

PATRICIA HELENA LUCAS PRANKE

***ALTERAÇÕES PROTEICAS DA MEMBRANA
ERITROCITÁRIA NA ELIPTOCITOSE HEREDITÁRIA E
"ELIPTOCITOSE ADQUIRIDA"***

Orientadora: Prof^a. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

**Tese apresentada ao Departamento de
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de mestre.**

Campinas

- 1994 -

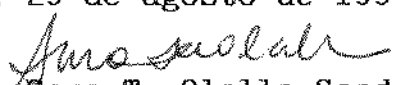
P886a

22486/BC

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Bioquímica Patricia Helena Lucas Pranke.

Campinas, 29 de agosto de 1994.


Profa. Dra. Sara T. Olalla Saad

- Orientadora -

Dedico este trabalho...

...à minha mãe: pelo que representou em sua efêmera, mas eterna presença

...à avó Cecília: por perpetuar minha formação com tanta dedicação

Agradeco

...à Prof^a. Dra. Sara Saad: pela compreensão, incentivo, apoio e amizade.

...ao Prof. Dr. Fernando F. Costa: pela confiança e exemplo profissional e de caráter.

...aos colegas de laboratório Valder, Maristela, Marilda, Carmem, Mônica, Silvana, Tita, Lena, Simone, Carlos, Eliana, Cristina, Neusa, Dilmara, Aranha, Afonso, Jovino, Simone e Paulo, Sócrates, Lili, Sandra e Simone (HLA) e todos os companheiros do "corredor": pela amizade no dia-a-dia.

...aos amigos do Hemocentro, em especial à Malú e Sandrinha pela paciência e pelos "quebra-galhos" possíveis e até impossíveis "quase" sempre de última hora.

...às gaúchas Nelci, Sandra, Preta, Denise, Rita e "Cláudia": pelo chimarrão e amizade.

...aos amigos, professores e funcionários da Farmacologia e por todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

...ao Roberto: pelo companheirismo, apoio, compreensão e por estar sempre presente, mesmo à distância.

...ao pai Rony (*in memoriam*), meus irmãos Herbert, Airton e Cristina, primos e tios em especial à tia Adelaide: por compartilhar toda esta caminhada.

...à FAPESP pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

...a Deus: pelo privilégio, nem sempre merecido, de tudo isto.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUÇÃO	
I. 1. A membrana eritrocitária	2
I. 2. O eliptócito	12
I. 3. Eliptocitose Hereditária	14
- Subtipos de ElH	16
- Defeitos proteicos e moleculares na ElH	20
I. 4. "Eliptocitose Adquirida"	30
II. OBJETIVOS	33
III. CASUÍSTICA	35
IV. MÉTODOS	
IV. 1. Análise Hematológica	40
IV. 2. Estudo Bioquímico	
1. Extração e solubilização das proteínas da membrana.eritrocitária	41
2. Eletroforese em gel de poliacrilamida	42
3. Quantificação das proteínas de membrana por densitometria	43
4. Extração de espectrina	44
5. Eletroforese em gel não desnaturante	44
6. Digestão triptica da espectrina	45
IV. 3. <i>Western-blotting</i>	51

IV. 4. Estudo Molecular	
1. Extração de DNA genômico	53
2. Amplificação do DNA através da PCR	54
3. Sequenciamento do DNA	54
4. Pesquisa de heteroduplex	57
V. RESULTADOS	
V. 1. Eliptocitose Hereditária	59
V. 2. "Eliptocitose Adquirida"	106
VI. DISCUSSÃO	115
VII. RESUMO	125
VIII. SUMMARY	127
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

I. INTRODUÇÃO

A hemácia, para exercer sua função de captar o oxigênio dos pulmões e levá-lo para todas as células através da hemoglobina, percorre os vasos sanguíneos do organismo aproximadamente 500.000 vezes (Lux, 1988). Durante a sua vida média de 120 dias, o eritrócito atravessa uma distância em torno de 250 km (Bull et al., 1990). Além disso, a hemácia transpõe capilares ou sinusóides esplênicos com diâmetro de 3 ou 4 μm , enquanto o diâmetro da hemácia é de 7 a 9 μm (Schrier, 1985; Bull et al., 1990). Tais fenômenos apenas são possíveis se o glóbulo vermelho mantiver íntegras suas principais propriedades: durabilidade e flexibilidade (Lux, 1988). Estas propriedades são mantidas pela membrana eritrocitária, viscosidade intracelular e pela razão superfície/volume (Bull et al., 1990).

1.1. A membrana eritrocitária

A membrana da hemácia, assim como a membrana de todas as células, é formada por lipídios e proteínas. A porção lipídica da membrana eritrocitária é constituída por uma mistura de fosfolipídios, colesterol não-esterificado e glicolipídeos, organizados em uma camada dupla e atravessados ao acaso por receptores e canais proteicos transmembranosos (Lux, 1988).

A bicamada lipídica é composta por uma porção hidrofílica (cabeça polar), com ligação para o plasma e citoplasma e por um centro lipofílico (cauda hidrofóbica), que contribui para a flexibilidade da membrana (Figura 1) (Shohet & Beutler, 1990). A porção lipídica da membrana tem uma influência relativamente limitada sobre a forma da hemácia (Delaunay, 1990).

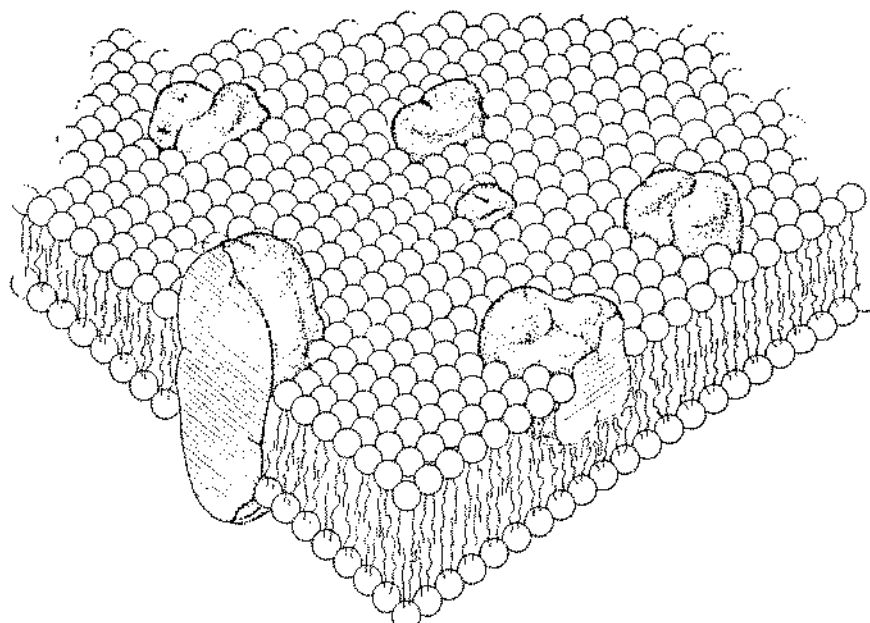


FIGURA 1: Esquema representativo da estrutura da membrana celular: proteínas integrais atravessam a bicamada lipídica. A camada dupla de lipídios tem a "cabeça" em contato com o plasma e o citoplasma e a "cauda" no centro hidrofóbico (Shohet & Beutler, 1990).

PROTEÍNAS DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA:

As proteínas da membrana da hemácia são divididas em dois grandes grupos:

a) **proteínas integrais** que atravessam a bicamada lipídica e b) **proteínas periféricas** que formam o citoesqueleto (Lux, 1988).

Proteínas Integrais:

Entre as proteínas integrais fazem parte a banda ou proteína 3 e as glicoforinas. A banda 3 é também chamada de transportador de ânions (Palek & Lambert, 1990). As glicoforinas carregam antígenos de superfície (Lux, 1988), como a glicoforina C que carrega o antígeno do grupo sanguíneo Gerbich sobre a superfície da hemácia (Palek, 1991).

Proteínas Periféricas:

O citoesqueleto é composto por espectrina, anquirina, proteínas 4.1, 4.2 e 4.9, actina e tropomiosina, entre outras. As principais proteínas do esqueleto da membrana são: espectrina, actina, proteína 4.1 e anquirina (Sahr et al., 1989; Delaunay et al., 1990). A espectrina é a mais abundante proteína do citoesqueleto, correspondendo a aproximadamente 75% do peso destas proteínas (Winkelmann et al., 1988; Delaunay et al., 1990).

A espectrina é constituída por duas cadeias longas e flexíveis, alinhadas paralelamente e torcidas uma em torno da outra (Lux, 1988). As duas cadeias de espectrina são chamadas α e β espectrina e formam o heterodímero de espectrina (Delaunay et al., 1990; Palek & Lambert, 1990; Shohet & Beutler, 1990). Os dímeros de espectrina interagem ao nível de sua "cabeça" para formar tetrâmeros (auto-associação da espectrina) (Lux, 1988). As proteínas do esqueleto da membrana da hemácia são responsáveis pela manutenção da forma, estabilidade e deformabilidade do eritrócito (Gallagher & Forget, 1993) (Figura 2).

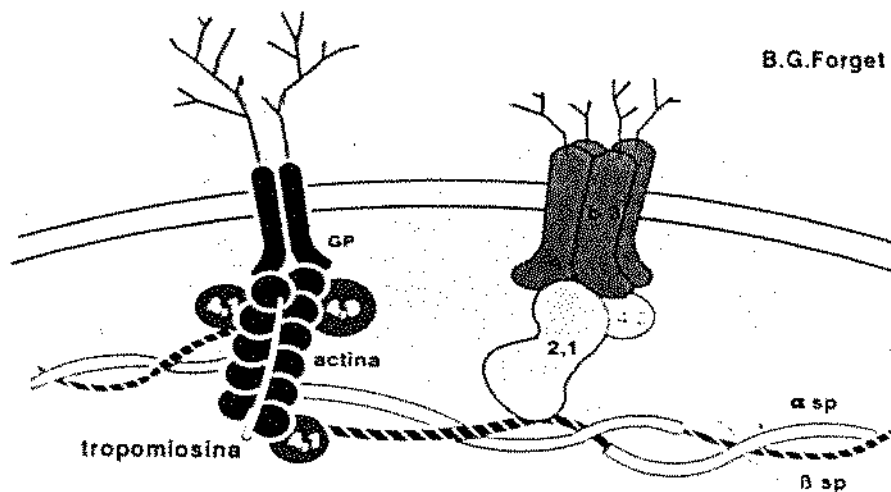


FIGURA 2: Disposição das proteínas integrais e periféricas na membranas eritrocitária. A membrana da hemácia é constituída por: espectrina (sp), proteína 2.1 ou anquirina (2.1), banda 3 (b 3), proteínas 4.1, 4.2 e 4.9, actina (5), glicoforina (GP) entre outras.

INTERAÇÕES ENTRE AS PROTEÍNAS:

À nível de cabeça de dímeros, o esqueleto está preso à dupla camada lipídica através da β -espectrina que se liga à proteína 2.1 (Morrow et al., 1980; Kundu et al., 1991), que por sua vez está ligada à banda 3, a qual atravessa a bicamada lipídica (Shohet & Beutler, 1990; Kundu et al., 1991). A proteína 2.1 ou anquirina portanto, "ancora" a ligação do citoesqueleto com a bicamada lipídica, via banda 3 (Shohet & Beutler, 1990) (Figura 2).

A cauda final do dímero é unida pela actina e proteína 4.1 (Palek & Lambert, 1990; Shohet & Beutler, 1990). O esqueleto, por sua vez, está ligado à glicoforina C via proteína 4.1 (Palek & Lambert, 1990), formando o complexo juncional (Figura 3). Já a proteína 4.2 está ligada à banda 3 e à anquirina (Figura 2) (Delaunay et al., 1990).

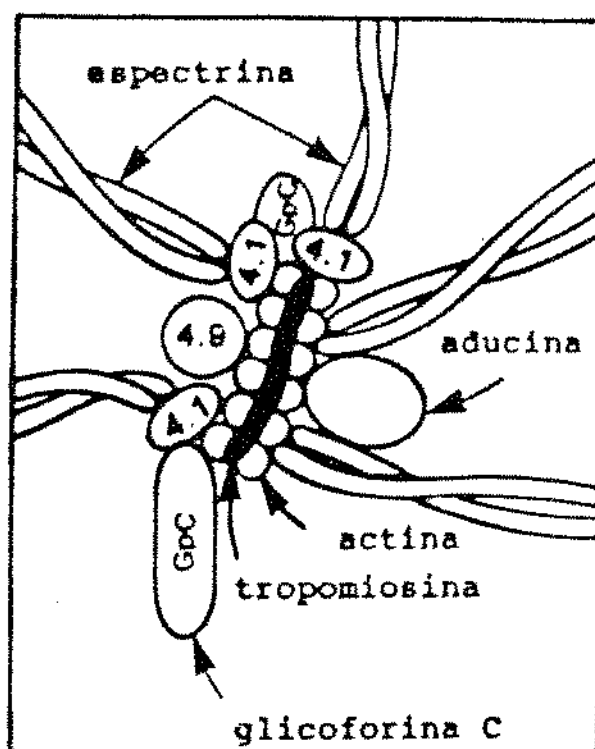


FIGURA 3: Um modelo da organização do complexo juncional: o complexo é composto por aproximadamente 12 monômeros de actina estabilizado pela tropomiosina; a espectrina está ligada à actina pela proteína 4.1 (que também liga a espectrina à glicoforina C) e pela aducina; cada aducina liga-se a dois heterodímeros de espectrina (Palek & Lambert, 1990).

SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA:

As proteínas de membranas eritrocitárias são denominadas numericamente de acordo com a sua mobilidade quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; Fairbanks et al., 1971; Palek & Lambert, 1990). A introdução de SDS, como um agente solubilizante para moléculas insolúveis, revolucionou o estudo das proteínas de membrana (Bretscher, 1973). A separação eletroforética destas proteínas pode ser realizada através do sistema de gradiente não linear 3,5 a 17% de poliacrilamida (Fairbanks et al., 1971), o qual permite a separação das proteínas: α e β espectrina, 2.1 e bandas menores: 2.2, 2.3 e 2.6 relativas a anquirina, banda 3, proteína 4.1 e 4.2, proteína 4.9 ou dematina, banda 5 ou actina, banda 6 (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e banda 7 ou tropomiosina (Delaunay et al., 1990). O sistema Laemmli 12% (Laemmli, 1970), por sua vez, permite a avaliação das proteínas 4.1 e 4.2 e a separação da proteína 4.1a e sua isoforma 4.1b (Delaunay et al., 1990).

ESPECTRINA:

A espectrina, o constituinte mais abundante da membrana eritrocitária de mamíferos (Ungewickell & Gratzer, 1978; Forget et al., 1988), exerce um papel importante na estabilização da membrana e manutenção de sua forma bicôncava (Ungewickell & Gratzer, 1978). Esta proteína contém duas subunidades alfa e beta espectrina com pesos moleculares de, respectivamente, 240 e 220 kDa estimados por SDS-PAGE, mas a partir do estudo do cDNA foram determinados como 280 e 240 kDa, presentes em aproximadamente 200.000 cópias por célula (Delaunay et al., 1991). As cadeias alfa e beta da espectrina estão paralelas e enoveladas entre si formando um dímero, o qual se auto-associa cabeça-a-cabeça para formar tetrâmeros de espectrina (Ungewickell & Gratzer, 1978; Delaunay et al., 1990).

A cabeça do dímero contém o N-terminal da cadeia alfa e o C-terminal da cadeia beta espectrina e o oposto ocorre na cauda do heterodímero. Cada cadeia alfa e beta da espectrina é dividida em domínios resistentes à digestão pela tripsina. A cadeia alfa-espectrina (α -sp) é dividida em cinco domínios e a cadeia beta-espectrina (β -sp) é dividida em quatro domínios. Os domínios resultantes da proteólise são designadas por algarismos romanos e de acordo com o peso molecular. Assim, a α -espectrina é composta dos domínios α I80, α II46, α III52, α IV41 e α V41 kDa, enquanto que a cadeia beta é composta dos domínios β I28, β II65, β III33 e β IV74 kDa e de um fragmento que carrega o sítio de fosforilação (Delaunay et al., 1990). Cada uma das cadeias de espectrina é formada por 106

aminoácidos repetidos ao longo de seu comprimento (Delaunay et al., 1990; Sahr et al., 1990b; Gallagher & Forget, 1993). A cadeia α -sp apresenta 20 repetições numeradas de $\alpha 1$ a $\alpha 20$ (Delaunay et al., 1990; Gallagher & Forget, 1993). A cadeia β -sp, por sua vez, é numerada de $\beta 1$ a $\beta 19$ com 18 repetições de 106 aminoácidos (Delaunay et al., 1990).

Segundo o modelo de Speicher e Marchesi, cada repetição de 106 aminoácidos está na forma de uma tripla hélice (Speicher & Marchesi, 1984), sendo que, a partir de estudos de Tse et al., 2 hélices β juntam-se a uma hélice α à nível de cabeça de dímeros opostos (Tse et al., 1990). Este complexo, por sua vez, une-se em tetrâmeros compostos de 2 cadeias α e 2 cadeias β (Figura 4) (Tse et al., 1990; Delaunay & Dhermy 1993). A hélice tripla repetida consiste de regiões alternadamente hidrofóbica e hidrofílica, formando uma estrutura resistente a proteólise (Tse et al., 1990; Gallagher et al., 1992). Cada hélice tripla de 106 aminoácidos (aproximadamente 12.000 daltons) possui uma região não helicoidal conectante com o segmento adjacente, a qual pode prover a flexibilidade da molécula (Speicher & Marchesi, 1984).

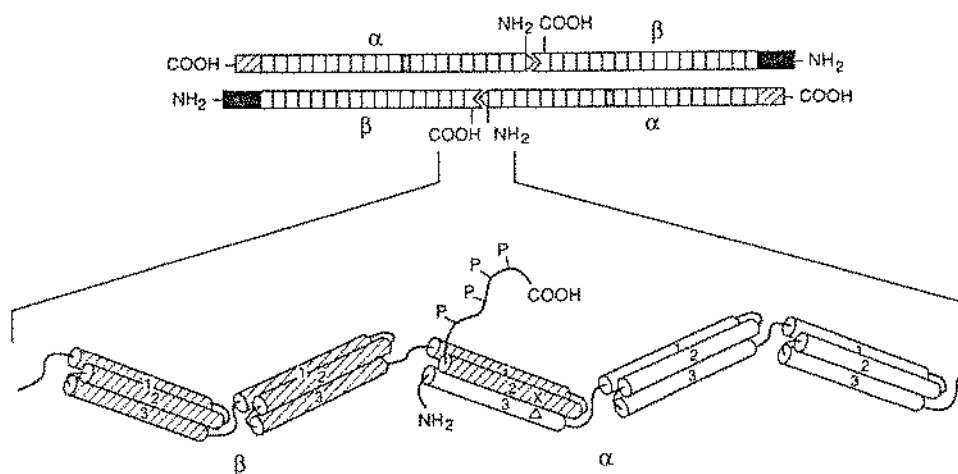


FIGURA 4: Um modelo do mecanismo de interação entre as cadeias α e β -sp (Tse et al., 1990).

Os heterodímeros e tetrâmeros de espectrina estão em equilíbrio reversível na membrana e em condições fisiológicas este equilíbrio favorece a formação de tetrâmeros de espectrina (Liu & Palek, 1980; Shahbakhti & Gratzner, 1986). Próximo à temperatura de 0°C, o equilíbrio spD-spT é cineticamente imobilizado (Liu et al., 1981; Palek, 1985; Palek & Lambert, 1990). Desta forma, após extração de espectrina a 0°C em tampão de baixa

força iônica, os dímeros de espectrina em indivíduos normais constituem apenas $8 \pm 3\%$ da espectrina total (Palek, 1985).

A espectrina pertence a uma super família de genes cujos membros incluem α -actina, fodrina (espectrina não-eritróide), distrofina e um gene relacionado à distrofina (Koenig et al., 1988; Dhermy, 1991; Amin et al., 1993). Genes não-eritróides homólogos da α e β espectrina codificam proteínas que são aproximadamente 60% idênticas a seus correspondentes eritróides (Winkelmann & Forget, 1993). O gene que codifica a cadeia α -espectrina eritróide está localizado no cromossomo 1 na região q 22 - q 23 (Huebner et al., 1985; Gallagher & Forget, 1993) adjacente ao gene do antígeno de grupo sanguíneo Duffy (Keats, 1979; Marchesi et al., 1987; Palek, 1991), enquanto que para a cadeia β -espectrina eritróide e muscular, o gene encontra-se no cromossomo 14 (Prchal et al., 1987; Delaunay et al., 1990; Winkelmann & Forget, 1993), banda q 23 - q 24.2 (Fukushima et al., 1990; Gallagher & Forget, 1993; Winkelmann & Forget, 1993). O tamanho estimado para o RNAm da cadeia β -espectrina eritróide é de 7,8 kb (Prchal et al., 1987). Este gene de cerca de 100 kb (Gallagher & Forget, 1993) compreende 32 *exons* (Amin et al., 1993; Gallagher & Forget, 1993) com 2137 aminoácidos e 6411 pares de base (Gallagher & Forget, 1993). Para o gene da cadeia α -espectrina estima-se um tamanho de 80 kb correspondente ao DNA genômico (Sahr et al., 1989; Gallagher & Forget, 1993). O cDNA é formado por 8001 pares de base (Sahr et al., 1990b; Gallagher & Forget, 1993) compreendido por 52 *exons* com 2429 aminoácidos (Gallagher & Forget, 1993). O domínio I da cadeia α -espectrina (α I-sp) é composto por 12 *exons* correspondentes a 17 kb que codificam os primeiros 526 aminoácidos (Sahr et al., 1989) formando 5 estruturas helicoidais triplas (Palek & Lambert, 1990).

PROTEÍNA 2.1 (ANQUIRINA):

A anquirina é a principal proteína envolvida na ligação do esqueleto com a membrana (Palek & Lambert, 1990) ligando a β -espectrina à banda 3 (Schrier, 1985). Sua massa molecular é estimada em 210 kDa por SDS-PAGE (Peters & Lux, 1993), porém o peso molecular deduzido do cDNA é de 206 kDa (Delaunay et al., 1991; Peters & Lux, 1993) e está presente em 100.000 cópias por célula (Schrier, 1985; Palek & Lambert, 1990; Delaunay et al., 1991). A anquirina é uma proteína globular, existindo uma anquirina por tetrâmero de espectrina (Palek & Lambert, 1990). Em SDS-PAGE, a anquirina contém bandas adicionais: 2.2 com peso molecular de 186 kDa (Schrier, 1985; Palek & Lambert, 1990; Peters & Lux, 1993), 2.3 com 170 kDa e 2.6 com 145 kDa (Peters & Lux, 1993) que podem ser resultado de uma clivagem alternativa (Delaunay, 1990). O gene que codifica a

proteína 2.1 ou anquirina foi localizado no cromossomo 8 (Lambert et al., 1990; Lux et al., 1990; Delaunay et al., 1990; Delaunay et al., 1991;) na região p11.2, com um cDNA estimado em 7 Kb (Delaunay et al., 1991) com 1880 aminoácidos (Peters & Lux, 1993).

ADUCINA:

A proteína aducina consiste de duas subunidades de 105 e 100 kDa formando um heterodímero que está presente em 30.000 cópias por célula. A aducina liga-se com a actina e a espectrina. A ligação da aducina com o esqueleto é inibida pela proteína 4.1, sugerindo que as duas proteínas podem competir pelo mesmo sítio de ligação com a molécula de espectrina. Então, em condições fisiológicas, não mais que 30% de espectrina está ligada à aducina (Palek & Lambert, 1990).

BANDA 3:

A banda 3 ou transportador de ânion tem um peso molecular de cerca de 95 kDa (Fairbanks et al., 1971) em SDS-PAGE e um peso molecular deduzido do cDNA de 106 kDa (Kopito et al., 1986; Tanner et al., 1988; Lux et al., 1989), correspondendo a 25% das proteínas de membrana (Delaunay et al., 1990). Representa a maior proteína transmembrana e está presente em aproximadamente 1.000.000 de cópias por célula (Palek & Lambert, 1990; Delaunay et al., 1991). Os dois maiores domínios estruturais estão correlacionados com as suas duas maiores funções: o transporte de ânion, através do domínio transmembrana e a interação com o esqueleto da membrana, através do domínio citoplasmático (Palek & Lambert, 1990). O domínio transmembrana atravessa a bicamada lipídica pelo menos 14 vezes (Tanner, 1993). O domínio citoplasmático, além de interagir com as proteínas do citoesqueleto, é também um sítio de ligação de alta afinidade para várias enzimas glicolíticas (Walder et al., 1984), hemoglobina (Shaklai et al., 1977; Walder et al., 1984) e hemicromos (Palek & Lambert, 1990). O gene que codifica a banda 3, localizado no cromossomo 17 q21-qter (Showe et al., 1987; Tanner, 1993), apresenta 20 *exons* que codificam 911 aminoácidos (Tanner, 1993) e um tamanho transcrito estimado em 4,7 Kb (Kopito et al., 1986; Tanner et al., 1988; Lux et al., 1989).

PROTEÍNA 4.1:

A proteína 4.1 exerce um importante papel na regulação das propriedades mecânicas da membrana eritrocitária através de múltiplas interações com as proteínas integrais

(banda 3 e glicoforina C) (Conboy et al., 1990), espectrina e actina (Correas et al., 1986; Conboy et al., 1990), aumentando a associação entre estas duas últimas proteínas (Correas et al., 1986). A proteína 4.1 apresenta quatro domínios estruturais maiores, definidos por leve digestão proteolítica, com um peso molecular aparente de: 30kDa (domínio de ligação com a glicoforina), 16kDa, 10 kDa (domínio de ligação com a espectrina e actina) e um último domínio de peso molecular entre 22 a 24 kDa (Conboy, 1993). Esta proteína multifuncional contém dois sítios funcionais distintos: 1) o domínio de ligação com a espectrina, onde a proteína 4.1 se liga com o final distal dos heterodímeros, aumentando a ligação da espectrina com oligômeros de actina e 2) o domínio de ligação com a glicoforina C, fosfatidilinositol e fosfatidilserina que facilita a ligação distal da espectrina com a membrana (Palek, 1991). A proteína 4.1 apresenta um peso molecular estimado por SDS-PAGE em 80 kDa, mas deduzido do cDNA de 66 kDa (Delaunay et al., 1991). Esta proteína globular está presente em 200.000 cópias por célula (Palek & Lambert, 1990; Delaunay et al., 1991) e é composta por duas subunidades: 4.1a (80kDa) e 4.1b (78kDa) (Schrier, 1985; Delaunay et al., 1990). A proteína 4.1a está presente nas hemácias normais, maduras, enquanto que a isoforma 4.1b é predominante em reticulócitos (Delaunay et al., 1990; Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991). A razão 4.1a/4.1b aumenta proporcionalmente à idade dos eritrócitos (Delaunay et al., 1990).

O gene que codifica a proteína 4.1 foi localizado no braço curto do cromossomo 1 (Conboy et al., 1986a; Conboy et al., 1986b; McGuire et al., 1988) próximo ao locus do antígeno Rh (Conboy et al., 1986b; McGuire et al., 1988), na região p34-p36-2 (Conboy et al., 1986b; Delaunay et al., 1991), com um cDNA estimado em 5,6 kb que codifica 588 aminoácidos (Delaunay et al., 1991).

PROTEÍNA 4.2:

A proteína 4.2 corresponde a 5% da massa proteica da membrana eritrocitária (Palek & Lambert, 1990). Tem peso molecular aparente de 72 kDa em SDS-PAGE e 77 kDa deduzido do cDNA (Delaunay et al., 1991). Está presente em 200.000 cópias por célula (Bennett, 1990; Delaunay et al., 1990; Delaunay et al., 1991) estabilizando a interação entre a anquirina e o transportador de ânion (Palek & Lambert, 1990), através da associação com o domínio citoplasmático da banda 3 bem como com a anquirina e proteína 4.1 (Bennett, 1990). Está localizada no cromossomo 15 região q14 - q15, com um cDNA estimado em 2,34 kb, compreendido por 13 *exons* que codificam 691 aminoácidos (Korsgren et al., 1990).

PROTEÍNA 4.9:

A proteína 4.9 ou dematina consiste de duas subunidades de peso molecular de 52 kDa (Ruff et al., 1991) e 48 kDa (Schrier, 1985; Bennett, 1989; Ruff et al., 1991) com aproximadamente 43.000 cópias por célula (Delaunay et al., 1990). Esta proteína liga-se à actina (Schrier, 1985; Palek & Lambert, 1990) e é importante na estabilização do esqueleto da membrana eritrocitária (Siegel & Branton, 1985). O gene que codifica a proteína 4.9 contém pelo menos 3 *exons* e estima-se que tenha entre 20 a 30 kb de comprimento. O mesmo está localizado no braço longo do cromossomo X entre os genes do fator VIII e da G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase) (Metzenberg & Gitschier, 1992). Durante a purificação da dematina, uma proteína de 55 kDa, p55, é copurificada. A estrutura primária da p55 contém uma sequência conservada SH-3 observada em protooncogenes e encontrada em várias proteínas associadas ao citoesqueleto e que exercem um importante papel na transmissão de sinais (Ruff et al., 1991).

ACTINA:

A actina ou banda 5 é uma proteína de peso molecular de 45 kDa (Delaunay et al., 1990; Delaunay et al., 1991) ocorrendo 500.000 cópias de actina por eritrócito (Palek & Lambert, 1990; Delaunay et al., 1991). Na membrana da hemácia, a actina aparece na forma de filamentos curtos de F-actina (Schrier, 1985). Cada filamento contém aproximadamente doze moléculas de actina, organizadas em duas margens paralelas, cada uma contendo cerca de 6 monômeros de actina ligados à tropomiosina (Palek & Lambert, 1990). O gene que codifica a actina está localizado no cromossomo 7 (Delaunay et al., 1991).

BANDA 6:

A banda 6 ou gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase apresenta um peso molecular de 35.000 daltons. A banda 6 liga-se à banda 3, no mesmo segmento de ligação com a hemoglobina (Schrier, 1985).

TROPOMIOSINA:

A banda 7 ou tropomiosina é composta por dois polipeptídeos de 27 e 29 kDa (Bennett, 1989; Palek & Lambert, 1990) e aparece associada com F-actina. O número de cópias de tropomiosina por célula é de 80.000. Considerando que há aproximadamente

500.000 cópias de actina por célula, existe cerca de seis actinas por uma tropomiosina (Palek & Lambert, 1990). Além disso, a tropomiosina pode estabilizar a ligação da proteína 4.9 com a actina (Delaunay et al., 1990). Em pacientes com estomatocitose hereditária hemolítica, esta proteína apresenta-se deficiente (Schrier, 1985).

GLICOFORINAS:

As glicoforinas representam um grupo de proteínas transmembranas que constituem os maiores sialoglicopeptídeos da membrana eritrocitária humana. A identificação destas proteínas é feita usando-se coloração com ácido periódico Schiff (PAS) em SDS-PAGE (Schrier, 1985). As sialoglicoproteínas caracterizam-se por serem ricas em ácido siálico (Delaunay et al., 1990) e podem ajudar a "ancorar" e estabilizar o citoesqueleto (Schrier, 1985).

Entre as sialoglicoproteínas presentes na membrana da hemácia, quatro são as principais: glicoforina A (também chamada sialoglicoproteína α), glicoforina B (designada também como sialoglicoproteína δ), glicoforina C (ou sialoglicoproteína β) e glicoforina D (denominada também como sialoglicoproteína γ). Os genes que codificam as glicoforinas A e B são distintos, mas fisicamente ligados à região q28 a q31 no cromossomo 4 (Cook et al., 1980; Rahuel et al., 1988; Delaunay et al., 1990). As glicoforinas A e B carregam mais que 90% do resíduo de ácido siálico sobre a superfície eritrocitária. Estas glicoforinas parecem ser membros de uma família de genes desenvolvidos de um ancestral comum. As glicoforinas C e D carregam o antígeno de grupo sanguíneo Gerbich (Ge) (Palek & Lambert, 1990) e são codificadas por genes localizados na região q14 - q21 do cromossomo 2 (Mattei et al., 1986; Delaunay et al., 1990). A glicoforina C associa-se com a proteína 4.1 promovendo um outro sítio de ligação do esqueleto com a membrana eritrocitária (Palek & Lambert, 1990).

1.2. O eliptócito

A presença de hemácias em forma elíptica ou oval é um fenômeno normal em certos animais como os pássaros, répteis, camelos (Djaldetti et al., 1984) e lhama (Palek, 1985). Nos humanos, não mais que 1% das hemácias de sangue periférico de indivíduos saudáveis são elípticas (Djaldetti et al., 1984; Delaunay et al., 1990), mas em várias doenças este número pode estar aumentado (Djaldetti et al., 1984).

Na Eliptocitose Hereditária, a porcentagem de eliptócitos pode ser de 10 até 100% (Marchesi et al., 1986; Delaunay et al., 1990) (Figura 5). Em vários tipos de anemias (Djaldetti et al., 1984) e processos hematológicos malignos (Rummens et al., 1986) a presença de eliptócitos pode ser observada (Djaldetti et al., 1984; Rummens et al., 1986) atingindo uma porcentagem de 10% ou mais em alguns tipos de anemia (Djaldetti et al., 1984). Eliptócitos podem aparecer como uma condição adquirida em anemia megaloblástica (Palek, 1991), anemia falciforme, talassemia (Palek & Lux, 1983; Djaldetti et al., 1984), anemia ferropriva (Palek & Lux, 1983; Djaldetti et al., 1984; Palek, 1991), policitemia (Djaldetti et al., 1984), mielofibrose (Palek & Lux, 1983; Djaldetti et al., 1984; Palek, 1991) e síndromes mielodisplásicas (Palek, 1991). Neste estudo, denominaremos estas síndromes de "eliptocitose adquirida".

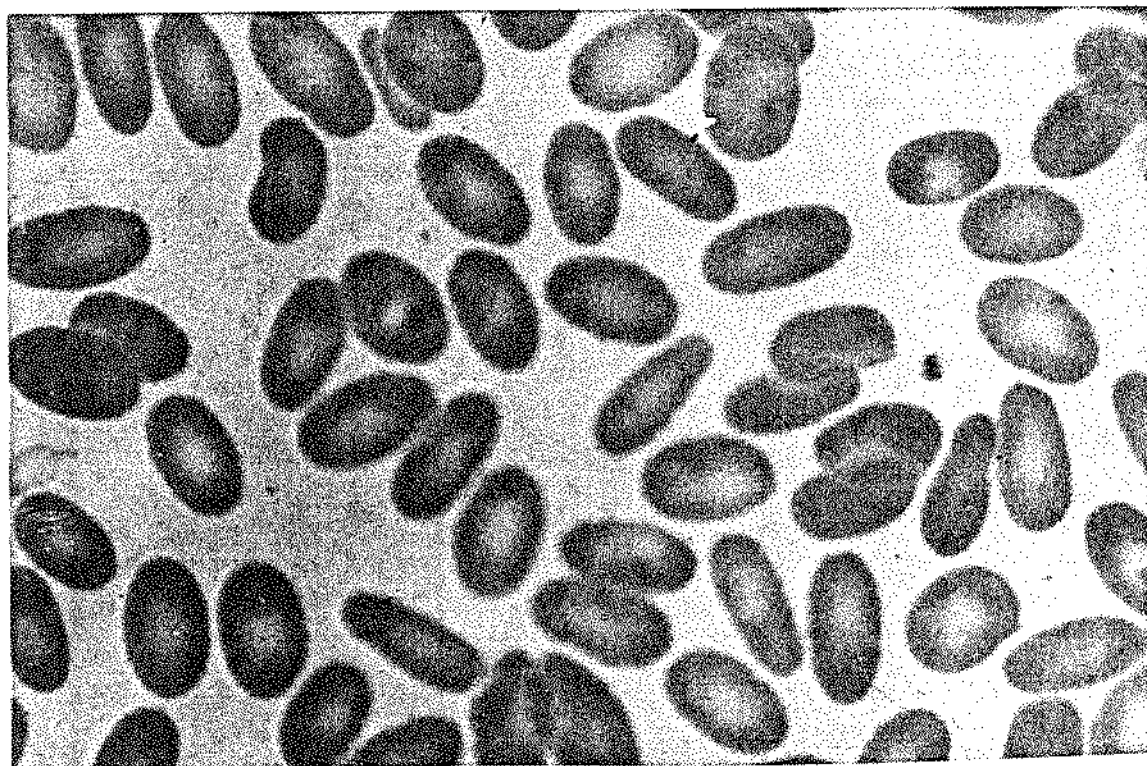


FIGURA 5: Esfregaço de sangue periférico mostrando presença de eliptócitos em um paciente com Eliptocitose Hereditária.

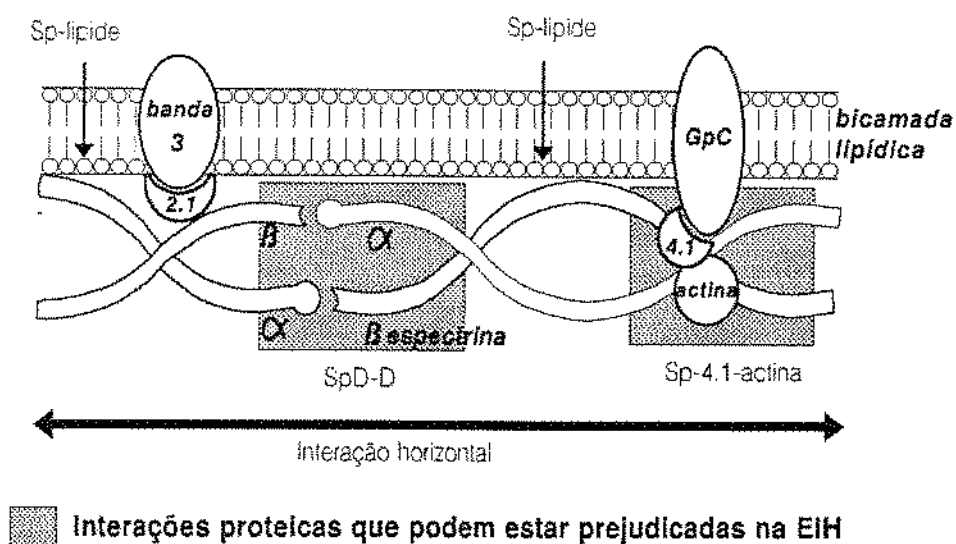
1.3. Eliptocitose Hereditária

Eliptocitose Hereditária (ElH) designa um grupo de doenças hereditárias caracterizado pela presença de hemácias elípticas (Palek, 1991) e por anemia hemolítica de gravidade clínica variável (Sahr et al., 1989). Eliptócitos foram detectados pela primeira vez em 1904 (Dresbach, 1904) e a natureza hereditária da doença foi estabelecida em 1929 (Hunter & Adams, 1929). Em alguns casos, os sinais clínicos estão ausentes e a eliptocitose é um achado laboratorial fortuito. Em outros casos, os sintomas básicos são anemia, icterícia pelo aumento da bilirrubina indireta, esplenomegalia, reticulocitose e redução de haptoglobina (Delaunay et al., 1990). A prevalência de ElH na população caucasóide é rara, atingindo 3 a 5 por 10.000 habitantes, mas tem prevalência de 0,6% nos negros da África equatorial (Palek, 1991). A ElH é causada por diferentes mutações nos genes que codificam as proteínas da membrana das hemácias e o modo de herança geralmente é autossômico dominante (Marchesi et al., 1986; Roux et al., 1989; Palek & Lambert, 1990).

As hemácias na ElH adquirem a forma elíptica após sua liberação na corrente circulatória (Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991), uma vez que os eritroblastos e os reticulócitos são arredondados (Hartz et al., 1984; Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991). É possível que os eritrócitos apresentem dificuldade em reassumir a forma bicôncava devido a uma frágil interação entre as proteínas do esqueleto (Palek, 1991). Muitos defeitos estão associados com a mudança na forma, podendo ocorrer um defeito na interação "horizontal" das proteínas do esqueleto envolvendo principalmente uma auto-associação defeituosa dos heterodímeros de espectrina (Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991) ou uma deficiência de proteína 4.1 que liga a espectrina à actina. Também pode ocorrer um defeito na interação "vertical" como deficiência de glicoforina C, onde a ligação do esqueleto com a membrana está prejudicada (Palek & Lambert, 1990) (Figura 6). Desta forma, em aproximadamente 70 a 80% dos pacientes com ElH, o defeito molecular pode ser dividido em quatro categorias: a) defeitos na auto-associação os heterodímeros de espectrina, b) defeito na β -espectrina conduzindo à ligação defeituosa da espectrina com a anquirina, c) defeitos na proteína 4.1 e d) deficiência de glicoforina C (Palek, 1991).

INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA

Jiri Palek



HIPÓTESE PARA A FORMAÇÃO DE ELIPTÓCITOS

defeito na interação horizontal

desestabilização
do esqueleto

defeito na recuperação
da forma



FIGURA 6: Possível etiopatogenia da formação do eliptócito (Palek, 1990; Palek, 1991).

