

HELOISA TEREZINHA MENEGHINI BICHIR TERRA

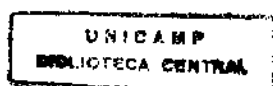
**FOSFORILAÇÃO EM TIROSINA DA BANDA 3
EM PACIENTES COM HEMOGLOBINOPATIAS**

*Dissertação de Mestrado
apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Farmacologia
da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em
Ciências na Área de
Farmacologia.*

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

Campinas

1997



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
T	11/08/98
V	34719
P	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/08/98
N.º CPD	

CM-00114406-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

T275f Terra, Heloisa Terezinha Meneghini Bichir
Fosforilação de tirosina da banda 3 em pacientes com
hemoglobinopatias / Heloisa Terezinha Meneghini Bichir Terra.
Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador : Sara Teresinha Olalla Saad
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Talassemia. 2. Anemia falciforme. 3. Hemoglobinopatias. 4.
Hemoglobina. I. Sara Teresinha Olalla Saad. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

Membros:

1. Prof. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

2. Prof. Dr. Paulo Augusto Silveira

3. Prof. Dr. Lício Augusto Veloso

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/11/1997

*Aos meus pais, Acácio e Leila, pela
oportunidade que me foi dada de fazer
parte desta vida.*

*Aos meus sogros, João e Fádua (in
memorian), pela vibração que
demonstravam a cada conquista por mim
efetuada.*

Aos meus filhos, Rubens, Ana Flávia e Rafael, pelo carinho e imenso amor que sei que sentem por mim e, por serem a razão de tudo isto.

Ao meu esposo Matheus, a quem me espelho buscando aprimoramento profissional, humano e ético.

Agradecimentos

Agradeço à Prof^a. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad pela orientação e possibilidade de realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mário Saad por sua “ co-orientação informal “.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmacologia da FCM.

À Dilmara, minha amiga e constante incentivadora, por sua colaboração e participação.

À Tereza e a todos os colegas do Hemocentro que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste estudo.

À Carla, pessoa incrível, por ser solidária e ter-me socorrido em momentos críticos.

Aos funcionários Luiz e Conceição, pela atenção e gentileza.

Aos pacientes e doadores do Hemocentro da Unicamp que concordaram com a coleta de sangue e tornaram este estudo uma realidade.

SUMÁRIO

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>i</i>
1.INTRODUÇÃO	<i>1</i>
2.OBJETIVOS	<i>8</i>
3.PACIENTES	<i>10</i>
4.MATERIAIS E MÉTODOS	<i>12</i>
5.RESULTADOS	<i>22</i>
6.DISSCUSSÃO	<i>38</i>
7.CONCLUSÕES	<i>44</i>
8.SUMMARY	<i>46</i>
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	<i>48</i>
10.ANEXOS	<i>63</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<i>Pág.</i>
<i>Figura 1</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2</i>	<i>25</i>
<i>Figura 3</i>	<i>26</i>
<i>Figura 4</i>	<i>26</i>
<i>Figura 5</i>	<i>27</i>
<i>Figura 6</i>	<i>29</i>
<i>Figura 7</i>	<i>31</i>
<i>Figura 8</i>	<i>33</i>
<i>Figura 9</i>	<i>34</i>
<i>Figura 10</i>	<i>35</i>
<i>Figura 11</i>	<i>36</i>
<i>Figura 12</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 1.....</i>	<i>11</i>
<i>Tabela 2.....</i>	<i>24</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

AE₁: anion exchanger 1, transportador de ânion- banda 3.

AMPc: adenosina monofosfato cíclico.

Asp: amino-acido aspargina.

ATP: adenosina trifosfato.

BSA: soro albumina bovina.

β tal: β talassemia intermediária.

Células MEL: células eritroleucêmicas de rato.

DMSO: dimetilsulfóxido, um típico agente indutor eritróide.

DTT: ditioneíto.

Gln: amino-acido glicina.

Glu: amino-acido glutamato ou ácido glutâmico.

G3PD: gliceraldeído -3 -fosfato desidrogenase.

HbC ($\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}}$): hemoglobina C com alteração molecular derivada da substituição de um resíduo de ácido glutâmico por um de lisina na posição 6 da cadeia β.

HbS($\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}}$): hemoglobina S com alteração molecular derivada da substituição de um resíduo de ácido glutâmico por um de valina na posição 6 da cadeia β.

HS: esferocitose.

H₂O₂: peróxido de hidrogênio.

IgG: imunoglobulina G.

Leu: amino-acido leucina.

Na₃VO₄: ortovanadato de sódio, inibidor da fosfotirosina fosfatase.

O₂⁻ •: ânion superóxido.

• OH: radical hidroxil.

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto.

PTK: proteína tirosina quinase.

PTP: fosfotirosina fosfatase.

p^{72syk}: nominação de um tipo de proteína tirosina quinase.

³²P: fósforo radioativo.

³²P-ATP: adenosina trifosfato marcado com fósforo radioativo.

Sβ: interação de anemia falciforme com β talassemia intermediária.

SC: interação de anemia falciforme com hemoglobinopatia C.

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida e dodecil-sulfato de sódio.

SS: anemia falciforme.

TRIS: metano hidroximetilamina.

Tyr: amino-acido tirosina.

RESUMO

O eritrócito humano contém uma tirosina quinase associada à sua membrana que fosforila a banda 3. O sítio de fosforilação tem sido identificado preferencialmente na tirosina 8, no N-terminal da banda 3, mas também na tirosina 21 e, essa região tem sítios de ligação com alta afinidade por várias proteínas periféricas incluindo hemoglobinas, hemicromos e enzimas glicolíticas. Muitas das funções das proteínas são controladas por sucessivas modificações reversíveis como seu estado de fosforilação. A fosforilação do domínio citoplasmático da banda 3 do eritrócito humano purificado, por uma proteína tirosina quinase, resultou na inibição da ligação com aldolase, G3PD, fosfofrutoquinase e hemoglobina e ativação de glicólise.

No presente estudo, examinamos o grau de fosforilação da tirosina da banda 3 em 34 pacientes com hemoglobinopatias: 15 com anemia falciforme, 6 com S β talassemia, 6 com hemoglobinopatia SC e 7 com β talassemia. Para esta avaliação foi utilizada a técnica de immunoblotting com anticorpo anti-fosfotirosina. No grupo de pacientes com doenças falciformes, a fosforilação aumentou de 2 a 10 vezes comparada com a fosforilação do controle normal (SS=7.8 $\pm$ 2.7 vezes; SC=3.8 $\pm$ 1.3 vezes; S β = 5.2 $\pm$ 2.0 vezes). No grupo de β talassemia a fosforilação também aumentou (β tal=4.3 $\pm$ 3.7 vezes), mas nesse grupo 3 pacientes apresentaram fosforilação da tirosina da banda 3 próximo do nível apresentado pelo controle normal(1, 1.5 and 1.7 vezes). No entanto, não houve diferença significativa na fosforilação da tirosina da banda 3 entre os vários grupos testados, exceto quando comparamos a fosforilação em hemácias intactas de pacientes com anemia falciforme(SS) e pacientes com hemoglobinopatia SC (U=6, p<0.02).

As conseqüências do aumento da fosforilação em tirosina em hemoglobinopatias ainda não estão claras, mas além da estimulação da glicólise, é possível uma ligação inadequada da banda 3 com anquirina, com instabilidade do esqueleto. Os mecanismos desta lesão necessitam de maior investigação.

