cadeia β) apresentou-se ligeiramente diminuída em relação ao controle. Para auxiliar na interpretação dos dados, foi calculada a relação entre as bandas 2 e 1 (α:β), demonstrando uma pequena diferença de proporção entre elas comparando-se o grupo controle em relação ao anêmico.

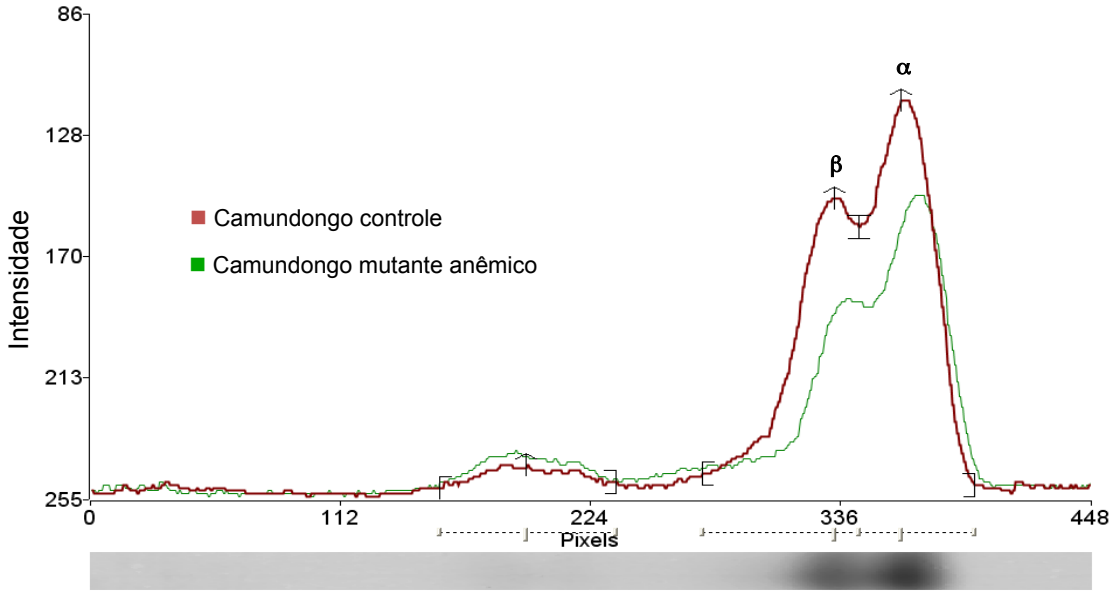
As cadeias globínicas das hemoglobinas de ambos os camundongos apresentaram padrão de migração semelhantes, visto a coincidência dos picos no gráfico 13, indicando que apresentam as mesmas cadeias globínicas na constituição de suas hemoglobinas, nas condições desta técnica.

Figura 11 - Perfil eletroforético de cadeias polipeptídicas em pH 8,6 de hemolisados de camundongo BALB/c controle, BALB/c mutante anêmico e de humano. Coloração Ponceau S - São Paulo – 2010



Legenda: Polo positivo à esquerda, onde é feita a aplicação da amostra. Corrida eletroforética no sentido do polo negativo. Bandas identificadas por números.

Gráfico 13 - Curva eletroforética de cadeias polipeptídicas em pH 8,6 de hemolisados de camundongo BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico. Análise em software VisionWorks, UVP - São Paulo - 2010



Legenda: Os picos da curva indicam as bandas eletroforéticas identificadas como 1 (cadeia β) e 2 (cadeia α).

Tabela 13 - Valor porcentual das bandas observadas na eletroforese de cadeias polipeptídicas em acetato de celulose em pH 8,6 de hemolisado de BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico – São Paulo – 2010

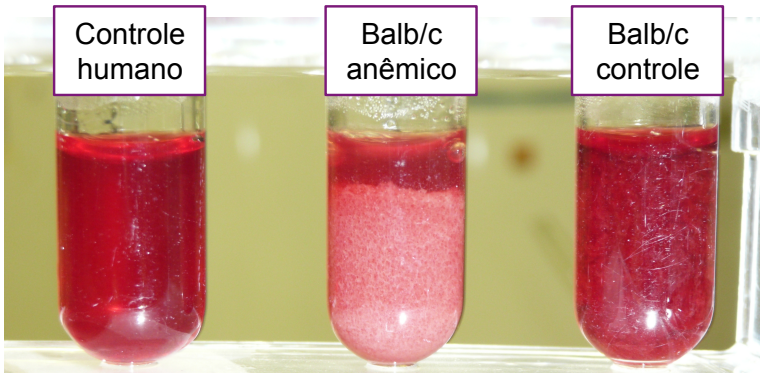
	Cadeia β	Cadeia α	relação α:β
Cf	48,11	51,89	1,1
Af	42,85	57,15	1,3
Cm	44,74	55,26	1,2
Am	41,16	58,84	1,4

4.5 TESTE DE ESTABILIDADE DA HEMOGLOBINA

4.5.1 Teste de desnaturação pelo calor

No teste de estabilidade da hemoglobina no calor a amostra do camundongo BALB/c anêmico apresentou turbidez aos 10 minutos. Ambas as amostras, de camundongos controle e mutante, precipitaram aos 30 minutos, permanecendo desta forma até completar os 60 minutos de observação (Figura 12).

Figura 12 – Teste de estabilidade da hemoglobina de desnaturação pelo calor - São Paulo – 2011

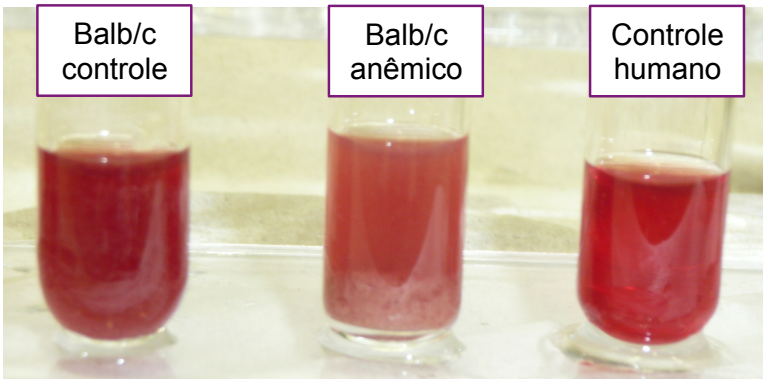


Legenda: Após 60 minutos de incubação, a amostra de humano permaneceu límpida, enquanto a amostra de camundongo BALB/c mutante anêmico apresentou intensa precipitação em relação ao camundongo controle.

4.5.2 Teste de precipitação em isopropanol

As amostras murinas apresentaram-se turvas desde os primeiros 10 minutos. A amostra do BALB/c anêmico apresentou floculação aos 20 minutos (Figura 13) e precipitação aos 60 minutos. A amostra do BALB/c controle apresentou floculação aos 30 minutos e precipitação aos 60 minutos. A amostra controle humana permaneceu límpida até precipitar aos 60 minutos.

Figura 13 – Teste de estabilidade da hemoglobina de precipitação em isopropanol - São Paulo – 2011

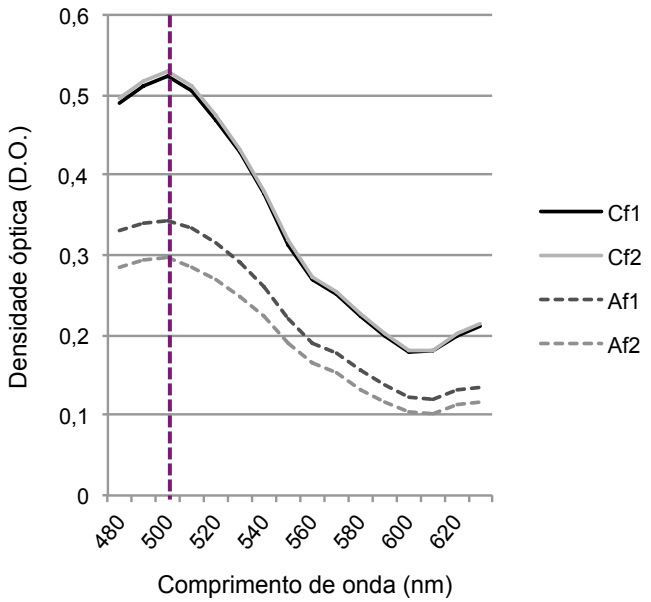


Legenda: Após 20 minutos de incubação, a amostra de humano apresentava-se límpida, enquanto as amostras murinas apresentavam-se turvas, com floculação na amostra do camundongo BALB/c mutante anêmico.

4.6 CURVA DE METAHEMOGLOBINA

As curvas de metahemoglobina de amostras sanguíneas de camundongos fêmeas BALB/c controle (Cf) e mutante anêmico (Af), G1, apresentaram o pico de absorbância no mesmo comprimento de onda de 500 nm (Gráfico 14), embora em concentrações de hemoglobina diferentes como revelado pela densidade óptica (D.O.) menor nas amostras dos mutantes. Isto indica que a metahemoglobina derivada das hemoglobinas de ambos os camundongos são semelhantes.

Gráfico 14 – Curva de metahemoglobina de camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, fêmeas, G1 (até 10 semanas de idade) - São Paulo – 2010



Legenda: A linha roxa indica a coincidência de picos das curvas de metaHb de amostras de sangue de camundongos mutantes e controles, implicando que ambas as amostras formam a mesma metaHb.

4.7 URINA TIPO I

A coloração da urina dos camundongos mutantes anêmicos é amarelo ouro a acastanhada, mais escura do que a urina de animais controle, que apresentaram urina de cor amarelo palha a citrino.

Com o *pool* de amostras de urina de camundongos mutantes, realizou-se a análise físico-química e a leitura da densidade urinária por refratometria, com apresentação dos resultados na tabela 14.

Tabela 14 - Resultados da análise físico-química do *pool* de urinas de camundongos BALB/c mutantes anêmicos – São Paulo – 2011

Parâmetro	**Resultado**
Cor	Acastanhada
Densidade urinária	maior que 1,040
pH	6,5
Proteínas	Traços
Glicose	Negativo
Corpos cetônicos	Negativo
Bilirrubinas	Negativo
Hemoglobina	+--

4.8 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

A avaliação bioquímica realizada para as fêmeas do Grupo 2 e fêmeas e machos do Grupo 3 está apresentada nas tabelas 15, 16 e 17. Algumas amostras, mesmo em *pool*, não foram suficientes para todas as análises pretendidas, indicadas como --- .