- Subtipos de ElH

A ElH é um grupo heterogêneo quanto à gravidade da doença, anormalidades morfológicas da hemácia e defeito molecular (Palek & Lambert, 1990). A ElH pode ser dividida em três maiores grupos de acordo com a morfologia do eritrócito: ElH comum, ElH esferocítica e Ovalocitose do Sudeste Asiático (Palek, 1991). A) ElH comum: morfológicamente caracteriza-se por eliptócitos bicôncavos; as formas mais graves apresentam também células em formas de bastão e poiquilócitos; B) ElH esferocítica, também denominada ovalocitose hemolítica, é um fenótipo híbrido entre ElH e esferocitose; e C) Ovalocitose estomatocítica (Sudeste da Ásia) caracteriza-se por células em forma de "colher" com uma fenda longitudinal ou um sulco transversal (Palek, 1991).

ELIPTOCITOSE HEREDITÁRIA COMUM

A ElH comum é rara na população ocidental (Palek & Lambert, 1990), porém comumente detectada na população negra. Na África equatorial, a prevalência é de 0,6% (Lecomte et al., 1988; Palek & Lambert, 1990). A apresentação clínica varia de um tipo assintomático com hemácias com sobrevivência normal até uma doença hemolítica grave (Palek & Lambert, 1990).

ElH leve e portador assintomático:

A maioria dos indivíduos com ElH comum são assintomáticos (Palek & Lambert, 1990). Em muitos pacientes com ElH leve, a eliptocitose é encontrada acidentalmente durante avaliação do esfregaço de sangue periférico (Palek, 1991). Enquanto alguns indivíduos têm uma leve anemia hemolítica compensada, outros não apresentam evidência de hemólise e seus eritrócitos têm uma sobrevivência normal com o esfregaço sangüíneo revelando apenas uma modesta eliptocitose (15% ou mais) (Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991). A base molecular da ElH leve é heterogênea e o defeito molecular relacionado inclui mutações na cadeia α e β da espectrina, deficiência parcial de proteína 4.1 ou ausência de glicoforina C (Palek, 1991).

EIH com hemólise esporádica:

Em alguns pacientes com uma forma leve de EIH, a hemólise e anormalidades na forma da hemácia podem piorar em associação com várias complicações incluindo esplenomegalia, deficiência de vitamina B12, infecções (Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991), rejeição de transplante renal (Palek & Lambert, 1990), coagulação intravascular disseminada ou púrpura trombocitopênica trombótica (Palek & Lambert, 1990; Palek 1991). Nas duas últimas condições, a piora na hemólise pode ser devido a perdas na microcirculação, imposta por uma instabilidade mecânica fundamental. A hemólise piora, junto com o aparecimento de poiquilócitos no esfregaço de sangue periférico (Palek, 1991).

EIH com hemólise crônica:

Pacientes com EIH e hemólise crônica apresentam uma anemia hemolítica moderada ou grave com eliptócitos e poiquilócitos no esfregaço de sangue periférico; alguns requerem esplenectomia e a variedade clínica deve-se ao tipo de mutação proteica presente (Palek, 1991).

EIH homozigota ou dupla heterozigota:

Em alguns casos, a EIH é acompanhada de hemólise sintomática, freqüentemente requerendo esplenectomia. Contudo, a maioria dos casos com EIH hemolítica grave são pacientes que herdaram genes de ambos os pais com forma leve de EIH comum. Tipicamente estes pacientes são homozigotos ou duplamente heterozigotos para uma ou duas mutações na α ou β -espectrina (Palek & Lambert, 1990). A gravidade clínica é variável dependendo do defeito molecular básico. Pacientes homozigotos para uma α -sp levemente disfuncional têm uma anemia hemolítica relativamente leve, não necessitando de esplenectomia, enquanto que pacientes homozigotos ou duplamente heterozigotos para defeitos maiores na α -sp, apresentam uma doença grave (Palek, 1991). Somada à proeminente eliptocitose, o esfregaço sangüíneo destes pacientes mostra uma notável poiquilocitose com presença de hemácias fragmentadas (Palek & Lambert, 1990). Alguns pacientes com EIH homozigótica são indistinguíveis de piropoiquilocitose hereditária (Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991).

ElH com poiquilocitose neonatal:

Neonatos gerados de pais com ElH leve apresentam anemia hemolítica sintomática e uma marcada poiquilocitose. Durante o primeiro ano de vida a hemólise e a poiquilocitose diminuem e o quadro clínico se transforma em ElH leve. A gravidade do defeito molecular quanto à porcentagem de dímeros e à quantidade de espectrina mutante nas hemácias é idêntica no período neonatal e na vida adulta. A piora da hemólise tem sido atribuída à presença da hemoglobina fetal (F) no período neonatal (Palek, 1991). A hemoglobina F tem uma baixa afinidade ao 2,3-DPG (2,3-difosfoglicerato) (Matovcik & Mentzer, 1985; Coetzer et al., 1987; Palek & Lambert, 1990), conduzindo a um aumento no nível de 2,3-DPG no citoplasma. Níveis aumentados de 2,3-DPG proporcionam uma redução de 50% na ligação de proteína 4.1 com espectrina (Mai et al., 1988). Assim, o contato de 2,3-DPG com a membrana desestabiliza o complexo espectrina /actina/banda 4.1, o qual pode aumentar a expressão do defeito da auto-associação de dímeros de espectrina, enfraquecendo o esqueleto ainda mais e conduzindo à poiquilocitose e fragmentação (Coetzer et al., 1987; Palek & Lambert, 1990).

A 2,3-DPG causa aumento na mobilidade lateral das proteínas integrais da membrana, podendo ocorrer um enfraquecimento da associação do citoesqueleto com a membrana lipídica. O aumento, portanto, da concentração de 2,3-DPG provocaria extensiva vesiculação resultando em dramática diminuição no tamanho da membrana. Esta vesiculação da membrana e o aumento da mobilidade lateral de proteínas causada pelo 2,3-DPG, podem resultar na ruptura do complexo proteico da membrana (Sheetz & Casaly, 1980).

Piropoiquilocitose Hereditária:

Em 1975, Zarkowsky et al. descreveram uma anemia hemolítica congênita como uma forma rara de ElH caracterizada por anemia moderadamente grave, esplenomegalia, poiquilocitose, microesferocitose e aumento da sensibilidade térmica das hemácias (Zarkowski et al., 1975). Este defeito foi identificado como piropoiquilocitose hereditária (Chang et al., 1979; Palek & Lux, 1983; Palek, 1991)

Piropoiquilocitose hereditária (PPH) é mais comum na raça negra (Lux, 1988). Tipicamente, um dos progenitores é portador de uma mutação na cadeia α ou β da espectrina e tem uma ElH leve ou é um portador assintomático para a espectrina defeituosa. O outro progenitor é hematologicamente normal e não são detectadas anormalidades bioquímicas da membrana eritrocitária (Palek & Lambert, 1990), entretanto apresenta defeito na síntese de espectrina detectada por quantificação de RNA (Hanspal et al., 1992).

Como a cadeia α -espectrina é sintetizada em excesso em relação à cadeia β -espectrina, heterozigotos simples para deficiência de α -espectrina são assintomáticos (Palek & Lambert, 1990). Em contraste, quando esta deficiência está associada a outras mutações da espectrina ocorre aumento da expressão do defeito da espectrina mutante (Coetzer et al., 1987). Na PPH, as hemácias apresentam-se 30% deficientes (Coetzer & Palek, 1986; Coetzer et al., 1987) em espectrina e há anemia hemolítica grave, potencializando o defeito na auto-associação dos heterodímeros de espectrina (Coetzer et al., 1987).

O defeito na auto-associação de heterodímeros de espectrina causa ruptura no esqueleto, conduzindo à poiquilocitose e fragmentação. A deficiência de espectrina proporciona a perda de superfície de área (Palek & Lambert, 1990) conduzindo à microesferocitose (Coetzer et al., 1987; Palek & Lambert, 1990). Os eritrócitos na PPH apresentam uma susceptibilidade aumentada para a desnaturação térmica (Liu et al., 1981), fragmentando-se à 45°C (Coetzer & Zail, 1981; Lux, 1988) e não à 49°C como seria normal (Lux, 1988).

ELIPTOCITOSE HEREDITÁRIA ESFEROCÍTICA.

Eliptocitose esferocítica ou ovalocitose hemolítica é uma forma relativamente rara de EIH, onde os eritrócitos combinam características de EIH e esferocitose hereditária: algumas hemácia são esferócitos, outras células são eliptócitos arredondadas (Palek & Lambert, 1990). A doença apresenta um caracter dominante, com hemólise clinicamente aparente e com fragilidade osmótica aumentada em alguns casos. Duas características distinguem esta condição da EIH comum: (1) pacientes com ovalocitose hemolítica apresentam hemólise sintomática, a qual é mínima ou ausente em pacientes com EIH comum havendo eliptocitose como a única anormalidade morfológica no esfregaço sanguíneo e (2) as hemácias na EIH esferocítica apresentam aumento da fragilidade osmótica, a qual é normal na EIH comum (Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991).

A base molecular da doença não está clara. Em alguns indivíduos com EIH homozigótica e deficiência completa de proteína 4.1, a apresentação clínica foi consistente com ovalocitose hemolítica, incluindo aumento da fragilidade osmótica, enquanto que pacientes com deficiência parcial de proteína 4.1 revelaram fragilidade osmótica normal e morfologia eritrocitária característica de EIH comum (Palek, 1991).

ELIPTOCITOSE HEREDITÁRIA ESTOMATOCÍTICA (OVALOCITOSE DO SUDESTE DA ÁSIA).

Esta doença é encontrada em mais de 30% da população de algumas áreas costeiras da Nova Guiné, Melanésia e Malásia (Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991). A condição é autossômica dominante (Palek & Lambert, 1990) e assintomática (Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991; Palek 1993) sem evidência clínica de destruição eritrocitária acelerada (Palek & Lambert, 1990). Caracteriza-se por uma morfologia eritrocitária distinta, com hemácias em forma de colher com um sulco transversal ou uma fenda longitudinal (Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991; Palek, 1993).

A alta prevalência desta condição em algumas partes do Sudeste da Ásia está relacionada com a resistência destas células à invasão por certos parasitas da malária (Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991). As membranas das hemácias na ovalocitose do Sudeste da Ásia exibe um marcado aumento em sua rigidez que pode ser responsável pela resistência à invasão do plasmódio (Palek & Lambert, 1990; Palek, 1993). A base molecular que conduz ao aumento da rigidez pode envolver uma banda 3 disfuncional que liga-se fortemente à anquirina (Liu et al., 1990; Palek, 1991). O defeito molecular envolve a deleção de 9 aminoácidos (*codons* 400 a 408) ou 27 pares de base na transição do domínio citoplasmático para o domínio transmembrana da banda 3 (Jarolim et al., 1991).

- Defeitos proteicos e moleculares na ElH

Estudos de ligação realizados em 1956 sugeriram que a ElH estava ligada ao grupo sanguíneo Rh (Morton, 1956; Lovric et al., 1965). Posteriormente, Keats demonstrou que a ElH poderia também estar ligada ao grupo sanguíneo Duffy (Fy) (Keats, 1979). Tais estudos forneceram dados cruciais para a identificação dos defeitos proteicos e moleculares na ElH.

As bases moleculares da ElH permaneceram obscuras até 1980, quando alguns estudos sugeriram um defeito de proteína do esqueleto (Liu et al., 1981; Palek et al., 1981; Tomaselli et al., 1981). Desde então, muitos defeitos foram descritos, alguns deles bem caracterizados à nível de sequência de aminoácidos e DNA (Palek, 1991). Hoje, sabe-se que

a ligação da ElH com o grupo Rh deve-se a um grande número de pacientes que apresentam defeito na proteína 4.1, cujo locus localiza-se no cromossomo 1 próximo ao locus Rh (Conboy et al., 1986b; McGuire et al., 1988; Palek, 1991). Do mesmo modo, a ligação com o antígeno Duffy deve-se aos casos cujo defeito molecular encontra-se no gene da α -espectrina também no cromossomo 1 (Marchesi et al., 1987; Palek, 1991).

ESPECTRINA

Anormalidades na cadeia α ou β da espectrina envolvendo o sítio de auto-associação de heterodímeros de espectrina são encontrados em 60% dos pacientes com ElH. A maioria destes indivíduos são da raça negra, mas estas mutações podem ser detectadas também em árabes e outros povos brancos (Palek, 1991).

ALFA-ESPECTRINA

Defeitos na cadeia α -espectrina (α -sp) têm sido encontrados na maioria dos pacientes com ElH e PPH (Coetzer et al., 1988). Só em uma minoria de pacientes com ElH a α -sp anormal pode ser identificada com base em seu menor tamanho e, portanto, com mobilidade eletroforética maior (Palek, 1991), denominada α -sp "truncada", caracterizada por redução em sua massa molecular (Palek & Lambert, 1990).

Na maioria dos casos, a espectrina mutante tem um tamanho normal (Palek, 1991) e mutações na α -sp não são detectadas por SDS-PAGE (Palek & Lambert, 1990). As espectrinas anormais podem ser caracterizadas pela digestão triptica demonstrando um dos peptídeos, correspondente a um domínio estrutural e funcional, distinto da espectrina normal (Morrow et al., 1980; Palek & Sahr, 1992). A digestão anormal de um peptídeo da cadeia α -sp, resulta do aumento na susceptibilidade dos sítios de clivagem para proteólise ou da formação de novos sítios de clivagem, com prejuízo na auto-associação de SpD-SpT (Palek, 1985; Palek, 1987; Palek & Lambert, 1990; Palek & Sahr, 1992).

O peptídeo correspondente ao domínio α ^{1/80} kDa, representando o sítio de auto-associação da espectrina, é o mais proeminente (Palek, 1985; Palek, 1987; Palek & Lambert, 1990; Palek & Sahr, 1992) e na ElH frequentemente encontra-se substituído por outros fragmentos. Estes novos fragmentos serão então denominados de acordo com o seu novo peso molecular. Algumas anormalidades da cadeia α -sp encontram-se na tabela 1.

TABELA 1 : Defeitos proteicos e moleculares da alfa-espectrina na EIH

Denominação/Docuça	Anormalidade Proteica	Defeito Molecular	Referências
Sp α I/78 (EIH/PPH)	α I 41 Arg $\rightarrow$ Trp (Sp Tunis); na repetição α I com clivagem em α I na lisina 16	41 CGG $\rightarrow$ TGG <i>exon 2 - α Sp</i>	Morlé et al., 1989; Delaunay et al., 1990
	α I 45 Arg $\rightarrow$ Ser; na repetição α I	45 AGG $\rightarrow$ AGT; <i>exon 2 - α Sp</i>	Garbarz et al., 1988; Lecomte et al., 1989; Delaunay et al., 1990
Sp α I/74 (EIH/PPH)	α I 46 Gly $\rightarrow$ Val (Sp Culoz); na repetição α I com clivagem em α I na lisina 48	46 GGT $\rightarrow$ GTT <i>exon 2 - α Sp</i>	Morlé et al., 1990
	α I 48 Lys $\rightarrow$ Arg; na repetição α I	48 AAG $\rightarrow$ AGG; <i>exon 2 - α Sp</i>	Floyd et al., 1991
	α I 49 Leu $\rightarrow$ Phe (Sp Lyon); na repetição α I com clivagem em α I na arginina 45	49 CTT $\rightarrow$ TTT <i>exon 2 - α Sp</i>	Morlé et al., 1990
	(*1) α I 28 Arg $\rightarrow$ Cys; na repetição α I	28 CGT $\rightarrow$ TGT; <i>exon 2 - α Sp</i>	Coetzer et al., 1991; Lorenzo et al., 1993
	α I 28 Arg $\rightarrow$ Leu; na repetição α I	28 CGT $\rightarrow$ CTT; <i>exon 2 - α Sp</i>	Coetzer et al., 1991
	α I 28 Arg $\rightarrow$ Ser; na repetição α I	28 CGT $\rightarrow$ AGT; <i>exon 2 - α Sp</i>	Coetzer et al., 1991
Sp α I/65 (EIH)	α I 28 Arg $\rightarrow$ His; na repetição α I	28 CGT $\rightarrow$ CAT; <i>exon 2 - α Sp</i>	Garbarz et al., 1990; Coetzer et al., 1991
	β I 2053 Ala $\rightarrow$ Pro; na repetição β 17 com clivagem em α I na lisina 48	2053 GCT $\rightarrow$ CCT; <i>exon X - β Sp</i>	Tse et al., 1990
	α I 154 Leu (+); na repetição α 2 com clivagem em α I na arginina 137	154 TTG (+) <i>exon 4 - α Sp</i>	Marchesi et al., 1987; Sahr et al., 1988; Roux et al., 1989; Sahr et al., 1989; Coetzer et al., 1990
	α I 260 Leu $\rightarrow$ Pro; na repetição α 3 com clivagem em α I após a arginina 256	260 CTG $\rightarrow$ CCG <i>exon 6 - α Sp</i>	Marchesi et al., 1987; Sahr et al., 1989; Sahr et al., 1990a; Gallagher et al., 1992
Sp α I/50-46a (EIH/PPH)	α I 261 Ser $\rightarrow$ Pro; na repetição α 3 com clivagem em α I após a lisina 258	261 TCC $\rightarrow$ CCC <i>exon 6 - α Sp</i>	Marchesi et al., 1987; Sahr et al., 1989; Sahr et al., 1990a; Gallagher et al., 1992
	(*2) α I 207 Leu $\rightarrow$ Pro; na hélice 2 da repetição α 2 com clivagem no <i>codon</i> 258	207 CTG $\rightarrow$ CCG; <i>exon 5 - α Sp</i>	Gallagher et al., 1992

Denominação/Doença	Anormalidade Proteica	Defeito Molecular	Referências
Sp α I/50-46b (EIH)	α I 471 Gln $\rightarrow$ Pro; na repetição α 5 com clivagem em α I após a arginina 468 α I 469 His $\rightarrow$ Arg; na repetição α 5 com clivagem em α I após a arginina 470 (*3) α I 469 His $\rightarrow$ Pro (Sp Barcelona); repetição α 5; clivagem em α I após arginina 470 (*3) α I 469 His (-) (Sp Alexandria); repetição α 5; clivagem em α I após arginina 470	471 CAG $\rightarrow$ CCG <i>exon</i> 11 - α Sp 469 CAT $\rightarrow$ CGT <i>exon</i> 11 - α Sp 469 CAT $\rightarrow$ CCT <i>exon</i> 11 - α Sp 469 CAT (-) <i>exon</i> 11 - α Sp; 1ª deleção da α Sp causada por pareamento desigual	Marchesi et al., 1987; Sahr et al., 1989; Sahr et al., 1990a Marchesi et al., 1987; Sahr et al., 1989 Venezia et al., 1993 Gallagher et al., 1993
Sp α I/36 (EIH)	(*4) α I 363 - 371 (-) (Sp Sfax); repetição α 4; clivagem em α I após arginina 356; 1ª variante reconhecida na repetição α 4	362 AGA $\rightarrow$ AGG; (-) 27 pb; aparecendo GU e ativação sítio clivagem oculto; <i>codon</i> 362 (Arg) inalterado; <i>exon</i> 8- α Sp	Bakkouti et al., 1992
Sp α II/31 (EIH)	(*4) α I 791 Asp $\rightarrow$ Glu (Sp Jendouba); na repetição α 8 com clivagem após a lisina 788	791 GAC $\rightarrow$ GAA <i>exon</i> 17 - α Sp	Alloisio et al., 1992
Sp α II/21 (EIH)	Sp Oran: 1º caso no domínio II da α Sp detectado em uma família com EIH grave homozigótica	defeitos proteico e molecular não detectados	Alloisio et al., 1988; Palek, 1991; Palek & Lambert, 1990

(*1) entre os casos descritos desta mutação, um apresentava quadro de poiquilocitose grave associada a uma mutação *de novo* na espectrina; a gravidade da doença ocorreu devido a presença da mutação α 28 em *trans* do polimorfismo α V/41 (Lorenzo et al., 1993).

(*2) 1ª descrição de mutação na hélice 2 do domínio I da α -sp; clivagem no meio da hélice 3 na posição oposta à substituição leu $\rightarrow$ pro (Gallagher et al., 1992).

(*3) quadro de eliptopoiquilocitose associado em *trans* ao polimorfismo α V/41 determinando uma variante α I/50-46b mais grave (Venezia et al., 1993; Gallagher et al., 1993).

(*4) associada ao polimorfismo α V/41.

Legenda: (+)= inserção α -Sp= alfa espectrina pb=pares de base
(-)= deleção β -Sp= beta espectrina

BETA ESPECTRINA

Com exceção de uma mutação de ponto (2053 Ala→Pro) na repetição β 17 associada com aumento da formação do fragmento Sp α I/74 (Tse et al., 1990), todas as mutações conhecidas da β -sp são identificadas com base em seu aumento de mobilidade em SDS-PAGE (Dhermy et al., 1982; Ohanian et al., 1985; Pothier et al., 1987; Eber et al., 1988; Lecomte et al., 1992; Yawata et al., 1990; Garbarz et al., 1991a; Palek & Sahr, 1992). Estas mutações resultam em uma β -espectrina "truncada" (com menor peso molecular) e prejuízo na auto-associação de SpD-SpD, resultando também na diminuição da fosforilação do C-terminal da β -sp (Palek & Sahr, 1992).

As mutações que resultam na beta-espectrina encurtada, podem incluir uma ausência na sequência que codifica um *exon* localizado próximo ao final 3' do gene da β -sp (*exon* X ou Y) devido a uma mutação no sítio de clivagem e criação de um *codon* de terminação prematuro (Gallagher et al., 1991; Garbarz et al., 1991b; Yoon et al., 1991; Palek & Sahr, 1992). A β -sp "truncada" pode ser também resultado de uma cadeia com terminação prematura devido à mudança na leitura por inserção ou deleção de alguns pares de base (Garbarz et al., 1991a; Tse et al., 1991; Palek & Sahr, 1992). O encurtamento da cadeia β -sp aumenta a susceptibilidade para a proteólise da lisina 48 da α -sp, causando aumento na formação do peptídeo de 74 kDa derivado da α -sp (Pothier et al., 1987; Palek & Sahr, 1992) e prejuízo na auto-associação de heterodímeros de espectrina (Tse et al., 1990).

Os defeitos na cadeia β -sp descritos na literatura encontram-se sumariamente descritos na tabela 2.

TABELA 2 : Defeitos proteicos e moleculares da beta-espectrina na EIH

Denominação/Doença	Anormalidade Proteica	Defeito Molecular	Referências
I- β-sp "truncada" (EIH)			
1. Perda de <i>exon</i> a-) Sp Rouen (β 220/218)	(*) C- t. t. e redução na fosforilação	G $\rightarrow$ T na posição + 3 no <i>intron</i> Y com (-) do <i>exon</i> Y conduzindo a <i>frameshift</i> e terminação prematura da cadeia	Garbarz et al., 1991b; Lecomte et al., 1992; Delaunay & Dherny, 1993
b-) Sp Le Puy (β 220/214)	(*) C- t. t. e ausência de fosforilação	A $\rightarrow$ G na posição + 4 no <i>intron</i> X com (-) do <i>exon</i> X conduzindo a <i>frameshift</i> e terminação prematura da cadeia	Dherny et al., 1982; Delaunay et al., 1990; Gallagher et al., 1991; Delaunay & Dherny, 1993
c-) Sp Göttingen (β 220/214)	C- t. t. e ausência de fosforilação	T $\rightarrow$ A posição +2 no <i>intron</i> X com (-) do <i>exon</i> X com <i>frameshift</i> e terminação prematura da cadeia	Yoon et al., 1991; Delaunay & Dherny, 1993
2. Frameshift (EIH)			
a-) Sp Nice (β 220/216)	(*) C- t. t. com (-) 4 kDa na região do sítio de fosforilação e ausência de fosforilação	duplicação AG nos <i>codons</i> 2045/2046; <i>exon</i> X com <i>frameshift</i> e terminação prematura da cadeia	Pothier et al., 1987; Tse et al., 1990; Tse et al., 1991
b-) Sp Tokyo (β 220/216)	(*) β I 2060 Ser $\rightarrow$ Ala C- t. t. com ausência de fosforilação	2059 GCC $\rightarrow$ AGC $\rightarrow$ GCA - GCT; (-) I pb no <i>exon</i> X conduzindo a <i>frameshift</i> e terminação prematura da cadeia; ocorre o mesmo <i>codon</i> de terminação da Sp Nice (CTG AAA) (2076-2077)	Kanzaki et al., 1992; Delaunay & Dherny, 1993
c-) Sp Tandil	(*) C- t. t. e ausência de fosforilação	(-) 7 pb após <i>codon</i> 2041 no <i>exon</i> X conduzindo a <i>frameshift</i> e terminação prematura da cadeia	Garbarz et al., 1991a; Garbarz et al., 1992; Palek & Sahr, 1992; Delaunay & Dherny, 1993
II- Mutação de ponto (EIH)			
	(*) β I 2053 Ala $\rightarrow$ Pro na hélice 2 da repetição β 17 com desestabilização da lisina α 48	2053 GCT $\rightarrow$ CCT	Tse et al., 1990
Legenda:			
(*) = formação do fragmento Sp α 1/74 kDa		(-) = deleção	α = alfa-espectrina
C-t. t. = C- terminal "truncado" ou encurtado		pb = pares de base	β = beta-espectrina

PROTEÍNA 4.1

Além de defeito de espectrina, pode ser identificado, em indivíduos com ElH, defeito de proteína 4.1 (Conboy, 1993). Os defeitos de proteína 4.1 podem ser divididos em dois grupos:

ElH 4.1 (-): designa uma condição na qual as mutações na ElH envolvem deficiência quantitativa da proteína 4.1 (Conboy, 1993), onde a proteína está reduzida (estado heterozigoto) ou ausente (estado homozigoto) (Venezia et al., 1992).

ElH 4.1 (+): determina as variantes qualitativas da proteína envolvendo mudança no peso molecular da mesma. Em muitos destes casos, o defeito foi primeiro atribuído à deficiência de proteína 4.1 baseada na redução quantitativa da proteína corada por azul de Coomassie na posição normal de aproximadamente 80 kDa. Contudo, a análise com anticorpo anti-proteína 4.1 revelam uma proteína de peso molecular anormal, isto é, um defeito qualitativo e não quantitativo (Conboy, 1993).

ElH 4.1 (-): A base molecular da deficiência de proteína 4.1 é heterogênea, porém muitos pacientes são descendentes de africanos do norte (Palek, 1991; Palek & Sahr, 1992). A proteína 4.1 pode apresentar uma deficiência parcial ou total (Palek, 1991; Conboy, 1993).

1) Deficiência parcial: estado heterozigoto: a deficiência parcial de proteína 4.1 é uma causa relativamente freqüente de ElH como tem sido descrita em várias famílias com ElH da França, Norte e Sul da África e nos Estados Unidos (Conboy, 1993) contudo parece ser mais freqüente em pacientes do Sul da França e Norte da África (Palek & Sahr, 1992). Uma deficiência parcial de proteína 4.1 está associada com ElH leve (Lambert & Zail, 1987; Palek, 1991; Palek & Sahr, 1992) com ausência de sinais, eliptócitos bem alongados (Alloisio et al., 1985b) e transmissão dominante (Alloisio et al., 1985b; Venezia et al., 1992).

2) Deficiência total: estado homozigoto: uma ausência total da proteína 4.1 é identificada na forma homozigota desta doença (Lambert & Zail, 1987; Palek, 1991) e associada com marcada instabilidade na membrana (Lambert & Zail, 1987), conduzindo à hemólise grave antes da esplenectomia (Alloisio et al., 1985b). Homozigoto 4.1 (-) é excepcional e a ausência da proteína 4.1 é acompanhada por redução grave de glicoforina C. Esta observação é uma forte evidência que a proteína 4.1 estabiliza a glicoforina C na membrana (Venezia et al., 1992). A taxa de fragmentação das membranas de pacientes com ElH 4.1 (-)

é dependente do grau de deficiência: células com deficiência total fragmentam-se mais rapidamente que células com deficiência parcial (Conboy, 1993).

ElH 4.1 (+): Proteínas 4.1 disfuncionais têm sido identificadas em pacientes com proteína de peso molecular baixo ou alto, produzida por um encurtamento ou alongamento da mesma (Palek, 1991), envolvendo principalmente o domínio de ligação com a espectrina conforme demonstrado por digestão enzimática e química da proteína 4.1 (Palek & Sahr, 1992). Membranas de eritrócitos com proteína 4.1 alongada fragmentam-se normalmente, enquanto que membranas de células com proteína 4.1 encurtada fragmentam-se mais rapidamente (Conboy, 1993).

1) Proteína 4.1 alongada: o alongamento da proteína 4.1 reduz a acessibilidade da proteína 4.1 para a espectrina (Palek & Lambert, 1990; Palek, 1991).

2) Proteína 4.1 encurtada: proteínas de menor massa molecular falham em promover a ligação da espectrina com a actina provavelmente por causa da deleção do domínio de ligação da espectrina. (Palek, 1991) provocando marcada diminuição na estabilidade da membrana (Conboy, 1993). O encurtamento da proteína 4.1 é uma forma rara e o paciente com esta proteína apresenta anemia hemolítica mais grave que o paciente com proteína 4.1 de alto peso molecular, provavelmente porque a última retém alguma, se não muito, de sua habilidade para se ligar a β -espectrina (Palek & Sahr, 1992).

Os principais defeitos na proteína 4.1 [ElH 4.1 (-) e ElH 4.1 (+)] encontram-se descritos na tabela 3.

TABELA 3 : Defeitos proteicos e moleculares da proteína 4.1 na EIH

Denominação/Doença	Anormalidade Proteica e expressão clínica	Defeito molecular	Referências
4.1 (-) (EIH)	(↓) prot. 4.1 com EIH leve em heterozigose e (∅) de prot. 4.1 com EIH com hemólise grave em dupla heterozigose ou homozigose; provoca instabilidade da membrana por prejuízo na interação sp-actina	(-) 318 pb com perda de 3 <i>exons</i> (incluindo <i>codon</i> de iniciação) impedindo a tradução do RNAm	Conboy et al., 1986b; Conboy et al., 1991
	(↓) prot. 4.1 com EIH leve em heterozigose e (∅) de prot. 4.1 com EIH com hemólise grave em homozigose	Rearranjo no gene da prot. 4.1 (braço curto do cromossomo 1) próximo <i>codon</i> de iniciação com incapacidade de tradução normal da proteína	Conboy et al., 1986 b; Conboy, 1993
	(∅) de prot. 4.1 com EIH grave em homozigose (alelo 4.1 Madrid)	AUG → ACG no <i>codon</i> de iniciação com completa ausência de prot. 4.1 eritróide	Venezia et al., 1992
4.1 (+) (EIH) ↑PM 4.1 95	(+) 15 kDa adjacente ao domínio de ligação com a sp conduzindo ao aparecimento de 2 domínios de ligação sp-actina resultando em EIH comum leve	duplicação de 123 a.a. ou 369 pb (lys 407 → gla 529) correspondendo a duplicação de 3 <i>exons</i>	Marchesi et al., 1988; Conboy et al., 1990; Marchesi et al., 1990; Conboy, 1993
↓PM 4.1 68/65	(-) 10 kDa no sítio de ligação sp-actina com remoção do domínio de ligação sp-actina inteiro, associado com anemia hemolítica grave	(-) 80 a.a. ou 240 pb (lys 407→gly 486) correspondendo a deleção de 2 <i>exons</i>	Marchesi et al., 1988; Conboy et al., 1990; Marchesi et al., 1990; Conboy, 1993
4.1 Presles	(-) 8,5 kDa associado a um encurtamento assintomático da proteína 4.1	(-) de um único <i>exon</i> (motif II)	Feddal et al., 1992

Legenda:
 (↓) = deficiência parcial
 (∅) = deficiência total
 ↑PM = alto peso molecular
 ↓PM = baixo peso molecular
 (+) = inserção
 (-) = deleção
 pb = pares de base
 a.a. = aminoácidos
 sp = espectrina
 prot. = proteína

GLICOFORINAS

Vários pacientes com EIH leve perdem uma das glicoproteínas da membrana da hemácia designada glicoforina C (Daniels et al., 1986; Palek, 1991). A glicoforina C deficiente é expressada clinicamente como uma EIH leve, herdada recessivamente, sem hemólise e eliptocitose suave. Exceto pela eliptocitose, estes pacientes são clinicamente assintomáticos. Anormalidades genéticas das glicoforinas A e B, cujos genes estão fisicamente ligados na região q28-q31 do cromossomo 8, incluindo deficiências de ambas glicoforinas A e B, são clinicamente assintomáticas (Palek & Sahr, 1992).

Ausência de glicoforina C: entre as mutações que conduzem à ausência de glicoforina C encontram-se:

- a) deleção do *exon* 3 e 4 resultando na troca da composição e *codon* de terminação prematuro;
- b) mutações nos *codons* 44 e 45 TGGCCG → TTGCG, resultando na troca da composição e *codon* de terminação prematuro (nucleotídeos 166-168) (Telen et al., 1990; Palek & Sahr, 1992).

Uma redução na glicoforina C ou sialoglicoproteína β pode acompanhar a ausência de proteína 4.1 (Venezia et al., 1992). A glicoforina C, a menor sialoglicoproteína da membrana eritrocitária, foi estudada em indivíduos com EIH 4.1 (-) homozigotos e heterozigotos, caracterizada pela ausência total ou parcial da proteína 4.1. Em membranas 4.1 (-) homozigota, a glicoforina C estava gravemente reduzida. A sialoglicoproteína γ ou glicoforina D (uma glicoproteína relacionada à glicoforina C) também torna-se reduzida. Em heterozigotos 4.1 (-), a glicoforina C aparece levemente reduzida, enquanto que a glicoforina D aparece normal. Estas observações mostram que há uma interação entre a proteína do esqueleto de membrana 4.1 e a glicoforina C (Alloisio et al., 1985a).

A deficiência de glicoforina C, que carrega o antígeno de grupo sanguíneo Gerbich, é também acompanhada pela perda da expressão de todos os antígenos Gerbich (Ge:1, Ge:2 e Ge:3), o chamado fenótipo Leach (Palek & Sahr, 1992) que é comum na Melanésia (Palek, 1991), podendo ocorrer invasão de hemácias deficientes em glicoforina C pelo parasita da malária *Plasmodium falciparum* (Hadley et al., 1988).

1.4. "Eliptocitose Adquirida"

Eliptócitos aparecem em várias situações com ou sem anemia, como síndromes mieloproliferativas (Djaldetti et al., 1984; Lichtman, 1990b), anemia falciforme (Djaldetti et al., 1984), anemia megaloblástica (Bull et al., 1990) e deficiência de ferro (Bull et al., 1990; Djaldetti et al., 1984). Nestas doenças, estudos bioquímicos da membrana da hemácia são escassos e os resultados controversos.

As *síndromes mieloproliferativas* são doenças do tronco celular hemopoiético onde pode ser observado esplenomegalia e anemia em alguns indivíduos. O sangue periférico pode apresentar eritroblastos, granulócitos imaturos, esquizócitos, dacriócitos (Lichtman, 1990a) e eliptócitos (Djaldetti et al., 1984; Lichtman, 1990a). Dentre estas síndromes, a mais freqüente é a *leucemia mieloide crônica (LMC)* que se caracteriza pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph¹) em aproximadamente 90% dos pacientes, como um resultado da translocação recíproca envolvendo o braço longo do cromossomo 9 e 22 (Cline & Ahuja, 1990). A exposição à radiação ionizante pode aumentar a ocorrência da doença (Lichtman, 1990a). A *mielofibrose primária*, também uma doença mieloproliferativa crônica, caracteriza-se por fibrose medular de etiologia desconhecida. Há comprometimento hemopoiético intramedular e ocorre principalmente após os 50 anos de idade (Lichtman, 1990b). Alguns estudos da membrana eritrocitária demonstram que na LMC há ligação cruzada das 2 subunidades da espectrina e que o defeito no citoesqueleto estaria associado com perda da assimetria dos fosfolípidos transmembranosos (Kumar & Gupta, 1983). Por outro lado, a proteína quinase C (PKC) está aumentada em eritrócitos de pacientes com LMC (Kundu et al., 1991; Cohen & Gascard, 1992) e o aumento da atividade de PKC, por sua vez, estaria associado com uma fosforilação anormal da proteína 4.1 (Kundu et al., 1991), causando inibição da sua ligação com a espectrina e da formação do complexo espectrina-actina-proteína 4.1 (Kundu et al., 1991; Cohen & Gascard, 1992). Porém, é possível que também a auto-associação dos heterodímeros de espectrina esteja prejudicada na LMC (Basu et al., 1988). Não há, entretanto, estudos semelhantes em outras síndromes mieloproliferativas.

Também não foram realizados estudos bioquímicos da membrana da hemácia nas anemias carenciais como na anemia megaloblástica e ferropriva. As *anemias megaloblásticas* decorrem de um prejuízo na síntese de DNA e devem-se à deficiência de

folato ou cobalamina. Os eritrócitos variam em tamanho e forma, mas são freqüentemente grandes e ovais (Babior, 1990). A *anemia ferropriva* é o estágio mais avançado da deficiência de ferro, caracterizada por diminuição ou ausência de estoques, baixa concentração de ferro sérico e baixa saturação da transferrina. A anisocitose, uma alteração morfológica reconhecida precocemente nos eritrócitos, é tipicamente acompanhada por ovalocitose leve e eliptócitos hipocrômicos alongados (Fairbanks & Beutler, 1990).

A *anemia falciforme* é o estado homozigótico para a hemoglobina S (Hb S). Esta hemoglobina anormal decorre da substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia polipeptídica β da hemoglobina (Ingram, 1957) ($GAG \rightarrow GTG$) (Marotta et al., 1977). A hemácia contendo Hb S adquire a forma de "foice" quando é desoxigenada (Beutler, 1990) e a doença possui componente hemolítico e vasooclusivo (Hebbel, 1991). Considerando-se a grosseira distorção que é imposta sobre a célula pela polimerização da hemoglobina, não é surpreendente que um certo número de anormalidades estruturais e funcionais têm sido notadas na membrana das hemácias falciformes (Ingram, 1986). A hemoglobina normal interage com proteínas de membrana, ligando-se ao domínio citoplasmático da banda 3 e estabiliza a auto-associação da espectrina (Platt and Falcone, 1988). A hemoglobina S apresenta mais afinidade pela membrana que a Hb A normal (Fischer et al., 1975). A modificação da membrana da hemácia por hemoglobinas anormais é importante na fisiopatologia da perda da membrana (Platt & Falcone, 1988) possivelmente levando a uma maior rigidez das hemácias falciformes (Evans & Mohandas, 1987). O aumento da ligação da hemoglobina e o aumento no acúmulo de cálcio (Chiu et al., 1979) na membrana das hemácias falciformes que são anormalmente permeáveis ao cálcio (Lux et al., 1976), alteram a permeabilidade e a fosforilação na membrana (Chiu et al., 1979). A espectrina liga-se a este cálcio avidamente que, por sua vez, modifica a fosforilação da espectrina por proteínas quinases e ATP. Estas alterações são associadas com a mudança no estado físico da espectrina. Alguns estudos indicam que as células irreversivelmente falcizadas (CIF) são também ATP-deficientes. Então, qualquer aumento de cálcio na membrana eritrocitária ou diminuição de ATP, ou ambos, pode levar à "fixação" do arranjo espectrina-actina na forma irreversivelmente falcizada (Lux et al., 1976).

Uma possibilidade para o aparecimento de eliptócitos nestas doenças seria um defeito na interação "horizontal" das proteínas da membrana eritrocitária com prejuízo na auto-associação dos heterodímeros de espectrina.

Diante do exposto, foi objetivo deste trabalho caracterizar, pela primeira vez numa população brasileira, os defeitos proteicos das membranas eritrocitárias na eliptocitose hereditária, através de quantificação densitométrica de gel de poliacrilamida com SDS, estudo de auto-associação de dímeros de espectrina, análise dos produtos da digestão de espectrina pela tripsina e, quando possível, estudo a nível de DNA. Foi também objetivo analisar por gel não-desnaturante a auto-associação dos heterodímeros de espectrina em outras doenças onde há eliptócitos no esfregaço de sangue periférico como anemia ferropriva, anemia megalobástica, anemia falciforme e síndromes mieloproliferativas (mielofibrose e leucemia mielóide crônica), às quais denominamos, em seu conjunto, de "eliptocitose adquirida".

II. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Caracterizar os defeitos proteicos da membrana eritrocitária em pacientes com Eliptocitose Hereditária encaminhados ao ambulatório de Hematologia da UNICAMP, através de quantificação densitométrica de gel de poliacrilamida com SDS, corado pelo azul de Coomassie, estudo de auto-associação de dímeros de espectrina e análise dos produtos da digestão de espectrina pela tripsina.

- Realizar estudo a nível de DNA, quando possível, naqueles pacientes com Eliptocitose Hereditária, cuja digestão triptica da espectrina demonstrou o aparecimento de um fragmento anormal.

- Avaliar a auto-associação dos heterodímeros de espectrina através de gel não desnaturante em outras doenças onde há eliptócitos no esfregaço de sangue periférico como anemia ferropriva, anemia megaloblástica, anemia falciforme e síndromes mieloproliferativas (mielofibrose e leucemia mielóide crônica), às quais denominamos, em seu conjunto, de "eliptocitose adquirida".

III. CASUÍSTICA

Foram estudados 36 pacientes, sendo: 10 pacientes com Eliptocitose Hereditária (EIH) e seus familiares, bem como 26 com Eliptocitose Adquirida (ElAd).