1.Introdução

O eritrócito é descrito como uma célula funcionalmente simples, no entanto, apresenta vários aspectos estruturais e funcionais extremamente complexos. A membrana eritrocitária é constituída por fosfolípides, colesterol não esterificado e glicolípides, arranjados na forma de camada dupla, onde estão distribuídos de forma assimétrica canais protéicos transmembrana e receptores (Schrier et al, 1985; Delauney et al, 1990; Gallagher et al, 1990; Palek et al, 1991; Palek et al, 1992). As proteínas da membrana do eritrócito são basicamente divididas em duas classes: integrais e periféricas. As integrais, representados por banda 3 e glicoforinas, por definição, têm uma porção central hidrofóbica que interage com os lipídeos da bicamada lipídica e, na maioria das vezes, essas proteínas assumem orientação transmembrana. O citoesqueleto eritrocitário se localiza logo abaixo da bicamada lipídica e é constituído basicamente de espectrina, anquirina, filamentos curtos de actina, tropomiosina, aducina e proteínas 4.1, 4.2, 4.9 (Schrier et al, 1985; Delauney et al, 1990; Gallagher et al, 1990; Palek et al, 1991; Palek et al, 1992; Goodman et al, 1988) (Fig. 1).

Essas proteínas sustentam cerca de 60 % da bicamada lipídica através de ligações entre: anquirina e banda 3; proteína 4.1 e glicoforina A; proteína 4.1 e glicoforina C; interação direta da espectrina e proteína 4.1 com cargas negativas dos lípides. Além das interações verticais as proteínas fazem interações horizontais entre β espectrina e anquirina,; espectrina- actina- proteína 4.1, essa última formando o complexo juncional. As proteínas da membrana do eritrócito são designadas numericamente de acordo com sua mobilidade relativa quando submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil- sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Schrier et al, 1985; Delauney et al, 1990; Gallagher et al, 1990, Palek et al, 1991; Palek et al, 1992).

Alguns defeitos do eritrócitos se devem à presença de hemoglobinas anômalas, que podem ser subdivididas em duas grandes classes: as estruturais e as por deficiência de síntese (talassemias). As hemoglobinopatias estruturais caracterizam-se por alterações na estrutura da fração globínica e as de principal importância são as HbS ($\alpha_2\beta_2^{6 \text{ glu} \rightarrow \text{val}}$) com alteração molecular derivada da substituição de um resíduo de ácido glutâmico por um de valina na posição 6 da cadeia β e, HbC ($\alpha_2\beta_2^{6 \text{ glu} \rightarrow \text{lys}}$) com alteração de um resíduo de ácido

glutâmico por um de lisina também na posição 6 da cadeia β . As talassemias representam a depressão geneticamente condicionada da síntese de um ou mais tipos de cadeias peptídicas da hemoglobina. As interações entre HbS e β talassemia também ocorrem e são resultado da miscegenação de populações.

O citoesqueleto é essencial na manutenção da forma bicôncava e na flexibilidade da hemácia e, conseqüentemente para sua sobrevivência na circulação. HbS possui tendência a polimerizar e pré-disposição para desnaturar e catalisar produção de agentes oxidantes. Como consequência, eritrócitos contendo HbS apresentam alterações na flexibilidade, na permeabilidade ao Ca^{2+} , na assimetria lipídica, na estrutura esquelética, na distribuição de cargas da superfície e na afinidade por anticorpos autólogos (IgG) (Mc Curdy, 1969; Lux et al, 1976; Mc Curdy & Sharma, 1978; Eaton et al, 1978; Hebbel et al, 1980; Saklai et al, 1981; Lubin & Chiu, 1981; Fukuda et al, 1981; Petz et al, 1984; Platt et al, 1985; Green et al, 1985; Hebbel, 1985) .

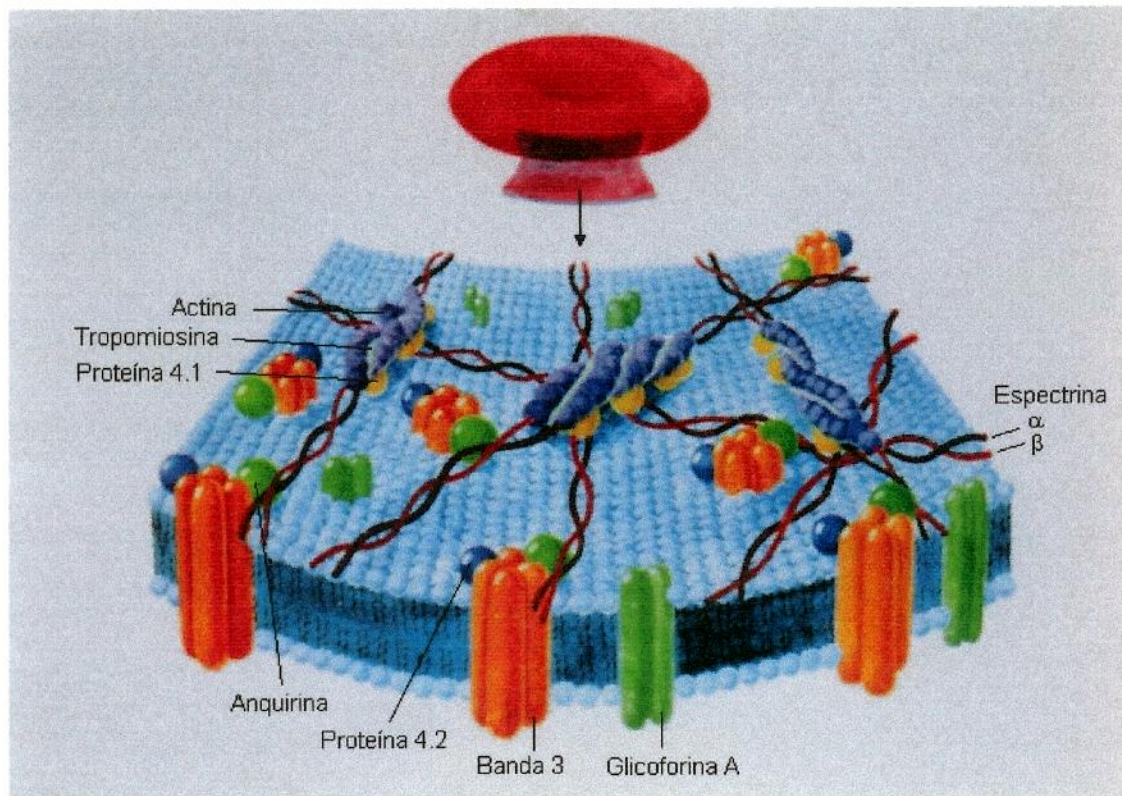


Fig. 1- Esquema representativo da disposição das proteínas integrais e periféricas na membrana eritrocitária. Entre as proteínas integrais fazem parte a banda 3 e glicoforinas e, as periféricas entre outras estão a espectrina, anquirina (proteína 2.1), proteínas 4.1 e 4.2, actina (proteína 5) e tropomiosina (Goodman et al., 1988).

A incubação da hemácia com ^{32}P , sob condições que induzem à geração de ^{32}P - Adenina trifosfato (^{32}P -ATP) intracelular, resulta na incorporação de ^{32}P em todas as proteínas da membrana esquelética, exceto actina (Cohen & Gascard, 1992).

Numerosos estudos *in vitro* de fosforilação de membranas isoladas ou em células intactas têm sugerido que a membrana de eritrócitos falcizados têm um nível anormal de fosforilação de proteína comparado com membranas normais (Beutler et al., 1976; Hosey & Tao, 1976; Dzandu & Johnson, 1980; Cohen & Gascard, 1992; Johnson & Dzandu, 1992). A fosforilação da espectrina está reduzida, enquanto a fosforilação na banda 3 e na região das bandas 4.5 e 4.9 está aumentada (Apovo et al, 1989). No entanto, a fosforilação em tirosina tem sido pouco estudada. Considerando os aspectos fisiológicos envolvidos na fosforilação/desfosforilação, há evidências de que ocorram alterações nas propriedades funcionais das proteínas da membrana eritrocitária causadas pela fosforilação das mesmas (Cohen & Gascard, 1992).