Tabela 15 – Perfil bioquímico hepático de camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, machos e fêmeas, dos Grupos G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

	G2			G3				
	Af	**Af**	**Cf**	**Af**	**Cf**	**Am1**	**Cm**	
Proteínas totais	4,77	4,78	4,87	5,78	6,19	5,85	5,87	g/dL
Albumina	2,68	2,77	3,04	3,21	3,25	3,17	3,04	g/dL
Fosfatase alcalina	44,9	43,4	44	36,9	---	29,3	---	U/L
Alanina amino transferase (ALT)	68,2	69	45,2	30,2	41,9	20,4	13	U/L
Aspartato amino transferase (AST)	161,3	142,6	104,9	74,3	81	82,7	50,3	U/L
Gama glutamil transferase (GGT)	---	---	0	0	0	0	0	U/L
Bilirrubina total	**1,02**	**0,96**	**0,33**	**0,64**	---	---	---	mg/dL
Bilirrubina direta	**0,39**	**0,47**	**0,27**	**0,42**	---	**0,43**	----	mg/dL
Bilirrubina indireta	**0,63**	**0,49**	**0,06**	**0,22**	---	---	---	mg/dL

Obs.: --- – não realizado; dados em negrito indicam alterações entre controle e mutante.

. Quanto às proteínas totais e albumina, conforme apresentado na tabela 15, houve um aumento em G3 em relação a G2, mas tanto em controle quanto em anêmicos. As atividades enzimáticas da fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotranferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT), que sinalizariam alguma injúria hepática, não foram diferentes entre os controles e os anêmicos, embora a FA, ALT e AST tenham apresentado uma pequena diminuição de atividade em G3. As bilirrubinas nos anêmicos estavam elevadas em relação ao controle, ao menos em G2 (não foi possível a realização das bilirrubinas do controle de G3). A bilirrubina total estava elevada principalmente pelo aumento da bilirrubina indireta.

Tabela 16 - Perfil bioquímico renal de camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, machos e fêmeas, dos Grupos G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

	G2			G3				
	Af	**Af**	**Cf**	**Af**	**Cf**	**Am1**	**Cm**	
Uréia	55	59,9	78	49,1	---	55,2	37	mg/dL
Creatinina	0,27	0,19	0,3	**0,42**	---	**0,41**	---	mg/dL

Obs.: --- – não realizado; dados em negrito indicam alterações entre controle e mutante.

Na avaliação do perfil renal dos anêmicos (Tabela 16), a concentração de uréia não variou entre as diferentes faixas etárias analisadas, nem entre o grupo controle e o anêmico. Entretanto, a concentração de creatinina foi maior em G3 do que em G2 no grupo dos anêmicos. Infelizmente, não foi possível realizar a concentração de creatinina no grupo controle do G3, o que poderia elucidar quanto deste aumento da creatinina poderia ter correlação com a idade.

Tabela 17 - Perfil bioquímico cardíaco de camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, machos e fêmeas, dos Grupos G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

	G2			G3				
	Af	**Af**	**Cf**	**Af**	**Cf**	**Am1**	**Cm**	
Lactatodesidrogenase (LDH)	---	---	286,5	415,2	115,7	516	445,2	U/L
Creatino quinase (CK)	---	---	221,8	128	39,5	52,5	26,4	U/L
Aspartato amino transferase (AST)	161,3	142,6	104,9	74,3	81	82,7	50,3	U/L

Obs.: --- – não realizado; dados em negrito indicam alterações entre controle e mutante.

A lactato desidrogenase (LDH), a creatino-quinase (CK) e a AST são enzimas marcadoras de injúria muscular, inclusive musculatura cardíaca (Tabela 17). Considerando-se o grupo G3, os anêmicos apresentaram maior atividade enzimática de LDH e CK.

Tabela 18 - Perfil bioquímico de camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, machos e fêmeas, dos Grupos G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade) e G3 (de 12 a 18 meses de idade) – São Paulo – 2011

	G2			G3				
	Af	**Af**	**Cf**	**Af**	**Cf**	**Am1**	**Cm**	
Glicose	---	104,3	166,2	120,2	---	70,3	---	mg/dL
Colesterol	61,8	74,4	51,8	66,9	94,3	82,8	108,3	mg/dL
Triglicérides	115,2	118,8	246,2	224,6	---	134,8	143	mg/dL
Sódio	137,6	137,7	145,5	148,5	145,6	151,8	147,3	mmol/L
Potássio	---	---	4,41	4,96	5,5	5,95	5,14	mmol/L
Cloro	105,7	106,4	109,3	109,4	109,7	109,3	108,5	mmol/L
Cálcio total	7,91	8,76	8,4	9,08	8,99	8,55	8,28	mmol/L
Fósforo	**7,83**	**8,29**	6,05	**5,77**	4,19	**7,85**	4,9	mg/dL

Obs.: --- – não realizado; dados em negrito indicam alterações entre controle e mutante.

A concentração de glicose plasmática (Tabela 18) foi de pequena valia, já que não foi possível manter os animais em jejum antes da coleta, mas não indica intensa variação de concentração entre controle e anêmico. A concentração de colesterol e triglicérides dos grupos não indicou diferença no metabolismo lipídico entre o camundongo anêmico e o controle.

Quanto aos eletrólitos, apenas o fósforo inorgânico plasmático do camundongo mutante apresentou concentrações maiores do que o controle, em G2 e em G3.

4.9 AVALIAÇÃO ANATOMO-PATOLÓGICA

À palpação abdominal, os animais mutantes apresentaram o baço facilmente palpável. No exame necroscópico, tanto baço quanto fígado, apresentaram coloração vermelha escura intensa quando comparados aos animais controle (Figuras 14 e 15). Apresentaram, ainda, pigmentação ictérica em tecido subcutâneo.

Figura 14 – Exame necroscópico. Camundongo BALB/c controle (A) e BALB/c mutante anêmico (B), G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade). Note o aumento de volume e da intensidade de coloração de fígado e baço e a icterícia em tecido subcutâneo - São Paulo – 2010

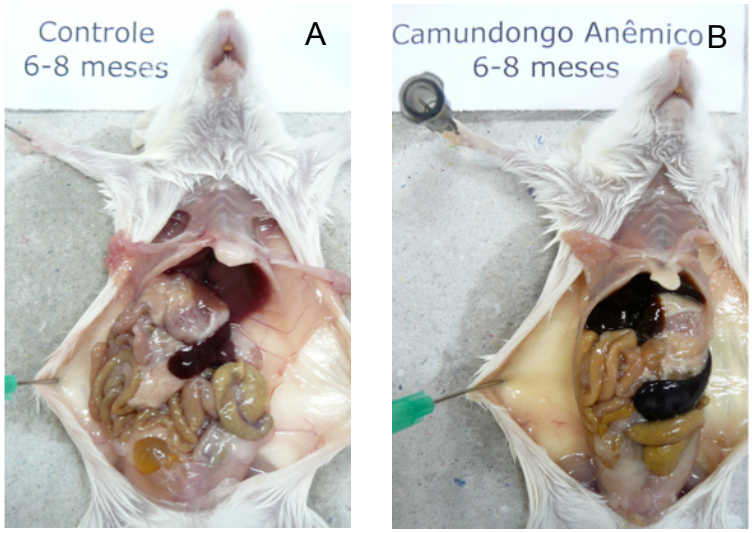
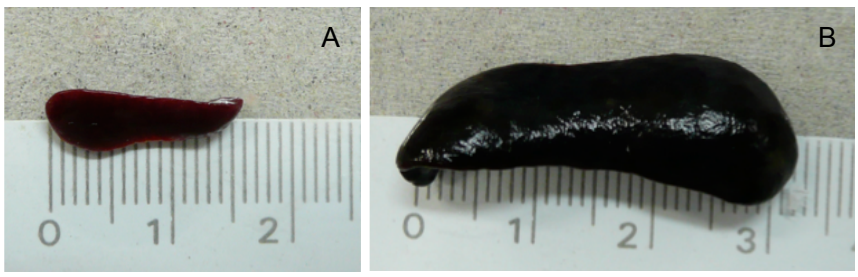


Figura 15 - Baço. (A) Camundongo BALB/c controle, G2 e (B) BALB/c mutante anêmico, G2 - São Paulo – 2010



Durante a necrópsia, baço, fígado e coração foram pesados e a porcentagem média do órgão em relação ao peso do camundongo foi calculada, assim como o aumento relativo dos órgãos do camundongo anêmico em relação ao controle. Os valores obtidos estão apresentados nas tabelas 19, 20 e 21.

Tabela 19 - Peso dos camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, fêmeas, G1 (de até 10 semanas de idade) e de seus respectivos órgãos (baço, fígado e coração), com a porcentagem do órgão em relação ao peso do camundongo e o aumento relativo dos órgãos no mutante em relação ao controle - São Paulo – 2010

G1	Cf		Af		Aumento relativo
	peso (g)	%	peso (g)	%	
peso	21,65	100	22,05	100	
baço	0,112	0,52	0,737	3,34	***6,48***
fígado	1,146	5,29	1,376	6,24	***1,18***
coração	0,117	0,54	0,156	0,71	***1,31***
n	2		2		

Legenda: Dados em destaque (negrito e itálico) indicam o aumento relativo importante dos órgãos dos animais mutantes aniemicos em relação aos controles.

Tabela 20 - Peso dos camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, fêmeas e machos, G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade), e de seus respectivos órgãos (baço, fígado e coração), com a porcentagem do órgão em relação ao peso do camundongo e o aumento relativo dos órgãos no mutante em relação ao controle - São Paulo – 2010

G2	Cf		Af		Aumento relativo	Cm		Am		Aumento relativo
	peso (g)	%	peso (g)	%		peso (g)	%	peso (g)	%	
peso	28,13	100	26,47	100		30,86	100	31,04	100	
baço	0,132	0,47	1,017	3,84	***8,16***	0,133	0,43	0,990	3,19	***7,40***
fígado	1,395	4,96	1,384	5,23	***1,05***	1,589	5,15	1,795	5,78	***1,12***
coração	0,160	0,57	0,190	0,72	***1,27***	0,171	0,56	0,212	0,68	***1,23***
n	6		6			8		8		

Legenda: Dados em destaque (negrito e itálico) indicam o aumento relativo importante dos órgãos dos animais mutantes aniemicos em relação aos controles.

Tabela 21 - Peso dos camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, fêmeas e machos, G3 (de 12 a 18 meses de idade), e de seus respectivos órgãos (baço, fígado e coração), com a porcentagem do órgão em relação ao peso do camundongo e o aumento relativo dos órgãos no mutante em relação ao controle - São Paulo – 2010

G3	Cf		Af		Aumento relativo	Cm		Am		Aumento relativo
	peso (g)	%	peso (g)	%		peso (g)	%	peso (g)	%	
peso	34,65	100	34,30	100		31,80	100	28,85	100	
baço	0,13	0,37	1,46	4,27	***11,65***	0,11	0,35	0,64	2,21	***6,38***
fígado	1,19	3,43	2,30	6,70	***1,95***	1,41	4,42	1,50	5,20	***1,18***
coração	0,17	0,50	0,23	0,67	***1,33***	0,17	0,53	0,20	0,68	***1,29***
n	2		1			1		2		

Legenda: Dados em destaque (negrito e itálico) indicam o aumento relativo importante dos órgãos dos animais mutantes aniemicos em relação aos controles.