Todos os participantes do estudo concordaram voluntariamente com os procedimentos adotados, após ampla explicação dos mesmos e foram submetidos à coleta de 20 a 40 ml de sangue periférico.

III. 1) Eliptocitose Hereditária

Caso 1 (WCM):

Sexo masculino, 17 anos, branco com ascendência materna negróide, possui história de palidez, fraqueza e internação por esplenomegalia.

Caso 2 (BAP):

Sexo feminino, 19 anos, branca com ascendência paterna e materna italiana, assintomática, sem esplenomegalia.

Caso 3 (RAN):

Sexo feminino, 22 anos, branca com ascendência paterna negróide e materna italiana, esplenomegalia detectada ao acaso por paciente procurar ambulatório devido a caso de talassemia na família.

Caso 4 (OSM):

Sexo feminino, 46 anos, branca com ascendência italiana, sem esplenomegalia, procurou hospital por anemia ferropriva devido a miomatose uterina. Após retirada cirúrgica do mioma e tratamento da anemia ferropriva, a ferritina retornou a níveis normais conforme evidenciado em duas análises independentes: 62 e 60 ng/ml (valores normais: 10 a 250 ng/ml -Roche). Entretanto, apesar do desaparecimento da microcitose e hipocromia, a hemoglobina não voltou a níveis normais e regular número de eliptócitos mantiveram-se presentes.

Caso 5 (BDF):

Sexo feminino, 69 anos, branca com ascendência paterna e materna italiana, assintomática, sem esplenomegalia, encaminhada do sul do país, possui história de filhos e irmãos com eliptocitose hereditária assintomática e baço normal.

Caso 6 (MJSL):

Sexo feminino, 35 anos, branca com provável ascendente negróide, possui história de anemia desde a infância e esplenomegalia.

Caso 7 (CARP):

Sexo feminino, 35 anos, branca com ascendência paterna alemã e materna italiana, possui história de anemia há 15 anos e esplenomegalia.

Caso 8 (LESN):

Sexo masculino, 4 anos, branco com ascendência materna negróide, história de anemia desde o nascimento, dependente de transfusão e acentuada esplenomegalia. Filho de pais consangüíneos (primos legítimos) e assintomáticos. A consangüineidade vêm ocorrendo pelo menos por duas gerações anteriores (Figura 7).

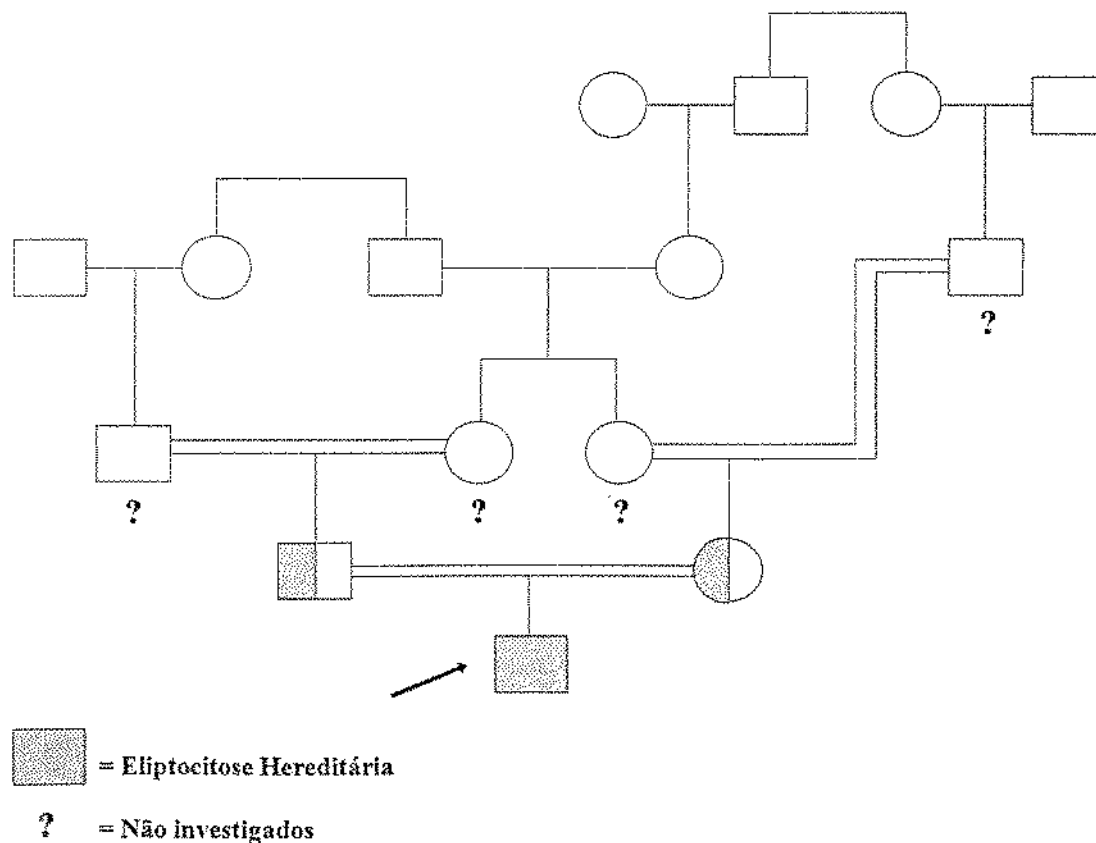


FIGURA 7: Heredograma da família do caso 8 (LESN).

Casos 9 (VRD e AAD):

Dois irmãos do sexo masculino (VRD, 22 anos e AAD, 25 anos), negróides, assintomáticos, sem esplenomegalia.

Caso 10 (MCP):

Sexo feminino, 19 anos, branca com ascendência paterna negróide e materna italiana, possui história de anemia desde a infância, com esplenomegalia e episódios de fraqueza e icterícia. A mãe apresenta anemia semelhante sendo submetida à esplenectomia há vários anos.

III. 2) "Eliptocitose Adquirida"

Foram estudados 26 pacientes, sendo: seis pacientes com mielofibrose, sete pacientes com leucemia mielóide crônica, três pacientes com anemia megaloblástica, cinco pacientes com anemia ferropriva e cinco pacientes com anemia falciforme.

IV. MÉTODOS

IV.1. Análise Hematológica

1. Para avaliação hematológica, foi realizada coleta de sangue periférico em EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético) na concentração de 1,5 mg/ml (Dacie & Lewis, 1984).
2. A hematimetria foi obtida através de contador eletrônico Cell Dyn 1600 (ABBOTT).
3. A contagem de reticulócitos foi levada a efeito pela incubação de volume/volume de sangue periférico com 1% de azul brilhante de cresil (Erslev, 1990).
4. A análise morfológica dos eritrócitos foi feita através de microscopia óptica de lâminas de sangue periférico coradas pelo May-Grünwald-Giemsa (Dacie & Lewis, 1984).

A avaliação quantitativa dos eliptócitos, dacriócitos e drepanócitos foi feita através da porcentagem destas células em 10 campos de cerca de 200 hemácias cada um. Esta porcentagem foi expressa em cruzes de acordo com o seguinte padrão:

- 4.1. Para avaliação quantitativa de eliptócitos na Eliptocitose Hereditária e de drepanócitos na Anemia Falciforme, foi considerada a seguinte legenda:
< 2% = (Ø); 2 - 10% = (+); 10 - 30% = (++); 30 - 60% = (+++) e > 60% = (++++).
- 4.2. Para avaliação quantitativa de eliptócitos e dacriócitos nas síndromes mieloproliferativas e nas anemias carenciais, foi considerada a seguinte legenda:
< 1% = (Ø); 1 - 2% = (+); 2 - 5% = (++); 5 - 10% = (+++) e > 10% = (++++).

IV.2. Estudo Bioquímico

1. Extração e solubilização das proteínas da membrana eritrocitária.

A extração de proteínas da membrana eritrocitária foi realizada de acordo com Dodge et al. (1963), com pequenas modificações.

- 1.1. Coleta de 20 ml de sangue venoso em 25% do anticoagulante ACD (ácido cítrico, citrato de sódio, dextrose) e conservação a 4°C por no máximo 10 dias (Wolfe, 1985).
- 1.2. Centrifugação de 5 ml de sangue a 2.500 rpm, por 10 minutos, a 4°C.
- 1.3. Remoção do plasma e da camada de leucócitos por aspiração.
- 1.4. Ressuspensão das células em 2 volumes de PBS a 4°C (5mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, 1mM azida sódica; pH 7,5). Centrifugação a 2.500 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Remoção do sobrenadante e leucócitos restantes por aspiração.
- 1.5. Repetição do item 1.4 duas vezes.
- 1.6. Lise de hemácias com 30 volumes de tampão de lise a 4°C (3mM Na₂HPO₄, 0,2mM NaH₂PO₄, 0,1mM EDTA, 0,1 mM PMSF; pH 8,0). Centrifugação a 16.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. Remoção do sobrenadante (hemoglobina) e do agregado de leucócitos formado sob o *pellet* de membrana, por aspiração.
- 1.7. Repetição do item 1.6 duas vezes, ou até o *pellet* adquirir cor branco leitosa.
- 1.8. Reserva de aproximadamente metade do volume do *pellet* obtido, a 4°C, para posteriormente proceder a extração de espectrina.
- 1.9. Determinação da concentração proteica através de espectrofotometria, utilizando-se curva padrão de soro albumina bovina em comprimento de onda de 595nm (*Bio-Rad Protein Assay* baseado no método de Bradford).

- 1.10. Solubilização da amostra (*pellet* de membranas) em igual volume da solução: 10mM EDTA, pH 8,0, 0,25M tris-base, 5% SDS, 1,25 M sacarose, 0,1M DTT e 0,05% de azul de bromofenol. Fervura por 2 minutos.

2. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

As proteínas de membrana foram fracionadas em gel de poliacrilamida contendo SDS.

- 2.1. Sistema Fairbanks: 30 µg de proteínas de membrana solubilizada foi aplicada em gel de gradiente exponencial de poliacrilamida 3,5 a 17% (Fairbanks et al, 1971), preenchido com tampão de corrida 40 mM tris-base, 20mM acetato de sódio, 2mM EDTA, pH 7,4, 0,2% SDS, 0,008% de 2- mercaptoetanol e submetido à tensão de 40 V por 16 horas.

- 2.2. Sistema Laemmli: 40 µg de proteínas foram aplicadas em gel de resolução contendo 12 % de poliacrilamida (Laemmli, 1970), preenchido com tampão de corrida 0,025M tris-base, 0,2M glicina, 0,1% SDS, 0,008% de 2-mercaptoetanol e submetido à tensão de 60 V por 16 horas.

Para ambos os sistemas foi utilizado aparato Hoefer modelo SE 400 e fonte Bio Rad modelo 1000/500.

- 2.3. Visualização das proteínas através de coloração com 0,25% de azul de Coomassie em 10% de ácido acético e 45% de metanol.
- 2.4. Lavagens subsequentes dos géis em solução descorante contendo 30% de metanol e 7% de ácido acético.
- 2.5. Secagem dos géis previamente tratados em solução contendo 1% de glicerol, 7% de ácido acético e 5% de metanol.

3. Quantificação das proteínas de membrana por densitometria (Hoefer modelo GS 300).

O cálculo das diferentes áreas sob os picos de α e β -sp, 2.1, banda 3, 4.1 e 4.2, foi levado a efeito pelo programa de computador GS 365 W - versão 3.01 - Hoefer.

Todas as amostras foram analisadas em duplicata e na maioria dos pacientes com ElH foram obtidas 2 amostras de sangue independentes e o resultado foi expresso pela média $\pm$ desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$).

3.1. Sistema Fairbanks 3,5-17 %:

Para identificação de eventual deficiência das proteínas da membrana utilizamos a banda 3 como razão, através do cálculo:

área total da proteína X / área total de banda 3.

Para detecção de deficiência de proteína 4.1 ou 4.2, utilizamos o cálculo:

área total prot. 4.1 / área total prot. 4.2

A padronização destas técnicas foi realizada previamente ao estudo dos pacientes, através da análise de 30 indivíduos normais, cujos dados encontram-se na tabela 4 e figura 8.

Para identificação de controle normal usado na razão α : β espectrina, na análise de um caso de ElH, o controle foi determinado após análise densitométrica de 22 diferentes controles. Os controles utilizados para a determinação dos valores normais, bem como sua média e desvio padrão, também se encontram na tabela 4 e figura 8.

3.2. Sistema Laemmli 12%:

Para confirmação de deficiência de proteína 4.1, foi utilizado o sistema Laemmli 12% através do cálculo 4.1/4.2. O controle foi obtido pela média de 6 indivíduos normais conforme tabela 5.

Para determinação de controle normal na razão 4.1a/4.1b, foi realizada a análise densitométrica de 3 controles de acordo com a tabela 5.

3.3. O modelo da separação eletroforética das proteínas totais da membrana eritrocitária através dos sistemas Fairbanks 3,5-17 % e Laemmli 12 % encontram-se na figura 9.

4. Extração de espectrina.

- 4.1. Tratamento do *pellet* reservado com 0,009% de DFP (diisopropilfosforofluoridato).
- 4.2. Ressuspensão da amostra (*pellet*), com tampão de extração de espectrina 0,1 mM Na_2HPO_4 , 0,00625 mM NaH_2PO_4 , 0,1mM EDTA, 0,1 mM DTT, pH 8,2. Centrifugação a 17.000 rpm, por 40 minutos, a 4°C. Remoção do sobrenadante por aspiração.
- 4.3. Incubação da amostra com tampão de extração de espectrina (espectrina: tampão = 2:1) a 4°C por 16 horas.
- 4.4. Centrifugação a 17.000 rpm, por 90 minutos, a 4°C. Coleta do sobrenadante de espectrina. Cerca de 50% da espectrina obtida foi colocada em meio isotônico (150mM de NaCl) com o objetivo de diminuir a conversão tetrâmero → dímero e armazenada a 0°C até a aplicação, por período sempre inferior a 6 horas. A outra metade da espectrina foi reservada para a digestão triptica.
- 4.5. Determinação da concentração de espectrina conforme descrito no item 1.9.

5. Eletroforese de espectrina em gel não-desnaturante.

- 5.1. Verificação de dímeros e tetrâmeros de espectrina, utilizando-se eletroforese em gel não-desnaturante: tris-base 0,04M, acetato de sódio 0,02M, EDTA 0,002M, pH 7,4, 0,3% agarose, 2,5% acrilamida, 0,003M persulfato de amônio, 0,025% TEMED (N, N, N', - Tetramethylethylenediamine).
- 5.2. Aplicação de 15µg de espectrina isotônica, acrescida de 44mM de DTT, 64mM de sacarose e 0,05% de azul de bromofenol para a eletroforese, utilizando-se tampão de corrida não-desnaturante a 4°C (40mM tris-base, 20mM acetato de sódio, 2mM EDTA, pH 7,4, e 0,008% de 2-mercaptoetanol) e submetido à tensão de 20V, por 20 horas a 4°C, usando-se aparato Bio-Rad modelo PROTEAN II e fonte Bio-Rad modelo 1000/500.

- 5.3. Visualização de dímeros e tetrâmeros de espectrina, através de coloração com 0,05% de azul brilhante de Coomassie em 25% de isopropanol e 10% de ácido acético.
- 5.4. Lavagens subsequentes do gel não-desnaturante em solução ácido acético:água (1:10).
- 5.5. Para obtenção dos valores normais de dímeros de espectrina foram utilizados 30 controles diferentes conforme tabela 4 e figura 8.
- 5.6. O modelo da separação eletroforética de tetrâmero-dímero de espectrina encontra-se na figura 10.

6. Digestão triptica da espectrina.

- 6.1. Digestão da espectrina (obtida no item 4.4) pela tripsina (tripsina: espectrina = 1:100 v/v) em solução contendo 1mM Na₂HPO₄ pH 8,0, 150mM NaCl, 5mM EDTA, pH 7,5, a 4°C, por 20 horas.
- 6.2. Interrupção da digestão triptica da espectrina através da adição de 1% SDS, 20mM DTT e fervura por 1 minuto.
- 6.3. Aplicação de 100 µg de espectrina digerida, adicionada de 27 mM de sacarose, 14mM de DTT e 0,03% de azul de bromofenol.
- 6.4. Fracionamento dos peptídeos de espectrina em gel de poliacrilamida, Sistema Laemmli 10%, preenchido com tampão de corrida 0,025M tris-base, 0,2M glicina, 0,1% SDS, 0,008% de 2-mercaptoetanol e submetido à tensão de 50V por 20 horas, em aparato Hoefer modelo SE 400 e fonte Bio-Rad modelo 1000/500.
- 6.5. Visualização dos peptídeos de espectrina por coloração com 0,25% de azul brilhante de Coomassie conforme descrito nos itens 2.3 e 2.4.
- 6.6. Secagem do gel conforme descrito no item 2.5.
- 6.7. O modelo da separação eletroforética dos peptídeos de espectrina encontra-se na figura 10.

TABELA 4: Controles utilizados para a determinação dos valores normais para as proteínas totais da membrana através do Sistema Fairbanks 3,5-17% e para heterodímeros de espectrina.

	sp/b3	2.1/b3	4.1 + 4.2/b3	4.1/4.2	α / β	Sp D(%)
	1,15	0,20	0,29	1,20	0,90	5,0
	0,91	0,18	0,28	1,15	0,94	5,5
	1,04	0,19	0,43	1,00	0,94	6,1
	1,05	0,20	0,36	1,04	1,02	7,1
	0,87	0,19	0,34	1,06	1,06	7,3
	0,96	0,23	0,35	0,91	0,91	7,7
	1,10	0,21	0,37	1,00	1,04	7,7
	1,06	0,19	0,33	0,97	1,04	8,0
	0,90	0,18	0,36	1,01	0,98	8,0
	1,00	0,18	0,33	0,98	1,02	8,1
	1,03	0,19	0,34	1,05	0,97	8,5
	1,04	0,18	0,33	0,88	0,97	8,5
	0,94	0,17	0,30	0,88	0,92	8,8
	1,05	0,17	0,33	0,90	0,94	9,0
	1,05	0,17	0,36	0,90	0,97	9,9
	1,01	0,23	0,32	0,88	0,97	10,0
	0,91	0,21	0,38	0,84	1,00	10,3
	0,95	0,21	0,35	0,90	0,92	10,5
	1,10	0,23	0,36	0,86	0,93	10,9
	0,95	0,23	0,40	1,00	0,88	11,6
	1,03	0,23	0,33	1,03	0,99	11,8
	1,11	0,20	0,28	1,20	0,90	11,9
	1,05	0,20	0,35	0,99		12,0
	1,04	0,21	0,35	0,88		12,4
	1,13	0,23	0,32	1,14		12,5
	1,01	0,20	0,38	1,00		12,6
	1,12	0,19	0,35	0,98		13,4
	0,98	0,17	0,33	0,92		13,6
	1,06	0,20	0,37	0,99		13,7
	0,95	0,23	0,42	1,12		14,0
n =	30	30	30	30	22	30
$\bar{x} \pm DP =$	$1,02 \pm 0,07$	$0,20 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,10$	$0,96 \pm 0,05$	$9,9\% \pm 2,5$
Variação =	(0,87 - 1,15)	(0,17 - 0,23)	(0,28-0,43)	(0,84 - 1,20)	(0,88-1,06)	(5,0 - 14,0)

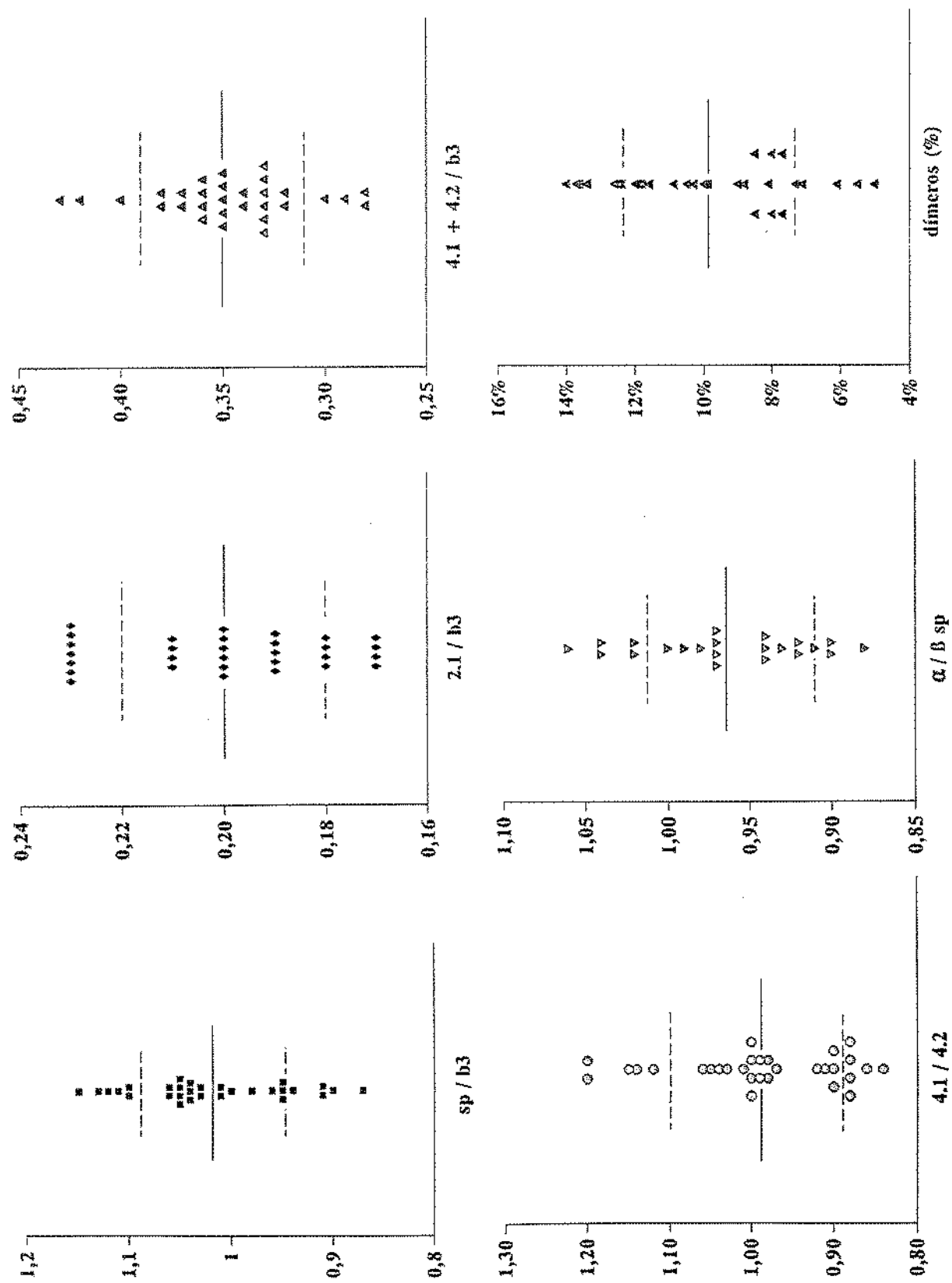


FIGURA 8: Dispersão dos valores controles obtidos para a padronização da densitometria das proteínas da membrana eritrocitária: espectrina/banda 3; 2.1/banda 3; 4.1+4.2/banda 3; α -sp/ β -sp e dímeros de espectrina // ——— = $\bar{x}$; - - - - - = DP.

TABELA 5: Controles utilizados para a determinação dos valores normais da razão = proteína 4.1/ proteína 4.2 e 4.1a/4.1b através do Sistema Laemmli 12%.

	4.1 / 4.2	4.1a / 4.1b
	0,84	2,30
	0,92	1,67
	0,92	1,65
	0,80	
	0,82	
	0,95	
n =	6	3
$\bar{x} \pm DP$	$0,88 \pm 0,06$	$1,87 \pm 0,30$
Variação	<u>(0,80 - 0,95)</u>	<u>(1,65 - 2,30)</u>

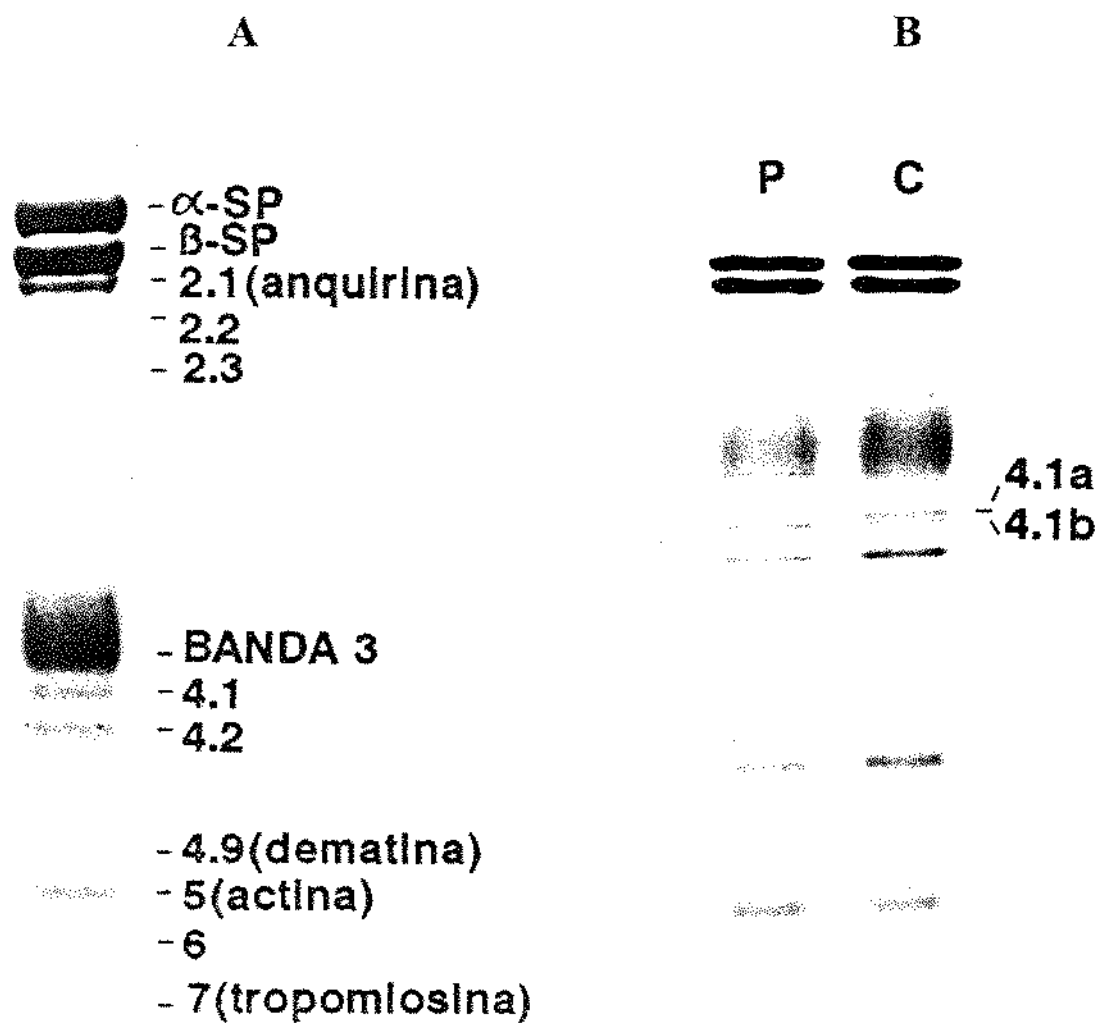


FIGURA 9: (A) SDS-PAGE: Sistema Fairbanks 3,5-17%. (B) SDS-PAGE: Sistema Laemmli 12% P=paciente e C=controle. Modelo da separação eletroforética das proteínas totais da membrana eritrocitária, mostrando aumento de proteína 4.1b em um paciente pelo sistema B.

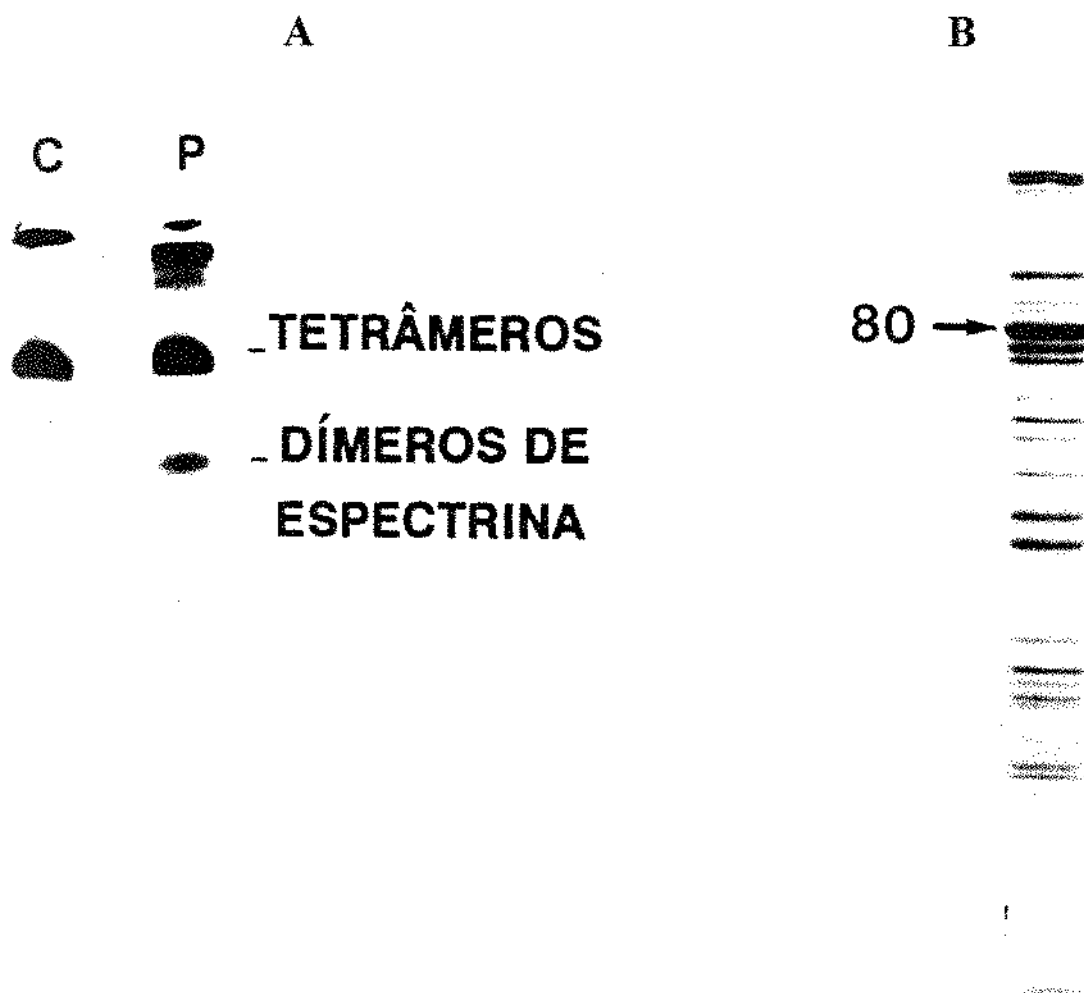


FIGURA 10: (A) Modelo da quantificação de heterodímeros de espectrina mostrando um controle normal (C) e dímero aumentado em paciente (P).
 (B) Modelo da separação eletroforética dos fragmentos correspondentes aos domínios das cadeias α e β da espectrina, indicando o domínio I da cadeia α -sp com 80kDa (Delaunay et al., 1990).

IV.3. Western-blotting

1. Utilizando-se a amostra obtida no item **IV.2.1.10.** (*pellet* de membranas) e no item **IV.2.6.3.** (espectrina digerida) procedeu-se a eletroforese em gel de poliacrilamida.

- 1.1. As proteínas do *pellet* de membranas foram fracionadas em gel de poliacrilamida contendo SDS através do Sistema Laemmli 6%: 40 µg de proteínas foram aplicadas em gel de resolução contendo 6% de poliacrilamida.

- 1.2. Os peptídeos da espectrina digerida foram fracionados em gel de poliacrilamida 10%, Sistema Laemmli: 40 µg de espectrina digerida foram aplicadas no gel de resolução contendo 10% de poliacrilamida.

Ambos os géis foram preenchidos com tampão de corrida idêntico ao item **IV.2.2.2.** e submetido à tensão de 80 V por 4 horas.

2. A transferência das proteínas fracionadas por SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose (modelo 0,45µ-Bio-Rad) foi levada a efeito usando-se tampão de transferência contendo tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,02% e submetido à tensão de 25 V por 20 horas e 100 V por 40 minutos.

3. A membrana de nylon foi tratada com solução bloqueadora contendo tris-base 0,02 M, NaCl 0,15M, tween 20 0,05% e leite em pó desnatado (Molico) 5% por 2 horas à temperatura ambiente.

4. Posteriormente, as membranas foram lavadas com solução basal (tris-base 0,02 M, NaCl 0,15 M, tween 20 0,05%).

5. Incubação com o respectivo anticorpo:

- 5.1. A membrana de nitrocelulose contendo as proteínas totais da membrana eritrocitária foi incubada com anticorpo anti-β espectrina, na concentração de 1:200 (anticorpo:solução) com a solução basal descrita no item 4, acrescida de 0,3% de BSA (soro albumina bovina) e azida sódica 0,02%, por 16 horas a 4°C.

- 5.2. A membrana de nitrocelulose contendo a espectrina digerida foi incubada com anticorpo anti-Sp α I/80 na concentração de 1:50 (anticorpo:solução) com a mesma solução descrita no item 5.1.

(Os anticorpos foram gentilmente cedidos pela Dra. Manjit Hanspal).

6. Subsequentes lavagens por 30 minutos com a solução basal descrita no item 4.
7. Incubação das membranas de nitrocelulose com solução basal adicionada de leite em pó desnatado (Molico) a 1% e 0,1% de Proteína A com Iodo 125 I-100 μ Ci / ml (Amersham) por 2 horas à temperatura ambiente.
8. Lavagens subsequentes por 1 hora com a solução basal descrita no item 4.
9. Exposição das membranas de nitrocelulose em filme de raio X Kodak por 3 horas (membrana tratada com anticorpo anti- β espectrina) e 6 horas (membrana tratada com anticorpo anti-Sp α I/80) a -80°C .

IV.4. Estudo Molecular

1. Extração de DNA genômico

- 1.1. Coleta de 20 ml de sangue periférico em frasco estéril, usando-se como anticoagulante EDTA, na concentração de 1,5 mg/ml (Dacie & Lewis, 1984).
- 1.2. Centrifugação da amostra a 2.000 rpm por 10 minutos para separação do plasma. Descarte do plasma.
- 1.3. Lise de hemácias com 5 vezes o seu volume em solução de 0,144M de NH_4Cl e 0,01M de NH_4HCO_3 . Repouso de 15 minutos à temperatura ambiente. Centrifugação a 2.500 rpm por 20 minutos. Remoção do sobrenadante.
- 1.4. Repetição do item 1.3. uma vez.
- 1.5. Lise de leucócitos em solução de 0,3M de NaCl, 10 mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 7M de uréia e 2% de SDS, a 37°C, por 16 horas.
- 1.6. Extração do DNA de leucócitos v/v de solução de lise/mistura de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Agitação lenta por 10 minutos. Centrifugação a 2.500 rpm, por 20 minutos. Separação da fase superior (contendo DNA) e descarte das demais. Repetir uma vez.
- 1.7. Adição v/v à fase aquosa de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1). Agitação lenta por 10 minutos. Centrifugação a 2500 rpm, por 20 minutos. Separação da fase superior e descarte das demais. Repetir uma vez.
- 1.8. Precipitação do DNA com adição de 10% do seu volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado.
- 1.9. Dissolução do DNA genômico precipitado em água destilada, desionizada e estéril.
- 1.10. Determinação da concentração de DNA através de espectrofotometria, em comprimento de onda de 260 nm.

2. Amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR)

- 2.1. Amplificação por PCR (Saiki et al., 1988) a partir de 1µg de DNA genômico com 10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM de MgCl₂, 50mM de KCl, 0,01% de gelatina, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0,1 µM de cada *primer* (iniciador) e 2,5 U de Taq DNA polimerase (BRL), completando-se a reação para 100 µl com água destilada, desionizada e estéril.
- 2.2. Após a desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos no ciclador de temperatura (DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer Cetus) a Taq DNA polimerase é adicionada e a reação é recoberta com 50 µl de óleo mineral.
- 2.3. Amplificação realizada em 40 ciclos compreendidos de desnaturação a 94°C, por 90 segundos, anelamento a 55°C, por 90 segundos e extensão a 72°C, por 120 segundos.
- 2.4. Extensão do último ciclo a 72°C, por 7 minutos.
- 2.5. Visualização do fragmento amplificado do DNA genômico, através de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e iluminado com luz ultravioleta.

3. Sequenciamento do DNA

- 3.1. Purificação do DNA.
 - 3.1.1. Diluição de aproximadamente 200 fmol de DNA amplificado pela técnica da PCR, para um volume total de 20µl com água destilada, desionizada e estéril.
 - 3.1.2. Adição de 20µl de acetato de amônio 4M e 160µl de isopropanol. Repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente. Centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos.
 - 3.1.3. Descarte do sobrenadante e lavagem do precipitado em 160µl de etanol 70%. Centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos.
 - 3.1.4. Descarte do sobrenadante e dissolução do precipitado em 20µl de solução contendo Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 0,1mM.

TABELA 6: *Primers* utilizados para amplificação dos *exons* 4 e 6 da cadeia alfa da espectrina e para sequenciamento do *exon* 6 da cadeia alfa da espectrina.

<i>EXONS</i>	<i>SEQÜÊNCIAS (5' - 3')</i>
<i>Sense:</i>	GAG GAT CCC TGC TCC CAG TGT CTG
4	
<i>Antisense:</i>	CTG AAT TGG GAC AGA GGA GTG GGA GGC
<i>Sense:</i>	CTC ATC TCT GTA TAA CTC CAG
6	
<i>Antisense:</i>	AGA GCC TAA TAC AAA GAC*
* utilizado também na reação de sequenciamento	

3.2. Marcação do *primer*

3.2.1. Marcação de um dos *primers* utilizados na reação da PCR, usando-se 1 pmol do *primer* marcado com 2 pmol de [γ - ^{32}P] ATP 10 mCi/ml, 5000 Ci/mmol (Amersham), 60mM Tris-HCl (pH 7,8), 10mM MgCl_2 , 0,2M KCl, 1U de T4 polinucleotídeo kinase obtendo-se um volume de 5 μl , completando, se necessário, com água destilada desionizada e estéril.

3.2.2. Incubação da reação por 30 minutos a 37°C. Reincubação por 5 minutos a 55°C. Conservação da reação em gelo.

3.2.3. Aos 5 μl do *primer* marcado adicionar 37,5 mM Tris-HCl (pH 9,0), 6,25 mM MgCl_2 , 37,5 mM KCl; 50 fmol do DNA purificado e 2,5 U de Taq DNA polimerase, completando-se a reação para 36 μl com água destilada, desionizada e estéril.

3.2.4. Separação de 8µl da reação total em 4 tubos e adição de 2µl de uma mistura de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) e o didesoxinucleotídeo específico para uma concentração final de:

Tubo 1: 0,4 mM ddATP e 20µM de cada dATP, dCTP, dTTP e 7-deaza-dGTP.

Tubo 2: 0,2 mM ddCTP e 20µM de cada dATP, dCTP, dTTP e 7-deaza-dGTP.

Tubo 3: 0,4 mM ddTTP e 20µM de cada dATP, dCTP, dTTP e 7-deaza-dGTP.

Tubo 4: 0,04 mM ddGTP e 20µM de cada dATP, dCTP, dTTP e 7-deaza-dGTP.

3.2.5. Adição de 10µl de óleo mineral sobre os 10µl de cada reação, e incubação em ciclador de temperatura Perkin-Elmer Cetus, através de 20 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 70°C por 60 segundos seguidos por 10 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos e extensão a 70°C por 60 segundos.

3.2.6. Interrupção da reação com adição de 5µl de solução de formamida 95%, 10mM EDTA pH 8,0, 0,1% de azul de bromofenol e 0,1% de xileno cianol (obtendo-se uma concentração final de 31,7% de formamida, 3,33mM EDTA pH 8,0, 0,03% de azul de bromofenol e 0,03% de xileno cianol).

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.3.1. Separação dos didesoxinucleotídeos marcados radioativamente através de gel de poliacrilamida 6%, tris-base 45mM, ácido bórico 45mM, EDTA 1mM pH 8,0 uréia 7M, 3,5mM persulfato de amônio e 0,05% de TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine) em placas 40×34 cm e 0,4 mm de espessura, preenchido com tampão de corrida tris-base 45mM, ácido bórico 45mM, EDTA 1mM pH 8,0 em aparato GIBCO-BRL modelo S2 e submetido à tensão de 1800V por 3 horas em fonte Bio-Rad modelo 3000 Xi.

3.3.2. Secagem do gel à 80°C por 30 minutos em aparelho Bio-Rad modelo 583.

3.3.3. Exposição do gel seco em filme raio X Kodak, por 24 horas, à temperatura ambiente.

4. Pesquisa de heteroduplex.

Para pesquisa de heteroduplex, o *exon* 4 foi amplificado por PCR segundo item IV.4.2. O produto de amplificação foi desnaturado a 95°C por 5 minutos e 65°C por 2 minutos e aplicado em gel de poliacrilamida 7%. Os fragmentos foram então visualizados por reação com brometo de etídio.