O processo de fosforilação de resíduos de aminoácidos de proteínas da membrana eritrocitária se dá pela transferência de grupos fosfatos do ATP catalisada por proteínas quinases (Yannoukakos, 1991). As proteínas fosfatases, por sua vez, realizam o processo inverso, ou seja, a desfosforilação. Muitas funções das proteínas são controladas por modificações reversíveis em suas cadeias laterais como seu estado de fosforilação. O eritrócito humano contém um número bem caracterizado de proteínas quinases que podem ser citosólicas ou associadas à membrana e, em alguns casos, translocar do citosol para a membrana por ativação. Dentre as principais quinases eritrocitárias estão proteína quinase C, que fosforila aducina, proteína 4.1, proteína 4.9 (Cohen & Foley, 1986); caseína quinase, que fosforila β espectrina, banda 3 (ligada a membrana e citosólica), proteína 4.1, proteína 4.9 (Hosey & Tao, 1977; Cohen & Foley, 1986); proteínas quinases dependentes de AMPc (PKAs), que fosforilam α espectrina, anquirina, aducina, proteína 4.1, proteína 4.9 (Fairbanks & Avruch, 1974; Fairbanks et al, 1983; Cohen & Foley, 1986) e proteínas tirosina quinases, que fosforilam especificamente resíduos de tirosina (PhanDinh Twy et al, 1985; Vasseur et al, 1987).

Fosforilação de proteína nos resíduos de tirosina tem sido implicada na regulação do crescimento normal assim como no conjunto de transformações celulares. Um dos aspectos mais

intrigantes das proteínas tirosina quinases celulares (PTKs) é sua presença nas células ausentes de núcleos na diferenciação terminal e não passar por divisão nem diferenciação como os eritrócitos (Dekowski et al., 1983; Harrison et al., 1991). Eritrócitos humanos contêm uma tirosina quinase ligada à membrana que é aparentemente específica para o transportador de ânion transmembrana, banda 3 (Mohamed & Steck, 1986). A proteína banda 3 é, então, fosforilada em resíduos de serina e treonina por caseínas quinases citosólica ou ligada à membrana, enquanto os resíduos de tirosina são fosforilados por tirosina quinases (Yannoukakos et al., 1991).

A banda 3 pertence à família de trocadores de ânions e é também conhecida como ânion exchanger 1 (AE1); é a proteína predominante da membrana eritrocitária a qual atravessa 12 a 14 vezes através da bicamada lipídica. Apresenta aproximadamente $1,2 \times 10^6$ cópias/ célula e contém 911 amino ácidos. AE1 tem duas principais estruturas dominantes que apresentam funções distintas: o C-terminal, com cerca de 55 kDa, localizado no domínio da membrana é responsável pela mediação do transporte dos ânions $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ que aumenta por volta de cinco vezes o total de CO_2 carregado pelo sangue e, o N-terminal, com aproximadamente 43kDa, localizado no domínio citoplásmico unindo a banda 3 às demais proteínas do citoesqueleto (Alper, 1991). Regiões da banda 3 são fosforiladas pela ação da tirosina quinase endógena: tirosina 904, tirosina 359, tirosina 21 e tirosina 8. A sequência de amino ácidos Glu-Glu-Leu-Gln-Asp-Asp-Tyr-Glu-Asp-Asp, na região do N-terminal, contém a tirosina 8 e é o sítio prevalente de fosforilação (Dekowski et al., 1983). Apesar de vários estudos neste sentido, ainda continua obscura a função fisiológica dessa reação na membrana do eritrócito (Yannoukakos et al., 1991). Uma possível consequência da fosforilação da banda 3 seria uma redução na capacidade de ligação da banda 3 de hemácias falciformes com a anquirina (Platt & Falcone, 1995). A região do domínio citoplasmático onde está localizado o N-terminal da proteína possui sítios de alta afinidade para várias proteínas periféricas como enzimas glicolíticas (aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfofrutoquinase lactase desidrogenase) (Murthy et al., 1981; Tsai et al., 1982; Jenkins et al., 1985) hemicromos (Waugh & Low, 1985) e hemoglobina (Walder et al., 1984; Chétrite & Cassoly, 1985; Harris & Winzor, 1990). As glicoforinas podem interagir com banda 3 para formar partículas intramembrana (Schrier, 1985; Harrison et al., 1991); porém, glicoforinas e fosfolípidos contribuem para diminuir a afinidade da hemoglobina pela membrana eritrocitária, determinando uma interação de baixa afinidade

A fosforilação do domínio citoplasmático purificado da banda 3 do eritrócito humano por uma proteína tirosina quinase (PTK) resulta na inibição da ligação da hemoglobina e de enzimas glicolíticas (Low et al., 1987). Então, é possível que a PTK no eritrócito humano regule a glicólise através da fosforilação da Tyr da banda 3.

O $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ é um oxidante leve que intensifica a glicólise na hemácia e aumenta a fosforilação da banda 3 (Harrison et al., 1991). Esse aumento da fosforilação ocorre também quando o peptídeo é exposto a 1mM de peróxido de hidrogênio ou 25 μM de diamina (Harrison et al., 1991). Harrison et al (1991) sugerem que oxidantes leves inibem a fosfatase com ativação da tirosina quinase da banda 3. No entanto, a fosforilação de fosfoproteínas pode ser inibida por concentrações elevadas de N-etilmaleimida, um oxidante de grupamentos sulfídricos (Kanner et al, 1992).

A hemoglobina normal sofre auto-oxidação produzindo radicais livres, e hemoglobinas anormais encontram-se em condições de maior estresse oxidativo. O excesso de radicais livres gerados pela auto-oxidação de hemoglobina S para metahemoglobina caracteriza uma das causas da lesão de membrana de hemácias falciformes (Hebbel et al, 1982). Eritrócitos falcizados têm abundante desnaturação de hemoglobina S na forma de corpos de Heinz que formam agrupamentos com a banda 3, anquirina e glicoforina (Shaklai et al, 1981; Waugh et al., 1986; Schluter & Drenckhahn, 1986; Waugh et al, 1987) com aumento da deposição de imunoglobulina na membrana da hemácia (Hebbel & Miller, 1984; Waugh et al., 1986; Waugh et al, 1987; Petz et al, 1984). No entanto, a relação entre essa ligação anormal e a banda 3 fosforilada em tirosina é desconhecida.

Assim, a ausência de dados na literatura nos conduziu a este estudo que tem o objetivo de verificar a fosforilação em tirosina da banda 3 em hemoglobinopatias hereditárias.

2.Objetivo

O presente trabalho teve por objetivo:

Avaliar por *immunoblotting* com anticorpo antifosfotirosina a fosforilação em tirosina da banda 3 em pacientes com β talassemia intermediária e doenças falciformes.

3. Pacientes

Foram estudados 34 pacientes atendidos no Hemocentro da Unicamp, sendo 15 com anemia falciforme, 6 heterozigotos SC, 6 interações S β , 5 β talassemias intermediárias e 2 δ β talassemias. Todos os pacientes eram clinicamente estáveis e o diagnóstico das hemoglobinopatias foi baseado em dados clínicos, familiares e laboratoriais, incluindo eletroforeses em acetato celulose em pH 8.9 e em gel de ágar em pH 6.2, o teste de solubilidade e a estimativa de HbF e HbA₂ (Weatherall & Clegg, 1981). Os pacientes não haviam recebido transfusão nos últimos quatro meses e concordaram voluntariamente com os procedimentos adotados após explicações dos mesmos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital da Universidade Estadual de Campinas. Foram usados como controles 10 indivíduos normais e 1 paciente com esferocitose hereditária. Dados clínicos e hematológicos desses pacientes estão na tabela 1.