No camundongo mutante anêmico, o baço (Figura 13) apresenta aumento relativo de pelo menos 6 a 8 vezes (Tabelas 19 e 20), aumento este que nos machos se mantém ao longo das faixas etárias estudadas, mas que se mostra progressivo com o avançar da idade e com um aumento de até 11,65 vezes nas fêmeas G3 (Tabela 21).

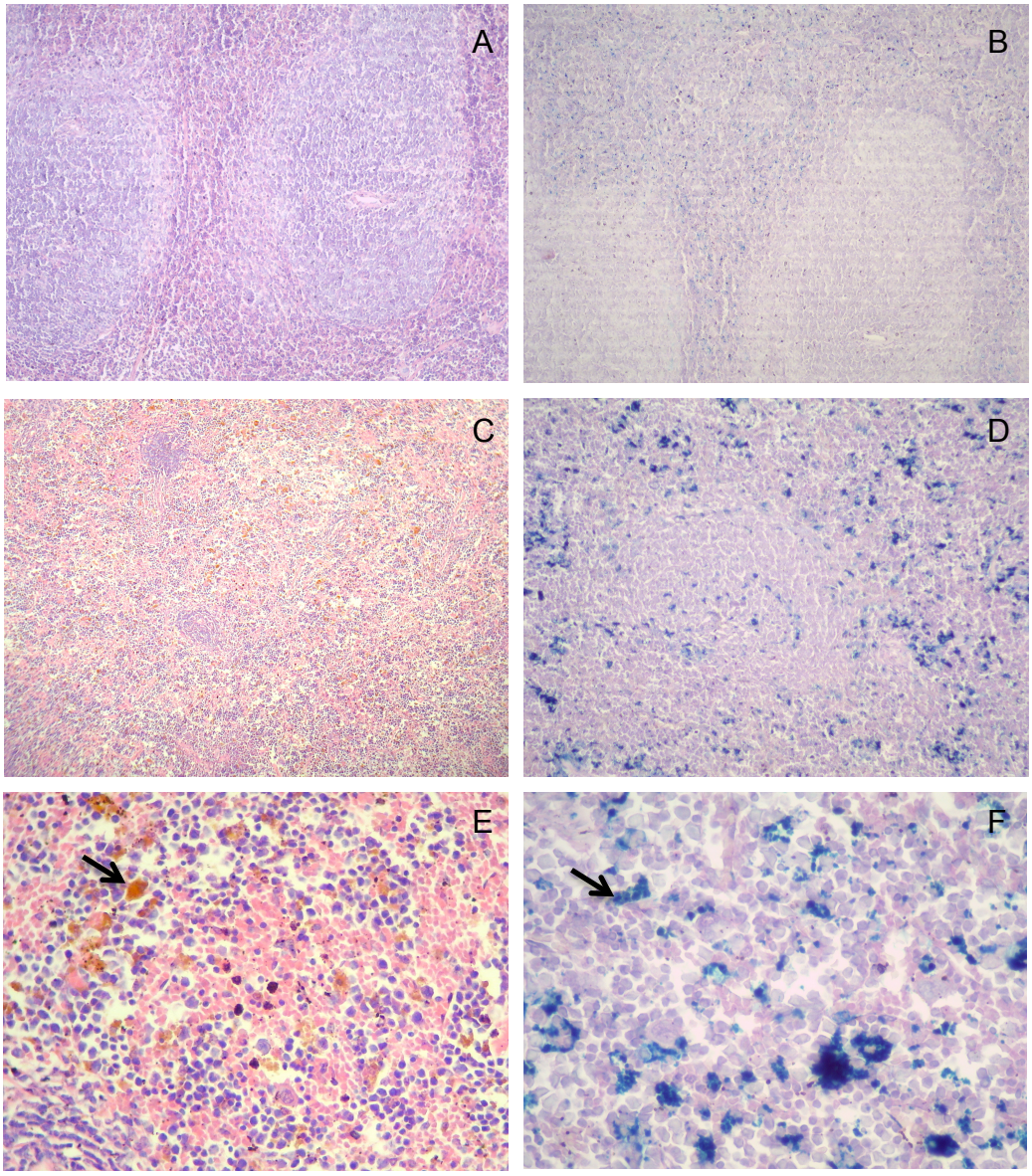
O fígado apresentou, macroscopicamente, espessamento de cápsula nos grupos G2 e G3. O aumento relativo do fígado nos anêmicos em relação aos controles foi discreto em todas as fixas etárias estudadas, aumentando apenas nas fêmeas de G3.

O coração dos anêmicos apresentou aumento relativo persistente e discretamente progressivo, sem distinção por gênero sexual.

Outros tecidos como órgãos de trato gastrintestinal, pulmões, músculos, glândulas e linfonodos não apresentaram alterações macroscópicas.

A seguir, estão apresentadas fotomicrografias dos cortes histológicos do baço, rim e fígado (Figuras 16, 17, 18, 19 e 20), na coloração de hematoloxilina – eosina (HE), para avaliação morfológica tecidual, e na coloração de Perls ou azul da Prússia, para avaliação dos depósitos de ferro, que ficam corados em azul.

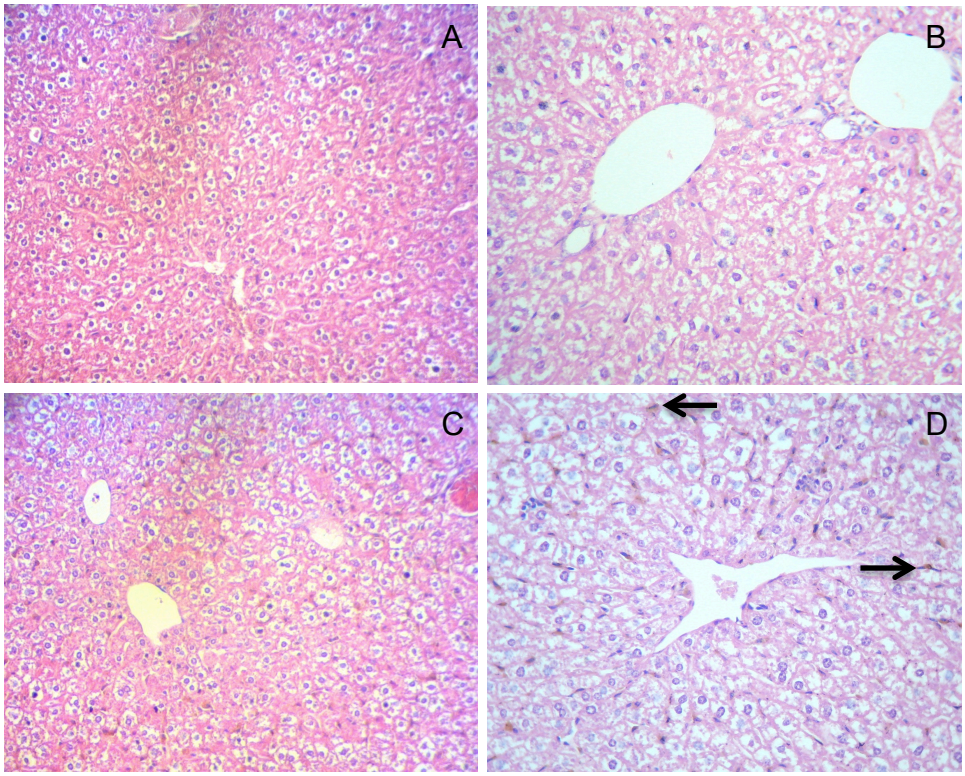
Figura 16 - Fotomicrografia de cortes histológicos de baço de camundongos BALB/c controle e anêmico. Coloração de hematoxilina e eosina (HE) e Perls – São Paulo – 2011



Legenda: (A) Controle, G2, HE, 100x. Arquitetura tecidual esplênica preservada. (B) Controle, G2, Perls, 100x. Padrão discreto de distribuição dos grânulos de depósito de ferro, corados em azul. (C) Anêmico, G2, HE, 100x. Arquitetura tecidual esplênica alterada. (D) Anêmico, G2, Perls. 100x. Moderada quantidade de grânulos de depósitos de ferro. (E) Anêmico, G2, HE, 400x. Depósitos de ferro evidentes, indicados pela seta. (F) Anêmico, G2, Perls, 400x. Grande quantidade de grânulos de depósitos de ferro corados em azul, indicados pela seta.

O baço do camundongo mutante anêmico, apresenta grande atividade hematopoiética com intenso aumento dos depósitos de ferro em macrófagos. Devido a hiperplasia, os centros germinativos ficam mais dispersos no tecido.

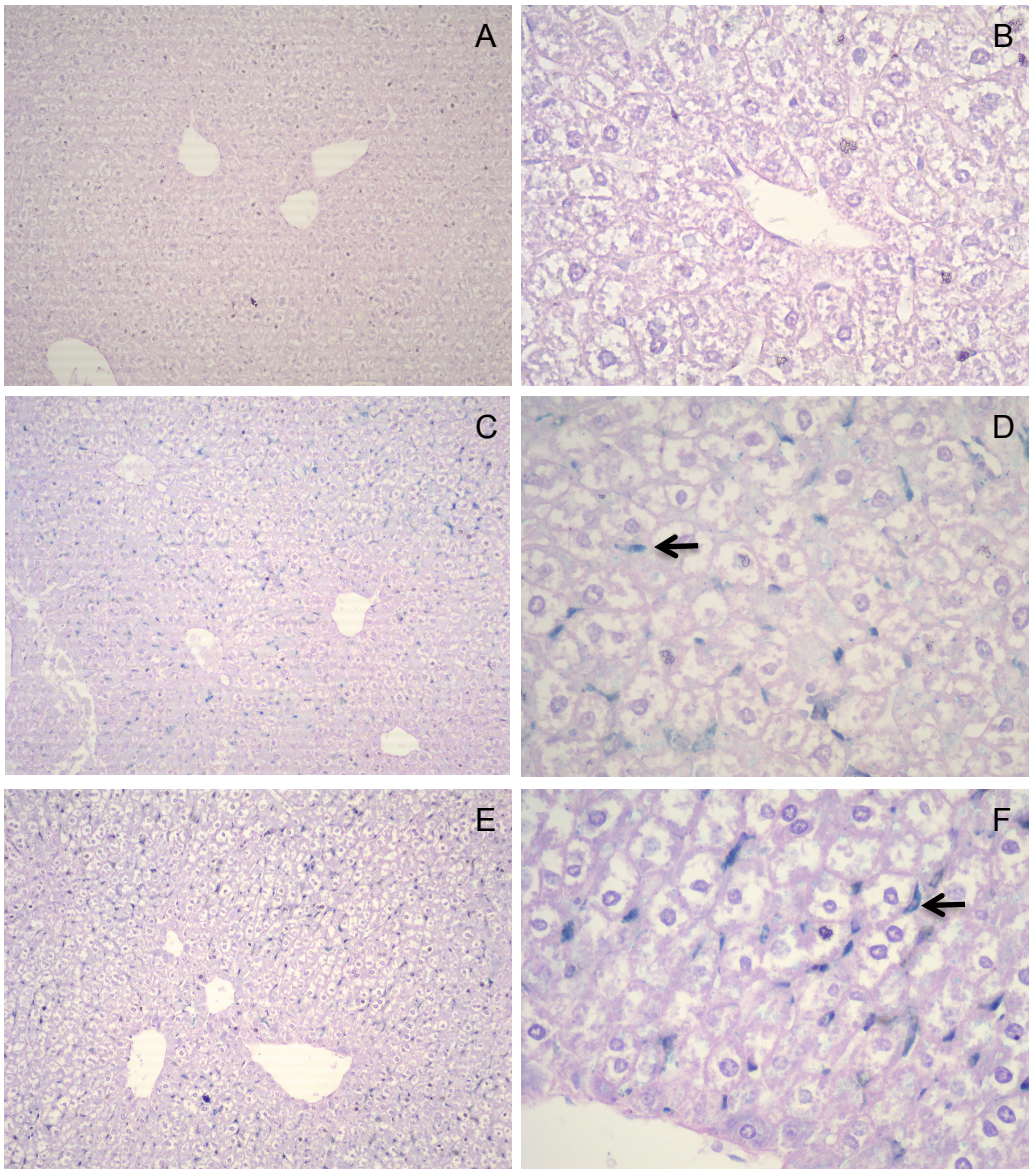
Figura 17 - Corte histológico do fígado de camundongos BALB/c, fêmeas, anêmico e controle, Grupo 2 (de 11 semanas a 8 meses de idade), coloração HE - São Paulo – 2011