V. RESULTADOS

V.1. Eliptocitose Hereditária

Caso 1:

Entre os membros da família do paciente 1 (WCM), sua mãe e um irmão eram assintomáticos mas apresentavam freqüentes eliptócitos no esfregaço de sangue periférico. Os dados hematológicos do paciente e seus familiares encontram-se na tabela 7.

A análise quantitativa das proteínas da membrana eritrocitária do paciente e 2 familiares foi normal (tabela 8 e figura 11). Porém o paciente apresentou aumento dos dímeros de espectrina como pode ser visto na tabela 9 (figura 12-A). A digestão pela tripsina demonstrou o aparecimento de um fragmento anormal de 50-46 kDa em substituição ao fragmento de 80 kDa normal, correspondente ao domínio I da cadeia alfa da espectrina (figura 12-B, tabela 9).

Conclusão: Sp $\alpha^{I/50-46}$

TABELA 7: Dados hematológicos do paciente e seus familiares

	Hb (g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos
Paciente (WCM)	14,1	1,1	++++
Pai (JCM)	14,4	1,4	Ø
Mãe (RM)	13,2	1,0	++
Irmão 1 (FM)	14,4	1,0	++
Irmão 2 (JCMJ)	13,8	0,9	Ø
Irmã (MM)	13,1	1,1	Ø

TABELA 8: Estudo quantitativo das proteínas da membrana eritrocitária

	sp/b3	2.1/b3	4.1+4.2/b3	4.1/4.2
Paciente (WCM)	1,07±0,08	0,20±0,03	0,36±0,01	0,98±0,13
Pai (JCM)	0,97	0,19	0,38	0,88
Irmão 2 (JCMJ)	0,93	0,20	0,35	0,98
Controle	1,00±0,1	0,20±0,01	0,37±0,01	1,01±0,01

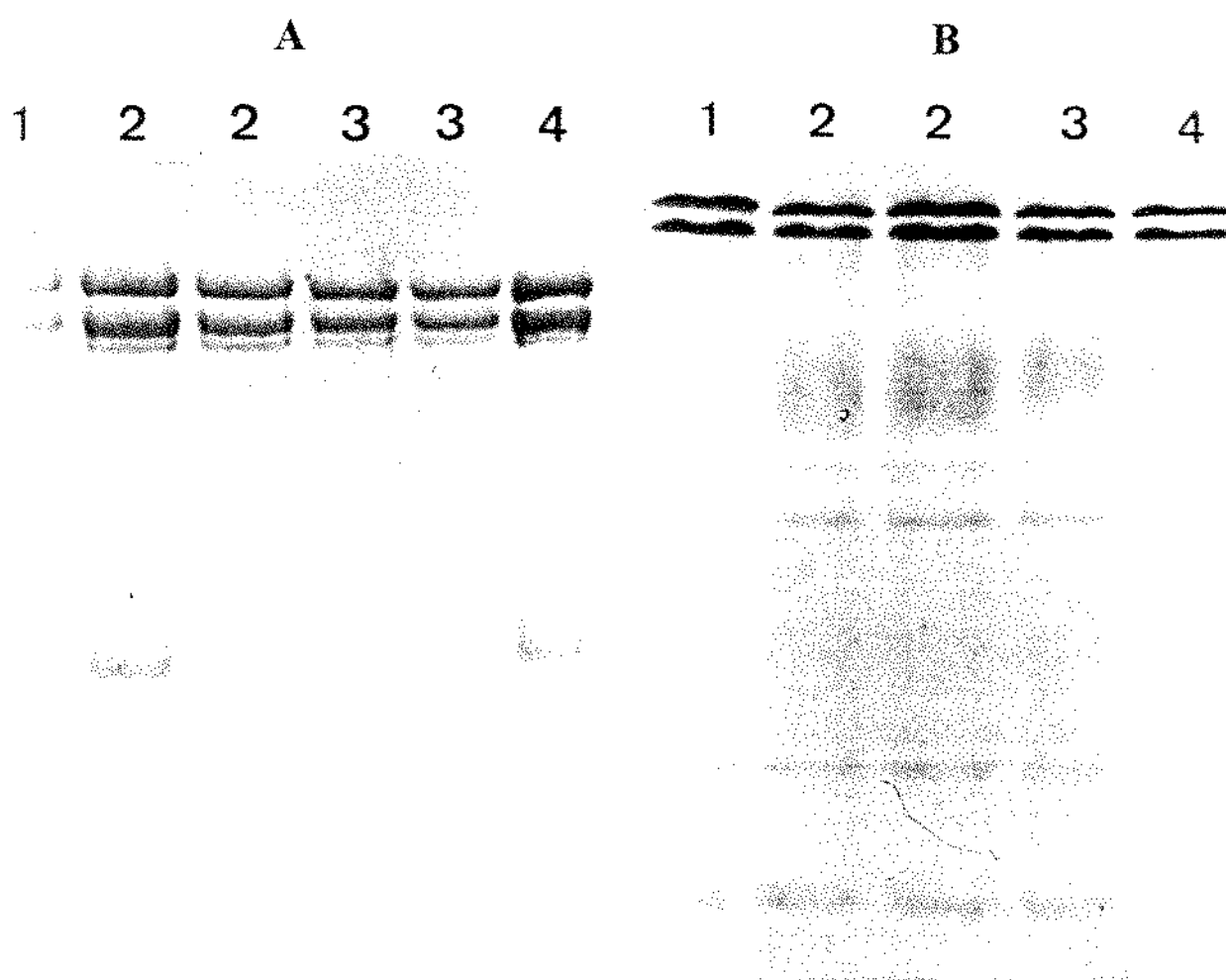


FIGURA 11: (A) SDS-PAGE = Sistema Fairbanks 3,5 - 17%. (B) SDS-PAGE = Sistema Laemmli 12%. 1= controle, 2 = paciente, 3 = irmão 2 do paciente e 4 = pai do paciente. Note que não houve alteração em A e B.

TABELA 9: Estudo quantitativo de heterodímeros de espectrina e digestão triptica da espectrina.

	Dímeros de espectrina (%)	Digestão pela tripsina
Paciente	33,3±2,7	α I/50-46/ α I/80
Pai	12,7	normal
Irmão 2	4,4	normal
Controle	13,7±1,1	

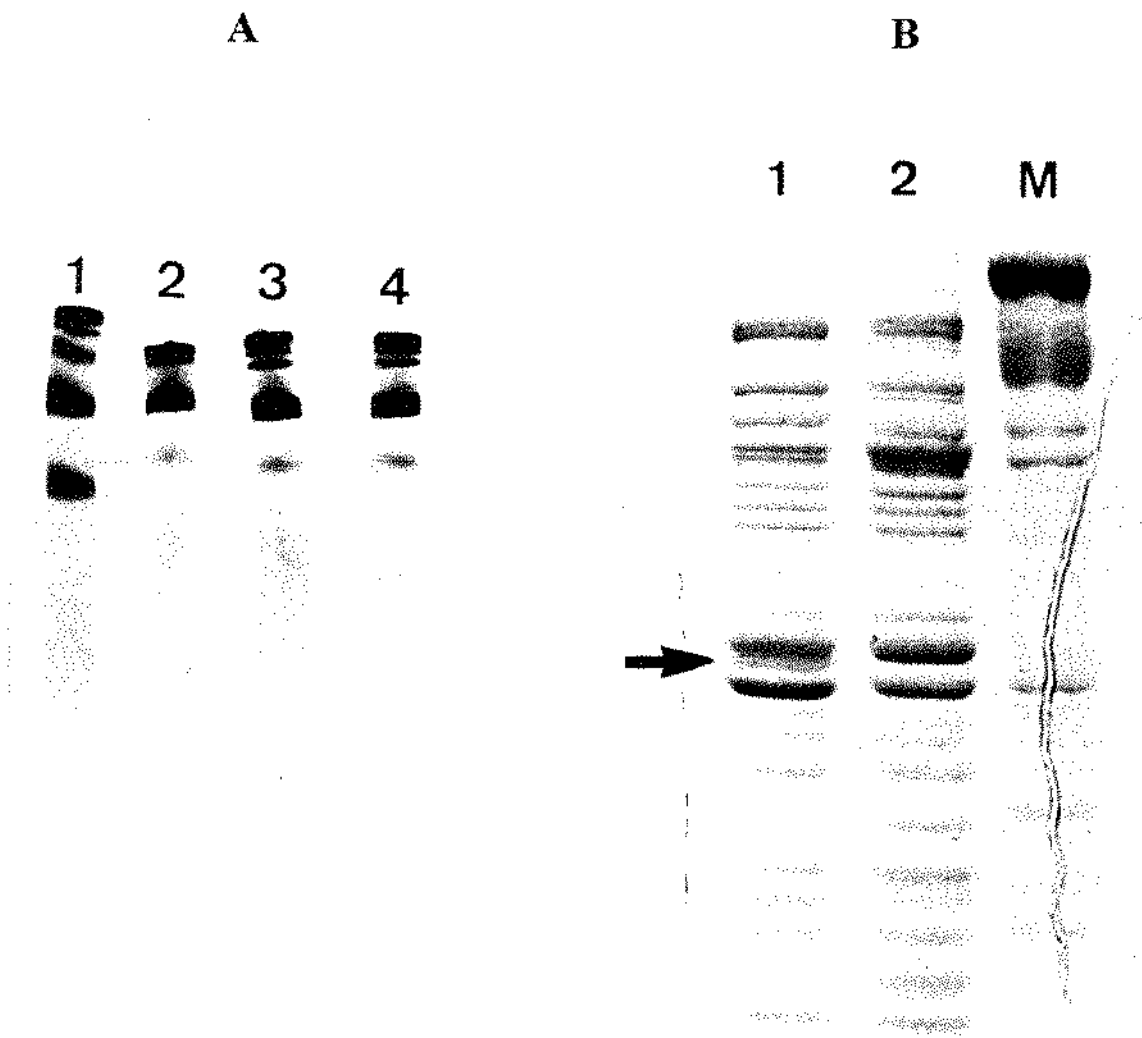


FIGURA 12: (A) Eletroforese em gel não-desnaturante. (B) SDS-PAGE = Sistema Laemmli 10%. Digestão triptica da espectrina 1 = paciente, 2 = controle, 3 = pai do paciente, 4 = irmão do paciente e M = marcador. Note que o paciente apresentou maior quantidade de dímeros de espectrina que o controle, porém seu pai e irmão apresentaram dímeros normais. O aumento de dímeros de espectrina no paciente, foi decorrente do aparecimento de um novo fragmento de 46 - 50kDa em substituição ao fragmento normal de 80kDa, correspondente ao domínio I da cadeia alfa da espectrina (seta).

Caso 2:

A paciente 2 (BAP) apresentava considerável quantidade de eliptócitos no esfregaço de sangue periférico, conforme pode ser visto na tabela 10.

A análise densitométrica das proteínas de membrana da hemácia em SDS-PAGE foi normal (tabela 11, figura 13) também não houve alteração quantitativa de heterodímeros de espectrina e a digestão trípica da espectrina apresentou-se normal de acordo com a figura 14 e tabela 12. Sendo assim, nesta paciente não foi identificado o defeito proteico que conduziu à EIH.

Conclusão: Não foi identificado o defeito proteico.

TABELA 10: Dados hematológicos da paciente 2:

	Hb (g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos
Paciente (BAP)	12,0	1,5	++

TABELA 11: Estudo quantitativo das proteínas da membrana eritrocitária

	sp/b3	2.1/b3	4.1+4.2/b3	4.1/4.2
Paciente	0,88±0,04	0,24±0,01	0,42±0,03	1,13±0,05
Controle	0,95±0,01	0,24±0,01	0,38±0,02	0,94±0,06

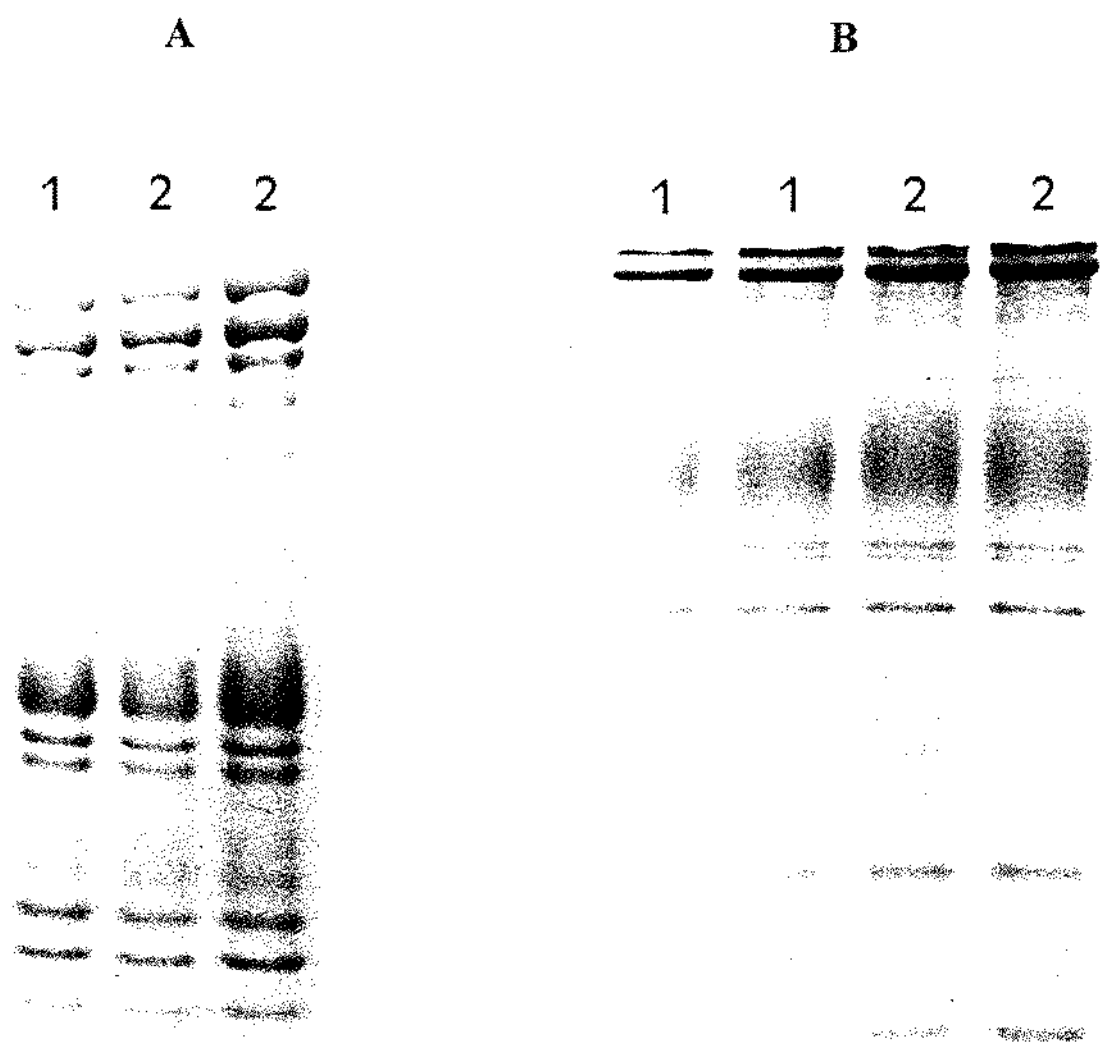


FIGURA 13: (A) SDS-PAGE: Sistema Fairbanks 3,5 - 17%. (B) SDS-PAGE: Sistema Laemmli 12%. 1 = paciente e 2 = controle. Note que não houve alteração em A e B.

TABELA 12: Estudo quantitativo de heterodímeros de espectrina e digestão triptica da espectrina.

	Dímeros de espectrina (%)	Digestão pela tripsina
Paciente	$8,9 \pm 1,9$	normal
Controle	$9,7 \pm 1,9$	

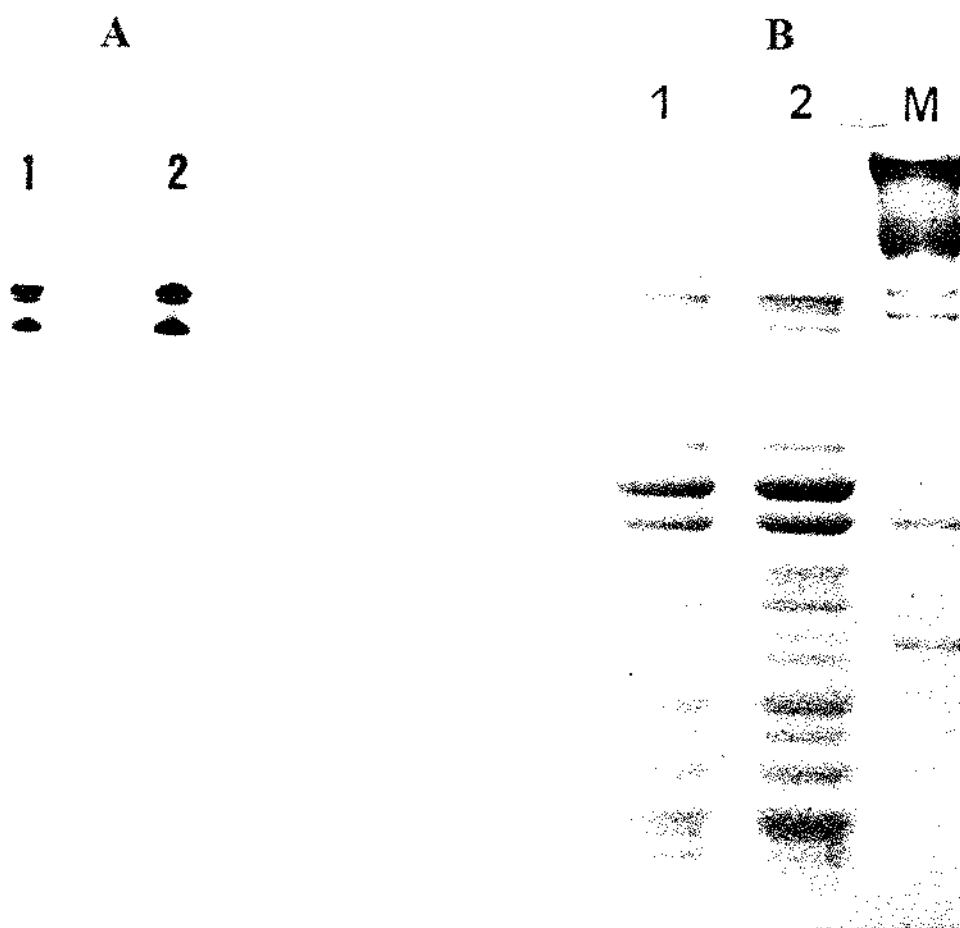


FIGURA 14: (A) Eletroforese em gel não-desnaturante. (B) SDS-PAGE = Sistema Laemmli 10%. Digestão triptica da espectrina. 1 = paciente e 2 = controle. Não houve alteração quantitativa de dímeros de espectrina, bem como qualitativa na digestão triptica da espectrina.

Caso 3:

A paciente 3 (RAN), assim como seu pai e 2 irmãs apresentaram eliptócitos no esfregaço de sangue periférico. Os dados hematológicos da paciente e membros de sua família podem ser observados na tabela 13. A quantificação densitométrica das proteínas da membrana eritrocitária fracionadas em SDS-PAGE foi normal (figura 15 e tabela 14). No entanto, verificou-se um leve aumento de dímeros de espectrina de acordo com a tabela 15 e figura 16-A. A digestão da espectrina pela tripsina demonstrou um fragmento de 65kDa em substituição ao fragmento de 80kDa que se apresentava quantitativamente diminuído conforme visto na figura 16-B.

A amplificação por PCR do *exon 4* da α -sp utilizando-se os *primers* descritos na tabela 6 originou um fragmento de 254 pares de base, conforme figura 17-A. Com o produto amplificado, realizou-se a pesquisa de heteroduplex, aplicando-se o produto em gel de poliacrilamida em repetição: sem desnaturação prévia e com desnaturação prévia à 95°C por 5 minutos e 65°C por 2 minutos. Observou-se o aparecimento de uma banda com migração retardada no propósito, em seu pai e em suas duas irmãs, segundo a figura 17-B.

Conclusão: Sp α 1/65

TABELA 13: Dados hematológicos da paciente 3 e de seus familiares.

	Hb (g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos
Paciente (RAN)	10,3	2,5	++++
Pai (GCN)	14,1	1,5	+++
Mãe (MCN)	12,9	1,4	Ø
Irmão (JAN)	14,8	1,4	Ø
Irmã 1 (RCN)	12,7	1,2	++++
Irmã 2 (LN)	11,4	1,8	++++

TABELA 14: Estudo quantitativo das proteínas da membrana eritrocitária.

	sp/b3	2.1/b3	4.1+4.2/b3	4.1/4.2
Paciente (RAN)	1,05	0,22	0,28	1,20
Controle	0,91	0,18	0,28	1,15

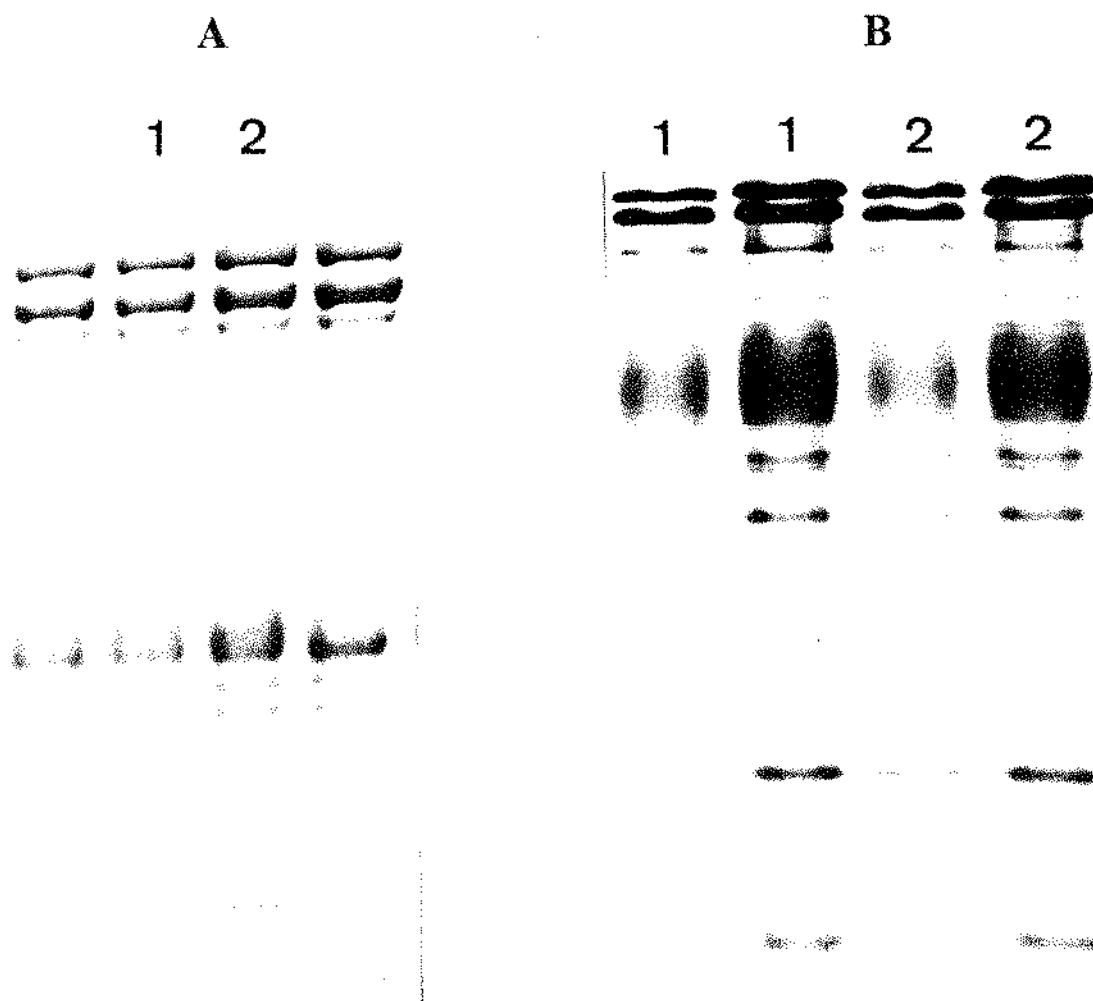


FIGURA 15: (A) SDS-PAGE = Sistemas Fairbanks 3,5 - 17%. (B) SDS-PAGE = Sistemas Laemmli 12%. 1 = paciente e 2 = controle. Observe que não houve alteração em A e B.

TABELA 15: Estudo quantitativo de heterodímeros de espectrina e digestão triptica da espectrina.

	Dímeros de espectrina (%)	Digestão pela tripsina
Paciente	16,2±0,9	$\alpha I/65/\alpha I/80$
Controle	8,0±1,9	

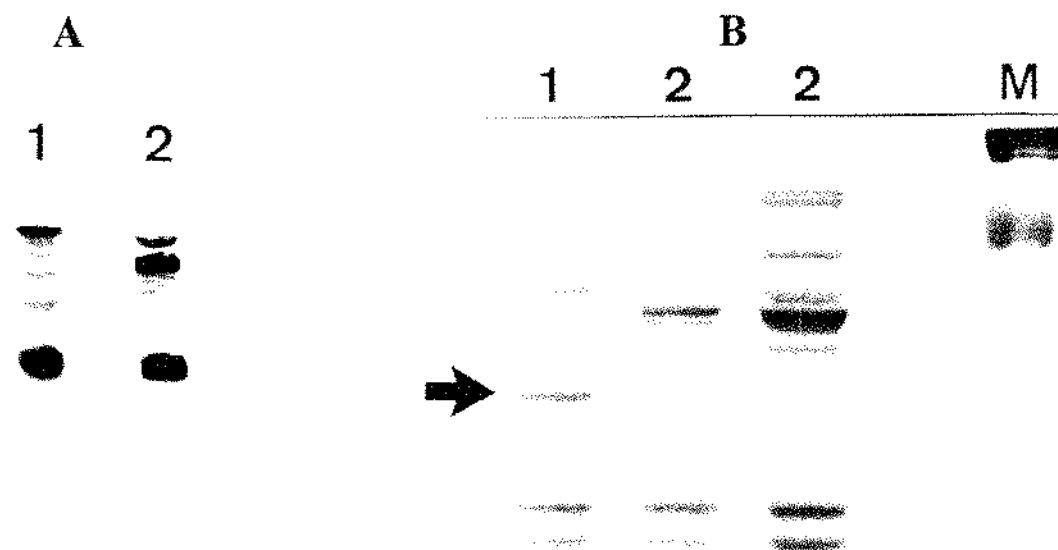
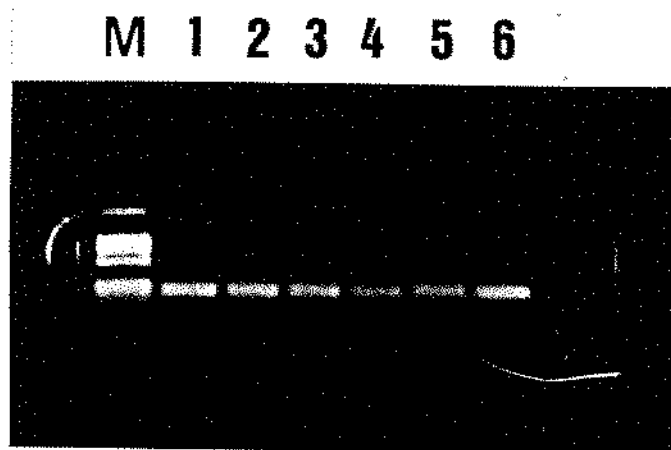


FIGURA 16: (A) Eletroforese em gel não-desnaturante. (B) SDS-PAGE = Sistema Laemmli 10%. Digestão triptica da espectrina. 1 = paciente, 2 = controle e M= marcador. Observe que ocorreu um leve aumento de heterodímeros de espectrina na paciente em relação ao controle, sendo o aumento de dímeros devido à substituição do fragmento de 80kDa, que se apresenta quantitativamente diminuído, pelo fragmento de 65kDa.

A



B

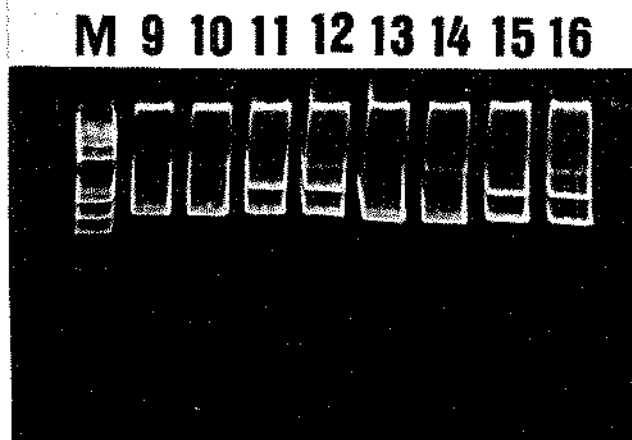
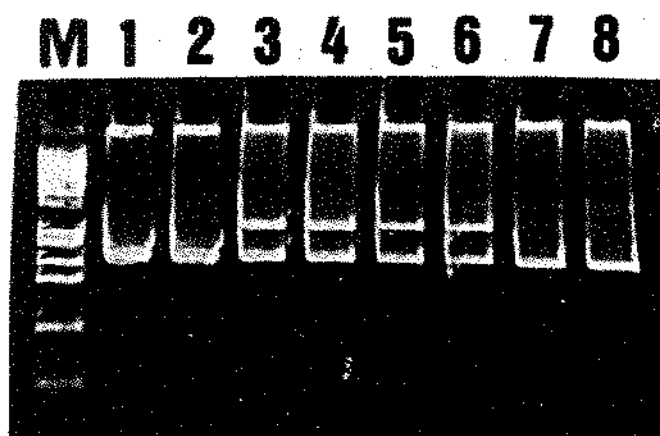


FIGURA 17 : (A) Amplificação pela técnica da PCR do *exon* 4 da cadeia alfa da espectrina.

M = marcador $\varnothing$ x 174; 1 = paciente (RAN); 2 = irmã 1; 3 = irmão; 4 = pai;

5 = mãe e 6 = irmã 2. (B) Pesquisa de heteroduplex: M = marcador $\varnothing$ x 174.

Produto da amplificação do *exon* 4 da α -sp sem desnaturação prévia e com desnaturação prévia à 95°C por 5 minutos e 65°C por 2 minutos,

respectivamente: 1 e 2: Controle negativo; 3 e 4: Paciente; 5 e 6: Irmã 1;

7 e 8: Irmão; 9 e 10: Controle negativo; 11 e 12: Pai; 13 e 14: Mãe; 15 e 16:

Irmã 2.

Caso 4:

O estudo da paciente 4 (OSM) e seus familiares demonstrou que apenas o propósito apresentava eliptócitos no esfregaço de sangue periférico conforme tabela 16.

A densitometria das proteínas da membrana eritrocitária fracionadas em SDS-PAGE não demonstrou alteração (tabela 17 e figura 18). A quantificação de heterodímeros e a digestão trípica da espectrina também foram normais (figura 19 e tabela 18).

Conclusão: Não foi identificado o defeito proteico.

TABELA 16: Dados hematológicos da paciente 4 e seus familiares.

	Hb (g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos
Paciente (OSM)	10,6	1,6	++
Irmão 1 (JSM)	13,3	-	Ø
Irmão 2 (JS)	13,9	-	Ø
Filho 1 (MM)	15,4	-	Ø
Filho 2 (RM)	16,1	-	Ø
Filha (FM)	12,4	-	Ø
Neta (AM)	12,4	0,4	Ø

TABELA 17: Estudo quantitativo das proteínas da membrana eritrocitária

	sp/b3	2.1/b3	4.1+4.2/b3	4.1/4.2
Paciente (OSM)	$1,04 \pm 0,15$	$0,21 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,02$	$1,04 \pm 0,17$
Controle	$1,02 \pm 0,12$	$0,21 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,02$	$1,08 \pm 0,07$

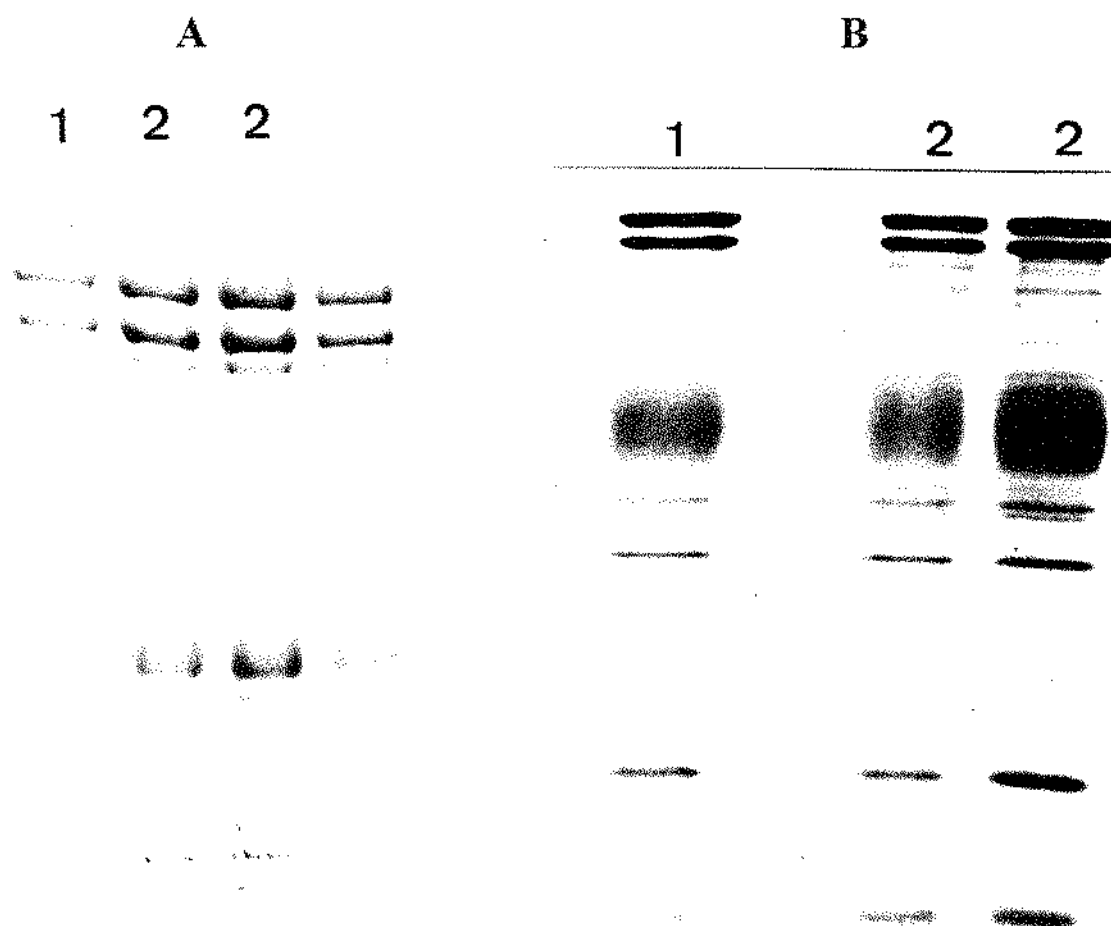


FIGURA 18: (A) SDS-PAGE = Sistema Fairbanks 3,5-17%. (B) SDS-PAGE = Sistema Laemmli 12%. 1 = paciente e 2 = controle. Note que não houve alteração em A e B.

TABELA 18: Estudo quantitativo de heterodímeros de espectrina e digestão triptica da espectrina.

	Dímeros de Espectrina (%)	Digestão pela Tripsina
Paciente	12,2±0,6	Normal
Controle	11,5±1,1	

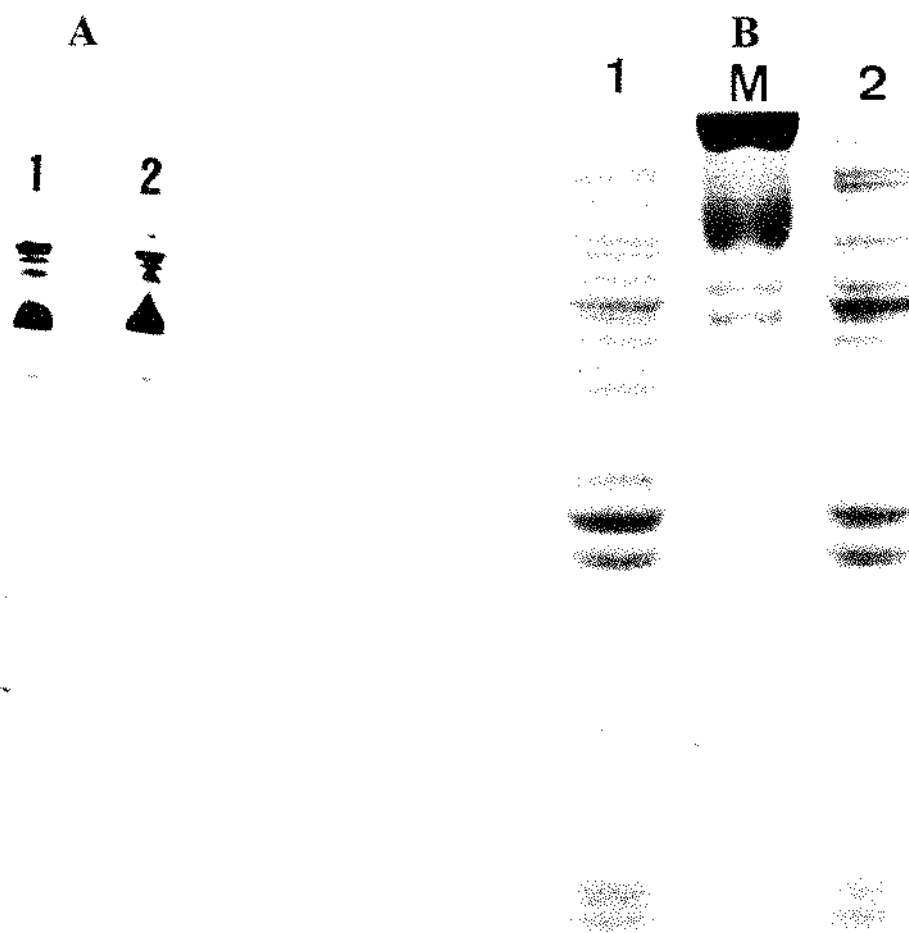


FIGURA 19: (A) Eletroforese em gel não-desnaturante. (B) SDS-PAGE = Sistema Laemmli 10%. Digestão triptica da espectrina. M = marcador, 1 = paciente e 2 = controle. Não houve alteração quantitativa de dímeros de espectrina, assim como qualitativa na digestão da espectrina pela tripsina.

Caso 5:

O caso índice 5 (BDF) apresentava eliptócitos em grande quantidade na análise do esfregaço de sangue periférico, conforme identificado na tabela 19.

O estudo quantitativo das proteínas totais da membrana eritrocitária por SDS-PAGE, demonstrou deficiência de proteínas 4.1 (tabelas 20 e 21, figuras 20 e 21).

O estudo de heterodímeros de espectrina e digestão da espectrina pela tripsina, foram normais (figura 22, tabela 22).

Conclusão: deficiência de proteína 4.1

TABELA 19: Dados hematológicos da paciente.

	Hb (g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos
Paciente (BDF)	14,3	2,0	+++

TABELA 20: Estudo quantitativo das proteínas da membrana eritrocitária pelo Sistema Fairbanks 3,5 - 17%.

	sp/b3	2.1/b3	4.1+4.2/b3	4.1/4.2
Paciente	0,95±0,05	0,23	0,25	0,71±0,02
Controle	1,03±0,12	0,19±0,01	0,29±0,01	1,18±0,02

TABELA 21: Estudo quantitativo das proteínas 4.1 e 4.2 através da análise densitométrica do Sistema Laemmli 12%.