Tabela 1-Dados clínicos e hematológicos dos participantes deste estudo:

Diagnostico	Idade (anos)	Hb (g/dl)	HCM (pg)	VCM (fl)	HbA ₂ (%)	HbF (%)
SS (n=15)	27.1 ± 7.1	8.0 ± 1.5	31.3 ± 2.5	95.3 ± 6.8	2.3 ± 0.5	7.6 ± 4.8
S β (n=6)	26.5 ± 8.4	8.7 ± 1.0	20.9 ± 2.1	66.3 ± 7.8	3.9 ± 0.8	7.9 ± 6.0
SC (n=6)	31.8 ± 10.9	11.4 ± 1.8	27.4 ± 3.5	82.9 ± 8.8	—	1.5 ± 0.8
β tal(n=7)	30.6 ± 9.0	7.7 ± 1.3	22.9 ± 2.1	70.6 ± 6.2	3.5 ± 2.2	47.0 ± 34.1
HS (n=1)	58	8.8	32	94	2.3	1.3

4. Materiais e Métodos

4.1.MATERIAIS

Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) e aparatos para immunoblotting foram da Bio-Rad (Richmond, CA). Fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), ditioneitol (DTT) e metano hidroximetilamina (TRIS) foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). Percoll e proteína A-sepharose foram da Pharmacia (Uppsala, Suécia). ^{125}I -Proteína A ($30\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) foi da ICN Biomedical (Costa Mesa, CA). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0.2 μm) foi de Schleicher & Schuell. O anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina foi da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). O anticorpo anti-banda 3 foi obtido em coelhos e gentilmente cedidos por Hani Hassoun (Laboratório de Investigação em Doenças da Membrana Eritrocitária, Tufts University).

4.2.SOLUÇÕES EMPREGADAS NOS DIVERSOS EXPERIMENTOS

4.2.1. Solução Tampão de salina-fosfato (PBS):

Utilizada para lavar as hemácias. Contém: 5mM Na_2HPO_4 , 150mM NaCl, 1mM de azida sódica; pH 7,5. Esta solução deve ser mantida a 4°C e 10mM de ortovanadato acrescidos no momento do uso.

4.2.3. Solução estoque de fosfato de sódio:

Estocar em temperatura ambiente. Contém: 189,5mM Na_2HPO_4 , 10mM NaH_2PO_4 , pH 8,0.

4.2.3. Solução Tampão de fosfato para Lise (3P):

Usada para lisar as hemácias e posterior obtenção das membranas isoladas (*ghost*). Contém: 3mM de fosfato de sódio (solução estoque) e 200mM de EDTA, pH 8,0. Esta solução deve ser mantida a 4°C . 20µg/ml de PMSF e 10mM de ortovanadato acrescidos no momento do uso.

4.2.4. Tampão Laemmli:

Utilizado para solubilizar as proteínas das membranas das células intactas e isoladas e sua posterior aplicação em SDS-PAGE a 8% (Laemmli, 1970). Contém: 0,1% de azul bromofenol; 1M de fosfato de sódio, pH 7,0; glicerol 50% ; SDS 20% adicionado de 100mM de DTT.

4.2.5. Solução Tampão para Eletroforese em gel (SDS-PAGE):

Usado para a realização da eletroforese no SDS-PAGE, das proteínas extraídas. Contém: 0,025 M tris-base, 0,2 M glicina, 0,1% SDS e 0,008% de β-mercaptoetanol.

4.2.6. Solução Tampão de Transferência:

Empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Contém: 25mM Trisma base, 192mM Glicina, 20% Metanol e 0,02% SDS para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A solução deve ser estocada a 4°C.

4.2.7. Soluções estoques para SDS-PAGE:

4.2.7.1. Tampão Lower 4x: solução de estoque que entra na produção do gel resolving. Contém: Tris base 1,5M. Ajustar em pH 8,8 com ácido clorídrico. Manter solução a 4°C.

4.2.7.2. Tampão Upper 4x: solução de estoque que entra na produção do gel stacking. Contém: Tris base 0,5M. Ajustar em pH 6,8 com ácido clorídrico. Manter solução a 4°C.

4.2.8. Solução Tampão para SDS-PAGE, gel de resolução (Resolving):

Para a composição do SDS-PAGE, gel de resolução a 8% , se faz necessário: 1,5M Tampão Lower 4x, Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 1%, SDS 20%, APS 10% e 0,1% TEMED.

4.2.9. Solução Tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento (Stacking):

Integrante na composição do SDS-PAGE, gel de empilhamento a 3,5% , se faz necessário: 0,5M Tampão Upper 4x, Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 1%, SDS 20%, APS 10% e 0,1% TEMED.

4.2.10. Solução Basal:

Utilizada para manter as condições básicas no manuseio da membrana de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas. Contém: 0,15 M Cloreto de sódio, 0,01M Trisma base, 0,05% Tween 20.

4.2.11. Solução Bloqueadora:

Para bloquear proteínas inespecíficas contidas na membrana de nitrocelulose, após a transferência. Contém: 5% de leite em pó desnatado (Molico®) e 0,02% de azida sódica, dissolvidos em solução basal.

4.2.12. Solução para Anticorpos:

Solução diluidora dos anticorpos específicos. Contém: 0,3% de soro albumina bovina (BSA) e azida sódica 0,02% , diluídos em solução basal.

4.2.13. Solução Percoll 75%:

Utilizada para separação de reticulócitos em ultra-centrífuga. Contém: 75ml de Percoll net diluídos em 25ml de PBS 4x. Manter solução a 4°C. Adicionar 10mM de ortovanadato de sódio no momento da utilização.

4.2.14. Soluções para Imunoprecipitado:

4.2.14.1. Solução Tampão A: utilizado para ressuspender as membranas isoladas(*ghosts*) e posterior incubação com anticorpo anti-banda 3 e proteína A-sepharose. Contém: 0,1M Tris-HCl, pH 8,5 ; 0,15M NaCl ; 5mM EDTA ; 0,5%NP-40, acrescido de 1% de SDS e 10mM de ortovanadato de sódio. Adição de TritonX-100 para 5% da concentração final. Solução mantida a 4°C.

4.2.14.2. Solução Tampão B: usado para lavar proteína A-sepharose. Contém: 1M de Tris; 0,2M de EDTA ; 10% de Triton X-100 0,2M; 2mM de ortovanadato de sódio.

4.2.15. Solução com proteína A hibridizada com ¹²⁵Iodo:

Solução que contém a proteína A com ¹²⁵Iodo para a marcação dos anticorpos específicos, o que torna possível a visualização em autoradiografia. Contém: 0,3% de BSA dissolvida em solução basal, acrescida de 2μCi de ¹²⁵I-proteína A.

4.3.MÉTODOS

4.3.1. Procedimentos com os pacientes:

Foram coletados 5ml de sangue venoso usando 25% do anticoagulante EDTA e 10mM de ortovanadato de sódio, imediatamente conservados em gelo. As hemácias foram lavadas 3 vezes em 20 volumes de PBS contendo 10mM de ortovanadato de sódio, a 2.500.rpm, por 2 minutos, a 4⁰ C. A fosforilação da tirosina da banda 3 foi avaliada em hemácias intactas e membranas isoladas através de immunoblotting com anticorpo anti-fosfotirosina, como descrito previamente (Towbin et al, 1979) com pequenas modificações.