Legenda: (A) e (B): BALB/c controle, aumento de 100x e 400x, respectivamente, sem alterações morfológicas dignas de nota; (C) e (D): BALB/c mutante anêmico, aumento de 100x e 400x, respectivamente. Observe o depósito de ferro intracitoplasmático nas células de Kupfer em (D) (seta).

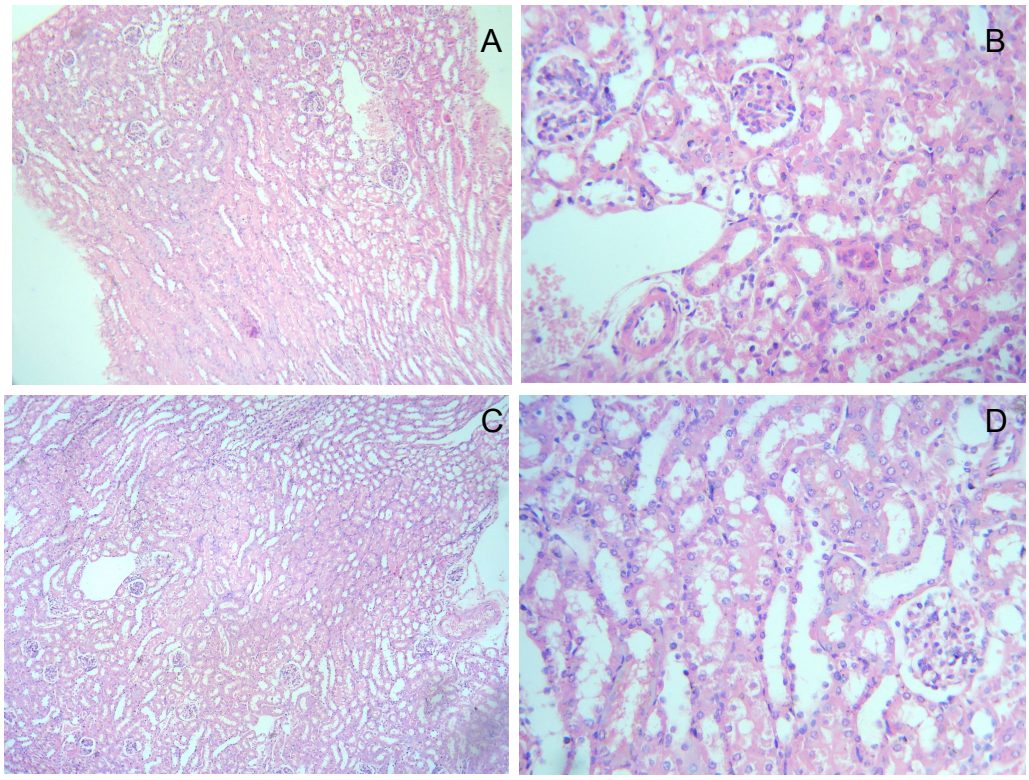
Microscopicamente, o fígado dos camundongos anêmicos não apresentou alterações de arquitetura tecidual ou celular, mas apresentou depósitos de ferro em células de Kupfer (Figura 17) que ficam mais evidentes na coloração de Perls e em maior quantidade com o avançar da idade, comparando os depósitos de ferro em G2 e em G1 (Figura 18).

Figura 18 – Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c controle e BALB/c anêmicos, de G1 (até 10 semanas de idade) e G2 (11 semanas a 9 meses de idade), coloração de Perls – São Paulo – 2011



Legenda: (A) e (B): Controle, G1, 100x e 400x, respectivamente. Ausência de depósitos de ferro no tecido. (C) e (D): Anêmico, G1, 100x e 400x, respectivamente. Note a distribuição difusa de grânulos de ferro em células de Kupfer, indicada pela cor azul e pela seta em (D). (E) e (F): Anêmico, G2, 100x e 400x, respectivamente. Observe o aumento da quantidade de grânulos de ferro de (E) em relação a (C), que estão depositados nas células de Kupfer, indicada pela seta em (F).

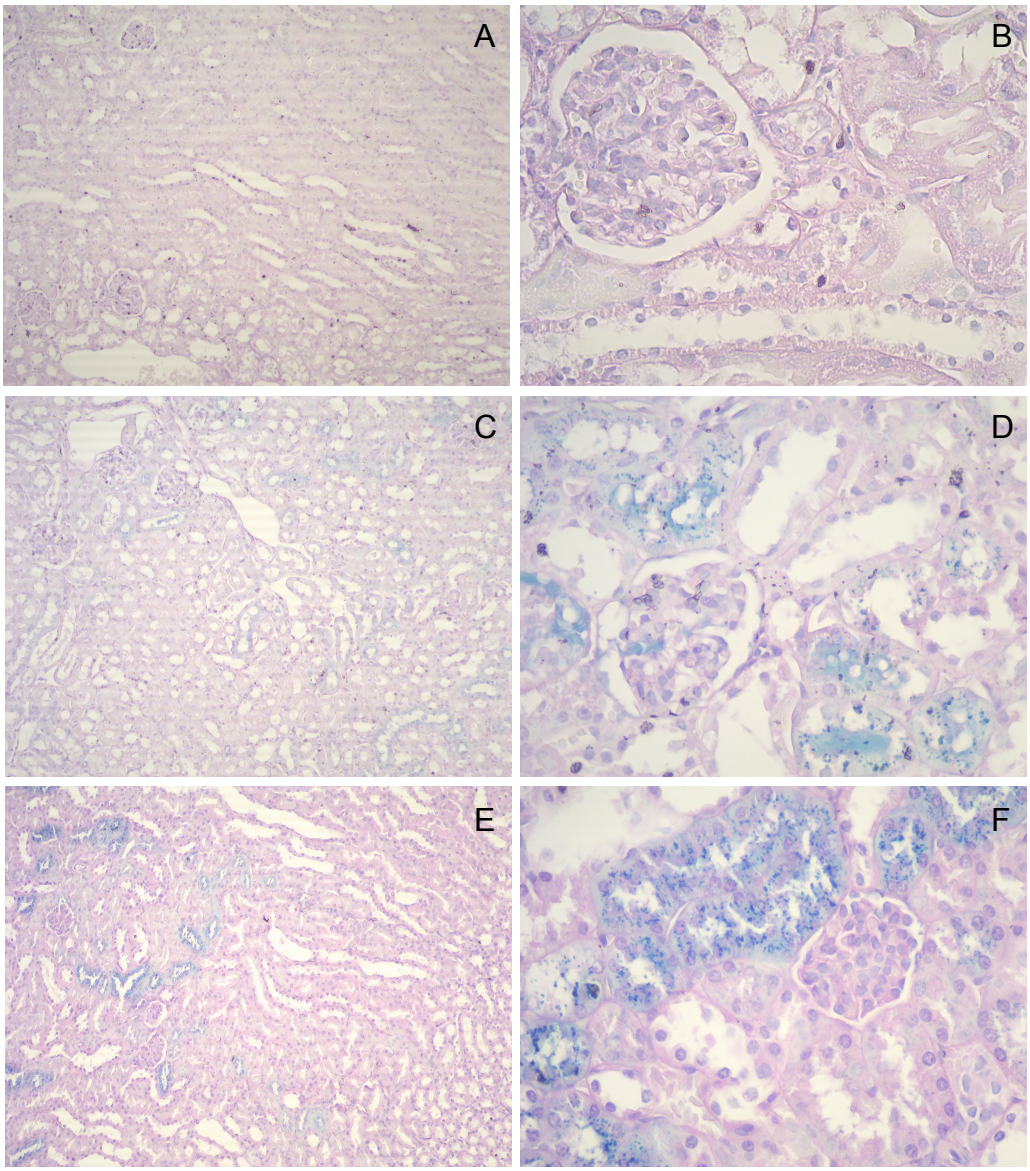
Figura 19 - Fotomicrografia de cortes histológicos de rim de camundongos BALB/c controle e BALB/c mutante, G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade), coloração HE - São Paulo – 2011



Legenda: (A) e (B): BALB/c controle, aumento de 100x e 400x, respectivamente, sem alterações de arquitetura; (C) e (D): BALB/c mutante anêmico, aumento de 100x e 400x, respectivamente, sem alterações de arquitetura.

Na coloração de HE, os rins não apresentaram alteração de arquitetura ou sinais de injúria tecidual (Figura 19). Entretanto, na coloração de Perls (Figura 20), observa-se nos camundongos anêmicos a deposição de ferro intracitoplasmática nas células tubulares renais. Além disso, estes grânulos de ferro parecem mais grosseiros em G2 do que em G1.

Figura 20 - Fotomicrografia de cortes histológicos de rim de camundongos BALB/c controle (G1 - até 10 semanas de idade) e BALB/c mutantes anêmicos (G1 e G2 - de 11 semanas a 8 meses de idade), coloração de Perls – São Paulo – 2011



Legenda: (A) e (B): Controle, G1, 100x e 400x, respectivamente. Ausência de depósitos de ferro. (C) e (D): Anêmico, G1, 100x e 400x, respectivamente. Observe o tom azulado nas células tubulares indicando os depósitos de ferro. (E) e (F): Anêmico, G2, 100x e 400x, respectivamente. Observe os grânulos de ferro mais grosseiros e em maior quantidade em relação a (D).