	4.1/4.2
Paciente	0,76
Controle	0,95

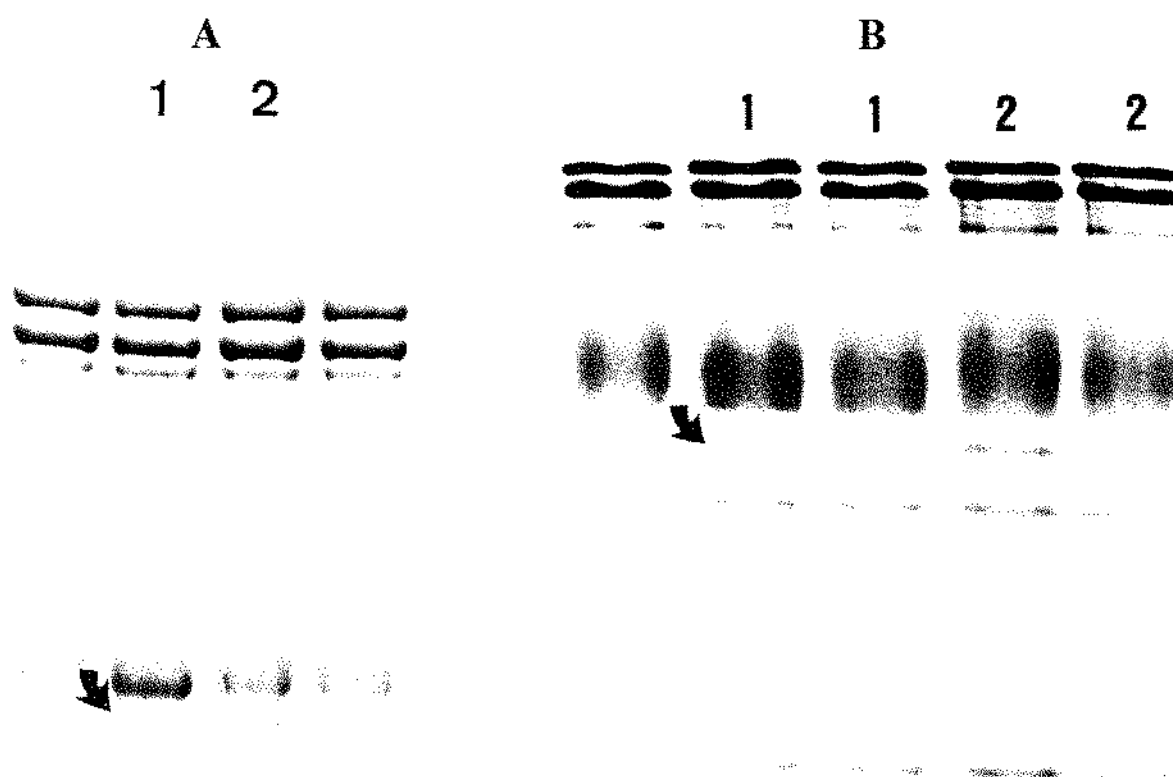


FIGURA 20: (A) SDS-PAGE = Sistema Fairbanks 3,5 - 17%. (B) SDS-PAGE = Sistema Laemmli 12%. 1 = paciente e 2 = controle. Note que em A e B, a proteína 4.1 encontra-se quantitativamente diminuída na paciente quando comparada com o controle.

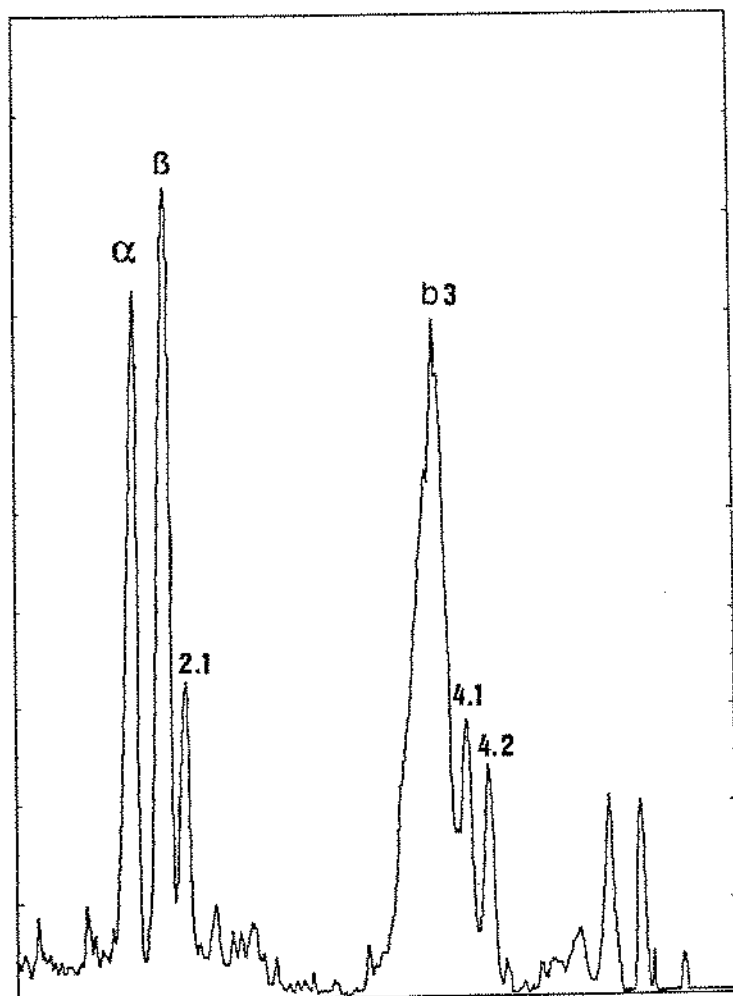
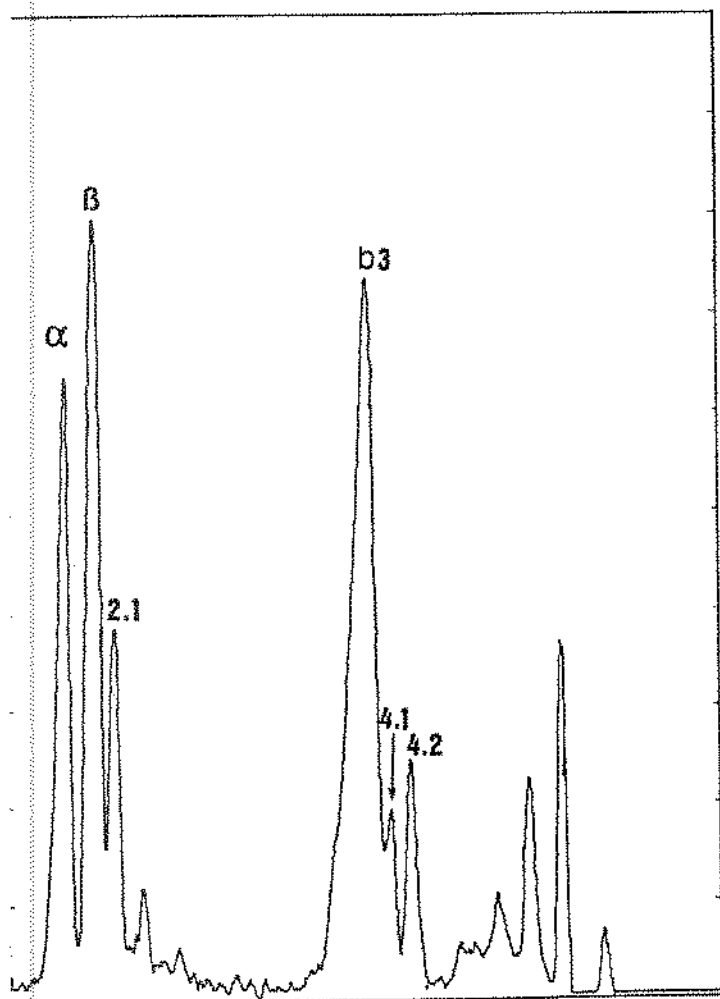
A**B**

FIGURA 21: Densitometria através do Sistema Fairbanks (3,5 - 17%) da paciente (A) e do controle (B), demonstrando deficiência de proteína 4.1 na paciente (A).

TABELA 22: Estudo quantitativo de heterodímeros de espectrina e digestão triptica da espectrina.

	Dímeros de Espectrina (%)	Digestão pela Tripsina
Paciente	10,4	Normal
Controle	5,5	

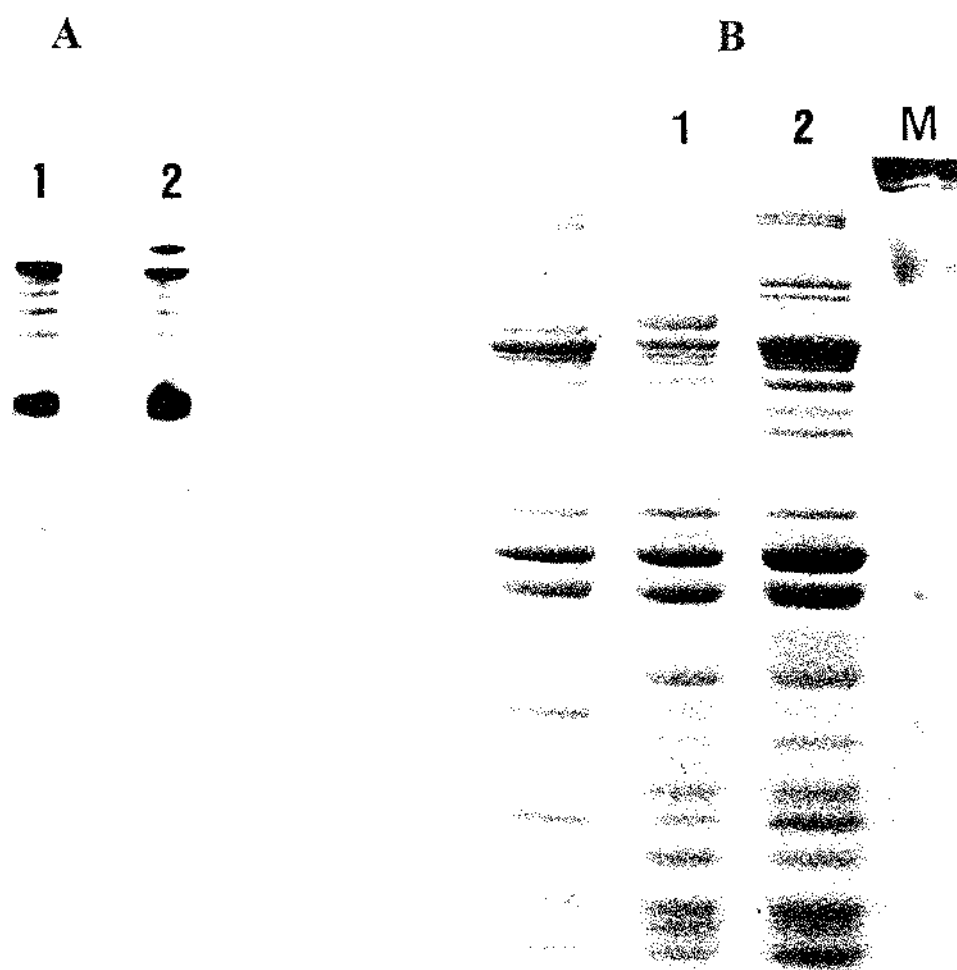


FIGURA 22: (A) Eletroforese em gel não-desnaturante. (B) SDS-PAGE = Sistema Laemmli 10%. Digestão triptica da espectrina. M = marcador. 1 = paciente e 2= controle. Note que não houve alteração em A e B.

Caso 6:

O esfregaço de sangue periférico demonstrou grande número de eliptócitos na paciente 6 (MJSL). Os dados hematológicos da paciente e familiares encontram-se descritos na tabela 23.

A análise quantitativa das proteínas totais da membrana eritrocitária da paciente foi normal (tabela 24 e figura 23). Por sua vez, o estudo de heterodímeros de espectrina da paciente, demonstrou aumento de dímeros e a digestão da espectrina pela tripsina evidenciou a substituição do fragmento normal de 80kDa correspondente ao domínio I da cadeia alfa da espectrina, por um fragmento de 50-46 kDa, conforme pode ser observado na figura 24 e tabela 25.

Utilizando-se a técnica da PCR, amplificou-se o *exon* 6 da cadeia alfa da espectrina usando-se os *primers* descritos na tabela 6, obtendo-se um fragmento de 247 pares de base, o qual foi sequenciado com o *primer antisense*. Constatou-se uma mutação CTG → CCG em um alelo no *codon* 260, responsável pela permuta do aminoácido leucina pela prolina, como se verifica na figura 25.

Conclusão: Sp $\alpha^{I/50-46}$ devido mçutação de ponto CTG → CCG (leucina → prolina).

TABELA 23: Dados hematológicos da paciente e seus familiares.

	Hb (g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos
Paciente (MJSL)	11,2	4,4	++++
Marido	13,6	-	Ø
Filha (APSL)	13,5	1,5	Ø

TABELA 24: Estudo quantitativo das proteínas da membrana eritrocitária.

	sp/b3	2.1/b3	4.1+4.2/b3	4.1/4.2
Paciente	1,02±0,06	0,22±0,03	0,35±0,03	0,97±0,03
Controle dia	1,05±0,05	0,20±0,02	0,35±0,02	0,99±0,01

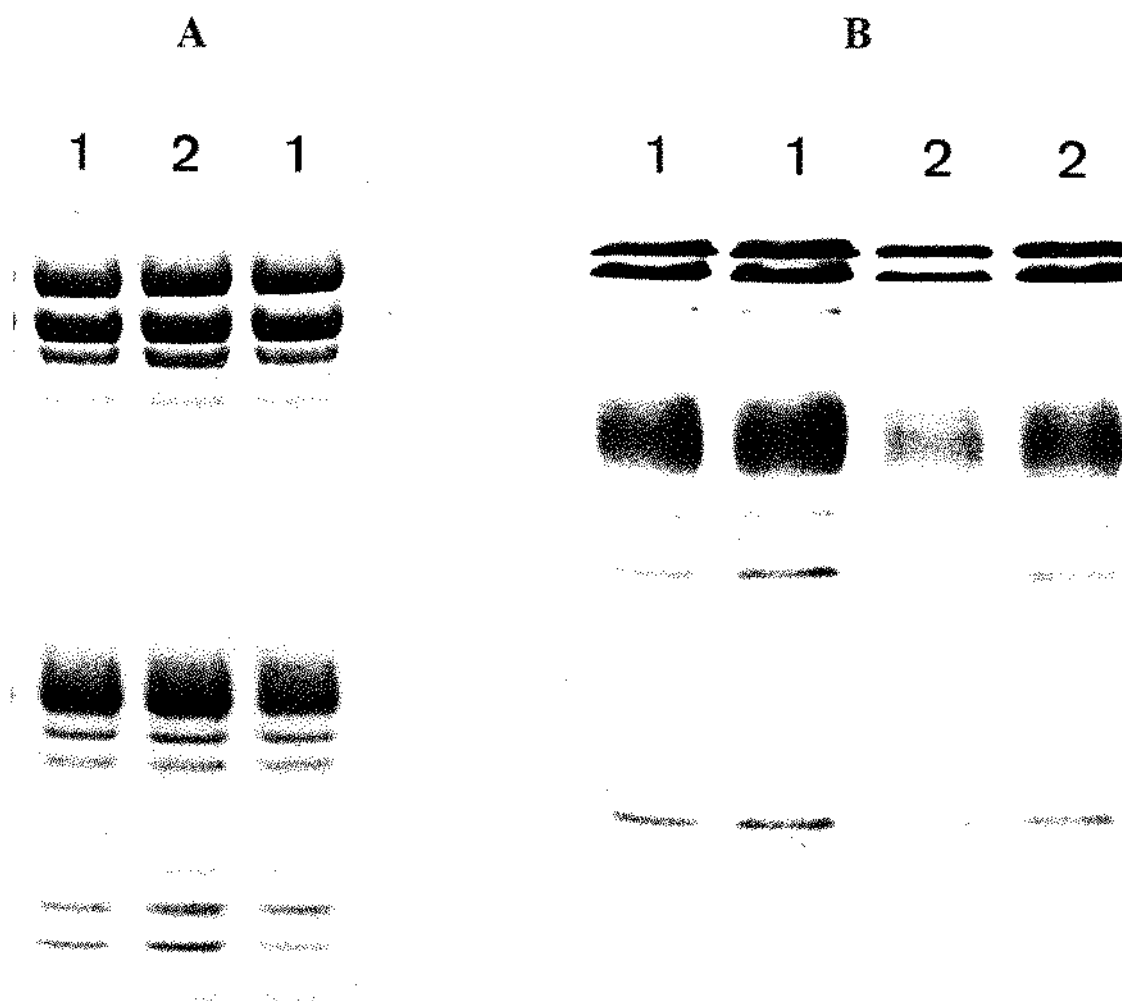


FIGURA 23: (A) SDS-PAGE = Sistema Fairbanks 3,5-17%. (B) SDS-PAGE = Sistema Laemmli 12%. 1 = controle e 2 = paciente. Note que não ocorreu qualquer alteração em A e B.

TABELA 25: Estudo quantitativo de heterodímeros de espectrina e digestão triptica da espectrina.

	Dímeros de Espectrina (%)	Digestão pela Tripsina
Paciente	29,3±0,3	α I/50-46/ α I/80
Controle	8,3±0,2	

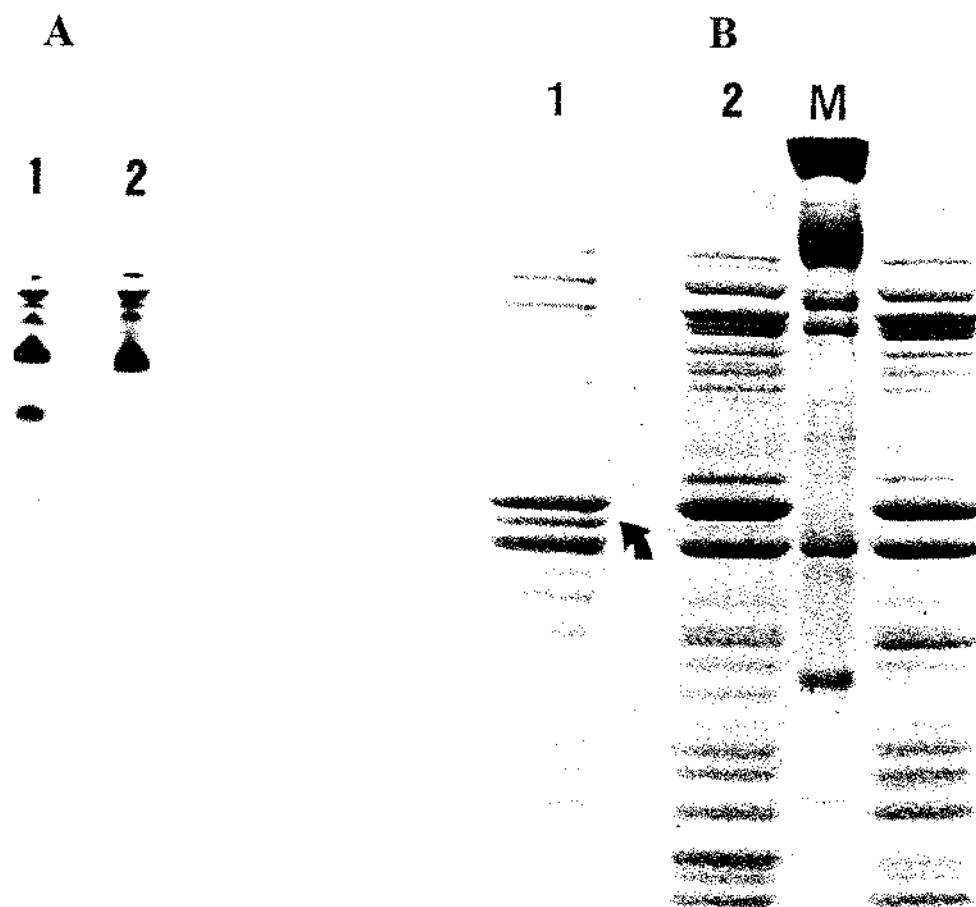


FIGURA 24: (A) Eletroforese em gel não-desnaturante. (B) SDS-PAGE = Sistema Laemmli 10%. Digestão triptica da espectrina. 1 = paciente, 2 = controle e M= marcador. Note o aumento de dímeros na paciente em A e o aparecimento de um novo fragmento de 50-46 kDa, o que provocou a diminuição quantitativa do fragmento de 80 kDa em B.

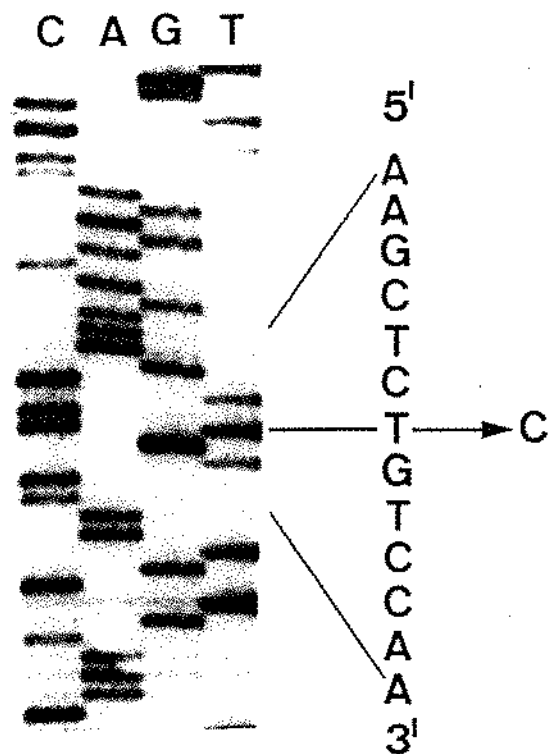


FIGURA 25: Sequenciamento do DNA genômico do *exon* 6 da cadeia alfa da espectrina, demonstrando uma mutação de ponto: CTG → CCG em um alelo do *codon* 260 (leucina → prolina).

Caso 7:

A paciente 7 (CARP) e seus dois filhos apresentavam grande quantidade de eliptócitos no esfregaço de sangue periférico. Os dados hematológicos da paciente e seus familiares encontram-se na tabela 26.

O estudo quantitativo das proteínas totais da membrana da hemácia demonstrou deficiência de proteína 4.1 na paciente e nos dois filhos (tabelas 27 e 28, figuras 26, 27 e 28).

O estudo de heterodímeros de espectrina e sua digestão pela tripsina apresentaram-se normais (figura 29 e tabela 29).

Conclusão: Deficiência de proteína 4.1.

TABELA 26: Dados hematológicos da paciente e seus familiares.

	Hb (g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos
Paciente (CARP)	11,1	1,3	++++
Marido (JRP)	13,0	1,3	Ø
Filho (FP)	12,1	1,9	+++
Filha (FP)	11,4	2,5	+++

TABELA 27: Estudo quantitativo das proteínas da membrana eritrocitária na paciente e seus familiares pelo Sistema Fairbanks 3,5-17%.

	sp/b3	2.1/b3	4.1+4.2/b3	4.1/4.2
Paciente	0,90±0,01	0,22±0,02	0,29±0,01	0,56±0,04
Marido	1,10±0,03	0,23±0,01	0,36±0,01	0,85±0,01
Controle	1,02±0,01	0,25±0,01	0,36±0,03	0,98±0,05
Filho	0,95	0,25	0,29	0,61
Filha	1,01	0,23	0,29	0,72
Controle	0,96	0,23	0,35	0,91

TABELA 28: Estudo quantitativo das proteínas 4.1 e 4.2 através da análise densitométrica do Sistema Laemmli 12%.

	4.1/4.2
Paciente	0,51
Marido	0,88
Controle	0,80
Filho	0,58
Filha	0,58
Controle	0,88±0,04

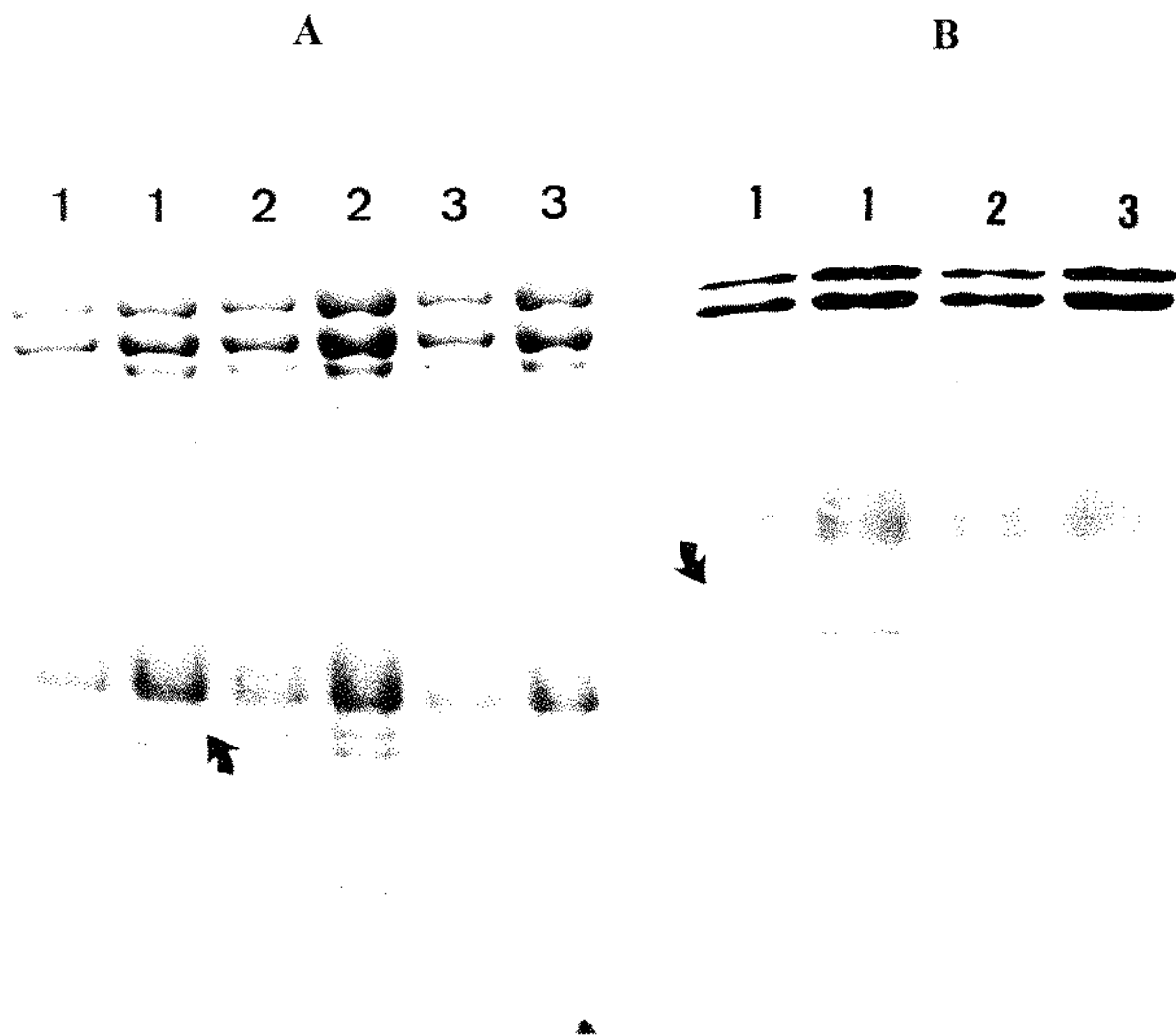


FIGURA 26: (A) SDS-PAGE: Sistema Fairbanks 3,5-17%. (B) SDS-PAGE: Sistema Laemmli 12%. 1 = paciente, 2 = marido da paciente e 3 = controle. Note diminuição quantitativa da proteína 4.1 na paciente estudada através dos 2 sistemas (A e B).

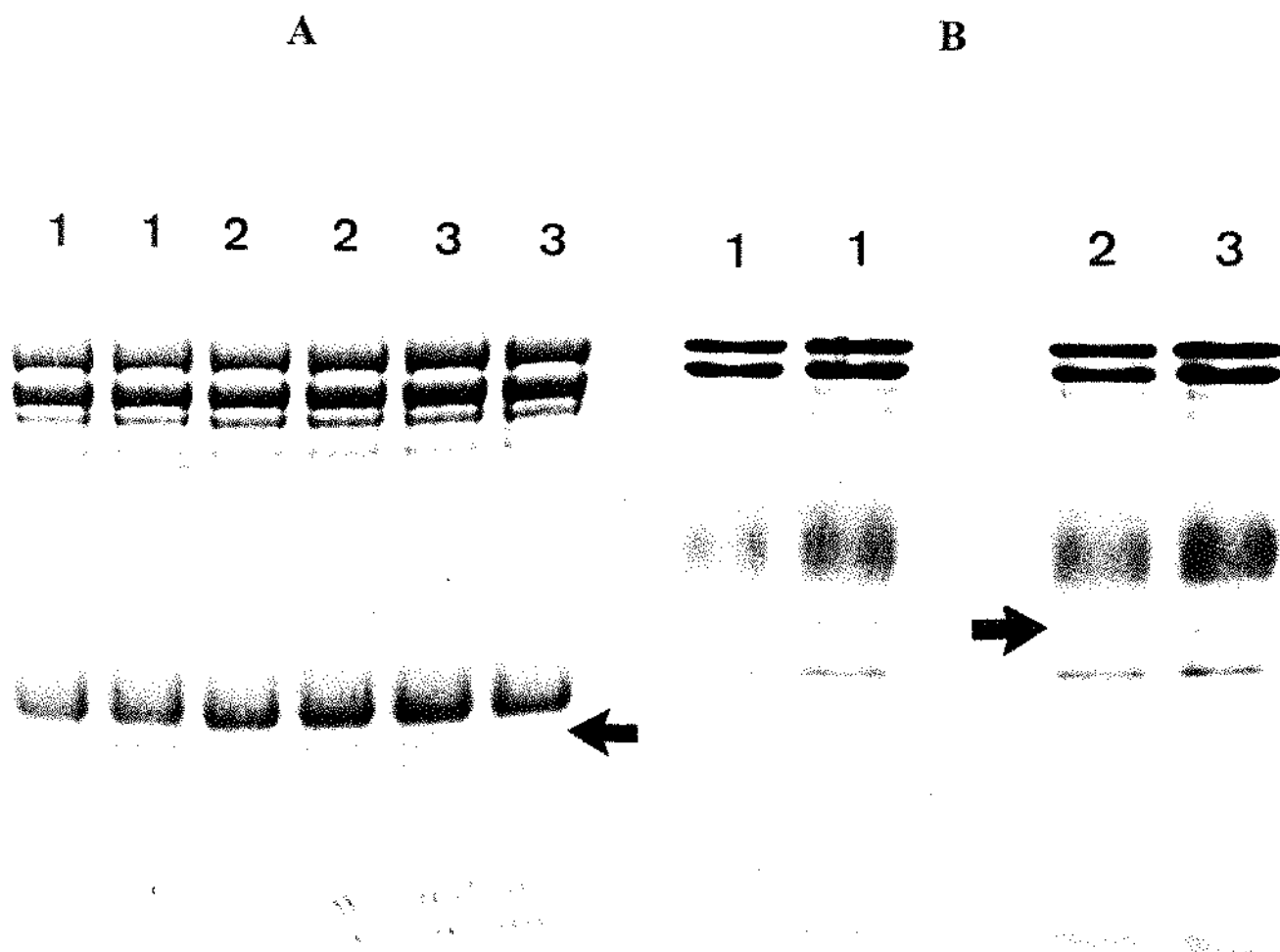


FIGURA 27: (A) SDS-PAGE: Sistema Fairbanks 3,5-17%. (B) SDS-PAGE: Sistema Laemmli 12%. 1 = controle, 2 = filho da paciente e 3 = filha da paciente. Observe diminuição quantitativa da proteína 4.1 em ambos os filhos da paciente, quando comparados com o controle.

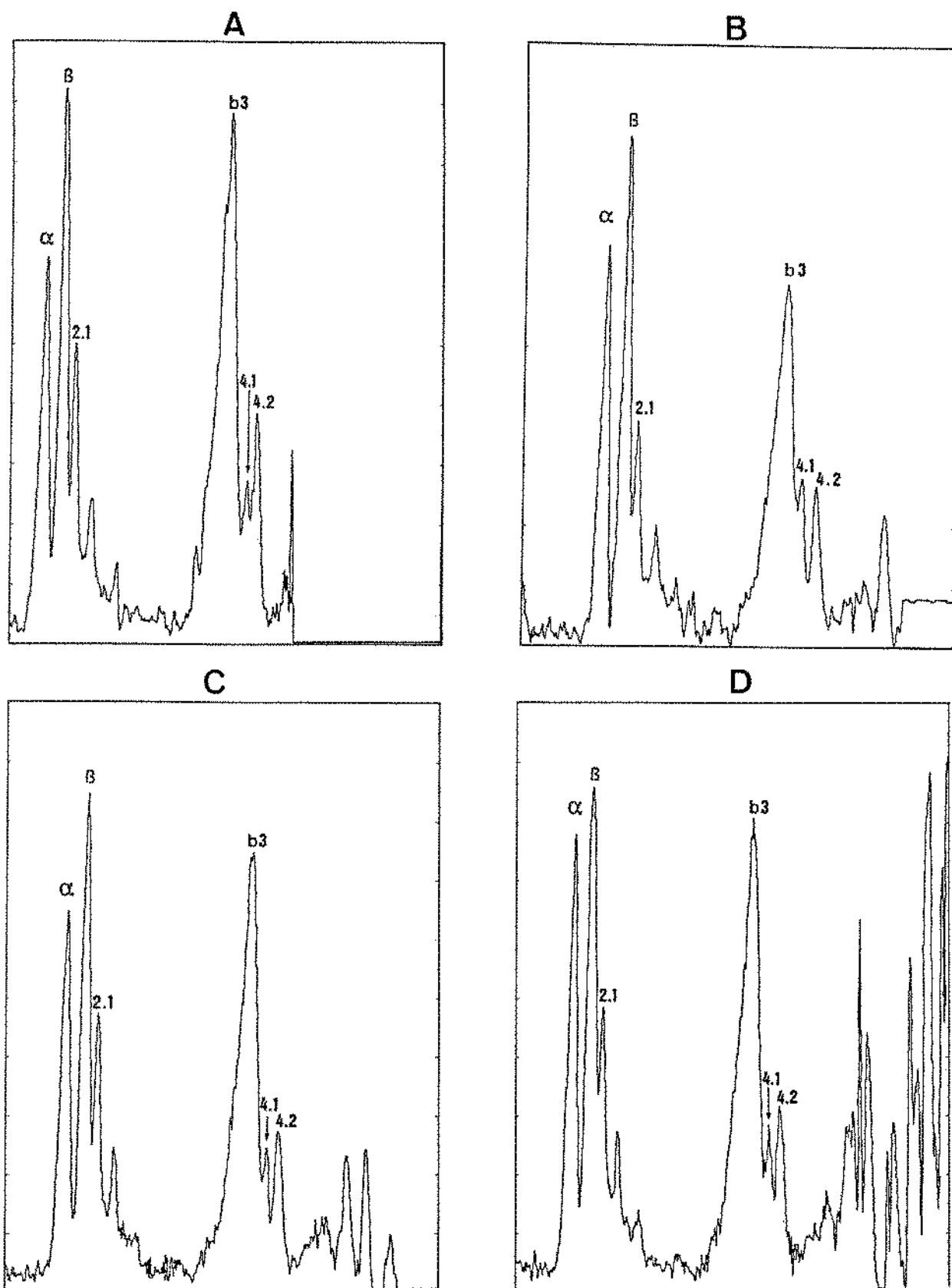


FIGURA 28: Densitometria através do Sistema Fairbanks (3,5-17%) da paciente (A), do marido (B), do filho (C) e da filha da paciente (D), demonstrou deficiência de proteína 4.1 na paciente (A), no filho (C) e na filha da paciente (D).

TABELA 29: Estudo quantitativo de heterodímeros de espectrina e digestão triptica da espectrina.

	Dímeros de espectrina (%)	Digestão pela tripsina
Paciente	8,8	Normal
Marido	11,0	Normal
Controle	8,0	

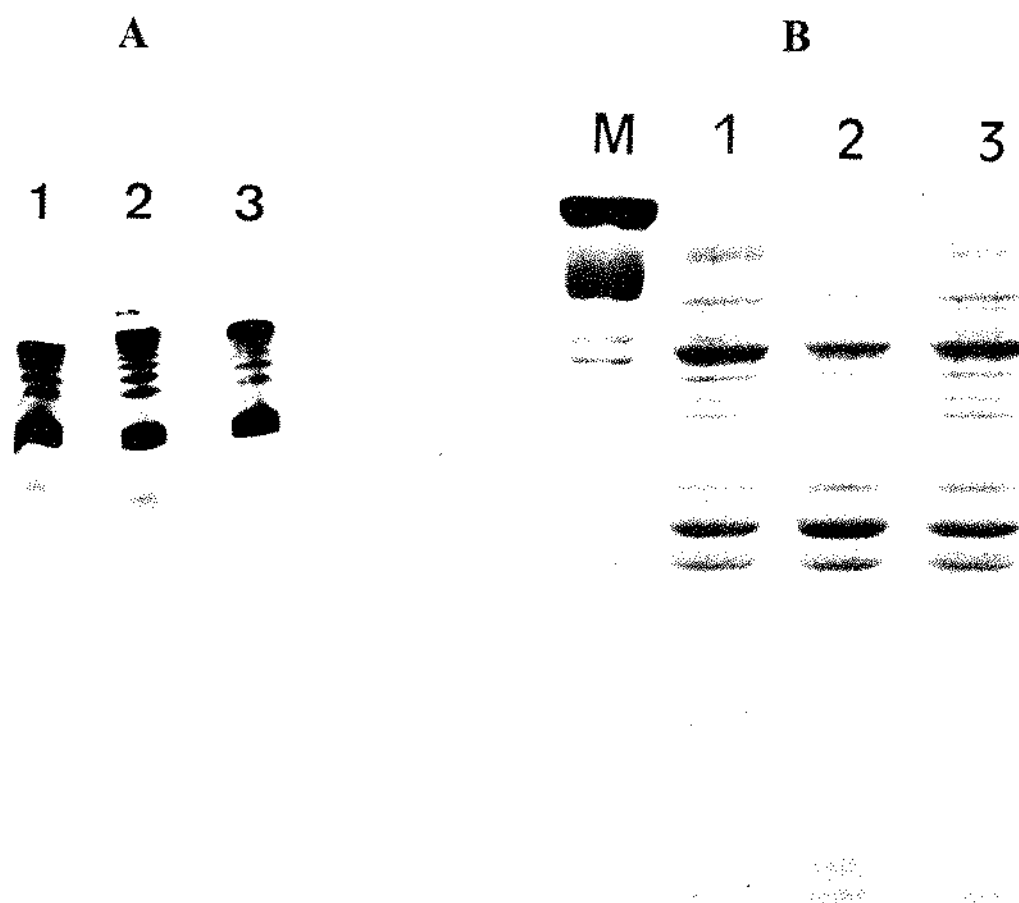


FIGURA 29: (A) Eletroforese em gel não-desnaturante. (B) SDS-PAGE: Sistema Laemmli 10% . Digestão triptica da espectrina. M = marcador, 1 = paciente, 2 = marido da paciente e 3 = controle. Note que não houve alteração em A e B.

Caso 8:

O caso índice 8 (LESN) e seus pais apresentaram grande quantidade de eliptócitos no esfregaço de sangue periférico. Os dados hematológicos do paciente e seus pais encontram-se na tabela 30.

A análise das proteínas da membrana das hemácias através de SDS-PAGE - Sistema Fairbanks foi normal (tabela 31, figura 30-A). No entanto, analisando-se o Sistema Laemmli 12% (figura 30-B) nota-se, no paciente, um aumento quantitativo da proteína 4.1b coerente com o grande número de reticulócitos citado na tabela 30. Este aumento de proteína 4.1b pode ser evidenciado na tabela 32.

A análise dos heterodímeros de espectrina demonstrou aumento na porcentagem dos mesmos e a digestão triptica da espectrina demonstrou o aparecimento de um fragmento de 65kDa no paciente e o desaparecimento do fragmento de 80kDa correspondente ao domínio I da cadeia alfa da espectrina. Os pais do paciente apresentaram este fragmento de 65kDa e também o fragmento de 80kDa (tabela 33, figura 31), sugerindo que os mesmos sejam heterozigotos $\alpha^{I/65}$ kDa e o paciente seja homozigoto.

A amplificação do *exon* 4 da cadeia alfa da espectrina pela técnica da PCR originou um fragmento de 254 pares de base (figura 32-A). Os *primers* utilizados na amplificação estão descritos na tabela 6. A pesquisa de heteroduplex demonstrou o aparecimento de uma banda com migração retardada apenas nos progenitores do paciente, enquanto que o caso índice apresentou apenas uma banda. Contudo, a mistura da amostra do paciente com a de um controle normal, levou ao aparecimento de uma banda com migração retardada idêntica àquela observada em seus pais (figura 32-B).

Conclusão: $Sp\alpha^{I/65}$

TABELA 30: Dados hematológicos do paciente e seus progenitores.

	Hb(g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos
Paciente (LESN)*	7,9	7,9	++++
Pai (HMN)	13,5	2,3	+++
Mãe (MJSN)	14,0	1,8	+++

* apresenta poiquilocitose, alguns microesferócitos, hemácias fragmentadas e acentuada anisocitose.

TABELA 31: Estudo quantitativo das proteínas da membrana eritrocitária.

	sp/b3	2.1/b3	4.1+4.2/b3	4.1/4.2
Paciente	0,97	0,26	0,38	1,33
Mãe	0,94	0,23	0,36	1,15
Pai	0,98	0,24	0,27	1,17
Controle	0,87	0,20	0,33	1,11

TABELA 32: Estudo quantitativo das proteínas 4.1a e 4.1b através de análise densitométrica do Sistema Laemmli 12%.