4.3.2. Fosforilação em membranas isoladas:

As células foram lisadas em 3mM de fosfato de sódio contendo 20µg/ml de PMSF, acrescidas de 10mM de ortovanadato de sódio e submetidas a centrifugação por 10 minutos, a 12.000 rpm, a 4° C. O procedimento foi repetido duas vezes. As membranas isoladas foram solubilizadas em tampão Laemmli adicionado de 100mM de DTT e posteriormente fervidos durante 3 minutos; então, após estimativa da concentração de proteína por espectrofotometria, utilizando-se curva padrão de soro albumina bovina em comprimento de onda de 595nm (baseado no método de Bradford), 60µg de membranas isoladas foram resolvidos em SDS-PAGE.

4.3.3. Fosforilação em hemácias intactas:

Os eritrócitos lavados a 50% de hematócrito foram fervidos durante 4 minutos em 5 volumes de Tampão Laemmli contendo 100mM de DTT e 40µl dessa mistura foram resolvidos em SDS-PAGE.

Similares estudos para avaliar a fosforilação da banda 3 sem interferência de ortovanadato de sódio também foram realizados em experimentos contendo sangue total coletado em EDTA e imediatamente fervido em Tampão Laemmli, como descrito acima.

4.3.4. Immunoblotting ou Westernblotting:

As proteínas foram fracionadas em SDS-PAGE de 1,5 mm de espessura e conduzidas por marcador de alto peso molecular da Bio-Rad (Richmond,CA) que contém miosina (205 kDa), β galactosidase (116 kDa), soro albumina bovina (80 kDa) e ovalbumina (49.5 kDa).

A eletroforese foi realizada em cuba de minigel Mini-PROTEAN®II Cell da Bio-Rad (Richmond,CA), com solução tampão para eletroforese. O SDS-PAGE (8% acrilamida) foi submetido inicialmente a 30 volts para que as proteínas pudessem se acomodar na fase de empilhamento (stacking) e, em seguida, submetido a 100 volts na fase de resolução (resolving) por 2 horas.

A transferência das proteínas fracionadas por SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose foi realizada durante duas horas a tensão constante de 100V. O minigel utilizado para a eletrotransferência também era da Bio Rad e a temperatura da cuba foi mantida baixa por sucessivas trocas de gelo (Towbin et al.,1979). A ligação de proteínas não específicas para a nitrocelulose foi reduzida pré-incubando o filtro por duas horas a temperatura ambiente em solução bloqueadora. Na sequência, a membrana foi lavada em solução basal por 4 sessões de dez minutos e, então, incubada com anticorpo anti-fosfotirosina monoclonal ou com anticorpo anti-banda 3 diluído em solução para anticorpos por 18 horas (*overnight*) a 4°C. A membrana foi novamente lavada, agora por 6 sessões de 10 minutos com solução basal. O filtro foi posteriormente incubado com 2 μ Ci de ¹²⁵I-proteína A em 10ml de solução bloqueadora por 1 hora a 22° C e lavado novamente, como já descrito, em 6 sessões de 10 minutos. ¹²⁵I-proteína A ligado ao anticorpo anti-fosfotirosina e anticorpo anti-banda 3 foi detectado por autoradiografia usando filme Kodak XAR com intensificador Cronex Lightning Plus a -70° C por 12 a 48 horas. A intensidade da banda 3 marcada foi quantificada por densitometria óptica (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco; modelo GS 300) do autoradiograma desenvolvido e as áreas sob os picos foram determinadas pelo programa GS 365 W, versão 3.01. Todos os experimentos constam de controles. A calibração do aparelho (ponto zero e ganho) foi padronizada, de modo que, num mesmo experimento, os diferentes indivíduos puderam ser comparados

entre si (Fig.3 e Fig.4). Os resultados da fosforilação foram expressos em relação a amostra controle normal baseados no seguinte cálculo e levando-se em conta a área sob a curva de densitometria:

$$\frac{\text{Fosforilação da banda 3 do paciente}}{\text{total de banda 3 do paciente}} \times \frac{\text{total de banda 3 do controle}}{\text{fosforilação da banda 3 do controle}}$$

4.3.5. Separação de Reticulócitos Depletados dos Eritrócitos por Percoll:

Com o objetivo de investigar a fosforilação da banda 3 sem a interferência de reticulócitos, foram coletados 20ml de sangue em EDTA e 10mM de ortovanadato de sódio e imediatamente conservados em gelo. Os eritrócitos foram lavados em PBS e 5 ml dos eritrócitos lavados foram aplicados na superfície de 20ml de Percoll 75% (75ml de Percoll net, 25ml PBS-4x e 10mM ortovanadato de sódio). Então eles foram centrifugados a 45000 g (rotor 30 Ti, 50 mm de raio) por 30 minutos a 4°C em ultracentrífuga Beckman, modelo L575B . Depois da corrida , 1 ml da fração foi coletado do topo e da fração inferior do gradiente. As células foram lavadas uma vez em PBS, solubilizadas em tampão Laemmli com 100mM DTT e 50µL dessa mistura foram resolvidos por SDS-PAGE.

4.3.6. Imunoprecipitação:

Com o objetivo de confirmar a fosforilação da tirosina da banda 3, foram ressuspensos 500 µl de membrana isolada (ghost) em 500µl de tampão A (0,1 mol/l Tris-HCl, pH 8,5 ; 0,15 mol/l NaCl ; 5 mmol/l EDTA ; 0,5%NP-40) contendo 1% de SDS e 10mM de ortovanadato de sódio, fervido por 2 minutos e, então, diluído em 5,0ml de tampão A com ortovanadato de sódio. Triton X-100 foi adicionado para 5% da concentração final. Anticorpo anti-banda 3 policlonal (100µl) foi, então, adicionado e a amostra incubada overnight a 4°C com agitador. Em seguida, 100µl de proteína A-sepharose foram adicionados e a amostra incubada por mais 4 horas a 4°C com agitador. A proteína A-sepharose foi, então, coletada e lavada 1 vez com tampão B (1M de Tris; 0,2M de EDTA ; 10% de Triton X-100 0,2M; 2mM de ortovanadato de sódio) e removida por centrifugação. O pellet foi ressuspenso em 40µl de tampão Laemmli e fervido por 5 minutos. Em seguida, a amostra foi aplicada em SDS-PAGE.

4.3.7. Análise Estatística:

Para comparação dos diferentes grupos de pacientes nós utilizamos o método de Mann-Whitney U test. Significância foi definida como $p < 0,05$.

5.Resultados

Nesse estudo analisamos, por *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina e na presença de ortovanadato, a fosforilação em tirosina em hemácias intactas e membranas isoladas de pacientes com anemia falciforme, hemoglobinopatia SC, S β -talassemia e β -talassemia intermediária. Nossos resultados mostraram um aumento na fosforilação de duas bandas, nas regiões de 100 kDa e 80 kDa, em anemia falciforme e β -talassemia quando comparadas com a fosforilação obtida em células intactas de controles normais e em um paciente com esferocitose hereditária (tabela 2 e Figs. 5A-12A). A imunoprecipitação de hemácias lisadas com anticorpo anti-banda 3 e *immunoblotting* com anticorpo anti-fosfotirosina confirma que a tirosina fosforilada na região de 100 kDa foi a banda 3, no entanto, não obtivemos anticorpo anti-proteína 4.1 para confirmar que a proteína de 80kDa, que encontramos fosforilada em Tyr, seja realmente a proteína 4.1(Dados não apresentados) .

No grupo de anemia falciforme, a fosforilação aumentou de 2 a 10 vezes comparada com a fosforilação do controle normal (SS= $7,8 \pm 2,7$ vezes; SC= $3,8 \pm 1,3$ vezes; S β = $5,2 \pm 2,0$ vezes). No grupo de β talassemia a fosforilação também aumentou (β tal= $4,3 \pm 3,7$ vezes), mas nesse grupo 3 pacientes apresentaram fosforilação da tirosina da banda 3 próximo do nível apresentado pelo controle normal (1; 1,5 e 1,7 vezes) (tabela 2). Não houve diferença significativa na fosforilação em tirosina da banda 3 entre os vários grupos testados, exceto quando comparamos a fosforilação em hemácias intactas de pacientes com anemia falciforme (SS) e pacientes com hemoglobinopatia SC (U=6, $p<0,02$).