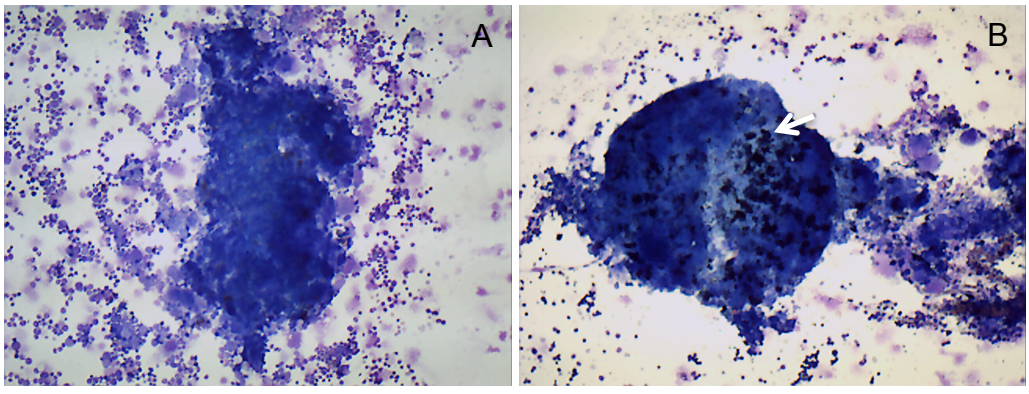
Durante a coleta de material de medula óssea, foi possível observar que o fêmur era mais escuro nos camundongos anêmicos do que nos controles.

A avaliação de celularidade de medula óssea para o Grupo 2 está demonstrada na tabela 22. A figura 21 ilustra a alta celularidade medular dos camundongos e o intenso aumento dos depósitos de ferro em macrófagos medulares nos animais mutantes.

Tabela 22 - Contagem média de células nucleadas em lavado femoral de camundongos BALB/c controle e BALB/c anêmicos, fêmeas e machos, do grupo G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade) – São Paulo – 2011

G2	Células/mm^3
Cf	22.433
Af	40.343
Cm	21.703
Am	48.660

Figura 21 - Fotomicrografia de citologia de medula óssea de camundongo BALB/c controle e BALB/c mutante anêmico, G2 (de 11 semanas a 8 meses de idade), coloração May Grünwald-Giemsa modificado, aumento de 100x – São Paulo – 2011



Legenda: (A): Controle. Grumo apresentando alta celularidade. e (B): Anêmico. Grumo apresentando alta celularidade e depósitos de ferro, indicados pela seta branca.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A genética da hemoglobina murina é de especial interesse na pesquisa científica devido à similaridade entre as hemoglobinas humanas e dos camundongos. O estudo mutagênico realizado por Massironi et al. (2006) produziu um camundongo BALB/c mutante que apresenta o fenótipo de anemia, com possível quadro de hemoglobina instável. E a continuação deste estudo com o mapeamento genético deste mutante (CRUZ, 2009; MASSIRONI, 2011) permitiu concluir que a mutação ocorreu no cromossomo 7, gene Hbb-b1 da cadeia globínica beta da hemoglobina, levando a uma substituição de uma leucina por uma prolina na posição 88 (posição helical F4) da cadeia beta, coincidindo com a mutação descrita para a hemoglobina instável de Santa Ana de humanos (Tabela 23) (GOUDEMAND et al., 1964; OPFELL et al., 1968; TANAKA et al., 1985; GONÇALVES et al., 1994; MIYAZAKI et al., 1997).

As hemoglobinas instáveis resultam de mutações em cadeias globínicas, levando à instabilidade do tetrâmero da molécula de hemoglobina e precipitação intracelular destas subunidades globínicas, denominados corpúsculos de Heinz. Estes corpúsculos são produtos da desnaturação da hemoglobina, também definidos como hemicromos e são formados quando o heme se dissocia do bolsão do heme e se liga a qualquer o outro sítio da globina, depois de desnaturada. Estas inclusões reduzem a meia vida das hemácias porque se ligam à membrana, diminuindo a deformabilidade da célula e aumentando a permeabilidade da membrana. O quadro final desta doença hemolítica também pode ser chamado de anemia hemolítica congênita com corpúsculos de Heinz, manifestando-se com anemia, reticulocitose, pigmentúria e esplenomegalia (WILLIAMSON, 1993; STEINBERG, 2009).

Geralmente, o que faz com que estes pacientes procurem por médicos é a urina escura e a esplenomegalia e no atendimento médico são descobertas as alterações hematológicas.

Os camundongos BALB/c mutantes anêmicos desenvolvidos por Massironi et al. (2006) apresentam a urina escura desde a primeira faixa etária estudada (de 1 a 2 meses de idade), semelhantemente ao descrito nos relatos de casos da hemoglobina de Santa Ana (GOUDEMAND et al., 1964; OPFELL et al., 1968;

TANAKA et al., 1985; GONÇALVES et al., 1994; MIYAZAKI et al., 1997).

Além de apresentarem sinais de hemoglobinúria, as alterações morfológicas eritrocitárias observadas nos camundongos mutantes de diferentes faixas etárias, como a presença de inclusões intraeritrocitárias, corpúsculos de Heinz e ponteado basofilico indicam a possibilidade de que a vida média destas hemácias esteja comprometida. A hemoglobinúria, o aumento de fósforo plasmático e a bilirrubinemia, principalmente por aumento da bilirrubina indireta, a qual impregna tecidos como o tecido celular subcutâneo, indicam a existência de um quadro hemolítico nesses animais.

Os camundongos mutantes apresentaram anemia desde o nascimento, com intensa reticulocitose (CRUZ, 2009). Em todas as faixas etárias estudadas, a constante presença de reticulócitos, hemácias mais jovens, levou ao aumento da amplitude de variação das hemácias (RDW) e anisocitose de hemácias, com tendência a macrocitose, indicada pelo VCM maior nos anêmicos quando comparado aos controles, e discreta hipocromia, indicada pelo CHCM menor. Do ponto de vista de classificação morfológica, trata-se de anemia macrocítica hipocrômica e, de acordo com a resposta medular, anemia regenerativa, que ocorre em processos tanto em hemorrágicos quanto hemolíticos. As alterações hematológicas foram observadas em todas as faixas etárias em igual magnitude, sem agravamento do quadro ao longo do tempo, apesar da hemossiderose observada em baço e fígado. Desta forma, podemos definir o quadro anêmico apresentado pelo mutante como anemia hemolítica congênita regenerativa, de caráter crônico, com a presença de inclusões intraeritrocitárias e corpúsculos de Heinz (TVEDTEN, 2010).

A eritroregeneração reflete no intenso aumento de volume e/ou da celularidade dos órgãos hematopoiéticos dos camundongos, especificamente medula óssea, baço e fígado. Na medula óssea, nota-se o aumento de quase duas vezes na celularidade, mas o órgão com maior impacto por esta eritropoiese aumentada é o baço, que se apresenta pelo menos seis vezes aumentado no mutante. O maior envolvimento do baço com a atividade eritropoiética foi citado por (EVERDS, 2007), ao descrever os trabalhos de Broudy et al. (1996) e Ohno et al. (1993), os quais, após a indução de hemólise em camundongos, observaram pequeno aumento de CFUs-E (unidades formadoras de colônia eritróides) e nenhum aumento de BFUs-E (unidades formadoras da explosão eritróide) na medula óssea

do fêmur enquanto no baço, observaram um aumento de 6 a 10 vezes de BFUs-E e de 25 a 50 vezes de CFUs-E. Além disso, nas fêmeas, o baço apresenta um crescimento progressivo com a idade (G3) de até 11,65 vezes o tamanho do baço do grupo controle, talvez pela necessidade de expansão do volume sanguíneo por conta das gestações, já que estavam em atividade reprodutiva. Outro ponto, é o aumento da hemocaterese devido às inclusões intraeritrocitárias e à maior fragilidade das hemácias e que ocorre, em grande parte, no baço.

Tabela 23 – Dados comparativos entre dados da literatura sobre a manifestação clínica da Hb de Santa Ana em humanos e achados no fenótipo do camundongo BALB/c mutante anêmico – São Paulo – 2012

	Pacientes humanos Hb Santa Ana	**Camundongo BALB/c mutante anêmico**
Mutação	gene Hbb, Cr 11, β88 Leu->Pro	gene Hbb-b1, Cr 7, β88 Leu->Pro
Urina	escura	escura
Esplenomegalia	Sim	Sim
Manifestação de dor	eventual dor epigástrica	não observada
Alterações de crescimento	Não	Não
Alterações de comportamento	Não	Não
Alterações de fertilidade	Não	Não
Necessidade de transfusão	Não	Não
Percurso da anemia	Congênita crônica	Congênita crônica
Anemia hemolítica	Sim: Hemoglobinúria e icterícia	Sim: Hemoglobinúria, icterícia, hiperfosfatemia, aumento dos depósitos de ferro intracelulares
Anemia regenerativa	Sim: Macrocítica, hipocrômica, reticulocitose (3 a 65,6%) Hiperplasia eritróide em medula óssea	Sim: Macrocítica, hipocrômica, reticulocitose (G2- 45 a 75%) Aumento de volume e atividade de ógãos hematopoiéticos
Morfologia eritrocitária	Anisocitose, inclusões intraeritrocíticas, corpúsculos de Heinz e de Howell-Jolly, ponteado basofílico	Anisocitose, inclusões intraeritrocíticas, corpúsculos de Heinz e de Howell-Jolly, ponteado basofílico, aumento da fragilidade osmótica eritrocitária

Fontes: (BISERTE et al., 1970; GONÇALVES et al., 1994; GOUDEMAND et al., 1964; MIYAZAKI et al., 1997; OPFELL et al., 1968; TANAKA et al., 1985;GEAGHAN, 2009; adaptado por MIYASHIRO, 2012)

Este aumento da atividade hematopoiética repercute também nas contagens de leucócitos, que embora não tenham apresentado um valor que indique uma diferença significativa, é notável o aumento do valor mediano de leucócitos totais dos mutantes em relação aos controles, principalmente em G2 e G3. Nos camundongos, é esperado que o leucócito predominante seja o linfócito e que este tenha participação em processos inflamatórios, juntamente com os neutrófilos (EVERDS, 2007; BOLLIGER et al., 2011). Comparando os valores dos animais

controle com os anêmicos, nota-se que os mutantes tendem a apresentar uma leucocitose por linfocitose absoluta em todas as faixas etárias estudadas. É interessante observar que nos animais mais velhos estudados (G3) os animais controle, fêmeas ou machos, tendem a uma neutropenia em relação às fases G1 e G2, enquanto os mutantes tendem a uma neutrofilia absoluta em relação a G1 e G2, mesmo mantendo a linfocitose absoluta, embora abaixo dos valores antes observados. Junta-se a estes dados a tendência à maior contagem de monócitos em mutantes em relação ao controle. Ainda na fase G3, tanto controle quanto anêmico apresentam diminuição de linfócitos absolutos, provavelmente por diminuição da linfopoiese associada à idade.

Esta distribuição linfocitária nos camundongos mutantes é curiosa, mas poderia também ser explicada pela redistribuição linfocitária, que faria com que os linfócitos permanecessem em circulação no sangue periférico, já que o principal órgão de residência destes (o baço) encontra-se devotado à hematopoiese extramedular, evidenciado pela esplenomegalia, com hiperplasia de polpa vermelha e hipoplasia relativa de polpa branca.