	4.1a/4.1b
Paciente	0,56
Controle	2,30

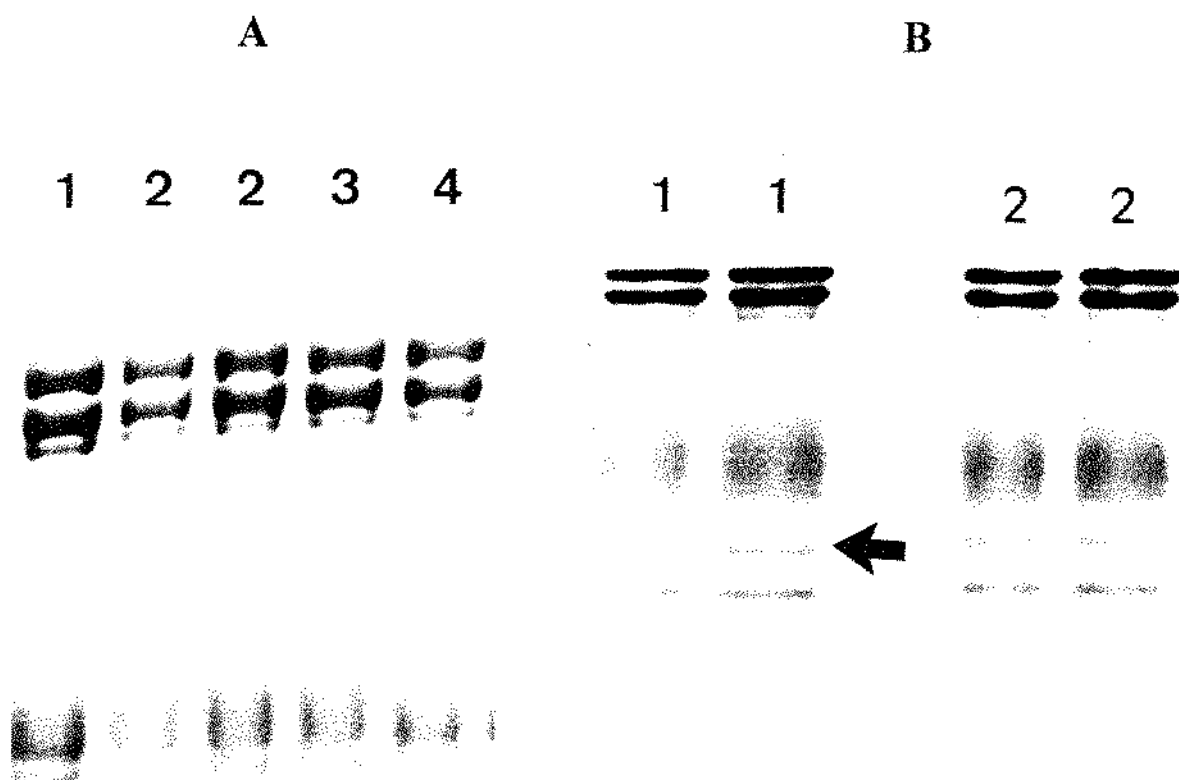


FIGURA 30: (A) SDS-PAGE: Sistema Fairbanks 3,5-17%. (B) SDS-PAGE: Sistema Laemmli 12%. 1 = paciente, 2 = controle, 3 = mãe do paciente e 4 = pai do paciente. Note que não houve qualquer alteração em A. Através do Sistema B, observa-se apenas um aumento qualitativo da proteína 4.1b coerente com a reticulocitose presente no paciente.

TABELA 33: Digestão triptica da espectrina.

	Dímeros de espectrina (%)	Digestão pela tripsina
Paciente	43,9	α I/65/ α I/65
Mãe	41,2	α I/65/ α I/80
Pai	32,6	α I/65/ α I/80
Controle	22,3	

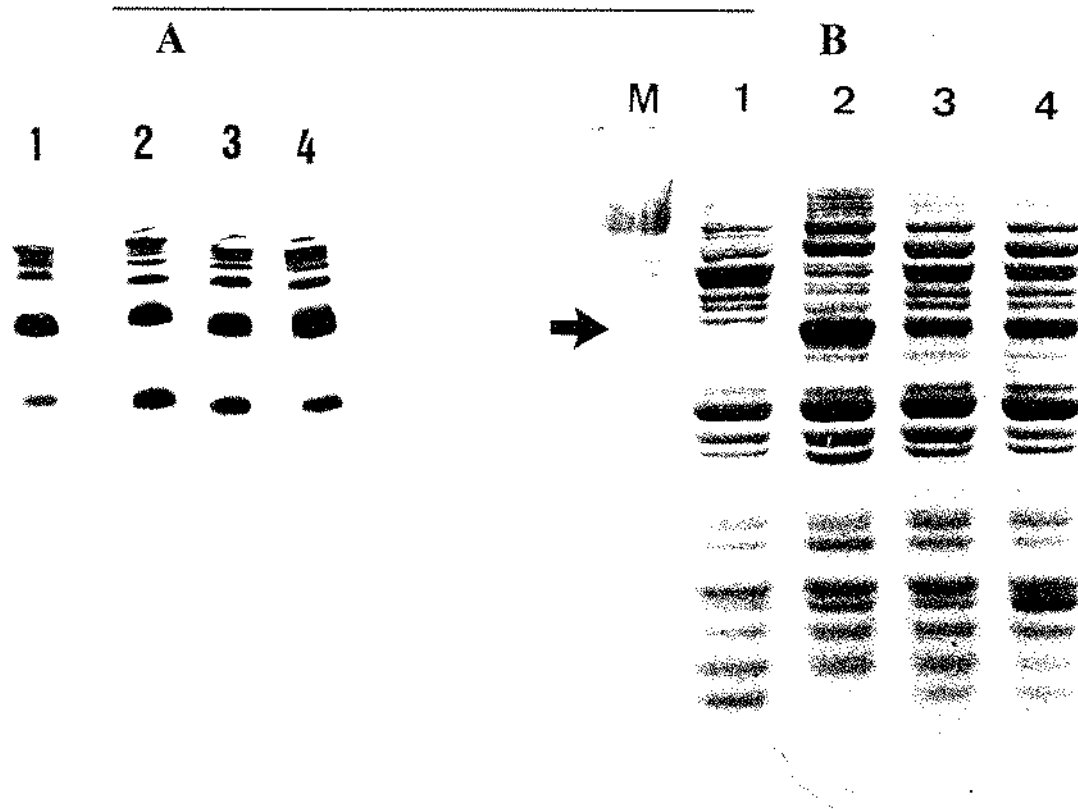


FIGURA 31: (A) Eletroforese em gel não-desnaturante. (B) SDS-PAGE = Sistema Laemmli 10%. Digestão triptica da espectrina. M = marcador, 1 = controle, 2 = paciente, 3 = mãe do paciente e 4 = pai do paciente. Note o aumento de heterodímeros de espectrina no paciente e em seus pais e o aparecimento do fragmento de 65 kDa em substituição ao fragmento de 80kDa que se encontra diminuído nos pais e ausente no paciente, sugerindo que o propósito seja homozigoto para o defeito gênico que conduziu a substituição do fragmento normal de 80kDa.

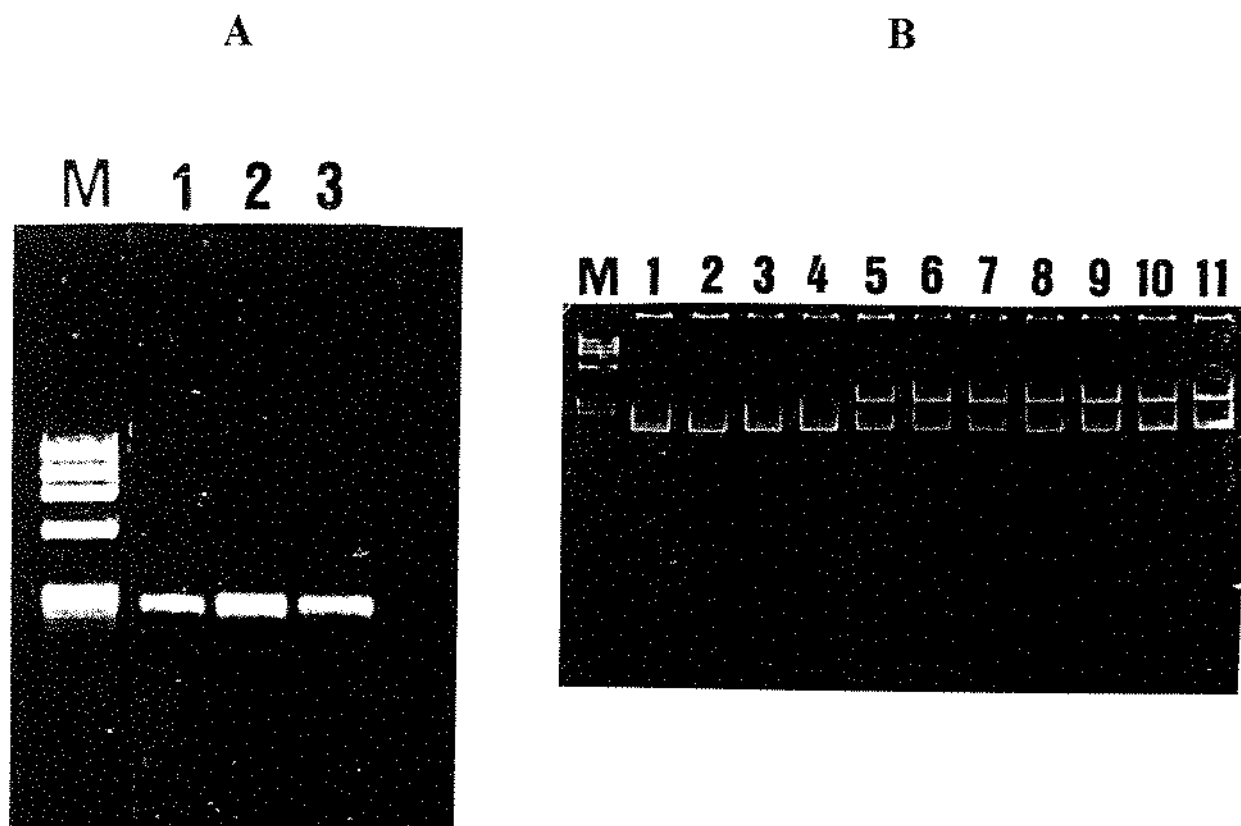


FIGURA 32: (A) Amplificação do *exon 4* da cadeia alfa da espectrina através da técnica da PCR. M = marcador ϕ x 174; 1 = paciente, 2 = mãe do paciente e 3 = pai do paciente. (B) Pesquisa de heteroduplex: M = marcador ϕ x 174. Amplificado do *exon 4* da cadeia alfa espectrina, sem desnaturação prévia e com desnaturação prévia a 95°C por 5 minutos e 65°C por 2 minutos, respectivamente: 1 e 2 = controle negativo; 3 e 4 = paciente; 5 = paciente + controle; 6 e 7 = mãe do paciente; 8 = mãe + controle; 9 e 10 = pai do paciente; 11 = pai + controle. Note que a mãe e o pai do paciente apresentaram uma banda com migração retardada e que a mesma só ocorreu no paciente quando houve mistura com um controle normal.

Caso 9:

Os pacientes A (VRD) e B (AAD) apresentaram grande quantidade de eliptócitos no esfregaço de sangue periférico conforme pode ser verificado na tabela 34.

Após 2 coletas em dias diferentes, a análise quantitativa das proteínas da membrana dos glóbulos vermelhos através de SDS-PAGE demonstrou o aparecimento de uma banda de migração mais lenta do que a alfa espectrina no paciente B (figura 33, tabela 35). A análise densitométrica das proteínas totais demonstrou uma redução da β espectrina e o aparecimento de um novo pico (figura 34). A proteína de migração lenta foi extraída da membrana segundo protocolo de extração de espectrina (figura 35). A diminuição da β -sp normal observada pela densitometria, sugere que esta banda anômala seja uma fração da β -sp (tabela 36). Tal hipótese foi confirmada através da análise por *Western-blotting* usando-se anticorpo anti- β espectrina conforme figura 37.

Ambos pacientes apresentaram aumento de dímeros de espectrina e a digestão triptica da espectrina mostrou o aparecimento de um fragmento normal de 80kDa diminuído (tabela 37, figura 36), surgindo um novo fragmento de 65kDa.

A amplificação do *exon* 4 da cadeia alfa da espectrina através da técnica de PCR demonstrou um fragmento de aproximadamente 254 pb (figura 38-A). Para a amplificação do *exon* 4 da cadeia alfa espectrina destes pacientes foram utilizados os *primers* descritos na tabela 6.

Com o produto da amplificação, foi realizada a pesquisa de heteroduplex, verificando-se o aparecimento de uma banda com migração retardada nos pacientes A e B (figura 38-B), sugerindo que o defeito gênico que originou o aparecimento do fragmento de 65 kDa seja o mesmo observado nos casos 3 e 8.

Conclusão: Paciente A: $Sp\alpha^{I/65}$

Paciente B: $Sp\alpha^{I/65}$ + cadeia β espectrina aumentada.

TABELA 34: Dados hematológicos dos pacientes A e B.

	Hb(g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos
Paciente A (VRD)*	13,4	1,0	++++
Paciente B (AAD)**	13,6	1,2	++++

* apresenta também poiquilocitose

** apresenta poiquilocitose e hemácias fragmentadas

TABELA 35: Estudo quantitativo das proteínas da membrana eritrocitária.

	sp/b3	2.1/b3	4.1+4.2/b3	4.1/4.2
Paciente A	1,19±0,01	0,27±0,01	0,37±0,03	1,11±0,04
Paciente B	1,02±0,02	0,27±0,03	0,36±0,03	1,02±0,03
Controle	1,19±0,07	0,27±0,03	0,37±0,03	1,13±0,06

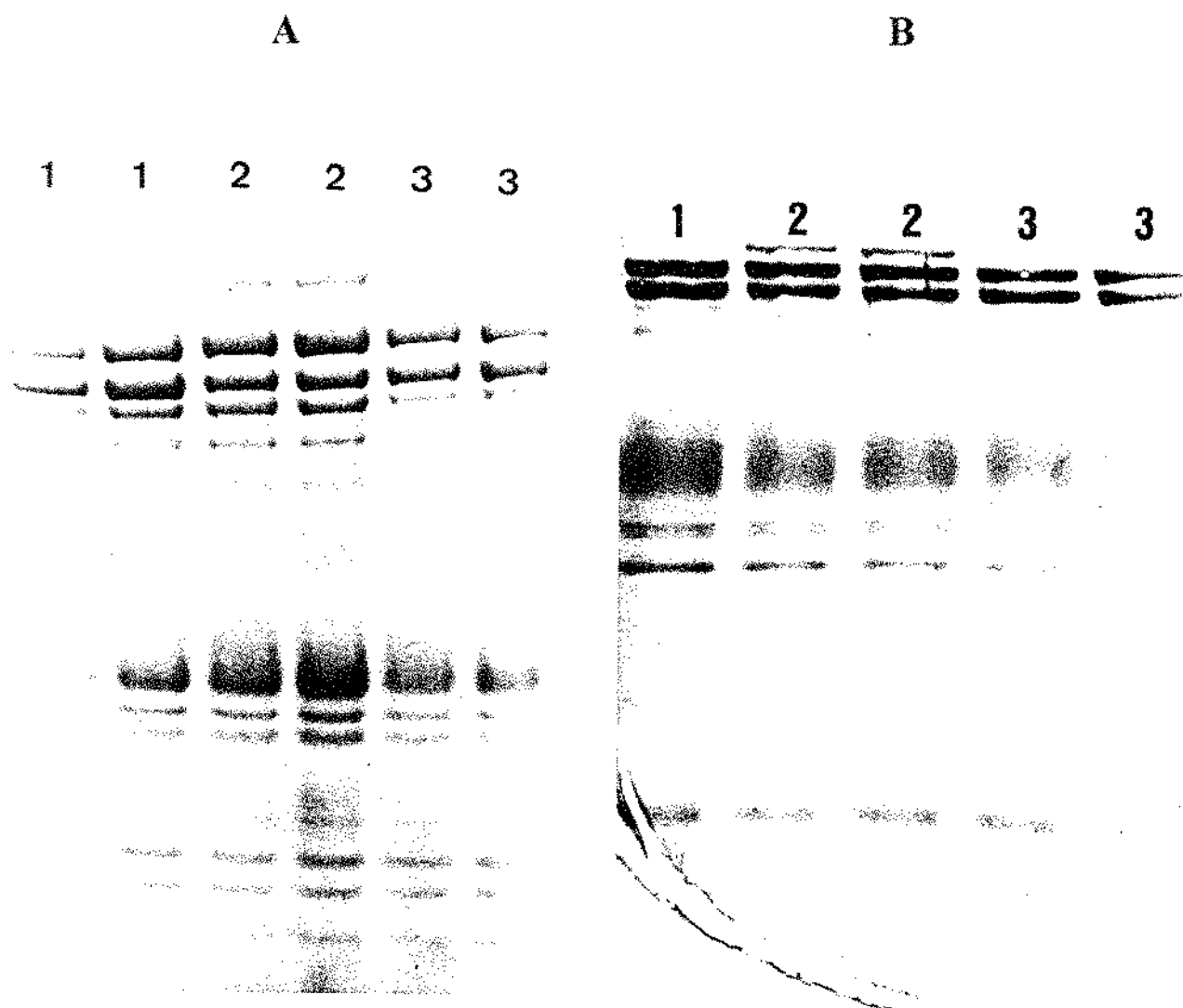


FIGURA 33: (A) SDS-PAGE: Sistema Fairbanks 3,5-17%. (B) SDS-PAGE: Sistema Laemmli 12%. 1 = paciente A; 2 = paciente B e 3 = controle. Note que não houve alteração em A e B com a amostra do paciente A, porém na amostra do paciente B, ocorreu o aparecimento de uma banda anômala de alto peso molecular.

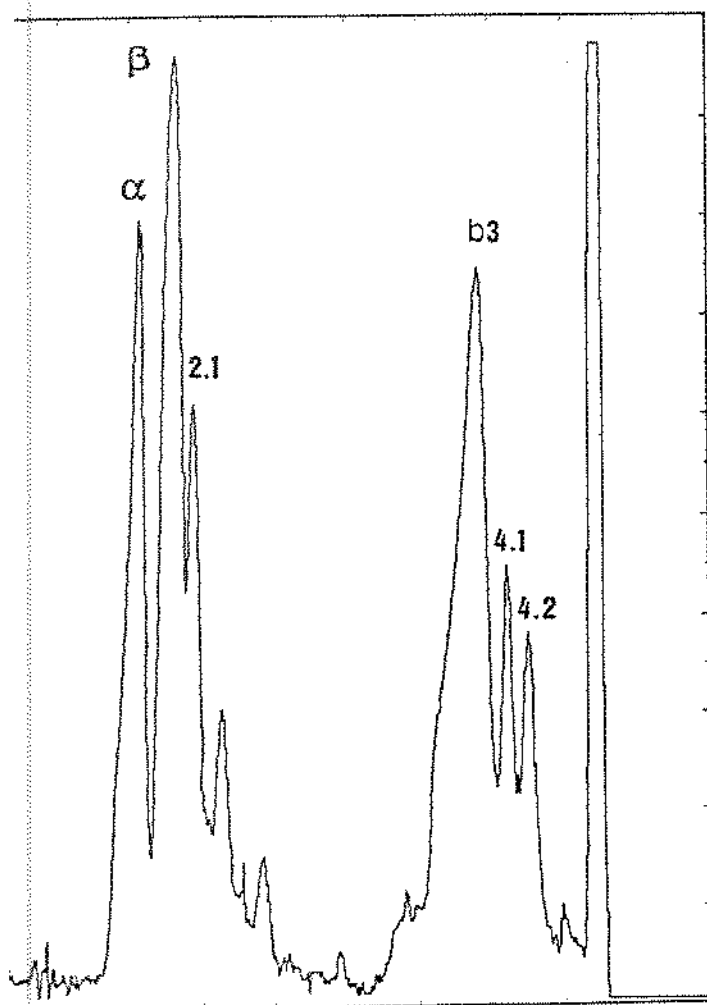
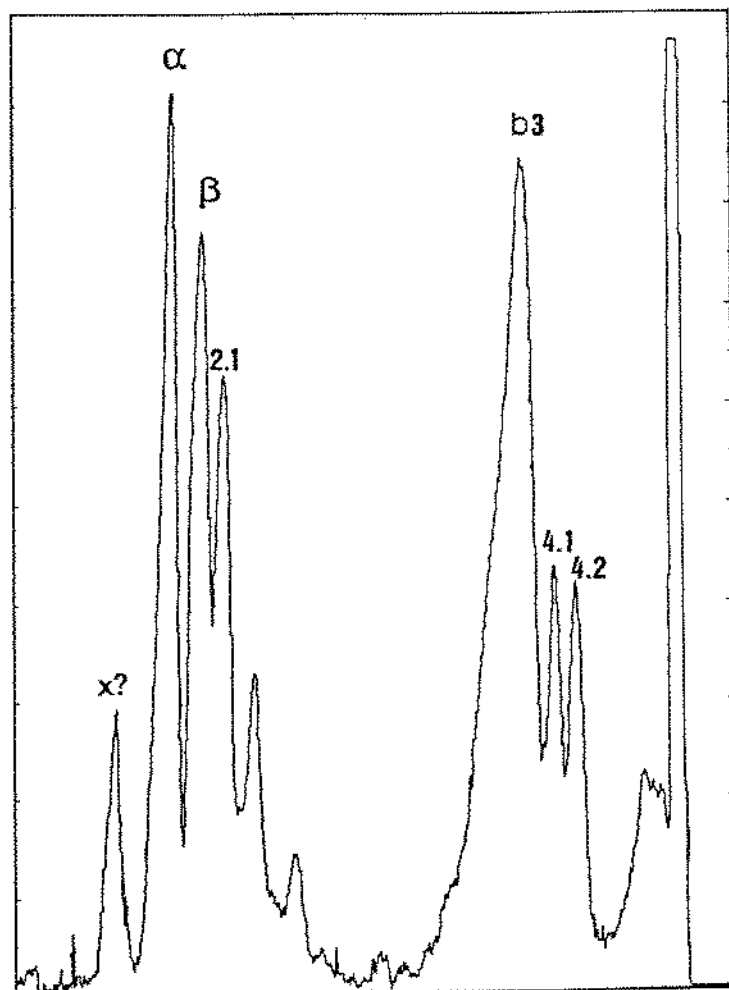
A**B**

FIGURA 34: Densitometria do paciente A (A) e do paciente B (B) demonstrando o aparecimento de uma banda anômala no paciente B e diminuição da banda correspondente a β -espectrina.

TABELA 36: Estudo quantitativo da espectrina nos pacientes A e B (x = banda anômala).

	α/β	$\alpha+x/\beta$	$\alpha/\beta+x$
Paciente A	$0,89\pm0,03$		
Paciente B	$1,15\pm0,03$	$1,46\pm0,03$	$0,89\pm0,02$
Controle	$0,87\pm0,01$		

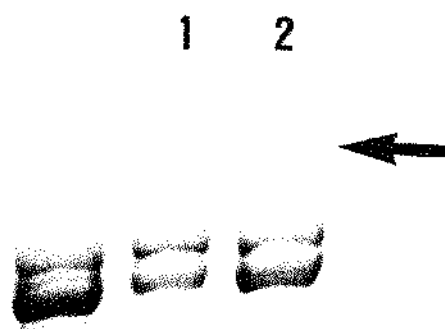


FIGURA 35: Espectrina extraída e aplicada em SDS-PAGE (Sistema Fairbanks 3,5-17%) mostrando a β -sp alongada no paciente B. 1 = paciente B e 2 = controle.

TABELA 37: Digestão triptica da espectrina.

	Dímeros de espectrina (%)	Digestão pela tripsina
Paciente A	35,0	α I/65/ α I/80
Paciente B	34,5	α I/65/ α I/80
Controle	15,0	

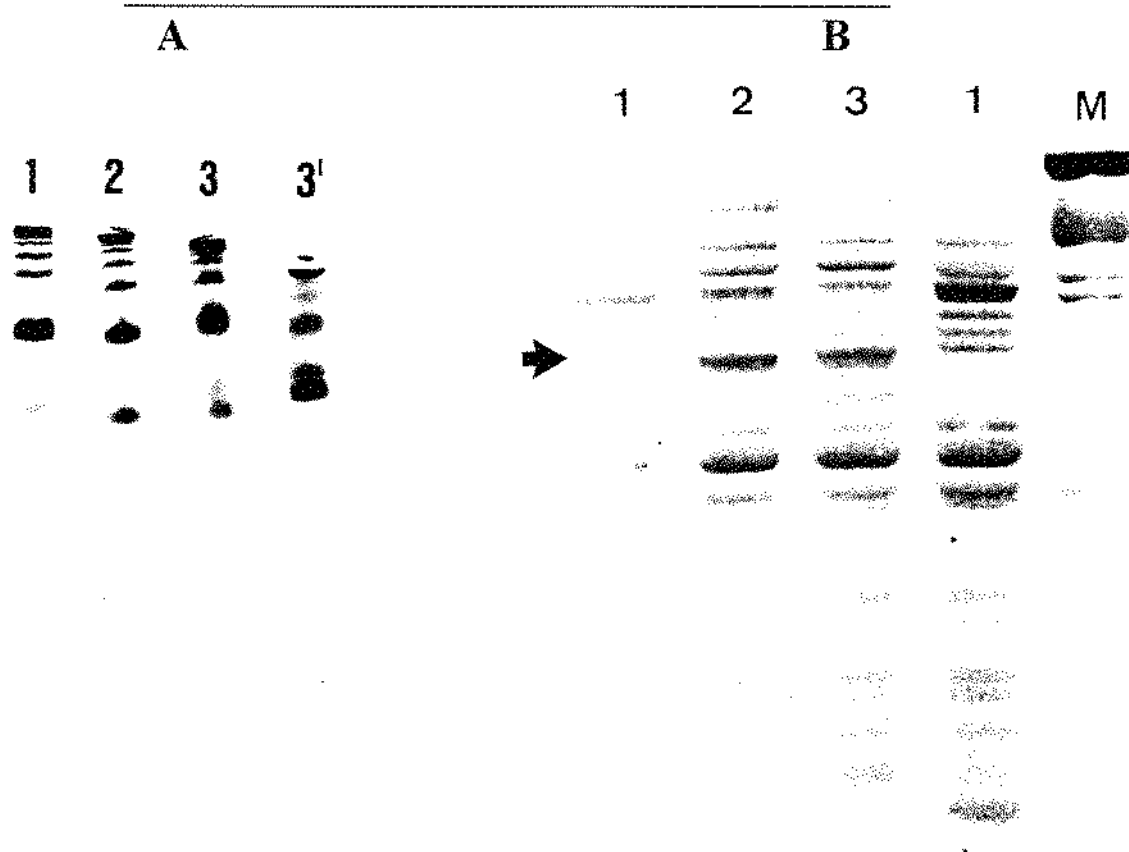


FIGURA 36: (A) Eletroforese em gel não-desnaturante. (B) SDS-PAGE = Sistema Laemmli 10%. Digestão triptica da espectrina. 1 = controle, 2 = paciente A, 3 = paciente B, 3' = eletroforese do mesmo paciente realizada em dia diferente e M = marcador. Note uma banda dupla correspondente aos heterodímeros de espectrina no paciente B e aumento quantitativo dos mesmos em ambos os pacientes e uma diminuição do fragmento normal de 80kDa e sua substituição por um fragmento de 65 kDa nos dois pacientes.

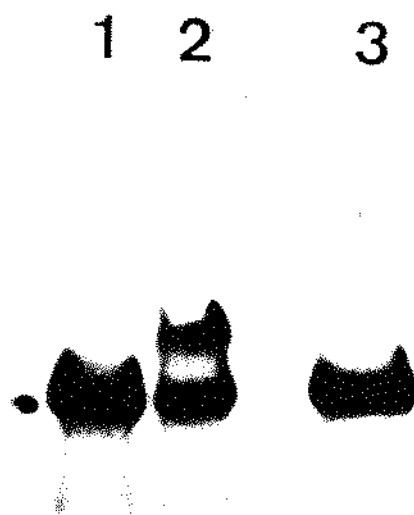


FIGURA 37: Análise por *Western-blotting* da proteína anômala detectada no paciente B (AAD) usando-se anticorpo anti- β espectrina. 1 = paciente A, 2 = paciente B e 3 = controle. Note que o anticorpo reagiu com a banda de alto peso molecular no paciente B.

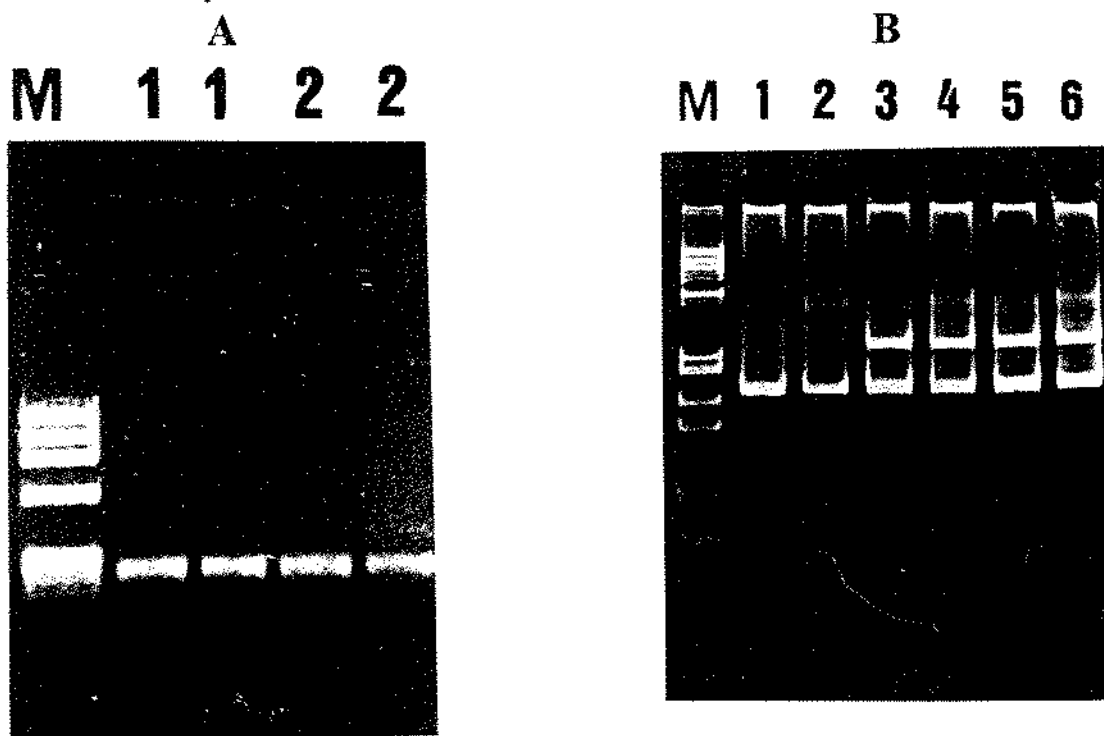


FIGURA 38: (A) Amplificação do *exon* 4 do gene da alfa-espectrina através da técnica da PCR. M = marcador ϕ x 174; 1 = paciente A; 2 = paciente B. (B) Pesquisa de heteroduplex. M = marcador. Amplificado do *exon* 4 da cadeia alfa-espectrina, sem desnaturação prévia e com desnaturação prévia a 95°C por 5 minutos e 65°C por 2 minutos, respectivamente: 1 e 2 = controle negativo; 3 e 4 = paciente A e 5 e 6 = paciente B.

Caso 10:

Entre os membros da família da paciente 10 (MCP), sua mãe também apresentava eliptócitos no esfregaço de sangue periférico. Os dados hematológicos da paciente e seus pais encontram-se na tabela 38.

A análise quantitativa das proteínas totais da membrana da hemácia por SDS-PAGE demonstrou o aparecimento de uma banda com maior mobilidade eletroforética que a beta espectrina na paciente e sua mãe (figura 39, tabela 39). A análise por densitometria das proteínas da membrana eritrocitária demonstrou uma redução na β -espectrina normal e um grande aumento da banda referente à anquirina (figura 40). A diminuição quantitativa da β -espectrina sugere que a banda anômala seja derivada da β -espectrina e que tenha migrado junto à anquirina pelo sistema Fairbanks. Esta hipótese foi corroborada pela análise de *Western-blotting* usando-se anticorpo anti- β espectrina (figura 41).

A análise dos heterodímeros de espectrina demonstrou um grande aumento dos mesmos e a digestão mostrou o aparecimento de um fragmento anormal de 74 kDa derivado do fragmento de 80 kDa o qual se apresentava diminuído na paciente e em sua mãe (tabela 40, figura 42). Através de *Western-blotting* usando-se anticorpo anti- $\alpha^{1/80}$ kDa confirmou-se a hipótese do fragmento de 74 kDa ser derivado de Sp $\alpha^{1/80}$ kDa (figura 43).

Conclusão : β -espectrina encurtada com fragmento Sp $\alpha^{1/74}$ kDa

TABELA 38: Dados hematológicos da paciente 10 e seus pais:

	Hb (g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos
Paciente (MCP)*	9,5	5,0	++++
Pai (SBP)	13,9	0,7	Ø
Mãe (MAP) **	12,0	3,1	++

* apresenta também anisopoiquilocitose

** apresenta poiquilocitose, hemácias fragmentadas e numerosos microesferócitos

TABELA 39: Estudo quantitativo das proteínas da membrana eritrocitária.

	sp/b3	2.1/b3	4.1+4.2/b3	4.1/4.2
Paciente	0,98	0,57	0,37	1,00
Pai	0,90	0,26	0,37	0,93
Mãe	0,78	0,44	0,35	1,02
Controle	1,03	0,27	0,35	0,97

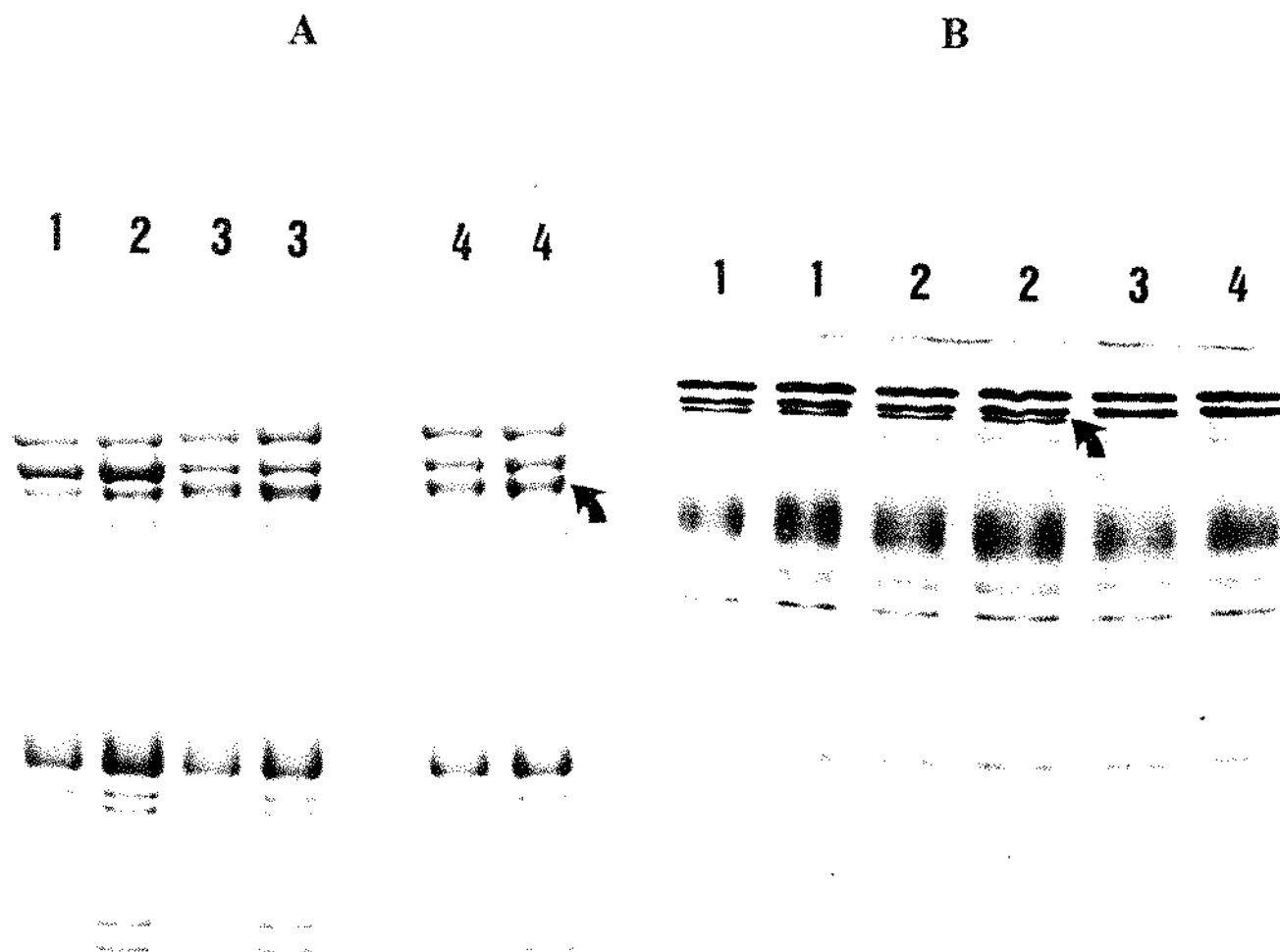


FIGURA 39: (A) SDS-PAGE: Sistema Fairbanks 3,5 - 17%. 1 = controle, 2 = pai da paciente, 3 = mãe da paciente e 4 = paciente. (B) SDS-PAGE: Sistema Laemmli 12%. 1 = mãe da paciente, 2 = paciente, 3 = pai da paciente e 4 = controle. Note aparecimento de uma banda anômala junto à anquirina na paciente e em sua mãe nos sistemas A e B.

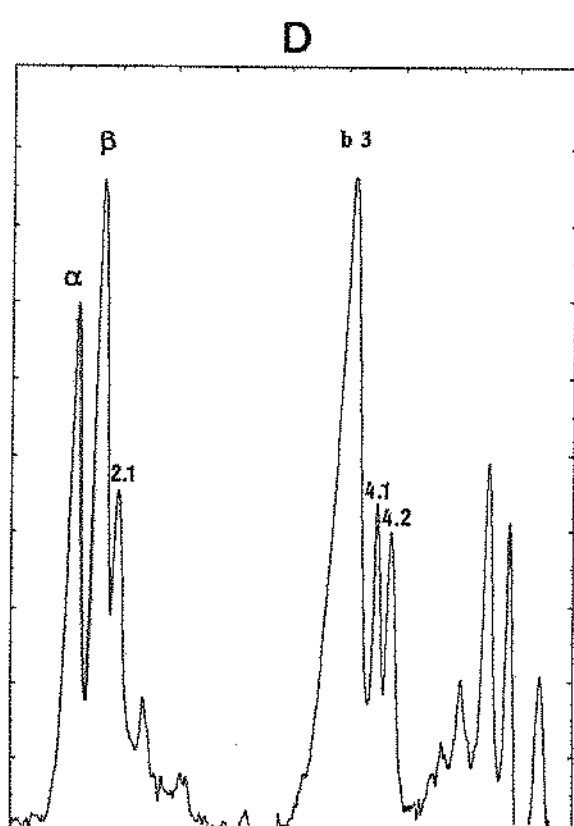
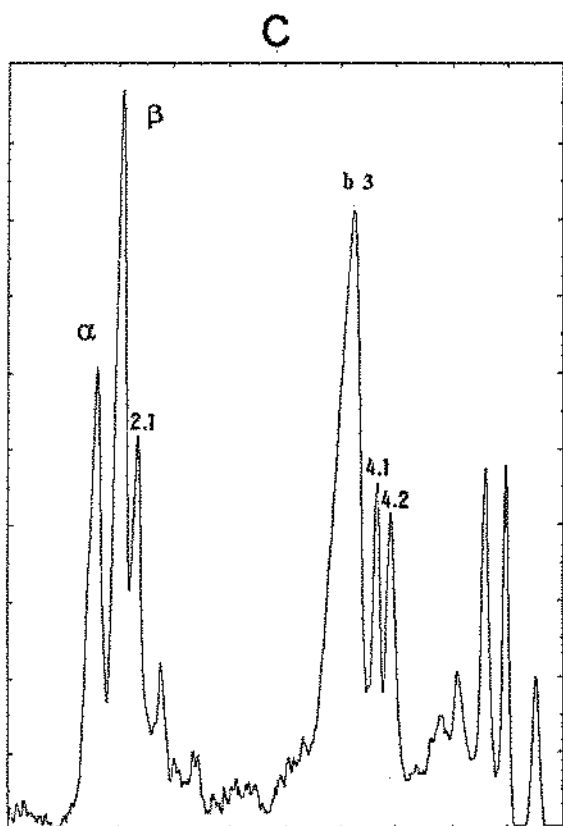
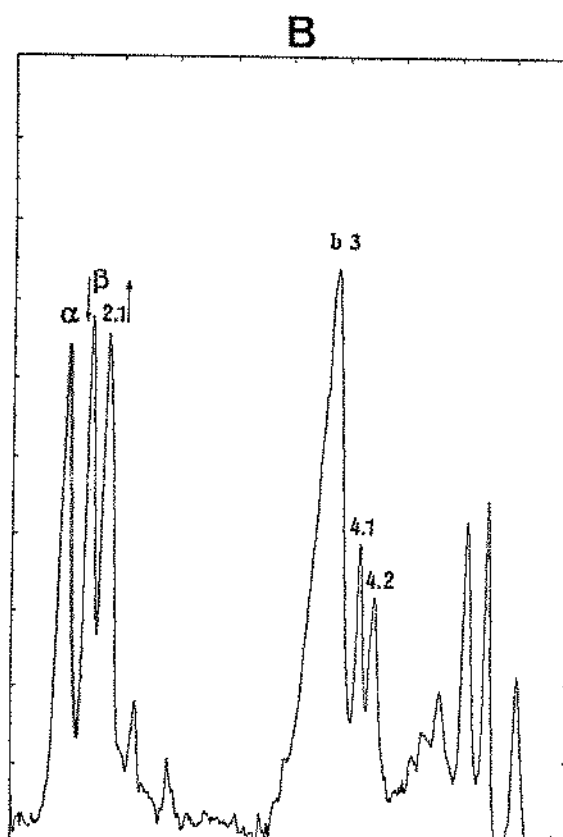
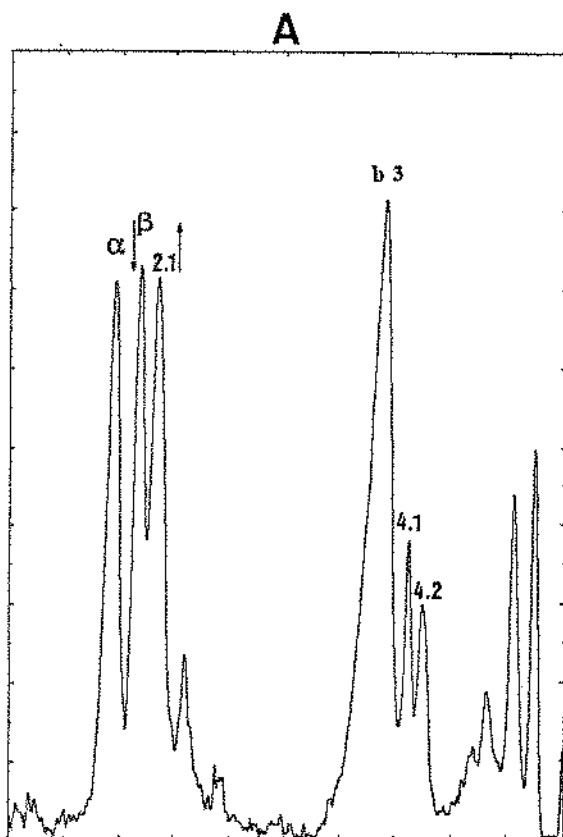


FIGURA 40: Densitometria da paciente (A), de sua mãe (B), de seu pai (C) e do controle (D), demonstrando diminuição na banda correspondente à β -espectrina e aumento da banda referente à anquirina na paciente e em sua mãe.