Com o propósito de avaliar a fosforilação em tirosina sem a interferência de ortovanadato, nós realizamos experimentos na ausência desse inibidor de fosfatase. Nenhuma fosforilação foi observada nos controles ou em anemia falciforme após os eritrócitos terem sido fervidos imediatamente após a coleta do sangue e submetidos, na sequência, a eletroforese.

Para nos certificarmos de que a fosforilação em tirosina da banda 3 estava aumentada em hemoglobinopatias na ausência de reticulócitos, nós separamos células jovens em Percoll. A fosforilação de células com HbS era mais alta que nos controles, tanto em células obtidas no topo como na fração inferior do gradiente Percoll (Dado não apresentado).

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão da fosforilação de tirosina da banda 3 em pacientes com hemoglobinopatias(média ± desvio padrão).O cálculo foi estimado de acordo com a fórmula fosforilação da banda 3 do paciente/ total de banda 3 do paciente × total da banda 3 do controle/ fosforilação da banda 3 do controle:

Diagnóstico	membranas isoladas	hemácias intactas
SS	4.5 ± 2.3	7.8 ± 2.7
Sβ	4.5 ± 0.5	5.2 ± 2.0
SC	1.0	3.8 ± 1.3 (*)
β Tal	6.8	4.3 ± 3.7 #
HS	—	0.8

inclui 2 pacientes com δβ-talassemia; (*) Significativamente diferente quando comparado com SS (U= 6, p< 0,02 ; Mann-Whitney U test).

Fosforilação *in vivo* em tirosina da banda 3 em células intactas de pacientes com hemoglobinopatias

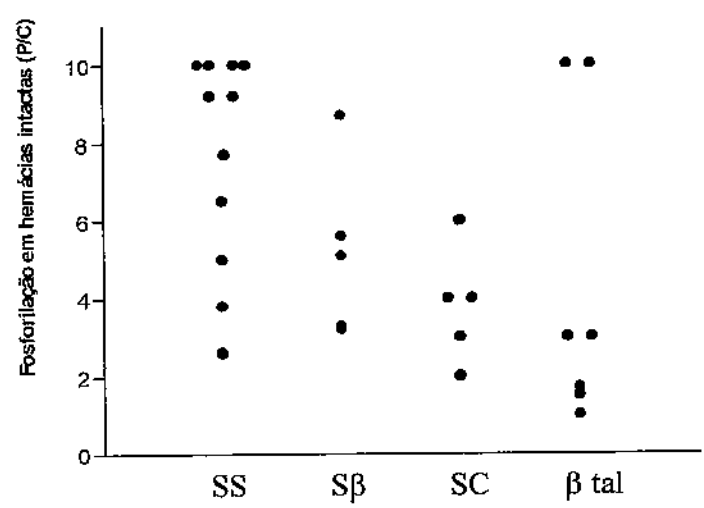


Fig.2.Os resultados da fosforilação foram expressos em relação a amostra controle normal baseados no seguinte cálculo:

$$\frac{\text{Fosforilação da banda 3 do paciente}}{\text{total de banda 3 do paciente}} \times \frac{\text{total de banda 3 do controle}}{\text{fosforilação da banda 3 do controle}}$$

Área de fosforilação da banda 3 em membranas isoladas (*ghosts*) de pacientes com hemoglobinopatia e seus respectivos controles:

I- Anticorpo anti-fosfotirosina

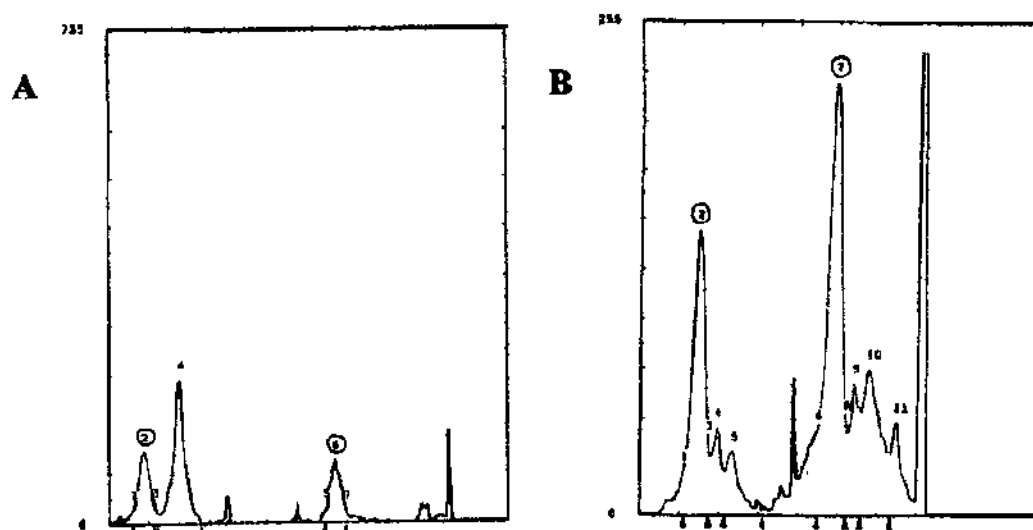


Fig.3. (A) 2- Controle, 6-Controle; (B) 2- Sβ, 7- Sβ.

II- Anticorpo anti-banda 3

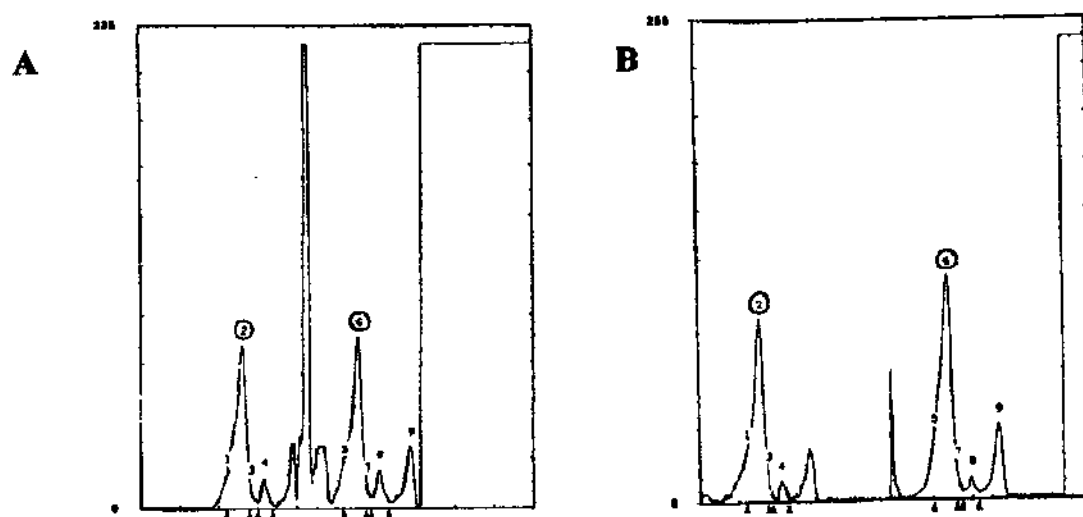
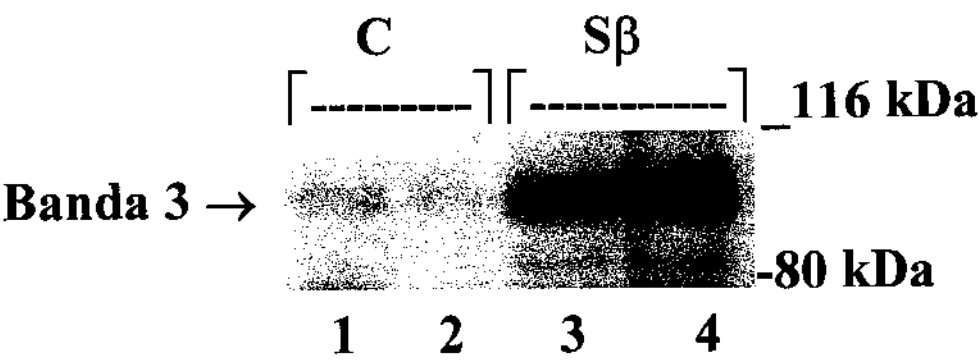