Os animais apresentam um quadro anêmico persistente, mas estável ao longo de 18 meses, de forma que o crescimento e desenvolvimento não apresentaram comprometimento secundário ao quadro. Não apresentaram evidentes alterações de comportamento ou fertilidade, nem manifestação de dor, à semelhança do que foi descrito no relato de ocorrência familiar da hemoglobina de Santa Ana por Opfell et al. em 1968 e Biserte em 1964, que ainda relatam a não necessidade de transfusão sanguínea nestes pacientes e que apresentam o padrão de hereditariedade da doença em heterozigose (ANEXO) (GOUDEMAND et al., 1964; OPFELL et al., 1968; BISERTE et al., 1970).

Os valores de plaquetas não apresentaram diferenças entre os grupos controle e anêmico, apenas ligeiro aumento em G3 em relação às outras faixas etárias, sem outras implicações. Embora os valores estejam abaixo dos valores de referência internacional, talvez por questões de métodos, acredita-se que o valor apresentado não tenha o valor comparativo diminuído. A avaliação da hemostasia, com testes de tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada, foi realizada por (CRUZ, 2009) e não acusou diferenças entre camundongos controle e mutantes.

A tão heterogênea população de hemácias observada no camundongo

mutante foi testada quanto a sua fragilidade osmótica. Na curva de porcentagem de lise notou-se que a hemólise da amostra sanguínea do camundongo mutante iniciou-se antes e terminou depois da curva da amostra de sangue de camundongo controle. No gráfico da curva cumulativa, que representa o incremento hemolítico, a amostra do camundongo controle apresenta um pico mais alto na concentração de NaCl 0,50%, que indica a hemólise da população predominante de hemácias maduras, e um pico menor em 0,35% de NaCl, representando a hemólise da pequena população de reticulócitos que é mais resistente à lise. Já a amostra do mutante, aparenta apresentar cerca de quatro tipos de população eritróides: uma pequena população que hemolisa rapidamente no tubo com 0,75% de NaCl (possivelmente as hemácias com alta fragilidade de membrana, talvez com maior quantidade de inclusões intraeritrocitárias); uma população importante e relativamente mista de células que apresentam hemólise num amplo espectro de concentrações de NaCl (de 0,65% a 0,55%, mas cujo pico fica próximo do pico do grupo controle em 0,50% de NaCl) que talvez inclua as hemácias normais e as hemácias com menor grau de alteração morfológica); a maior população de hemácias, relativamente mista e mais resistente, provavelmente composta por reticulócitos com pico de hemólise na concentração de NaCl de 0,40%; e uma quarta e pequena população que deve ainda compor o grupo de hemácias muito resistentes a lise por NaCl de reticulócitos mais imaturos ainda.

Para o estudo da hemoglobina, foram realizados alguns dos testes preconizados para estudo de hemoglobinopatia em humanos (NAOUM, 1997; KIMURA et al., 2008). A hemoglobina de camundongos é muito semelhante à humana, inclusive sua genética. Um dos pontos de diferença seria a ausência de hemoglobina fetal no camundongo e a respectiva cadeia globínica γ. Nos camundongos, as α-globinas são codificadas por 3 genes (ε, α_1 e α_2) localizados no cromossomo 11. As β-globinas são codificadas por quatro ou cinco genes ativamente transcritos (ε^y, βh1, βmin, βmaj, +/- βh0) localizados no cromossomo 7. As Hbs no camundongo adulto tem em sua constituição as cadeias globínicas α_1, α_2, βmin e βmaj. (EVERDS, 2007).

A eletroforese em tira de acetato celulose em pH alcalino, para pesquisa de hemoglobinas anormais, revelou que o camundongo BALB/c controle apresenta 3 bandas, provavelmente três tipos de hemoglobina circulantes, de forma que duas

correspondem a cerca de 90% das hemoglobinas circulantes - banda 2 e banda 3, provavelmente as hemoglobinas adultas do camundongo, identificadas como $\alpha_2\beta_2^{dmaj}$ e $\alpha_2\beta_2^{dmin}$. O padrão de migração do hemolisado do camundongo mutante é o mesmo do controle, de forma que, sob as condições deste teste, não foi possível observar uma diferença no padrão de migração que possibilite a identificação de uma Hb anormal, assim como a Hb Santa Ana em humanos, que não foi identificada neste teste. No presente estudo, observou-se uma redistribuição dos tipos de hemoglobina no camundongo mutante, pois ao mesmo tempo que ocorre uma diminuição da Hb $\alpha_2\beta_2^{dmaj}$ (banda predominante no controle e no mutante), observa-se um aumento relativo da banda de Hb $\alpha_2\beta_2^{dmin}$ e da banda 1, não identificada (Tabela 24).

Não sendo possível a identificação da molécula de Hb anormal íntegra, a eletroforese de cadeias polipeptídicas em pH alcalino poderia vir a esclarecer quanto aos tipos de globinas que constituem as Hbs. Mas as bandas apresentadas com o hemolisado do controle e do mutante coincidiram novamente, indicando que ambos apresentavam as mesmas cadeias globínicas na hemoglobina. A banda 2, com cerca de 55% de representatividade em ambos os grupos deve corresponder a cadeia α. Entretanto, a cadeia β (banda 1) apresentou-se em menor porcentagem no camundongo mutante em relação ao controle. Esta informação poderia implicar em menor estabilidade da globina ou fragmentação da proteína.

A eletroforese de cadeias globínicas em pH ácido seria o passo seguinte para a investigação da Hb, mas não apresentou sucesso em sua execução. A amostra preparada segundo técnicas descritas para humanos não apresentou mobilidade no gel de poliacrilamida; uma possível explicação seria algum tratamento diferente da amostra murina para este teste. Diferentes protocolos devem ser testados para continuação do estudo.

Outro teste utilizado para tentar diferenciar a Hb mutante, foi a curva de metahemoglobina, que caso a anormalidade da porção globínica ocorra devido a substituição da histidina proximal ou distal por outro aa, a metaHb apresentaria pico de absorção diferente ao da metaHb de Hb normal (NAOUM, 1997). Tanto a amostra do BALB/c controle quanto do mutante apresentaram absorção máxima no mesmo comprimento de onda (500nm), indicando que não apresentam metahemoglobinas distintas.

A avaliação funcional da hemoglobina mutante por hemogasometria não foi possível, devido à grande dificuldade na obtenção da amostra para a análise.

Dos testes de precipitação de hemoglobinas instáveis, no teste de desnaturação pelo calor, a amostra do mutante apresentou-se turva aos 10 minutos, enquanto o controle apresentava-se límpido. Com 30 minutos de incubação, ambas as amostras precipitaram. Talvez a limitação do volume da amostra não tenha colaborado com o teste, mas a turbidez aos 10 minutos de incubação provavelmente indica maior instabilidade da hemoglobina do camundongo mutante.

Os resultados do teste de precipitação por isopropanol para as amostras de hemolisados murinos também apresentaram performance diferente do descrito para humanos. As amostras de camundongos controle e anêmico apresentaram-se turvas desde os 10 minutos de incubação, enquanto o controle humano encontrava-se límpido. Mas aos 20 minutos, a amostra de camundongo mutante apresentou floculação, enquanto o controle apresentou floculação aos 30 minutos, sugerindo que a amostra do mutante seja mais instável do que a amostra do controle. A precipitação de todas as amostras ocorreu apenas aos 60 minutos. Talvez sejam necessárias adaptações da técnica à Hb murina para que a precipitação entre uma amostra de Hb instável não ocorra tão próxima da amostra controle.

Tabela 24 – Dados comparativos entre dados da literatura sobre o estudo da hemoglobina da Hb de Santa Ana em humanos e achados no fenótipo do camundongo BALB/c mutante anêmico – São Paulo – 2012

	Pacientes humanos Hb Santa Ana	**Camundongo BALB/c mutante anêmico**
Eletroforese de Hb em pH alcalino	Discreta banda com migração entre HbA e HbA_2	Bandas com migração igual ao controle murino, mas com diferentes proporções: $\downarrow\alpha_2\beta_2^{dmaj}$, $\uparrow\alpha_2\beta_2^{dmin}$ e banda 1
Eletroforese de cadeias globínicas em pH alcalino	Dados ausentes	Migração das bandas α e β igual ao controle, com menor quantidade de cadeia β
Curva de metahemoglobina	Dados ausentes	Igual ao controle murino (mutação não acomete a histidina proximal ou distal)
Teste de estabilidade da Hb - desnaturação pelo calor	Precipitação rápida e total	Houve precipitação
Teste de estabilidade da Hb - precipitação em isopropanol	Houve precipitação	Houve precipitação
Teste de estabilidade da Hb - estabilidade mecânica por agitação	Instável na forma oxiHb e desoxiHb	Não realizado
Afinidade por oxigênio	Aumentada, menor oxigenação tecidual	Não realizado

Fontes: (BISERTE et al., 1970; GONÇALVES et al., 1994; GOUDEMAND et al., 1964; MIYAZAKI et al., 1997; OPFELL et al., 1968; TANAKA et al., 1985;GEAGHAN, 2009; adaptado por MIYASHIRO, 2012)

Quanto à avaliação anátomo-patológica, o coração apresentou-se cerca de 30% maior nos mutantes em relação aos controles, indicando uma cardiomegalia compensatória, devido à anemia crônica. A compensação cardíaca mostrou-se eficiente, pois não observou-se alterações comportamentais como diminuição de atividade ou alteração de peso em relação ao controle. As enzimas que sinalizam lesão cardíaca (AST, CK, LDH) apresentaram discreta elevação de atividade nos anêmicos. A análise histopatológica não revelou alterações entre o controle e o mutante.

Quanto ao fígado, na macroscopia do exame necroscópico observou-se alteração de cápsula hepática nos camundongos mutantes em relação aos controles, e discreto aumento relativo, compatível com uma doença cardíaca. Na microscopia, observou-se deposição de ferro nas células de Kupfer de forma difusa em G1 e G2. Apesar disto, as enzimas sinalizadoras de injúria hepática (ALT, AST, FA e GGT) em G2 e G3 não apresentaram aumento de atividade significativo em relação ao controle e a produção de albumina manteve-se normal durante o período estudado, indicando atividade hepática normal.

Entretanto, os rins, na coloração de Perls, apresentaram deposição de ferro citoplasmática em células tubulares, finamente pontilhada e aumento de creatinina plasmática (G2 e G3), demonstrando que a hemoglobinúria persistente comprometeu a função renal ao longo do tempo.

A intensa atividade hematopoiética dos camundongos mutantes anêmicos, seja de eritropoiese ou hemocaterese, encontra no baço a possibilidade de expansão e repercute de forma impressionante na esplenomegalia, principalmente nas fêmeas mutantes mais velhas (G3). Na microscopia, nos BALB/c controle, observou-se discreta deposição de ferro em citoplasma de macrófagos ao redor do centro germinativo de forma disseminada; nos BALB/c mutantes a deposição de ferro apresentou-se muito mais abundante, com grânulos grosseiros, também de forma disseminada e, por vezes, no interior dos centros germinativos, que se encontram mais dispersos no tecido esplênico.