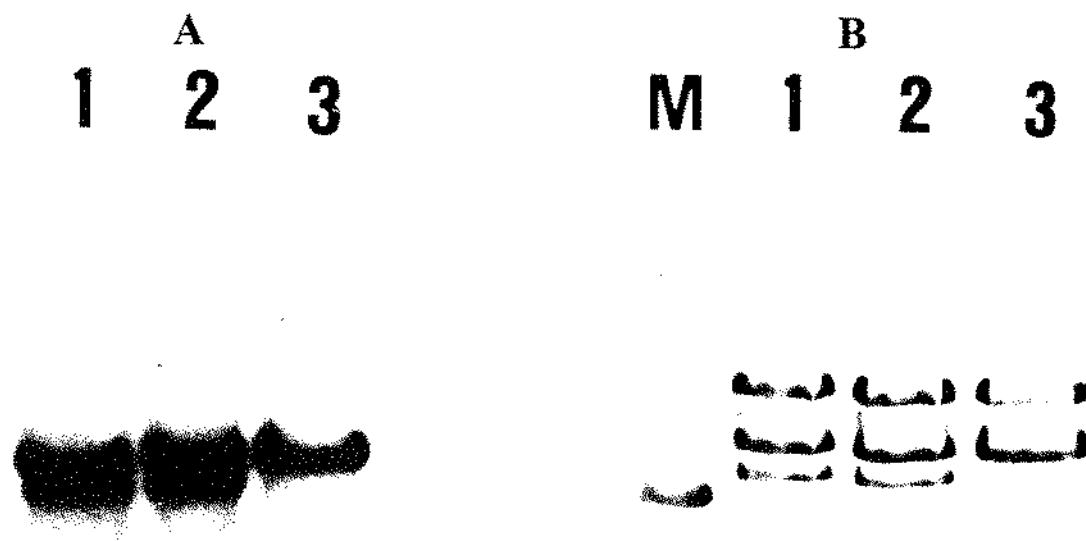


FIGURA 41: (A) Análise por *Western-blotting* da proteína com peso molecular diminuído da paciente e sua mãe, usando-se anticorpo anti- β espectrina. (B) Coloração por azul de Coomassie brilhante do gel 6% submetido à transferência. 1 = mãe da paciente; 2 = paciente; 3 = controle e M = controle. Note que o anticorpo reagiu com a banda de baixo peso molecular na paciente e em sua mãe.

TABELA 40: Estudo quantitativo de heterodímeros de espectrina e digestão triptica da espectrina.

	Dímeros de Espectrina (%)	Digestão pela Tripsina
Paciente	43,0	α I/74/ α I/80
Pai	14,0	normal
Mãe	51,0	α I/74/ α I/80
Controle	12,0	

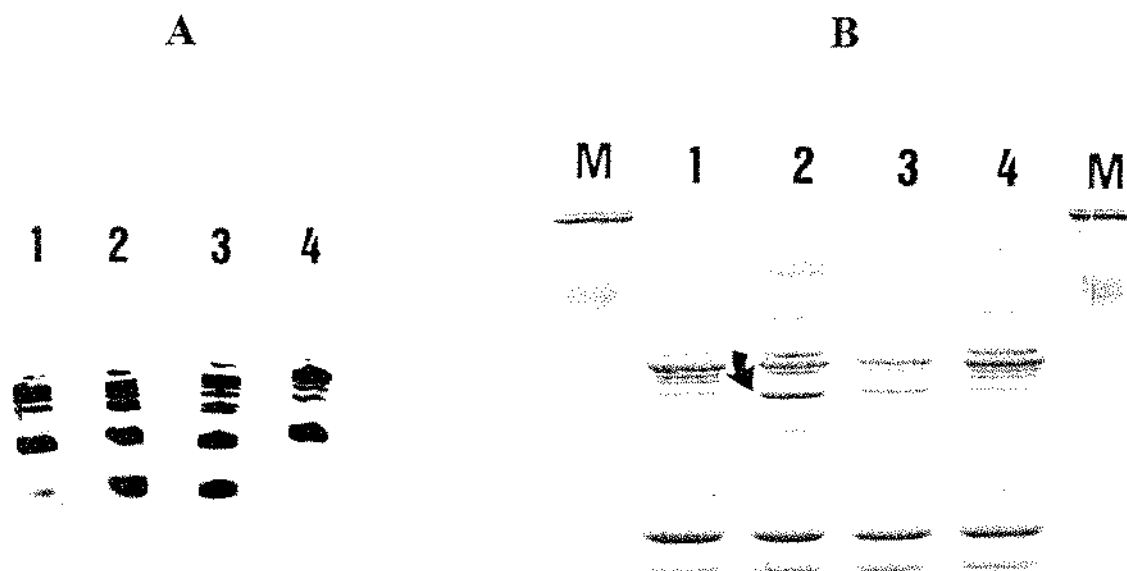


FIGURA 42: (A) Eletroforese em gel não-desnaturante. (B) SDS-PAGE: Sistema Laemmli 10%. Digestão triptica da espectrina. 1 = pai da paciente, 2 = mãe da paciente, 3 = paciente; 4 = controle e M = marcador. Note que a paciente e sua mãe apresentaram grande número de dímeros de espectrina quando comparado com o pai da paciente e o controle. A digestão triptica da espectrina demonstrou o aparecimento de um fragmento de 74 kDa derivado do fragmento normal de 80 kDa que estava diminuído na paciente e em sua mãe.

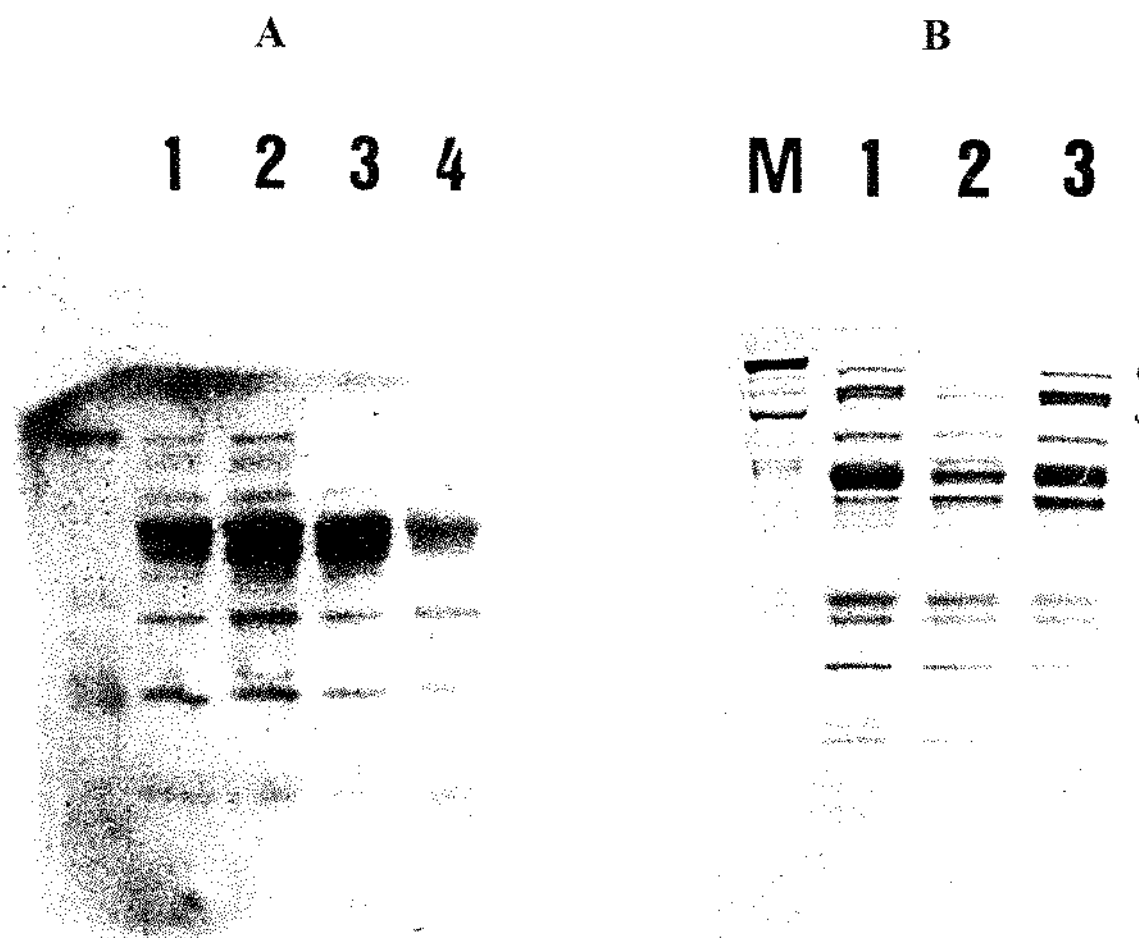


FIGURA 43: (A) Estudo por *Western-blotting* usando-se anticorpo anti- α I/80 kDa, mostrando que o fragmento anormal era derivado do domínio I da cadeia α -espectrina. 1 = pai da paciente, 2 = mãe da paciente, 3 = paciente e 4 = controle. (B) Coloração por azul de Coomassie brilhante do gel 10% submetido à transferência. 1 = pai da paciente, 2 = paciente, 3 = mãe da paciente e M = marcador.

V.2. "Eliptocitose Adquirida"

1 - Mielofibrose

O estudo da auto-associação de heterodímeros de espectrina foi realizado em seis pacientes com mielofibrose em que era freqüente o aparecimento de eliptócitos no esfregaço de sangue periférico (tabela 41).

O estudo dos dímeros de espectrina nos pacientes com mielofibrose foi normal (tabela 42).

TABELA 41: Dados hematológicos dos pacientes com mielofibrose analisados.

Pacientes	Hb(g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos	Dacriócitos
1.A.D.C.	7,2	1,6	++	+++
2.A.B.	13,3	-	++	++
3.A.K.	10,9	-	++++	+++
4.M.L.R.	9,0	1,7	+++	++++
5.L.O.	10,2	-	++	+++
6.A.L.S.	9,5	2,1	++	++

TABELA 42: Estudo da auto-associação de heterodímeros de espectrina nos pacientes com mielofibrose:

	Dímeros (%)	
	Pacientes	Controles
1.A.D.C.	8,8±0,1	7,7±0,4
2.A.B.	13,1	13,7
3.A.K.	9,4	10,0
4.M.L.R.	12,9	13,8
5.L.O.	15,9	15,3
6.A.L.S.	12,5	14,7

2 - Leucemia Mielóide Crônica (LMC)

A análise de heterodímeros de espectrina em pacientes com LMC, foi feita em sete pacientes onde apareciam eliptócitos e dacriócitos após estudo do esfregaço de sangue periférico (tabela 43).

Um destes pacientes apresentou significativo aumento de dímeros em relação ao controle segundo tabela 44 e figura 44.

TABELA 43: Dados hematológicos dos pacientes com LMC.

Pacientes	Hb (g/dl)	Eliptócitos	Dacriócitos
1.O.P.	7,9	++	++
2.G.F.S.	12,6	++	++
3.T.D.N.	9,2	++	++
4.C.C.	9,4	+	+
5.M.P.J.	13,4	++	+
6.J.P.S.	11,2	++	+
7.I.R.M.	10,1	++	++

TABELA 44: Estudo da auto-associação de heterodímeros de espectrina nos pacientes com LMC.

	Dímeros (%)	
	Pacientes	Controles
1.O.P.	19,8±1,3	9,6±2,2
2.G.F.S.	9,0	8,0
3.T.D.N.	9,3	7,3
4.C.C.	8,3	8,0
5.M.P.J.	14,8	13,7
6.J.P.S.	9,4	7,3
7.I.R.M.	9,4	8,0



FIGURA 44: Eletroforese em gel não-desnaturante. 1 = paciente 1 (O.P.) e 2 = controle. Note aumento de dímeros de espectrina no paciente quando comparado com o controle.

3 - Anemia Falciforme

Foi realizado estudo de heterodímeros de espectrina em cinco pacientes portadores de anemia falciforme. Os dados hematológicos destes pacientes estão expostos na tabela 45, enquanto que a análise dos dímeros pode ser encontrada na tabela 46. Não houve aumento quantitativo dos dímeros de espectrina nos pacientes estudados.

TABELA 45: Dados hematológicos dos pacientes com anemia falciforme estudados.

Pacientes	Hb (g/dl)	Reticulócitos (%)	Drepanócitos
1.M.C.C.B.	8,9	2,7	+
2.H.B.S.	10,1	6,3	Ø
3.M.I.S.A.	4,7	7,2	++++
4.D.A.L.	8,6	-	++++
5.C.B.S.	7,4	-	++++

TABELA 46: Estudo de heterodímeros em pacientes com anemia falciforme.

	Dímeros (%)	
	Pacientes	Controles
1.M.C.C.B.	11,5	8,5
2.H.B.S.	13,6	13,6
3.M.I.S.A.	10,0	10,5
4.D.A.L.	10,0	10,5
5.C.B.S.	11,7	12,6

4 - Anemia Megaloblástica

Foram estudados três pacientes com anemia megaloblástica que apresentavam eliptócitos e outras alterações na morfologia da hemácia (tabela 47).

Não foram observadas alterações quantitativas das proteínas da membrana (tabela 48) e o estudo da auto-associação dos heterodímeros de espectrina também não demonstrou qualquer alteração quantitativa nos pacientes analisados, de acordo com a tabela 49.

TABELA 47: Dados hematológicos dos pacientes com anemia megaloblástica.

Pacientes	Hb (g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos	Dacriócitos
1.J.I.S.	8,9	0,2	++	Ø
2.D.L.B.	9,8	1,0	++	+
3.J.E.L.P.	5,4	0,2	+++	+++

TABELA 48: Estudo quantitativo das proteínas da membrana eritrocitária nos pacientes com anemia megaloblástica.

Pacientes	sp/b3	2.1/b3	4.1+4.2/b3	4.1/4.2
1. J.I.S.	1,14	0,21	0,35	1,11
Controle	1,06	0,19	0,33	0,97
2. D.L.B.	1,19	0,27±0,01	0,39±0,01	0,96±0,03
Controle	1,19±0,09	0,23	0,39±0,03	0,91±0,05
3. J.E.L.P.	1,39	0,24	0,35	1,20
Controle	1,35	0,28	0,38	1,17

TABELA 49: Estudo quantitativo de heterodímeros de espectrina.

	Dímeros (%)	
	Pacientes	Controles
1. J.I.S.	16,6	15,5
2. D.L.B.	8,9	10,5

5 - Anemia Ferropriva

Dentre os cinco pacientes com anemia ferropriva analisados, todos apresentavam anemia, microcitose e hipocromia moderada à acentuada. Os dados hematológicos destes pacientes encontram-se na tabela 50.

O estudo das proteínas da membrana eritrocitária não demonstrou alterações quali ou quantitativas em SDS-PAGE (tabela 51), bem como alterações nos heterodímeros de espectrina (tabela 52).

TABELA 50: Dados hematológicos dos pacientes com anemia ferropriva estudados.

Pacientes	Hb (g/dl)	Reticulócitos (%)	Eliptócitos	Dacriócitos
1.J.A.S.	7,6	0,4	++	++
2.W.C.S.	6,2	12,0	++	++
3.A.P.A.	8,9	0,5	++	+
4.L.V.S.	6,0	1,2	+++	++
5.M.W.	10,9	1,1	+	+

TABELA 51: Estudo quantitativo das proteínas da membrana eritrocitária nos pacientes com anemia ferropriva.

Pacientes	sp/b3	2.1/b3	4.1+4.2/b3	4.1/4.2
1. J.A.S.	1,00	0,24	0,36	0,89
Controle	1,01	0,23	0,32	0,88
2. W.C.S.	0,92±0,01	0,24	0,34±0,01	0,96±0,02
Controle	1,04±0,01	0,18±0,01	0,33	0,89±0,01
3. A.P.A.	1,03	0,17	0,28	1,10
Controle	0,91	0,18	0,28	1,15
4. L.V.S.	0,87	0,27	0,37	1,13
Controle	0,95	0,23	0,40	1,00
5. M.W.	1,07	0,21	0,37	0,85
Controle	1,10	0,23	0,36	0,86

TABELA 52: Estudo quantitativo de heterodímeros de espectrina nos pacientes estudados.

	Dímeros (%)	
	Pacientes	Controles
1.J.A.S.	3,8	12,0
2.W.C.S.	13,8	12,5
3.A.P.A.	11,3±0,4	10,0±3,8
4.L.V.S.	6,5	5,0
5.M.W.	14,0	10,5

VI. DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo caracterizar as alterações proteicas da membrana da hemácia em uma população de pacientes com ElH e outras doenças onde também há o aparecimento de eliptócitos.

Naqueles casos com eliptocitose hereditária, três famílias apresentaram o fragmento Sp α I/65, duas famílias o defeito era Sp α I/50-46, em uma família e um paciente houve deficiência de proteína 4.1 e em outra família, a ElH devia-se a uma β -sp "truncada". Em dois casos não foi detectado o defeito proteico através da metodologia empregada neste estudo. As manifestações clínicas variaram desde indivíduos assintomáticos até com anemia grave, dependente de transfusão, embora todos os pacientes apresentassem a forma comum da ElH.

A gravidade da expressão clínica depende, entre outros fatores, do número de genes mutantes (Palek, 1987). Quando a ElH é devido a alterações na espectrina, a gravidade da hemólise pode ser correlacionada com as diferenças quantitativas na porcentagem de dímeros de espectrina (Coetzer et al., 1987; Palek & Lambert, 1990), bem como com o conteúdo total da espectrina na membrana. Os fatores que influenciam estes dois determinantes incluem diferenças funcionais entre as espectrinas mutantes, a quantidade relativa e a estabilidade da espectrina mutante e a possibilidade de um defeito genético sobreposto, envolvendo a síntese de espectrina (Coetzer et al., 1987), como a deficiência parcial de espectrina (Coetzer & Palek, 1986) devido a um defeito de síntese de α -sp descrito recentemente na PPH (Hanspal et al., 1992). A porcentagem de dímeros de espectrina também depende da quantidade de espectrina mutante e do grau de disfunção desta espectrina (Palek & Lambert, 1990). Deste modo, em algumas destas espectrinas mutantes o defeito de auto-associação é muito leve (Sp α I/65), enquanto que em outras é grave (Sp α I/74) (Palek, 1987).

Neste estudo, os defeitos na cadeia α -sp não foram evidenciados pela análise densitométrica das proteínas totais da membrana em SDS-PAGE. De fato, diferente da β -sp apenas em uma minoria de pacientes com ElH, a α -sp anormal pode ser detectada baseada na mudança de mobilidade eletroforética (Palek, 1991).

Nos dois pacientes com Sp α I/50-46, o defeito causou prejuízo na auto-associação de heterodímeros de espectrina, expresso por um aumento dos dímeros de 30 %. Em

ambos os casos, a digestão triptica demonstrou também a presença do fragmento α I/80, embora reduzido, sugerindo heterozigose para o defeito Sp α I/50-46. Este dado foi confirmado no caso 6 (MISL), pois o sequenciamento do *exon* 6 da α -sp demonstrou uma mutação de ponto (CTG→CCG) em um alelo no *codon* 260, responsável pela troca do aminoácido leucina pela prolina. Esta substituição está localizada na hélice 3 da terceira unidade repetida, próxima ao segmento conectante, região esta de grande importância na regulação da função (Palek & Sahr, 1992) e na manutenção da estrutura da hélice tripla. Além disso, aparentemente resíduos de prolina possuem alta propensão para provocar a ruptura na alfa hélice (Gallagher et al., 1992). Corroborando esta hipótese, a maioria das substituições de aminoácidos, descritos na literatura, que originam Sp α I/50-46a (nossa paciente do caso 6) e Sp α I/50-46b são por prolina (Palek & Sahr, 1992). Consequentemente à quebra da estrutura helicoidal há prejuízo na auto-associação de dímeros de espectrina (Tse et al., 1990). Neste trabalho o defeito α I/50-46 levou a um quadro de EIH leve com discreta anemia, provavelmente porque o fragmento preserva a capacidade de formar tetrâmeros de espectrina (Coetzer et al., 1987). Ambos os casos possuíam ascendência negróide, confirmando a observação de Morlé et al. de que os defeitos Sp α I/50-46 são aparentemente confinados à população negra (Morlé et al., 1990).

Com exceção da espectrina Barcelona (469 His-Pro) que é a primeira α I/50-46 (a ou b) descrita em uma família branca (Venezia et al., 1993), os defeitos relacionados a Sp α I/50-46 são heterogêneos e aparentemente confinados à população negra (Marchesi et al., 1987; Sahr et al., 1989; Morlé et al., 1990; Gallagher et al., 1992; Palek & Sahr, 1992). Os indivíduos afetados podem ser assintomáticos ou apresentar hemólise grave requerendo transfusão de sangue. O grau de deficiência de espectrina e o prejuízo na auto-associação de espectrina varia amplamente neste grupo de pacientes (Gallagher et al., 1992). Os sítios de clivagens que conduzem à formação do peptídeo de 50kDa envolvem a arginina 256 ou lisina 258 (Sp α I/50a) que é relativamente comum, distinta de uma forma rara caracterizada pelo sítio de clivagem na arginina 468 ou arginina 470 (Sp α I/50b) (Marchesi et al., 1987; Sahr et al., 1989; Palek & Sahr, 1992).

Embora um grande número de mutações associadas à EIH e PPH foram identificadas na região correspondente a hélice 3 em diferentes repetições do domínio I da cadeia α -espectrina, há descrição de um caso cuja mutação ocorre na hélice 2. A substituição do aminoácido neste caso (207 Leu→Pro), pode romper a conformação local da hélice 2, perturbando a estrutura secundária dentro da unidade helicoidal e, provavelmente, expondo a hélice 3 para uma proteólise aumentada (Gallagher et al., 1992).

Confirmando dados da literatura, os nossos pacientes heterozigotos para Sp α I/65, todos com ascendência negra (casos 3, 8 e 9), eram assintomáticos, apresentavam grande número de eliptócitos no sangue periférico (maior que 60 %) e dímeros discretamente aumentados (caso 3). Por outro lado, o paciente do caso 8 era homozigoto para Sp α I/65, conforme evidenciado pela ausência do fragmento α I/80 e pela pesquisa de heteroduplex. Neste paciente, a manifestação clínica da EIH era exuberante com transfusões freqüentes e necessidade de esplenectomia. Os pais do paciente, primos em primeiro grau, apresentavam o mesmo defeito proteico na forma heterozigótica e eram assintomáticos. Este defeito parece ser o mais leve entre todas as mutações do domínio I da cadeia α -sp do ponto de vista clínico e formação de dímeros de espectrina (Palek & Sahr, 1992) e aparentemente, a gravidade clínica não é proporcional à quantidade de eritrócitos anormais morfológicamente, mas sim à quantidade de heterodímeros formados (Coetzer et al., 1987). O defeito molecular que gera este fragmento anormal na espectrina é homogêneo, consistindo na duplicação do *codon* TTG no *exon* 4 da α -sp, com inserção de uma leucina entre as posições 153 e 154 (de acordo com a nova nomenclatura), na repetição α 2, com clivagem na arginina 137 (Palek & Sahr, 1992). A gravidade do defeito funcional parece depender da hélice tripla afetada. Mutações localizadas em peptídeos diretamente envolvidos no sítio de auto-associação de dímeros de espectrina conduz à completa incapacidade para formar tetrâmeros. Por outro lado, mutações localizadas em hélices triplas longe do sítio de auto-associação conferem redução da afinidade dos dímeros de espectrina, como é observado em casos homozigotos para Sp α I/50-46a ou Sp α I/65 (Gallagher et al., 1992). Segundo Sahr et al., a duplicação da leucina em todos os indivíduos EIH Sp α I/65 provavelmente resulte do fenômeno de pareamento anormal intracromossomal de cromátides irmãs, durante a meiose, em regiões de seqüências curtas repetidas (Sahr et al., 1990a).

Em 1985, dois grupos independentes descobriram esta anormalidade do domínio I da cadeia α -sp (Lawler et al., 1985; Lecomte et al., 1985). O defeito genético desta variante de espectrina é homogêneo à nível de DNA (Sahr et al., 1988; Sahr et al., 1990a; Palek & Lambert, 1990; Palek & Sahr, 1992) e proteína (Palek & Lambert, 1990; Palek & Sahr, 1992). O defeito é relativamente comum na raça negra (Morlé et al., 1990; Palek & Lambert, 1990; Palek & Sahr, 1992), com alta incidência no Centro-Oeste da África sugerindo que a mutação original espalhou-se desta região para a África do Norte e subsequentemente para a América do Norte e Europa (Sahr et al., 1989). É portanto, freqüente nos negros africanos e americanos, no norte da África (Alloisio et al., 1986; Iolascon et al., 1993) e recentemente relatada em brancos italianos (Giudice et al., 1992; Iolascon et al., 1993). A mutação Sp α I/65 parece ser a mais leve entre todas as mutações do domínio α I: a auto-associação de heterodímeros de espectrina é somente levemente

prejudicada e a expressão clínica é leve (Boivin et al., 1990; Coetzer et al., 1990; Palek & Sahr, 1992). Na forma heterozigótica, a EIH é leve mas em homozigose a EIH pode ter gravidade moderada (Palek & Sahr, 1992), com anemia hemolítica leve (Boivin et al., 1990; Coetzer et al., 1990; Palek & Lambert, 1990; Palek & Sahr, 1992) que freqüentemente não requer esplenectomia (Palek & Lambert, 1990). Hemácias contendo espectrina mutante apresentam alguma resistência à malária exibindo uma redução no crescimento do parasita (Facer, 1989; Schulman et al., 1990; Palek & Sahr, 1992). É possível que esta espectrina mutante, assim como outras mutações similares na espectrina, apresentem algum grau de proteção para a invasão pelo parasita da malária (Palek & Sahr, 1992).

O paciente AAD (caso 9), além do fragmento Sp α I/65 apresentou uma proteína anormal de alto peso molecular. É provável que esta proteína seja uma β -espectrina porque há uma diminuição quantitativa na β -espectrina normal, conforme evidenciado pela densitometria de SDS-PAGE. Por outro lado, quando a banda anômala é somada à β -sp normal, os valores da razão de alfa:beta espectrina ficam mais próximos do normal. Recentemente, Johnson et al. (1992) descreveram uma família com uma β -sp com peso molecular estimado de 330 kDa mas cuja migração em SDS-PAGE, semelhante à proteína observada neste estudo, correspondia a 260 kDa e foi designada β Detroit. Esta família, assim como o caso 9, também apresentava EIH devido, provavelmente, ao defeito α I/65 e não correlacionado com a proteína alongada. A associação da anemia e eliptocitose com a β -espectrina alongada foi apenas coincidente. As possibilidades para o aparecimento desta β -sp incluem: a) uma falha no *codon* de terminação; b) uma pré-proteína que não cliva apropriadamente; c) um *crossing-over* meiótico desigual e d) uma falha no mecanismo de clivagem do RNAm. As mais prováveis explicações seriam uma duplicação interna no gene ou uma alteração da clivagem do RNA. Uma clivagem anormal, evento que incorporaria seqüências de *introns* causaria inclusão do domínio normal expresso somente em tecidos não eritróides. Uma falha no mecanismo de clivagem normal do RNAm retira seqüências de *exons* que são normalmente excluídos da β -espectrina eritróide mas são expressas na β -sp não eritróide. A isoforma da espectrina encontrada em músculo é idêntica à espectrina eritróide e as duas são codificadas pelo mesmo gene mas, por clivagem alternativa distinta nos diferentes tecidos, a β -espectrina muscular é maior na região C-terminal, havendo na carboxila terminal *exons* adicionais no gene da β -espectrina (Johnson et al., 1992).

A EIH da família 10 deve-se provavelmente a uma β -sp "truncada". Segundo a literatura, a maioria das mutações na β -sp é identificada com base em sua maior mobilidade eletroforética em SDS-PAGE (Dhermy et al., 1982; Ohanian et al., 1985; Pothier et al., 1987; Eber et al., 1988; Lecomte et al., 1992; Yawata et al., 1990; Garbarz et al., 1991a). Essas mutações resultam em β -sp com menor peso molecular, prejuízo na auto-associação da espectrina (Palek & Sahr, 1992) e aumento da susceptibilidade para a proteólise da lisina 48 da cadeia alfa da espectrina com aumento na formação do peptídeo de 74 kDa da α -sp (Pothier et al., 1987; Palek & Sahr, 1992). Estes fatos foram observados em nossa paciente e em sua mãe. Naqueles casos com a formação do fragmento de 74kDa, a auto-associação de heterodímeros de espectrina é gravemente prejudicada (Coetzer et al., 1987) e observa-se inabilidade dos dímeros em participar da formação de tetrâmero (Tse et al., 1990). De fato, tanto a paciente como sua mãe apresentaram aproximadamente 50% de dímeros de espectrina. Em pacientes homozigotos Sp $\alpha^{I/74}$ kDa, a espectrina apresenta perda completa em se reunir para formar tetrâmeros, acompanhado por uma anemia hemolítica grave, dependente de transfusão e só parcialmente corrigido por esplenectomia (Palek & Lambert, 1990).

Os defeitos que originam o fragmento $\alpha^{I/74}$ pertencem a um grupo heterogêneo de mutações envolvendo a cadeia α ou β da espectrina (Palek & Lambert, 1990); é encontrado em brancos, negros, árabes e melanésios (Palek & Sahr, 1992) e resultam em anormalidades na região da "cabeça" do dímero de espectrina (Morlé et al., 1990). A detecção destas mutações fornece uma base para o modelo de auto-associação da espectrina no qual a última unidade repetida da β -sp situa-se em justaposição direta com a primeira hélice da α -sp (Tse et al., 1990; Palek & Sahr, 1992). Consequentemente, mutações nesta região auxiliam na desestabilização do sítio de clivagem lisina 48 (resultando no peptídeo de 74 kDa) (Palek & Sahr, 1992).

A análise proteica da membrana eritrocitária nos pacientes dos casos 5 e 7 demonstrou uma diminuição quantitativa na proteína 4.1. Esta redução parcial da proteína 4.1 sugere a forma heterozigótica, que costuma estar associada à EIH leve (Palek, 1991; Palek & Sahr, 1992) com ausência de sinais e sintomas (Alloisio et al., 1985b). Embora a deficiência de proteína 4.1 seja mais freqüente na África do Norte (Palek, 1991; Palek & Sahr, 1992), a deficiência parcial desta proteína já foi descrita em várias famílias da França e Estados Unidos (Conboy, 1993). A paciente do caso 5 possui ascendência paterna e materna italiana, enquanto que a paciente do caso 7 apresenta ascendência materna italiana e paterna alemã. Neste último caso, fica evidente a herança autossômica dominante pela transmissão

do defeito para dois filhos. Esta última paciente, diferente do caso 5, apresenta esplenomegalia com história de anemia há muitos anos. Assim, é possível que os defeitos que levaram à deficiência de proteína 4.1 nas pacientes 5 e 7 sejam diferentes do ponto de vista molecular, determinando, consequentemente, manifestações clínicas distintas (Palek, 1991; Palek & Sahr, 1992).

Através da metodologia empregada neste trabalho não foi possível detectar o defeito nos casos 2 e 4. Talvez nestas pacientes, o defeito esteja na glicoforina ou outra proteína cuja alteração ainda não foi descrita.

Analisando-se os dez casos estudados, verificamos que seis destes pacientes, cinco negróides e um caucasoíde, apresentaram defeito na α ou β -sp e na auto-associação de dímeros de espectrina. Tais observações condizem com a literatura, onde anormalidades na cadeia α ou β da espectrina envolvendo a auto-associação de heterodímeros de espectrina são encontrados em 60% dos pacientes com EIH, a maioria da raça negra (Palek, 1991).

Há muito se reconhece alterações da forma de hemácias como eliptocitose, dacriocitose, fragmentação de hemácias e outras, em doenças adquiridas como anemia ferropriva, anemia megaloblástica, leucemia mielóide crônica (LMC) e mielofibrose (Djaldetti et al., 1984; Bull et al., 1990; Lichtman, 1990b).

O estudo da auto-associação dos heterodímeros de espectrina em treze pacientes com *síndromes mieloproliferativas* (seis com mielofibrose e sete com LMC) e variável quantidade de eliptócitos e dacriócitos no sangue periférico, demonstrou o aumento de dímeros em apenas um indivíduo com LMC.

No relato de Basu et al (1988) foi demonstrado, através do fracionamento da espectrina em Sepharose-4B, uma diminuição de tetrâmeros de espectrina em cinco indivíduos com LMC. Assim é possível que outros fatores como a reorganização de outras proteínas do citoesqueleto incluindo a anquirina, proteína 4.2 e banda 5 e a possível distribuição e/ou mobilidade topográfica alterada da banda 3 (Basu et al., 1988) e/ou a diminuição (Kundu et al., 1991; Cohen & Gascard, 1992) ou aumento (Basu et al., 1988) de interação espectrina-actina-proteína 4.1 também contribuam para a formação de eliptócitos.

É importante lembrar que o paciente com diminuição de tetrâmeros de espectrina apresentava uma quantidade não significativa de eliptócitos no esfregaço de sangue periférico (cerca de 2 %), enquanto que nos outros pacientes com LMC e mielofibrose estudados, com número igual ou moderado de eliptócitos (entre 5 a 10 % ou até maior que 10 %), os dímeros estiveram normais, sugerindo, assim como na ELH, que a quantidade de eliptócitos presente não seja o fator principal na identificação de um defeito na auto-associação dos dímeros de espectrina.

Tanto na *anemia megaloblástica* como na *anemia ferropriva*, nenhum dos pacientes apresentou defeito na auto-associação de heterodímeros de espectrina ou alteração quantitativa das proteínas totais da membrana eritrocitária, apesar da quantidade de eliptócitos nos pacientes ser razoável (entre 2 a 10 %). Liu & Palek (1984) verificaram que a presença de moléculas de hemoglobina aumenta a auto-associação dos heterodímeros de espectrina nos eritrócitos humanos. A inibição da transformação de tetrâmeros de espectrina para dímeros é atribuída à hemoglobina intracelular, desde que a adição de hemoglobina em membranas isoladas ou extrato de espectrina bloqueia a conversão de tetrâmeros para dímeros, estabilizando a espectrina no estado tetramérico. A promoção da interação dímero-dímero de espectrina pela hemoglobina, por sua vez, aumenta a estabilidade estrutural do esqueleto da membrana. Proteínas que são carregadas positivamente (por exemplo citocromo c ou hemoglobina) podem se ligar e neutralizar as cadeias de espectrina carregadas negativamente. Isto provavelmente diminui a carga de repulsão entre os grupos da cabeça e estabiliza a associação dímero-dímero de espectrina. Contudo, este efeito eletrostático da hemoglobina sobre a espectrina foi notavelmente reduzido sob condições isotônicas. Assim, é provável que este defeito, exerça um papel secundário na promoção da associação de dímero-dímero sob condições fisiológicas (Liu & Palek, 1984).

Também em cinco pacientes com *anemia falciforme*, não observamos aumento de formação de dímeros de espectrina. Há evidências de que perdas da membrana exercem um papel na patogênese da doença. Em certas circunstâncias, a polimerização intracelular conduz à saída de potássio, acompanhada da perda de água. Há aumento na concentração intracelular da hemoglobina, que acelera a razão na qual a polimerização pode ocorrer. Este círculo vicioso pode conduzir à formação das células irreversivelmente falcizadas (CIF) (Ingram, 1986). Um rearranjo dos lipídios da membrana durante o processo de falcização, sugere uma reorganização permanente dos lipídios na membrana das CIF (Chiu et al., 1979).

Entretanto, a extrema anormalidade da forma das CIF não pode ser explicada apenas pela polimerização da hemoglobina ou por anormalidade na membrana lipídica. A mudança na forma reflete um rearranjo das proteínas de membrana (Ingram, 1986; Lux et al., 1976). O citoesqueleto (espectrina, actina e proteína 4.1) torna-se irreversivelmente deformado (Ingram, 1986). Por outro lado contradizendo hipóteses anteriores, a fosforilação da espectrina em hemácias SS é normal. (Johnson et al., 1986).

Após a ocorrência repetida do fenômeno de falcização e "desfalcização", a hemácia desenvolve espículas terminais (Ingram, 1986; Liu & Derick, 1992). A fragmentação destas espículas formadas principalmente de banda 3, mas não de proteínas do citoesqueleto como a espectrina, conduz à perda da membrana do eritrócito (Ingram, 1986; Liu et al., 1991). Esta perda da membrana pode estar associada com a formação das CIF (Allan et al., 1982).

As hemácias falciformes são mais suscetíveis à lesão oxidativa que a hemácia normal. Esta anormalidade pode ser devido a perda da integridade estrutural da membrana acompanhando o evento de falcização e aumento da taxa de geração de radicais na Hb S (Chiu & Lubin, 1989). Os agentes oxidantes podem oxidar a membrana e também lesar a anquirina. A maior geração de radicais livres nas hemácias falciformes pode interferir com a ligação espectrina-anquirina por lesão oxidativa na anquirina próximo ao sítio de ligação com a espectrina (Platt et al., 1985). Na hemácia falciforme, a proteína 4.1, normalmente associada à glicoforina, possui uma menor capacidade de ligação com a membrana e a banda 3 apresenta menor número de sítios de ligação de alta afinidade da anquirina (Hebbel, 1991).

A deformação irreversível da célula está associada com um rearranjo do esqueleto através da dissociação de tetrâmeros de espectrina para dímeros e uma subsequente reassociação de dímeros para tetrâmeros na nova configuração (deformada). Estes achados podem explicar uma estabilização permanente de células irreversivelmente falcizadas em sua forma anormal "in vivo" (Liu & Derich, 1992; Liu et al., 1993). Assim, é possível que a ausência de alteração na quantidade de dímeros de espectrina, observada em nosso estudo, decorra de um equilíbrio SpT→SpD normal, após o rearranjo do esqueleto.

Os resultados encontrados neste estudo demonstram pela primeira vez as anormalidades moleculares da EIH na população brasileira. Os dados apresentados coincidem com aqueles observados em estudos nos Estados Unidos e Europa, onde 60% dos pacientes com EIH apresentam anormalidades na cadeia α ou β da espectrina envolvendo a região de auto-associação de heterodímeros de espectrina. Em 20% dos

pacientes, todos de origem italiana, a EIH foi conseqüente de deficiência de proteína 4.1. Embora esta deficiência seja mais freqüente em negros, foi também descrita em famílias francesas. Nos demais casos não foram detectados os defeitos proteicos que conduziram à EIH sugerindo que possam ser provocados por anormalidades de glicoforina ou outras proteínas.

O presente trabalho detectou também duas β -espectrinas com mobilidades eletroforéticas alteradas. A β -sp "truncada" detectada no presente estudo, provavelmente é menor que as descritas nos seis casos relatados anteriormente. Por outro lado, a β -sp alongada representa o segundo caso da literatura e ambas apresentam a mesma mobilidade eletroforética.