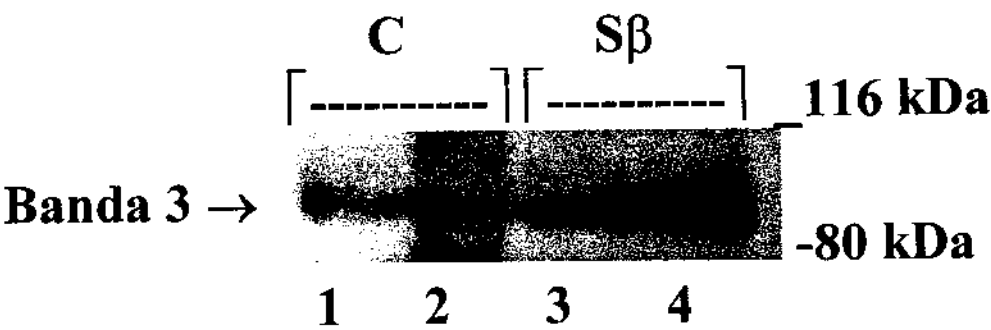
Fig.4. (A) 2- Controle, 6-Controle; (B) 2- Sβ, 6- Sβ.

Fosforilação em tirosina da banda 3 em membranas isoladas(ghosts)

A) Blot: α PY



B) Blot: α Banda 3



C) Fosforilação em Tyr da Banda 3

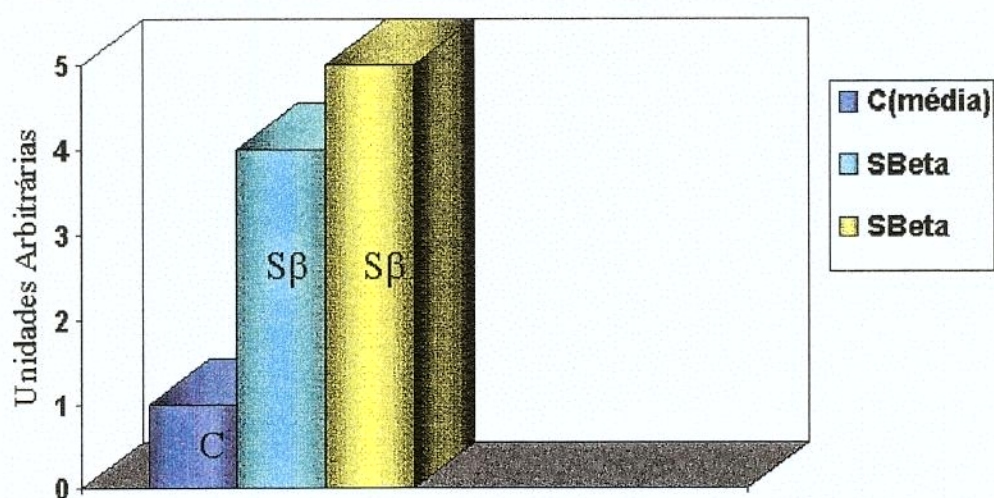
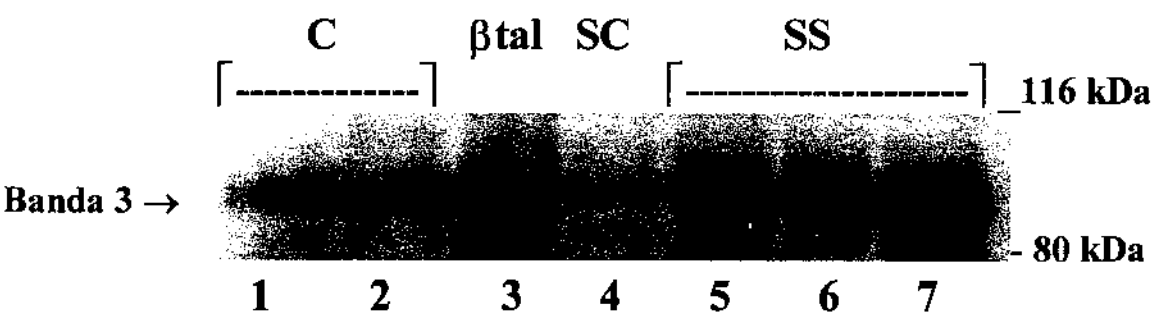
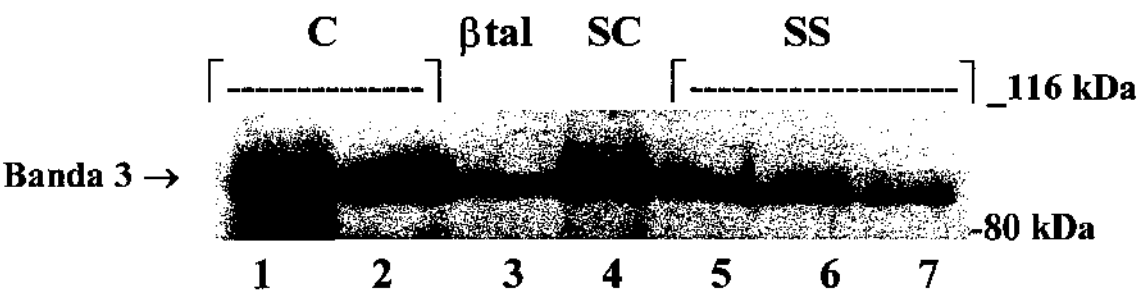


Fig.5. Fosforilação em Tirosina da Banda 3 em membranas isoladas de pacientes com hemoglobinopatias, analisadas por immunoblotting. (A e C): 1,2)Controles; 3,4)S β talassemia, foram isoladas como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS. As células foram lavadas 3 vezes em PBS gelado com 10mM de ortovanadato de sódio e lisadas com Tampão para Lise. As membranas isoladas foram solubilizadas em Tampão Laemmli e fervidas durante 4 min com 100mM DTT ; 40 μ l dessa mistura resolvidos em 8% SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose. As membranas foram blotadas com anticorpo antifosfotirosina (A), anticorpo anti-banda 3 (C), marcadas com 125 I-proteína A e submetidas a autoradiografia.