Muitos dos dados levantados precisam ainda ser repetidos para obtenção de um número amostral significativo e muitos dos testes devem ser repetidos com diferentes protocolos ou com as devidas adaptações ao tipo de hemoglobina e hemácia de camundongos.

Os casos descritos de hemoglobina de Santa Ana relatam a procura dos

pacientes portadores da doença por atendimento médico devido a coloração da urina, eventualmente por dor em região epigástirca. Geralmente têm conhecimento da anemia desde a infância, mas aparentemente não receberam outras instruções quanto ao acompanhamento clínico do quadro. Como a doença tem curso crônico, sem interferências no desenvolvimento ou imunidade, os relatos do quadro só foram realizados quando estes pacientes foram procurar por atendimento médico em grandes centros, onde foi possível pesquisar o histórico dos pacientes e seus familiares e aprofundar a investigação desta hemoglobinopatia, permitindo a identificação da mutação no gene da cadeia beta da globina.

Na maioria dos casos, realizou-se a esplenectomia, mas sem melhora clínica do quadro. Apenas no relato de Miyazaki et al. (1997) houve associação do quadro com colelitíase. Não foi possível saber se estes pacientes receberam acompanhamento clínico após os relatos.

Existem poucos modelos animais com alterações de hemoglobina disponíveis, a maioria está associada a talassemias e anemia falciforme. Alguns mutantes estão associados a outras hemoglobinopatias, mas alguns sem completa fenotipagem ou mapeamento genético (LEWIS et al., 1985; PETERS et al., 1985).

O camundongo mutante desenvolvido por Massironi et al. (2006) apresenta fenótipo muito semelhante ao descrito para a hemoglobina Santa Ana. Além disso, com a finalização do mapeamento genético, a mutação foi encontrada exatamente no mesmo gene descrito em humanos.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. O camundongo BALB/c mutante anêmico desenvolvido por Massironi et al. (2006) apresenta fenótipo similar ao da hemoglobina instável de Santa Ana descrita em humanos. O genótipo, segundo Massironi (dados não publicados), também apresenta grande similaridade com a Hb Santa Ana.

2. O camundongo BALB/c mutante anêmico apresentou anemia hemolítica congênita regenerativa (macrocítica e hipocrômica) com presença de inclusões intraeritrocitárias e corpúsculos de Heinz, de caráter crônico. As hemácias do camundongo BALB/c mutante anêmico apresentaram-se em diferentes populações em termos de resistência à lise em diferentes concentrações de NaCl.

3. A hemoglobina do BALB/c mutante anêmico não apresentou padrão de migração distinguível na eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino. A hemoglobina do BALB/c mutante anêmico apresentou precipitação no teste de desnaturação pelo calor e no teste de precipitação por isopropanol mais precocemente do que a hemoglobina do BALB/c controle, classificando-a como instável.

4. As cadeias globínicas que constituem a hemoglobina do camundongo BALB/c mutante anêmico foram as mesmas do BALB/c controle pela eletroforese de cadeias globínicas em pH alcalino.

5. O camundongo BALB/c mutante anêmico apresentou alterações anátomo-patológicas compatíveis com doença hemolítica crônica, com repercussão principalmente em baço, rins, coração e fígado.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. D. The mouse genome. In: FOX, J. G.; BARTHOLD, S. W.; DAVISSON, M.; NEWCOMER, C.E.; QUIMBY, F.W.; SMITH, A. L. (Eds.). **The mouse in biomedical research**. 2nd. ed. Amsterdam: Academic Press - Elsevier, 2007. p. 99-114, v.1.

ANGELIS, M. H. DE; MICHEL, D.; WAGNER, S.; BECKER, S.; BECKERS, J. Chemical mutagenesis in mice. In: FOX, J. G.; BARTHOLD, S. W.; DAVISSON, M. NEWCOMER, C.E.; QUIMBY, F.W.; SMITH, A. L. (Eds.). **The mouse in biomedical research**. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press - Elsevier, 2007. p. 225-260, v. 1.

BEDELL, M. A; JENKINS, N. A; COPELAND, N. G. Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. **Genes & Development**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 1997.

BISERTE, G.; GOUDEMAND, M.; VOISIN, D.; CHARLESWORTH, D.; LORKIN, P. A.; LEHMANN, H. Hémoglobine instable au cours d' une anémie hémolytique a inclusions érythrocytaires et urines noires. **Nouvelle Revue Française d' Hématologie**, v. 10, n. 2, p. 201-208, 1970.

BOLLIGER, A. P.; EVERDS, N. E.; ZIMMERMAN, K. L.; MOORE, D.M.; SMITH, S. A.; BARNHART, K.F. Hematology of laboratory animals. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds.). **Schalm's veterinary hematology**. 6th. ed. Singapore: Wiley-Blackwell, 2011. p. 852- 887.

BRAYTON, C.; JUSTICE, M.; MONTGOMERY, C. A. Evaluating mutant mice: anatomic pathology. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 1, p. 1-19, 2001.

CRUZ, C. C. **Mapeamento genético e caracterização fenotípica do mutante anêmico induzido por ethyl-nitroso-urea**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, São Paulo, 2009.

DESSYPRIS, E. N.; SAWYER, S. T. Erythropoiesis. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; RODGERS, G. M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B.; ARBER, D. A.; MEANS JR, R. T. (Eds.). **Wintrobe´s clinical hematology**. 12th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. p. 106-125, v. 1.

EATON, W. A; HENRY, E. R.; HOFRICHTER, J.; MOZZARELLI, A. Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood? **Nature Structural Biology**, v. 6, n. 4, p. 351-8, 1999.

ENGELKING, L. R. **Textbook of veterinary physiological chemistry**. Jackson, Wyoming: Teton Newmedia, 2004. p. 590

EPPIG, J. T. Mouse strain and genetic nomenclature: an abbreviated guide. In: FOX, J. G.; BARTHOLD, S. W.; DAVISSON, M. NEWCOMER, C.E.; QUIMBY, F.W.; SMITH, A. L. (Eds.). **The mouse in biomedical research**. 2nd. ed. Amsterdam: Academic Press - Elsevier, 2007. p. 79-97. v.1.

EVERDS, N. E. Hematology of the laboratory mouse. In: FOX, J. G.; BARTHOLD, S. W.; DAVISSON, M. T.; NEWCOMER, C.E.; QUIMBY, F.W.; SMITH, A. L. (Eds.). **The mouse in biomedical research:** normative biology, husbandry, and models. 2nd. ed. Amsterdam: Academic Press, 2007. p. 133-170. v. 3.

GEAGHAN, S. M. Normal blood values: selected health-associated values for neonatal, pediatric, and adult populations. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; RODGERS, G. M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B.; ARBER, D. A.; MEANS JR, R. T. (Eds.). **Wintrobe's clinical hematology**. 12th. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. p. 2584-2594.

GONÇALVES, M. S.; FÁTIMA SONATI, M.; KIMURA, E. M.; ARRUDA, V.R.; COSTA, F.F.; NECHTMAN, J.F.; STOMING, T.A. Association of Hb Santa Ana ($\alpha 2\beta 2$(F4)Leu->Pro) and Hb Porto-Alegre [a2b29(A6)Ser->Cys] in a Brazilian female. **Hemoglobin**, v. 18, n. 3, p. 235-239, 1994.

GOUDEMAND, M.; BISERTE, G.; HABAY, D.; VOISIN, D. Hémoglobine anormale et anémie hémolytique familiale avec inclusions erythrocytaires et urines noires. **Nouvelle Revue Française d' Hématologie**, v. 4, n. 4, p. 487- 504, 1964.

GUÉNET, J. L. Chemical mutagenesis of the mouse genome: an overview. **Genetica**, v. 122, p. 9-24, 2004.

GUÉNET, J. L.; BONHOMME, F. Origin of the laboratory mouse and related subspecies. In: HEDRICH, H. J.; BULLOCK, G.; PETRUSZ, P. (Eds.). **The laboratory mouse**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. p. 3-13.

HENDRIX, C. M.; SIROIS, M. **Laboratory procedures for veterinary technicians**. Philadelphia : Mosby Elsevier, 2007. p. 400

KIMURA, E. M.; OLIVEIRA, D. M.; JORGE, S. E. D. C.; ABREU, C.F.; ALBUQUERQUE, D.M.; COSTA, F.F.; FÁTIMA SONATI, M. Identificação e caracterização de variantes novas e raras da hemoglobina humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 4, p. 316–319, 2008.

LOUKOPOULOS, D. L. Haemoglobinopathies. **eLS - Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-10, 2002.

LEWIS, S.E.; JOHNSON, F.M.; SKOW; L.C.; POPP, D.; BARNETT, L.B.; POPP, R.A. A mutation in te β-globin gene detected in the progeny of a female mouse treated with ethylnitrosourea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.82, p. 5829-5831, 1985.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Dacie and Lewis practical haematology**. 10th. ed. Philadelphia : Churchill Livingstone, Elsevier, 2006. p. 722.

LUKENS, J. N. Hereditary disorders of hemoglobin structure and synthesis. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N.; RODGERS, G. M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B. (Eds.). **Wintrobe's clinical hematology**. 11th. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 1247-1262.

MASSIRONI, S. M. G.; REIS, B. L. F. S.; CARNEIRO, J. G.; BARBOSA, L. B. S.; ARIZA, C. B.; SANTOS, G. C.; GUÉNET, J. L.; GODARD, A. L. B. Inducing mutations in the mouse genome with the chemical mutagen ethylnitrosourea. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 9, p. 1217-26, 2006.

MCGARRY, M. P.; PROTHEROE, C. A.; LEE, J. J. **Mouse hematology** - a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010. p. 99

MIYAZAKI, A; NAKANISHI, T.; KISHIKAWA, M.; SHIMIZU, A.; JOZAKI, K.; YONEZAWA, T. The first Japanese case of Hb Santa Ana, an unstable abnormal hemoglobin, identified rapidly by electrospray ionization mass spectrometry. **Internal Medicine (Tokyo, Japan)**, v. 36, n. 5, p. 365-70, maio 1997.

MORSE III, H. C. Building a better mouse: one hundred years of genetics and biology. In: FOX, J. G.; BARTHOLD, S. W.; DAVISSON, M. T.; NEWCOMER, C.E.; QUIMBY, F.W.; SMITH, A. L. (Eds.). **The mouse in biomedical research**. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press - Elsevier, 2007. p. 1-11. v.1.

NAOUM, P. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997. p. 171

NGUYEN, D.; XU, T. The expanding role of mouse genetics for understanding human biology and disease. **Disease Models & Mechanisms**, v. 1, n. 1, p. 56-66, 2008.