A auto-associação dos heterodímeros de espectrina apresentou-se alterada em um caso de LMC, mas foi normal em indivíduos com anemias carenciais, anemia falciforme e mielofibrose.

VII. RESUMO

No presente trabalho foram analisados 10 pacientes com EIH e seus familiares através do estudo das proteínas totais em SDS-PAGE (Sistema Fairbanks 3,5-17% e Sistema Laemmli 12%), estudo da auto-associação de heterodímeros de espectrina e digestão triptica da espectrina. Seis destas famílias apresentaram defeito na auto-associação dos heterodímeros de espectrina, sendo dois casos de Sp α I/50-46, três famílias com Sp α I/65 e uma família com uma β -espectrina encurtada, conforme evidenciado por técnica de western-blotting com anticorpo anti- β espectrina. Numa das famílias com Sp α I/65, um dos pacientes apresentou também uma β -espectrina alongada, mas esta associação não determinou maior gravidade da doença ou aumento dos dímeros de espectrina. Uma família e um paciente apresentaram deficiência de proteína 4.1 e em dois casos não foi possível detectar, pela metodologia empregada, o defeito proteico.

Nos pacientes Sp α I/65 kDa a pesquisa de heteroduplex após a amplificação do *exon* 4 do DNA genômico da cadeia alfa da espectrina demonstrou o aparecimento de uma banda com migração retardada nas três famílias estudadas sugerindo a duplicação do *codon* TTG. Em uma paciente Sp α I/50-46 kDa o sequenciamento do *exon* 6 da cadeia α -sp mostrou uma mutação de ponto CTG leu $\rightarrow$ CCG pro em um alelo no *codon* 260. Este é o primeiro estudo das alterações proteicas da EIH na população brasileira. A β -espectrina alongada observada neste trabalho é o segundo caso descrito na literatura enquanto que a β -espectrina "truncada" é, provavelmente, a menor β -sp já descrita.

O estudo da auto-associação dos heterodímeros de espectrina foi também levado a efeito em 26 pacientes com doenças cujo aparecimento de eliptócitos no esfregaço de sangue periférico era freqüente (7 LMC, 6 mielofibrose, 5 anemia ferropriva, 3 anemia megaloblástica e 5 anemia falciforme). Destes, um paciente com LMC apresentou aumento de dímeros de espectrina sugerindo, neste caso, um prejuízo na auto-associação de heterodímeros de espectrina.

VIII. SUMMARY

The aim of this work was to study the protein defects in Hereditary Elliptocytosis (HE) in a Brazilian population and to analyse the self-association of spectrin in patients without HE whose elliptocytes are frequently observed. Red cell membrane of ten patients with HE and their relatives were investigated by SDS-PAGE (Fairbanks' system 3,5-17% and Laemmli's system 12%), by non denaturing gels for spectrin heterodimer self-association study and by the tryptic digestion of spectrin. Six families presented a defect in the spectrin self-association: two had Sp α I/50-46, three with Sp α I/65 and one with a "truncated" β -spectrin as observed by western-blotting using anti- β spectrin antibody. In one family with Sp α I/65, one patient presented also a elongated β -spectrin but this association did not increase the amount of spectrin dimers or the clinical severity of the disease. One family and one patient presented a deficiency of protein 4.1 and in two families, the protein defect was not detected by the approach used in this study.

In the Sp α I/65 kDa patients, the analysis of heteroduplex after amplification of exon 4 of the genomic DNA for the α -spectrin chain revealed the appearance of a slower migrating band in the three families studied suggesting the duplication of codon TTG. In one patient with Sp α I/50-46 kDa the sequencing of exon 6 of the α -sp chain showed a point mutation CTG leu $\rightarrow$ CCG pro in an allele in codon 260.

As far as we know, this is the first study of red cell membrane in hereditary elliptocytosis in a Brazilian population. The elongated β -spectrin observed in this study is the second case described in the literature and the truncated β -spectrin probably corresponds to the smaller β -sp already described.

The study of the spectrin heterodimer self-association was also performed in 26 patients with diseases in which elliptocytes are frequently observed in peripheral blood smears (7 CML, 6 myelofibrosis, 5 iron deficiency anemia, 3 megaloblastic anemia and 5 sickle cell disease). Only one patient with CML had increased levels of the spectrin dimer, which suggested a defect in the spectrin heterodimer self-association.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allan D, Limbrick AR, Thomas P and Westerman MP. Release of spectrin-free spicules on reoxygenation of sickled erythrocytes. *Nature* 295: 612-613, 1982.
- Alloisio N, Morlé L, Bachir D, Guetarni D, Colonna P and Delaunay J. Red cell membrane sialoglycoprotein β in homozygous and heterozygous 4.1 (-) hereditary elliptocytosis. *Biochim Biophys Acta* 816: 57-62, 1985a.
- Alloisio N, Morlé L, Dorléac E, Gentilhomme O, Bachir D, Guetarni D, Colonna P, Bost M, Zouaoui Z, Roda L, Roussel D and Delaunay J. The heterozygous form of 4.1 (-) hereditary elliptocytosis [the 4.1 (-) trait]. *Blood* 65: 46-51, 1985b.
- Alloisio N, Guetarni D, Morlé L, Pothier B, Ducluzeau MT, Soun A, Colonna P, Clere M, Philippe N, Delaunay J. Sp α ^{I/65} hereditary elliptocytosis in North Africa. *Am J Hematol* 23: 113-122, 1986.
- Alloisio N, Morlé L, Pothier B, Roux A-F, Maréchal J, Ducluzeau M-T, Benhadji-Zouaoui Z and Delaunay J. Spectrin Oran (α ^{II/21}), a new spectrin variant concerning the α II domain and causing severe elliptocytosis in the homozygous state. *Blood* 71: 1039-1047, 1988.
- Alloisio N, Wilmotte R, Morlé L, Baklouti F, Maréchal J, Ducluzeau M-T, Denoroy L, Féo C, Forget BG, Kastally R and Delaunay J. Spectrin Jendouba: an α ^{II/31} spectrin variant that is associated with elliptocytosis and carries a mutation distant from the dimer self-association site. *Blood* 80: 809-815, 1992.
- Amin KM, Scarpa AL, Winkelmann JC, Curtis PJ and Forget BG. The exon-intron organization of the human erythroid β -spectrin gene. *Genomics* 18: 118-125, 1993.
- Babior BM. The megaloblastic anemias. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA eds. *Hematology 4th ed.*, New York, McGraw-Hill, 453-481, 1990.
- Baklouti F, Maréchal J, Wilmotte R, Alloisio N, Morlé L, Ducluzeau MT, Denoroy L, Mrad A, Ben Aribia MH, Rastally R and Delaunay J. Elliptocytogenic α ^{I/36} spectrin sfax lacks nine amino acids in helix 3 of repeat 4. Evidence for the activation of a cryptic 5'-splice site in exon 8 of spectrin α -gene. *Blood* 79: 2464-2470, 1992.
- Basu J, Kundu M, Rakshit MM and Chakrabarti P. Abnormal erythrocyte membrane cytoskeleton structure in chronic myelogenous leukaemia. *Biochim Biophys Acta* 945: 121-126, 1988.
- Bennett V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim Biophys Acta* 988: 107-121, 1989.
- Bennett V. Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiol Rev* 70: 1029-1065, 1990.

- Beutler E. The sickle cell diseases and related disorders. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA eds. *Hematology 4th ed.*, New York, McGraw-Hill, 613-644, 1990.
- Boivin P, Lecomte MC, Garbarz M, Féo C, Bournier O, Devaux I, Galand C, Gautero H, Dhermy D. Clinical expression of spectrin α I variants. In: Cohen CM, Palek J (eds). Cellular and molecular biology of normal and abnormal erythroid membranes. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series 118*. New York, NY, Wiley-Liss, 235, 1990. cit.: Palek J and Sahr KE. Mutations of the red blood cell membrane proteins: from clinical evaluation to detection of the underlying genetic defect. *Blood 80*: 308-330, 1992.
- Bretscher MS. Membrane structure: some general principles. *Science 181*: 622-629, 1973.
- Bull BS, Breton-Gorius J and Beutler E. Morphology of the erythron. In Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA eds. *Hematology 4th ed.*, New York, McGraw-Hill, 297-316, 1990.
- Chang K, Williamson JR, Zarkowsky HS. Effect of heat on the circular dichroism of spectrin in hereditary pyropoikilocytosis. *J Clin Invest 64*: 326-328, 1979.
- Chiu D, Lubin B and Shohet SB. Erythrocyte membrane lipid reorganization during the sickling process. *Br J Haematol 41*: 233-234, 1979.
- Chiu D and Lubin B. Oxidative hemoglobin denaturation and RBC destruction: the effect of heme on red cell membranes. *Semin Hematol 26*: 128-135, 1989.
- Cline MJ and Ahuja H. Oncogenes. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA eds. *Hematology 4th ed.*, New York, McGraw-Hill, 89-94, 1990.
- Coetzer T and Zail SS. Tryptic digestion of spectrin in variants of hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest 67*: 1241-1248, 1981.
- Coetzer T and Palek J. Partial spectrin deficiency in hereditary pyropoikilocytosis. *Blood 67*: 919-924, 1986.
- Coetzer T, Lawler J, Prchal JT and Palek J. Molecular determinants of clinical expression of hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis. *Blood 70*: 766-772, 1987.
- Coetzer T, Lawler J, Jarolim P and Palek J. Structural and functional heterogeneity of α -spectrin mutants in hereditary elliptocytosis/pyropoikilocytosis. *Blood 72*: 38a (Suppl 1), 1988.

- Coetzer T, Palek J, Lawler J, Liu SC, Jarolim P, Lahav M, Prchal JT, Wang W, Alter BP, Schewitz G, Mankad V, Gallanello R, Cao A. Structural and functional heterogeneity of α spectrin mutations involving the spectrin heterodimer self-association site: relationships to hematologic expression of homozygous hereditary elliptocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Blood* 75: 2235-2244, 1990.
- Coetzer TL, Sahr K, Prchal J, Blacklock H, Peterson LA, Koler R, Doyle J, Manaster J and Palek J. Four different mutations in codon 28 of α spectrin are associated with structurally and functionally abnormal spectrin α I⁷⁴ in hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest* 88: 743-749, 1991.
- Cohen CM and Gascard P. Regulation and post-translational modification of erythrocyte membrane and membrane-skeletal proteins. *Semin Hematol* 29: 244-292, 1992.
- Conboy J, Kan YW, Shohet SB and Mohandas N. Molecular cloning of protein 4.1, a major structural element of the human erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9512-9516, 1986a.
- Conboy J, Mohandas N, Tchernia G and Kan YW. Molecular basis of hereditary elliptocytosis due to protein 4.1 deficiency. *N Engl J Med* 315: 680-685, 1986b.
- Conboy J, Marchesi S, Kim R, Agre P, Kan YW and Mohandas N. Molecular analysis of insertion/deletion mutations in protein 4.1 in elliptocytosis. *J Clin Invest* 86: 524-530, 1990.
- Conboy JG, Chasis JA, Winardi R, Tchernia G, Kan YW, Mohandas N. Tissue-specific deficiency of protein 4.1 as a consequence of usage of an alternative translation initiation site. *Blood* 78: 365a (Abstr, Suppl 1), 1991.
- Conboy JG. Structure, function, and molecular genetics of erythroid membrane skeleton protein 4.1 in normal and abnormal red blood cells. *Semin Hematol* 30: 58-73, 1993.
- Cook PJJ, Noades JE, Lomas CG, Buckton KE and Robinson EB. Exclusion mapping illustrated by the MNSs blood group system. *Ann Hum Genet* 44: 61-73, 1980.
- Correas I, Speicher DW and Marchesi VT. Structure of the spectrin-actin binding site of erythrocyte protein 4.1. *J Biol Chem* 261: 13362-13366, 1986.
- Dacie JV and Lewis SM. *Practical Haematology 6th ed.*, New York, Churchill Livingstone, 1984.
- Dalla Venezia N, Alloisio N, Forissier A, Denoroy L, Aymerich M, Vives-Corrons JL, Besalduch J, Besson I and Delaunay J. Elliptopoikilocytosis associated with the α 469 His $\rightarrow$ Pro mutation in spectrin Barcelona (α I^{50-46b}). *Blood* 82: 1661-1665, 1993.

- Daniels GL, Shaw M-A, Judson PA, Reid ME, Anstee DJ, Colpitts P, Cornwall S, Moore BPL and Lee S. A family demonstrating inheritance of the Leach phenotype: a Gerbich-negative phenotype associated with elliptocytosis. *Vox Sang* 50: 117-121, 1986.
- Delaunay J, Alloisio N, Morlé L, Pothier B. The red cell skeleton and its genetic disorders. *Mol Asp Med* 11: 161-241, 1990.
- Delaunay J, Alloisio N, Morlé L and Baklouti F. The genetic disorders of the red cell skeleton. *XIe Congrès de la Société Française d'Hématologie*: 63-70, 1991.
- Delaunay J and Dhermy D. Mutations involving the spectrin heterodimer contact site: clinical expression and alterations in specific function. *Semin Hematol* 30: 21-33, 1993.
- Dhermy D, Lecomte MC, Garbarz M, Bournier O, Galand C, Gauthero H, Féo C, Alloisio N, Delaunay J and Boivin P. Spectrin β -chain variant associated with hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest* 70: 707-715, 1982.
- Dhermy D. The spectrin super family. *Biol Cell* 71: 249-254, 1991.
- Djaldetti M, Cohen A and Hart J. Elliptocytosis preceding myelofibrosis in a patient with polycythemia vera. *Acta Haematol* 72: 26-28, 1984.
- Dodge JT, Mitchell C and Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristics of haemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 100: 119-130, 1963.
- Dresbach M. Elliptical human red corpuscles. *Science* 19: 469-470, 1904. cit.: Palek J. Hereditary elliptocytosis and related disorders. *Clin Haematol* 14: 45-87, 1985.
- Eber SW, Morris SA, Schröter W, Gratzer WB. Interactions of spectrin in hereditary elliptocytes containing truncated spectrin β -chains. *J Clin Invest* 81: 523-530, 1988.
- Erslev AJ. Reticulocyte Enumeration. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA eds. *Hematology 4th ed.*, New York, McGraw-Hill, 1702-1703, 1990.
- Evans EA and Mohandas N. Membrane-associated sickle hemoglobin: a major determinant of sickle erythrocyte rigidity. *Blood* 70: 1443-1449, 1987.
- Facer CA. Malaria, hereditary elliptocytosis, and pyropoikilocytosis. *Lancet* i 8643: 897, 1989.
- Fairbanks G, Steck TL and Wallach DFH. Electrophoretic analysis of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10: 2606-2614, 1971.

- Fairbanks VF and Beutler E. Iron deficiency. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA eds. *Hematology 4th ed*, New York, McGraw-Hill, 482-505, 1990.
- Feddal S, Hayette S, Baklouti F, Rimokh R, Wilmotte R, Magaud JP, Maréchal J, Benz Jr EJ, Girot R, Delaunay J and Morlé J. Prevalent skipping of an individual exon accounts for shortened protein 4.1 Presles. *Blood* 80: 2925-2930, 1992.
- Fischer S, Nagel RL, Bookchin RM, Roth Jr EF and Tellez-Nagel I. The binding of hemoglobin to membranes of normal and sickle erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 375: 422-433, 1975.
- Floyd PB, Gallagher PG, Valentino LA, Davis M, Marchesi SL, Forget BG. Heterogeneity of the molecular basis of hereditary pyropoikilocytosis and hereditary elliptocytosis associated with increased levels of the spectrin α I/74-kilodalton tryptic peptide. *Blood* 78: 1364-1372, 1991.
- Forget BG, Chang J-G, Coupal E, Stanislovitis P, Costa FF, Winkelmann JC, Agre PC, Marchesi VT and Watkins PC. Molecular genetics of the human β -spectrin gene. *Trans Assoc Am Phys* 101: 149-154, 1988.
- Fukushima Y, Byers MG, Watkins PC, Winkelmann JC, Forget BG and Shows TB. Assignment of the gene for β -spectrin (SPTB) to chromosome 14q23 $\rightarrow$ q24.2 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53: 232-233, 1990.
- Gallagher PG, Tse WT, Costa FF, Scarpa A, Boivin P, Delaunay J and Forget BG. A splice site mutation of the β -spectrin gene causing exon skipping in hereditary elliptocytosis associated with a truncated β -spectrin chain. *J Biol Chem* 266: 15154-15159, 1991.
- Gallagher PG, Tse WT, Coetzer T, Lecomte M-C, Garbarz M, Zarkowsky HS, Baruchel A, Ballas SK, Dhermy D, Palek J and Forget BG. A common type of the spectrin α I 46-50a-kD peptide abnormality in hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis is associated with a mutation distant from the proteolytic cleavage site. *J Clin Invest* 89: 892-898, 1992.
- Gallagher PG and Forget BG. Spectrin genes in health and disease. *Semin Hematol* 30: 4-20, 1993.
- Gallagher PG, Roberts WE, Benoit L, Speicher DW, Marchesi L and Forget BG. Poikilocytic hereditary elliptocytosis associated with spectrin Alexandria: an α I/50b Kd variant that is caused by a single amino acid deletion. *Blood* 82: 2210-2215, 1993.

- Garbarz M, Lecomte MC, Devaux I, Dhermy D, d'Auriol L, Boivin P and Grandchamp B. The DNA's from HE and HPP related patients with the spectrin α I/78 kD variant contains a single base substitution in exon-3 of the α spectrin gene. *Blood* 72: 41a (Abstr, Suppl 1), 1988. cit.: Delaunay J, Alloisio N, Morlé L and Pothier B. The red cell skeleton and its genetic disorders. *Mol Asp Med* 11: 161-241, 1990.
- Garbarz M, Lecomte MC, Féo C, Devaux I, Picat C, Lefebvre C, Galibert F, Gautero H, Bournier O, Galand C, Forget BG, Boivin P, Dhermy D. Hereditary pyropoikilocytosis and elliptocytosis in a white French family with the spectrin α I/74 variant related to a CGT to CAT codon change (Arg to His) at position 22 of the spectrin α I domain. *Blood* 75: 1691-1698, 1990.
- Garbarz M, Feldman L, Boulanger L, Lecomte MC, Gautero H, Galand C, Boivin P, Dhermy D. Molecular basis of spectrin Tandil, a shortened β spectrin variant associated with hereditary elliptocytosis. *Blood* 78: 84a (Abstr, Suppl 1), 1991a.
- Garbarz M, Tse WT, Gallagher PG, Picat C, Lecomte MC, Galibert F, Dhermy D, Forget BG. Spectrin Rouen (β 220/218), a novel shortened β -chain variant in a kindred with hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest* 88: 76-81, 1991b.
- Garbarz M, Boulanger L, Pedroni S, Lecomte MC, Gautero H, Galand C, Boivin P, Feldman L and Dhermy Didier. Spectrin β Tandil, a novel shortened β -chain variant associated with hereditary elliptocytosis is due to a deletional frameshift mutation in the β -spectrin gene. *Blood* 80: 1066-1073, 1992.
- Giudice EM del, Ducluzeau MT, Alloisio N, Wilmotte R, Delaunay J, Perrotta S, Cutillo S, Iolascon A. α I/65 hereditary elliptocytosis in southern Italy: evidence for an African origin. *Hum Genet* 89: 553-556, 1992.
- Hadley TJ, Klotz FW, Anstee DJ and Miller LH. Invasion of erythrocytes deficient in glycophorin C (β , β 1 and γ) by *P. falciparum* malaria parasites. *Blood* 72: 27a (Suppl 1), 1988.
- Hanspal M, Hanspal JS, Kalraiya R, Liu S-C, Sahr KE, Haward D and Palek J. Asynchronous synthesis of membrane skeletal proteins during terminal maturation of murine erythroblasts. *Blood* 80: 530-539, 1992.
- Hartz JW, Buss DH, Whitt DR, Bond MG, Scharyj M. Marked elliptocytosis and schistocytosis in hematopoietic dysplasia. *Am J Clin Pathol* 82: 354-359, 1984.
- Hebbel RP. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood* 77: 214-237, 1991.

- Huebner K, Palumbo AP, Isobe M, Kozak CA, Monaco S, Rovera G, Croce CM and Curtis PJ. The α -spectrin gene is on chromosome 1 in mouse and man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3790-3793, 1985.
- Hunter WC, Adams RB. Hematologic study of three generations of a white family showing elliptical erythrocytes. *Ann Intern Med* 2: 1162-1174, 1929. cit.: Palek J. Hereditary elliptocytosis and related disorders. *Clin Haematol* 14: 45-87, 1985.
- Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle haemoglobin. *Nature* 180: 326-328, 1957.
- Ingram V. Sickle cell disease-molecular and cellular pathogenesis. In: Bunn HF and Forget BG. *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*. Philadelphia WB. Saunders Company, 452-564, 1986.
- Iolascon A, Giudice EM del, Perrotta S, Pinto L, Cutillo S. A rapid method for the detection of alpha ¹⁶⁵ hereditary elliptocytosis. *Acta Haematol* 89: 52-53, 1993.
- Jarolim P, Palek J, Amato D, Hassan K, Sapak P, Nurse GT, Rubin HL, Zhai S, Sahr KE and Liu S-C. Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria - resistant Southeast Asian Ovalocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11022-11026, 1991.
- Johnson RM, Dzandu JK, Warth JA. The phosphoproteins of the sickle erythrocyte membrane. *Arch Biochem Biophys* 244: 202-210, 1986.
- Johnson RM, Ravindranath Y, Brohn F and Hussain M. A large erythroid spectrin β -chain variant. *Br J Haematol* 80: 6-14, 1992.
- Kanzaki A, Rabodonirina M, Yawata Y, Wilmotte R, Wada H, Ata K, Yamada O, Akatsuka J, Iyori H, Horiguehi M, Nakamura H, Mishima T, Morlé L and Delaunay J. A deletional frameshift mutation of the β -spectrin gene associated with elliptocytosis in spectrin Tokyo ($\beta^{220/216}$). *Blood* 80: 2115-2121, 1992.
- Keats BJB. Another elliptocytosis locus on chromosome 17. *Hum Genet* 50: 227-230, 1979.
- Koenig M, Monaco AP and Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53: 219-228, 1988.
- Kopito RR, Andersson M and Lodish HF. Structure and organization of the murine band 3 gene. *J Biol Chem* 262: 8035-8040, 1987.
- Korsgren C, Lawler J, Lambet S, Speicher D and Cohen CM. Complete amino acid sequences and homologies of human erythrocyte membrane protein 4.2. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 613-617, 1990.

- Kumar A and Gupta CM. Red cell membrane abnormalities in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 303: 632-633, 1983.
- Kundu M, Basu J, Rakshit M and Chakrabarti P. Abnormalities in erythrocyte membrane band 3 in chronic myelogenous leukemia. *Biochim Biophys Acta* 985: 97-100, 1989.
- Kundu M, Basu J, Fujimagari M, Williamson P, Schlegel RA and Chakrabarti P. Altered erythrocyte protein kinase C activity and membrane protein phosphorylation in chronic myelogenous leukemia. *Biochim Biophys Acta* 1096: 205-208, 1991.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227: 680-686, 1970.
- Lambert S and Zail S. Partial deficiency of protein 4.1 in hereditary elliptocytosis. *Am J Hematol* 26: 263-272, 1987.
- Lambert S, Yu HI, Prchal JT, Lawler J, Ruff P, Speicher D, Cheung MC, Kan YW and Palek J. A cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1730-1734, 1990.
- Lawler J, Coetzer TL, Palek J, Jacob HS and Luban N. Sp $\alpha^{1/65}$: a new variant of the α subunit of spectrin in hereditary elliptocytosis. *Blood* 66: 706-709, 1985.
- Lecomte MC, Dhermy D, Solis C, Ester A, Féo C, Gautero H, Bournier O and Boivin P. A new abnormal variant of spectrin in black patients with hereditary elliptocytosis. *Blood* 65: 1208-1217, 1985.
- Lecomte MC, Garbarz M, Grandchamp B, Féo C, Gautero H, Devaux I, Bournier O, Galand C, d'Auriol L, Galibert F, Sahr KE, Forget BG, Boivin P, Dhermy D. Sp $\alpha^{1/78}$: a mutation of the α I spectrin domain in a white kindred with HE and HPP phenotypes. *Blood* 74: 1126-1133, 1989.
- Lecomte MC, Dhermy D, Gautero H, Bournier O, Galand C, Boivin P. L'elliptocytose héréditaire en Afrique de l'Ouest: fréquence et répartition des variants de la spectrine. *C R Acad Sci Paris* 306: 43-46, 1988. cit.: Palek J and Lambert S. Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol* 27: 290-332, 1990.
- Lecomte MC, Gautero H, Bournier O, Galand C, Lahary A, Vannier JP, Garbarz M, Delaunay J, Tchernia G, Boivin P and Dhermy D. Elliptocytosis-associated Spectrin Rouen β ($^{220/218}$) has a truncated but still phosphorylatable β chain. *Br J Haematol* 80: 242-250, 1992.
- Lichtman MA. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA eds. *Hematology 4th ed.*, New York, McGraw-Hill, 202-223, 1990a.

- Lichtman MA. Agnogenic myeloid metaplasia. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA eds. *Hematology 4th ed*, New York, McGraw-Hill, 223-232, 1990b.
- Liu S-C and Palek J. Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons. *Nature* 285: 586-588, 1980.
- Liu S-C, Palek J, Prchal J. and Castleberry RP. Altered spectrin dimer-dimer association and instability of erythrocyte membrane skeletons in hereditary pyropoikilocytosis. *J Clin Invest* 68: 597-605, 1981.
- Liu S-C and Palek J. Hemoglobin enhances the self-association of spectrin heterodimers in human erythrocytes. *J Biol Chem* 259: 11556-11562, 1984.
- Liu S-C, Zhai S, Palek J, Golan DE, Amato D, Hassan K, Nurse GT, Babona D, Coetzer T, Jarolim P, Zaik M and Borwein S. Molecular defect of the band 3 protein in Southeast Asian Ovalocytosis. *N Engl J Med* 323: 1530-1538, 1990.
- Liu S-C, Derick LH, Zhai S and Palek J. Uncoupling of the spectrin - based skeleton from the lipid bilayer in sickled red cells. *Science* 252: 574-576, 1991.
- Liu S-C and Derick LH. Molecular anatomy of the red blood cell membrane skeleton: structure-function relationships. *Semin Hematol* 29: 231-243, 1992.
- Liu S-C, Derick LH and Palek J. Dependence of the permanent deformation of red blood cell membranes on spectrin dimer-tetramer equilibrium: implication for permanent membrane of irreversibly sickled cells. *Blood* 81: 522-528, 1993.
- Lorenzo F, Giudice EM del, Alloisio N, Morlé L, Forissier A, Perrotta S, Sciarratta G, Iolascon A and Delaunay J. Severe poikilocytosis associated with a *de novo* $\alpha 28$ Arg $\rightarrow$ Cys mutation in spectrin. *Br J Haematol* 83: 152-157, 1993.
- Lovric VA, Walsh RJ, Bradley MA. Hereditary elliptocytosis: genetic linkage with the Rh chromosome. *Aust Ann Med* 14: 162-166, 1965. cit.: Conboy J, Mohandas N, Tchernia G and Kan YW. Molecular basis of the hereditary elliptocytosis due to protein 4.1 deficiency. *N Engl J Med* 315: 680-685, 1986.
- Lux SE, John KM and Karnovski MJ. Irreversible of the spectrin-actin lattice in irreversibly sickled cells. *J Clin Invest* 58: 955-963, 1976.
- Lux SE. Hereditary defects in the membrane or metabolism of the red cel. In: Cecil. *Textbook of Medicine 18th ed*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, 909-917, 1988.

- Lux SE, Tse WT, Menninger JC, John KM, Harris P, Shalev O, Chilcote RR, Marchesi SL, Watkins PC, Bennett V, McIntosh S, Collins FS, Francke U, Ward DC and Forget B. Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8. *Nature* **343**: 736-739, 1990.
- Lux SE, John KM, Kopito RR and Lodish HF. Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1). *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9089-9093, 1989.
- Mai TT, Potter WT, Brandt PJ, Norman JA, Benson ES, Rosenberg A. Spectrin binding to band 4.1: the influence of 2,3 diphosphoglycerate on the red cell cytoskeleton. *Blood* **72**: 31a (Suppl 1), 1988.
- Marchesi S, Knowles WJ, Morrow JS, Bologna M and Marchesi VT. Abnormal spectrin in hereditary elliptocytosis. *Blood* **67**: 141-151, 1986.
- Marchesi SL, Letsinger JT, Speicher DW, Marchesi VT, Agre P, Hyun B and Gulati G. Mutant forms of spectrin α -subunits in hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest* **80**: 191-198, 1987.
- Marchesi SL, Letsinger JT, Agre PA, McGuire M and Speicher DW. Characterization of high and low molecular weight variants of protein 4.1 associated with elliptocytosis. *Blood* **72**: 31a (Suppl 1), 1988.
- Marchesi SL, Conboy J, Agre P, Letsinger JT, Marchesi VT, Speicher DW, Mohandas N. Molecular analysis of insertion/deletion mutations in protein 4.1 elliptocytosis. I. Biochemical identification of rearrangements in the spectrin/actin binding and functional characterizations. *J Clin Invest* **86**: 516-523, 1990.
- Marotta CA, Wilson JT, Forget BG and Weissman SM. Human β -globin messenger RNA. III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA. *J Biol Chem* **252**: 5040-5051, 1977.
- Matovcik LM and Mentzer WC. The membrane of the human neonatal red cell. *Clin Haematol* **14**: 203-221, 1985.
- Mattei MG, Colin Y, LeVankim C, Mattei JF and Cartron JP. Localization of the gene for human erythrocyte glycophorin C to chromosome 2, q14-q21. *Hum Genet* **74**: 420-422, 1986.
- McGuire M, Smith BL and Agre P. Distinct variants of erythrocyte protein 4.1 inherited in linkage with elliptocytosis and Rh type in three white families. *Blood* **72**: 287-293, 1988.

- Metzenberg AB and Gitschier J. The gene encoding the palmitoylated erythrocyte membrane protein, p55, originates at the CpG island 3' to the factor VIII gene. *Hum Mol Genet* 1: 97-101, 1992.
- Morlé L, Morlé F, Roux AF, Godet J, Forget BG, Denoroy L, Garbarz M, Dhermy D, Kastally R, Delaunay J. Spectrin Tunis (Sp α I⁷⁸), an elliptocytogenic variant, is due to the CGG→TGG codon change (Arg→Trp) at position 35 of the α I domain. *Blood* 74: 828-832, 1989.
- Morlé L, Roux A-F, Alloisio N, Pothier B, Starck J, Denoroy L, Morlé F, Rudigoz R-C, Forget BG, Delaunay J and Godet J. Two elliptocytogenic α I⁷⁴ variants of the spectrin α I domain. Spectrin Culoz (GGT→GTT; α I 40 Gly→Val) and Spectrin Lyon (CTT→TTT; α I 43 Leu→Phe). *J Clin Invest* 86: 548-554, 1990.
- Morrow JS, Speicher DW, Knowles WJ, Hsu CJ and Marchesi VT. Identification of functional domains of human erythrocyte spectrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6592-6596, 1980.
- Morton NE. The detection and estimation of linkage between the genes for elliptocytosis and the Rh blood type. *Am J Hum Genet* 8: 80-96, 1956.
- Ohanian V, Evans JP, Gratzer WB. A case of elliptocytosis associated with a truncated spectrin chain. *Br J Haematol* 61: 31-39, 1985.
- Palek J, Liu S-C, Liu P-Y, Prchal J and Castleberry RP. Altered assembly of spectrin in red cell membranes in hereditary pyropoikilocytosis. *Blood* 57: 130-139, 1981.
- Palek J and Lux S. Red cell membrane skeletal defects in hereditary and acquired hemolytic anemias. *Semin Hematol* 20: 189-224, 1983.
- Palek J. Hereditary elliptocytosis and related disorders. *Clin Haematol* 14: 45-87, 1985.
- Palek J. Hereditary elliptocytosis, spherocytosis and related disorders: consequences of a deficiency or a mutation of membrane skeletal proteins. *Blood Rev* 1: 147-168, 1987.
- Palek J. Hereditary elliptocytosis and Related disorders. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. eds. *Hematology 4th ed.*, New York, McGraw-Hill, 569-581, 1990.
- Palek J and Lambert S. Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin Hematol* 27: 290-332, 1990.
- Palek J. Red cell membrane disorders. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ eds. *Hematology - Basic Principles and Practice. 1st ed.*, New York, Churchill Livingstone, 472-504, 1991.

- Palek J and Sahr KE. Mutations of the red blood cell membrane proteins: from clinical evaluation to detection of the underlying genetic defect. *Blood* 80: 308-330, 1992.
- Palek J. Red blood cell membrane proteins, their genes and mutations. *Semin Hematol* 30: 1-3, 1993.
- Peters LL and Lux SE. Ankyrins: structure and function in normal cells and hereditary spherocytes. *Semin Hematol* 30: 85-118, 1993.
- Platt OS, Falcone JF and Lux SE. Molecular defect in sickle erythrocyte skeleton: abnormal spectrin binding to sickle inside-out vesicles. *J Clin Invest* 75: 266-271, 1985.
- Platt OS and Falcone JF. Membrane protein lesions in erythrocytes with Heinz bodies. *J Clin Invest* 82: 1051-1058, 1988.
- Pothier B, Morlé L, Alloisio N, Ducluzeau MT, Caedani C, Féo C, Garbarz M, Chaveroche I, Dhermy D, Lecomte MC, Boivin P and Delaunay J. Spectrin Nice ($\beta^{220/216}$): a shortened β -chain variant associated with an increase of the $\alpha^{1/74}$ fragment in a case of elliptocytosis. *Blood* 69: 1759-1765, 1987.
- Prchal JT, Morley BJ, Yoon S-H, Coetzer TL, Palek J, Conboy JG and Kan YW. Isolation and characterization of cDNA clones for human erythrocyte β -spectrin. *Proc Nat Acad Sci USA* 84: 7468-7472, 1987.
- Rahuel C, London J, d'Auriol L, Mattei MG, Tournamille C, Skrzynia C, Lebouc Y, Galibert F and Cartron JP. Characterization of cDNA clones for human glycophorin A. Use for gene localization and for analysis of normal and glycophorin-A-deficient (Finnish type) genomic DNA. *Eur J Biochem* 172: 147-153, 1988.
- Roux A-F, Morlé F, Guetarni D, Colonna P, Sahr K, Forget BG, Delaunay J and Godet J. Molecular basis of sp $\alpha^{1/65}$ hereditary elliptocytosis in north Africa: insertion of a TTG triplet between codons 147 and 149 in the α -spectrin gene from five unrelated families. *Blood* 73: 2196-2201, 1989.
- Ruff P, Speicher DW and Husain-Chishti A. Molecular identification of a major palmitoylated erythrocyte membrane protein containing the *src* homology 3 motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6595-6599, 1991.
- Rummens JL, Verfaillie C, Criel A, Hidajat M, Vanhoof A, Berghe HV den, Louwagie A. Elliptocytosis and schistocytosis in myelodysplasia: report of two cases. *Acta Haematol* 75: 174-177, 1986.
- Sahr KE, Garbarz M, Boivin P, Laughinghouse K, Marchesi SL and Forget BG. Use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of mutations causing hereditary elliptocytosis. *Blood* 72: 34a (Suppl 1), 1988.

- Sahr KE, Tobe T, Scarpa A, Laughinghouse K, Marchesi SL, Agre P, Linnenbach AJ, Marchesi VT and Forget BG. Sequence and exon-intron organization of the DNA encoding the α I domain of human spectrin. *J Clin Invest* 84: 1243-1252, 1989.
- Sahr KE, Garbarz M, Dhermy D, Lecomte MC, Boivin P, Agre P, Laughinghouse K, Scarpa A, Coetzer T, Palek J, Marchesi SL and Forget BG. Use of the polymerase chain reaction for the detection and characterization of mutations causing hereditary elliptocytosis. In: Cohen CM, Palek J (eds): *Cellular and Molecular Biology of Normal and Abnormal erythroid membranes*, New York, NY, Wiley-Liss, 201-210, 1990a.
- Sahr KE, Laurila P, Kotula L, Scarpa AL, Coupal E, Leto TL, Linnenbach AJ, Winkelmann JC, Speicher DW, Marchesi VT, Curtis PJ and Forget BG. The complete cDNA and polypeptide sequence of human erythroid alfa spectrin. *J Biol Chem* 265:4434-4443, 1990b.
- Saiki RK, Geelfond DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988.
- Schrier SL. Red cell membrane biology- Introduction. *Clin Haematol* 14: 1-12, 1985.
- Schulman S, Roth EF Jr, Cheng B, Rybicki AC, Sussman II, Wong M, Wang W, Ranney HM, Nagel RL, Schwartz RS. Growth of *Plasmodium falciparum* in human erythrocytes containing abnormal membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7339-7343, 1990.
- Shahbakhti F and Gratzer WB. Analysis of the self-association of human red cell spectrin. *Biochemistry* 25: 5969-5975, 1986.
- Shaklai N, Yguerabide J and Ranney HM. Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane. *Biochemistry* 16: 5593-5597, 1977.
- Sheetz MP and Casaly J. 2,3 Diphosphoglycerate and ATP dissociate erythrocyte membrane skeletons. *J Biol Chem* 255: 9955-9960, 1980.
- Shohet SB and Beutler E. The red cell membrane. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA eds. *Hematology 4st ed.*, New York, McGraw-Hill, 368-377, 1990.
- Showe LC, Ballantine M, Huebner K. Localization of the gene for the erythroid anion exchange protein, band 3 (EMPB 3), to human chromosome 17. *Genomics* 1: 71-76, 1987. In: Tanner MJA. Molecular and cellular biology of the erythrocyte anion exchanger (AE 1). *Semin Hematol* 30: 34-57, 1993.
- Siegel DL and Branton D. Partial purification and characterization of an actin-bundling protein band 4.9 from human erythrocytes. *J Cell Biol* 100: 775-785, 1985.

- Speicher DW and Marchesi VT. Erythrocyt spectrin is composed of many homologous triple helical segments. *Nature* **311**: 177-180, 1984.
- Tanner MJA, Martin PG and High S. The complete amino acid sequence of human erythrocyte membrane anion-transport protein deduced from the cDNA sequence. *Biochem J* **256**: 703-712, 1988.
- Tanner MJA. Molecular and cellular biology of the erythrocyte anion exchanger (AE 1). *Semin Hematol* **30**: 34-57, 1993.
- Telen MJ, Levankim C, Chung A, Cartron J-P, Colin Y. Varying molecular basis of elliptocytosis due to glycophorin C deficiency. *Blood* **76**: 18a (Abstr, Suppl 1), 1990.
- Tomaselli MB, John KM, Lux SE. Elliptical erythrocyte membrane skeletons and heat-sensitive spectrin in hereditary elliptocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 1911-1915, 1981.
- Tse TW, Lecomte M-C, Costa FF, Garbarz M, Féo C, Boivin P, Dhermy D and Forget BG. Point mutation in the β -spectrin gene associated with α I/74 hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest* **86**: 909-916, 1990.
- Tse WT, Gallagher PG, Pothier B, Costa FF, Scarpa A, Delaunay J, Forget BG. An insertional frameshift mutation of the β -spectrin gene associated with elliptocytosis in spectrin Nice (β 220/216). *Blood* **78**: 517-523, 1991.
- Ungewickell E, Gratzer W. Self-association of human spectrin. *Eur J Biochem* **88**: 379-385, 1978.
- Venezia ND, Gilsanz F, Alloisio N, Ducluzeau M-T, Benz EJ and Delaunay J. Homozygous 4.1 (-) hereditary elliptocytosis associated with a point mutation in the downstream initiation codon of protein 4.1 gene. *J Clin Invest* **90**: 1713-1717, 1992.
- Walder JA, Chatterjei R, Steck TL, Low PS, Musso GF, Kaiser ET, Rogers PH and Arnone A. The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* **259**: 10238-10246, 1984.
- Winkelmann JC, Leto TL, Watkins PC, Eddy R, Shows TB, Linnenbach AJ, Sahr KE, Kathuria N, Marchesi VT and Forget BG. Molecular cloning of the cDNA for human erythrocyte β -spectrin. *Blood* **72**: 328-334, 1988.
- Winkelmann JC and Forget BG. Erythroid and nonerythroid spectrins. *Blood* **81**: 3173-3185, 1993.
- Wolfe L. The red cell membrane and the storage lesion. In: The red blood cell membrane. *Clin Hematol* **14**: 259-276, 1985.

- Yawata Y, Kanzaki A, Wada H, Ata K, Inone T, Akatsuka J, Delaunay J. A trait of beta spectrin variant HE (Sp β 220/216) with hereditary elliptocytosis. *Blood* 76: 22a (Abstr, Suppl 1), 1990.
- Yoon SH, Yu H, Eber S, Prchal JT. Molecular defect of truncated β -spectrin associated with hereditary elliptocytosis. β -spectrin Göttingen. *J Biol Chem* 266: 8490-8494, 1991.
- Zarkowski HW, Mohandas N, Speaker CB and Shohet SB. A congenital haemolytic anaemia with thermal sensitivity of the erythrocyte membrane. *Br J Haematol* 29: 537-543, 1975.