OPFELL, R. W.; LORKIN, P. A; LEHMANN, H. Hereditary non-spherocytic haemolytic anaemia with post-splenectomy inclusion bodies and pigmenturia caused by an unstable haemoglobin Santa Ana-beta-88 (F4) leucine--proline. **Journal of Medical Genetics**, v. 5, n. 4, p. 292-297, 1968.

PETERS, J.; ANDREWS, S.J.; LOUTIT, J.F.; CLEGG, J.B. A mouse β-globin mutant that is an exact model of hemoglobin Rainier in man. **Genetics**, v. 110, p. 709-721, 1985.

QUIMBY, F. W.; LUONG, R. H. Clinical chemistry of the laboratory mouse. In: FOX, J. G.; BARTHOLD, S. W.; DAVISSON, M. T.; NEWCOMER, C.E.; QUIMBY, F.W.; SMITH, A. L. (Eds.). **The mouse in biomedical research:** normative biology, husbandry, and models. 2nd. ed. Amsterdam: Academic Press - Elsevier, 2007. p. 171-216. v. 3.

SCHECHTER, A. N.; SINGER, K.; LEHMANN, H.; CASTLE, W.; HUISMAN, T.; JAFFE, E. ASH 50th anniversary review hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-3938, 2008.

SIROIS, M. **Medicina de animais de laboratório**. São Paulo: Editora Roca, 2008. p. 332

STEINBERG, M. H. Hemoglobins with altered oxygen affinity, unstable hemoglobins, M-hemoglobins, and dyshemoglobinemias. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J; RODGERS, G.M. PARASKEVAS, F.; GLADER, B.; ARBER, D. A.; MEANS JR, R. T. (Eds.). **Wintrobe's clinical hematology**. 12th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. p. 1132-1142. v. 1.

TANAKA, Y.; KELLEHER, J.; SCHWARTZ, E.; ASAKURA, T. Oxygen binding and stability properties of Hb Santa Ana (β88 Leu→ Pro). **Hemoglobin**, v. 9, n. 2, p. 157-169, 1985.

TELEN, M. J. The mature erythrocyte. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; RODGERS, G. M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B.; ARBER, D. A.; MEANS JR, R. T. (Eds.). **Wintrobe's clinical hematology**. 12th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. p. 126-155. v. 1.

TVEDTEN, H. Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds.). **Schalm's veterinary hematology**. 6th. ed. Singapore: Wiley-Blackwell, 2010. p. 152-161.

WILLIAMSON, D. The unstable haemoglobins. **Blood Reviews**, v. 7, n. 3, p. 146-163, 1993.

ANEXO

ANEXO - RELATOS DE CASOS HUMANOS DE HB DE SANTA ANA

Opfell et al. (1968) descreveram um paciente que apresentava anemia e esplenomegalia desde um ano de idade, com exame laboratorial indicando intensa anisocitose e discreta policromasia, além da urina âmbar. O paciente foi acompanhado ao longo dos anos e observou-se que a partir dos 12 anos a icterícia tornou-se persistente e o baço aumentava cada vez mais de tamanho. Com 22 anos, foi esplenectomizado – o baço pesava 1920g. Seis meses após a cirurgia, apresentou discreta melhora do quadro anêmico. Casou-se e teve filhos. De seus quatro filhos, três apresentaram quadro semelhante (Tabela 20). Investigou-se seus parentes diretos (pai, mãe, irmão) e sua esposa, mas nenhum apresentou as alterações observadas. Foram realizados testes de sequenciamento de aas da Hb mutante, localizando a alteração.

Tabela 25 - Dados dos pacientes acompanhados por Opfell et al. (1968) em Santa Ana, Califórnia, EUA

	He ($x10^6/\mu L$)	**Hb (g/dL)**	**Ht (%)**	**Morfologia eritrocitária**	**Outros dados**
Paciente 1	(nascimento em1926)				
1 ano	2,7			Anisocitose +++, policromasia +	Esplenomegalia, icterícia, urina âmbar
3 anos	3,9				Esplenomegalia, icterícia
21 anos	3,5	9,0		Anisocitose +++, ponteado basofílico, Trombocitopenia (20.000/uL)	Esplenomegalia, icterícia, urina âmbar; Fragilidade osmótica eritrocitária: normal
22 anos					Esplenectomia – baço: 1920g
6 meses após a cirurgia	4,4	12,0			
27 anos	3,27	13,4	49,5	Reticulócitos: 5,6%	Teste de Coombs: neg; Bilirrubina total: 2,4 mg/dL

	He ($x10^6/\mu L$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	Morfologia eritrocitária	Outros dados
30 anos		14,0	44	Anisocitose +++, policromasia +++, macrocitose +, CHJ +++, CH++++, em pequena quantidade: corp. Pappenheimer e ponteado basofílico, reticulócitos: 10%	Icterícia +, urina acastanhada
31 anos		9,5			Obs: pneumonia aguda
		12 a 14			Obs: recuperação espontânea do quadro, sem outras intercorrências

Paciente 2	Filha do paciente 1 (nascimento em 1952)				
					Urina escura desde alguns meses de idade
1,5 ano				Anemia	Esplenomegalia, icterícia
7 anos			33	Anisocitose +++, Policromasia +++, Ponteado basofílico, Reticulócitos: 20%, Sem outras inclusões eritrocitárias	
10 anos					Esplenectomia – baço: 552g
3 meses após cirurgia		12,2	37	Presença de inclusões intra-eritrocitárias* em 58% das hemácias	Bilirrubina: 0,6 mg/dL
	Crescimento e desenvolvimento normais				

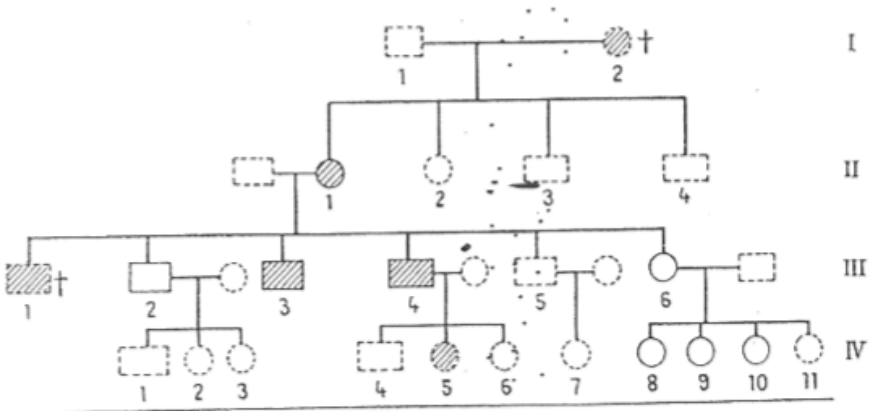
Paciente 3	Filho do paciente 1 (nascimento em 1957)				
					Urina escura desde 2 meses de idade
1,5 ano				Anemia	Icterícia
2 anos		8,1	30	Anisocitose +++, Policromasia +++, Ponteado basofílico, Reticulócitos: 25%, Sem outras inclusões eritrocitárias	Esplenomegalia
8 anos					Esplenectomia – baço: 414g
Meses após a cirurgia			38	Reticulócitos: 3%, Presença de inclusões intra-eritrocitárias* em 80% das hemácias	
Paciente 4	Filha do paciente 1				
	Sem alterações hematológicas, sem icterícia ou esplenomegalia				

Paciente 5	Filho do paciente 1 (nascimento em 1967)
	A morfologia eritrocitária sugere que a criança seja acometida

Fonte: Adaptado por MIYASHIRO, 2012 de OPFELL et al., 1968
Legenda: CHJ: corpúsculo de Howell-Jolly; CH: corpúsculo de Heinz
+: grau discreto, ++: grau moderado, +++: grau intenso
*: o autor descreve estas inclusões com tamanho variável, geralmente grandes e centrais. Considera-as como corpúsculos de Heinz ao final do estudo, mas não empregou o termo em todos os momento.

Biserte et al. (1970) descrevem um quadro de hemoglobina anormal e anemia hemolítica familiar (Figura 20), com inclusões eritrocitárias e urina escura, observada em 1964 e relatada por Goudemand et al. (1964). Somente em 1970, com técnicas e tecnologia mais avançadas, o grupo pode concluir a identificação da hemoglobina mutante, que se encaixou no perfil da Hb Santa Ana.

Figura 22 – Árvore geneológica da família estudada por Biserte et al. (1964)



Legenda: ○□: exame negativo
○□ (contorno pontilhado): não examinado
●■: exame positivo

Fonte: (GOUDEMAND et al., 1964)

Tanaka et al. (1985) relata o caso de um garoto de 4 anos de idade, caucasiano, com histórico de anemia hemolítica crônica, com urina escura, observada desde os 3 meses de idade, sem nunca ter recebido transfusão sanguínea. No exame físico, apresentava discreta palidez e baço palpável. Nos exames laboratoriais de triagem, apresentou hematócrito de 33,8 %, concentração de hemoglobina de 10,1 g/dL, VCM 92fL e contagem de reticulócitos de 34,4%. Na eletroforese de Hb em acetato de celulose pH 8,6, observou-se um padrão A A2 com presença de uma Hb de migração lenta de cerca de 15%. Ambos os pais eram normais em termos hematológicos.

O caso descrito por Gonçalves et al. (1994) no Brasil é de uma menina de 10 anos, caucasiana, com anemia e esplenomegalia persistentes, observadas desde os

3 anos de idade. Morfologicamente, suas hemácias apresentavam evidente ponteado basofílico. No estudo genético do gene da β-globina, detectou-se a mutação T→ C no códon 88, que leva a troca de aa Leu → Pro na posição 88 (Hb Santa Ana ou mutação α2β2), e outra mutação C → G no códon 9, que implica na troca Ser → Cys, observada na Hb Porto Alegre. No estudo familiar, a mãe não apresentou nenhuma alteração, mas o irmão também apresentava a mutação no códon 9 do gene da β globina, sugerindo que o pai (que não participou do estudo) fosse o carreador da Hb Porto Alegre.

No Japão, Miyazaki et al. (1997) relataram outro caso de Hb Santa Ana, uma japonesa de 18 anos, com histórico de dor em região epigástrica superior direita e icterícia. Na avaliação laboratorial, observou-se discreta anemia, contagem de reticulócitos alta, bilirrubinemia indireta, enzimas elevadas sugerindo colestase. Chegou-se ao diagnóstico de colelitíase e foi submetida a retirada de vesícula biliar. Com 2 anos, apresentava anemia, icterícia e esplenomegalia e aos 9 anos de idade, foi submetida a esplenectomia, com melhora da anemia. Nunca necessitou de transfusão sanguínea, mesmo durante as cirurgias. Sua mãe, no momento do relato, tinha 42 anos e com 30 anos teve o baço e a vesícula biliar removidos devido a colelitíase e anemia hemolítica. Também nunca necessitou de transfusão sanguínea.

A lua dilui-se lentamente
e um sol menino espreguiça os braços translúcidos...

Frescos murmúrios de águas puras
que se abandonam aos declives

Um par de asas dança na atmosfera rosada.

Silêncio,
meus amigos,

o dia vai nascer.

Clarice Lispector