A) Blot: α PY



B) Blot: α Banda 3



C) Fosforilação em Tyr da Banda 3

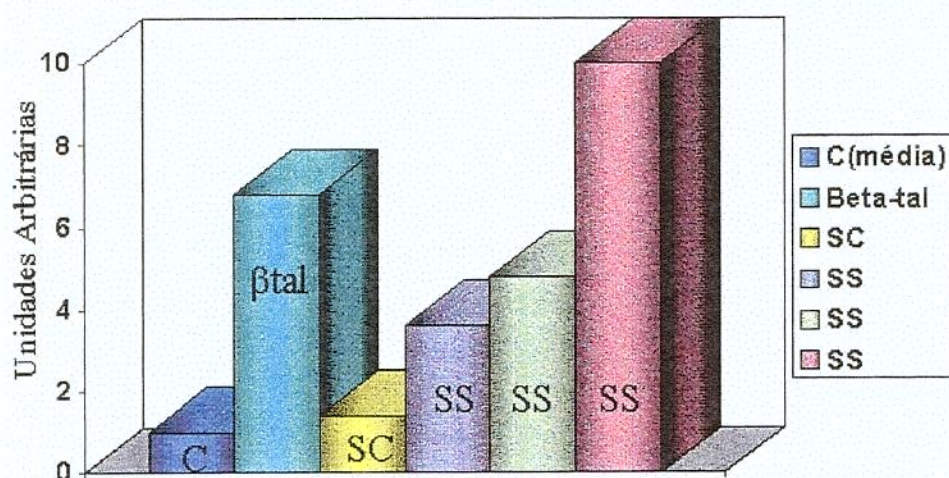
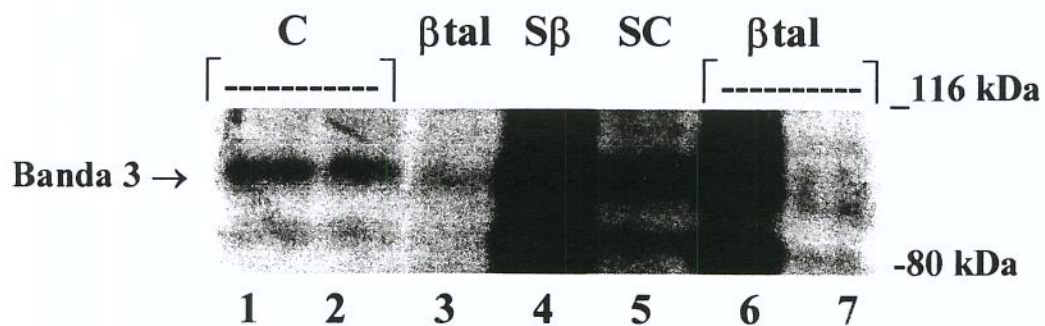


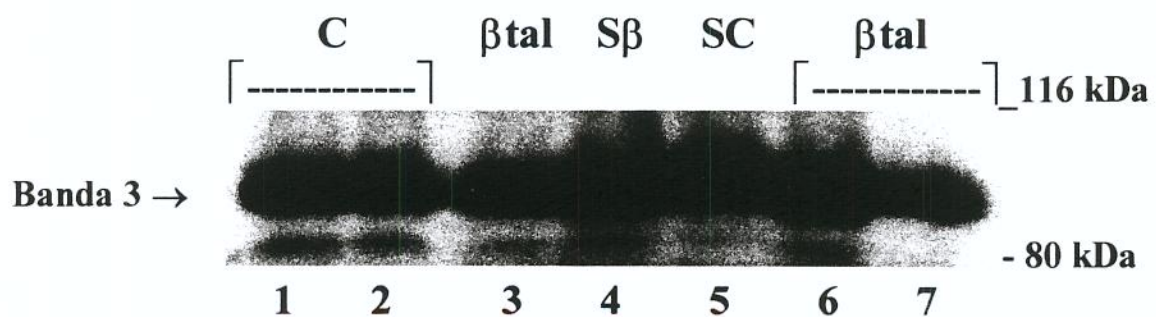
Fig.6. Fosforilação em Tirosina da Banda 3 em membranas isoladas de pacientes com hemoglobinopatias, analisadas por immunoblotting. (A e C): 1,2)Controles; 3) β talassemia; 4)Hemoglobinopatia SC; 5-7)Anemia Falciforme. As membranas foram isoladas como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS. As células foram lavadas 3 vezes em PBS gelado com 10mM de ortovanadato de sódio e lisadas com Tampão para Lise. As membranas isoladas foram solubilizadas em Tampão Laemmli e fervidas durante 4 min com 100mM DTT ; 40 μ l dessa mistura resolvidos em 8% SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose. As membranas foram blotadas com anticorpo antifosfotirosina (A), anticorpo anti-banda 3 (C), marcadas com 125 I-proteína A e submetidas a autoradiografia.

Fosforilação em tirosina da banda 3 em células intactas

A) Blot: α PY



B) Blot: α Banda 3



C) Fosforilação em Tyr da Banda 3

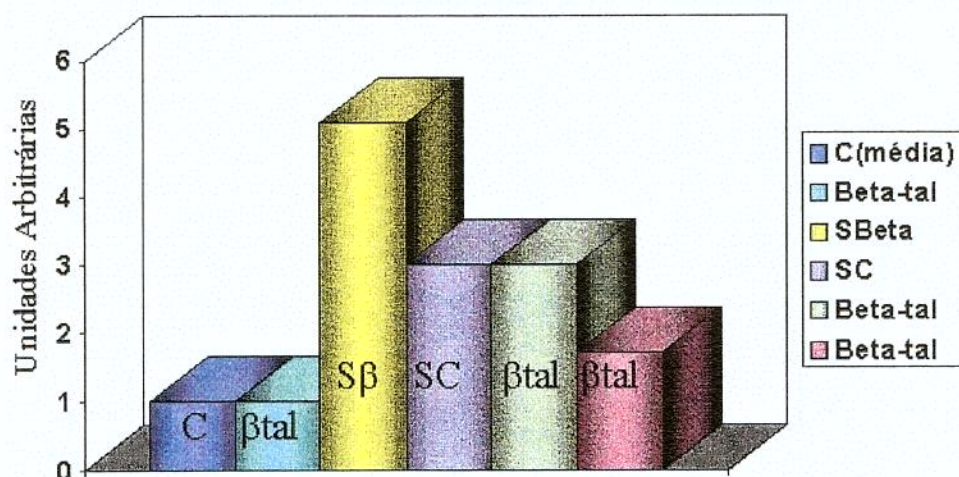
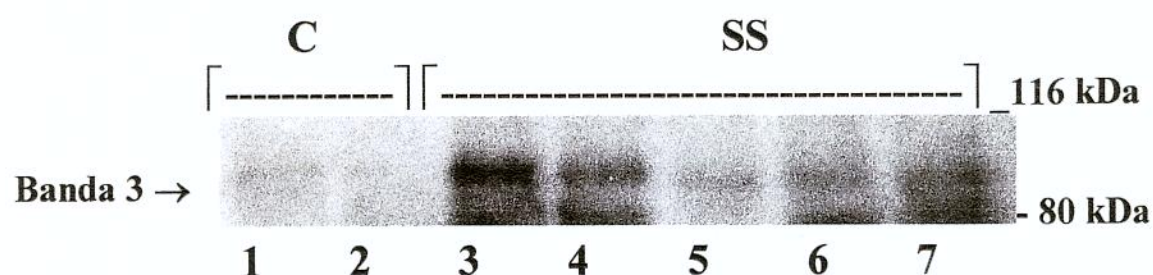


Fig.7. Fosforilação em Tirosina da Banda 3 em células intactas de pacientes com hemoglobinopatias, analisadas por immunoblotting. (A e C): 1,2)Controles; 3)β talassemia, 4) Sβ talassemia, 5)Hemoglobinopatia SC, 6-7) β talassemia. As membranas intactas foram tratadas como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS. As células foram lavadas 3 vezes em PBS gelado com 10mM de ortovanadato de sódio, solubilizadas em Tampão Laemmli e fervidas durante 4 min com 100mM DTT ; 40μl dessa mistura resolvidos em 8% SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose. As membranas foram blotadas com anticorpo antifosfotirosina (A), anticorpo anti-banda 3 (C) e marcadas com ^{125}I -proteína A e submetidas a autoradiografia.

A) Blot: α PY



B) Fosforilação em Tyr da Banda 3

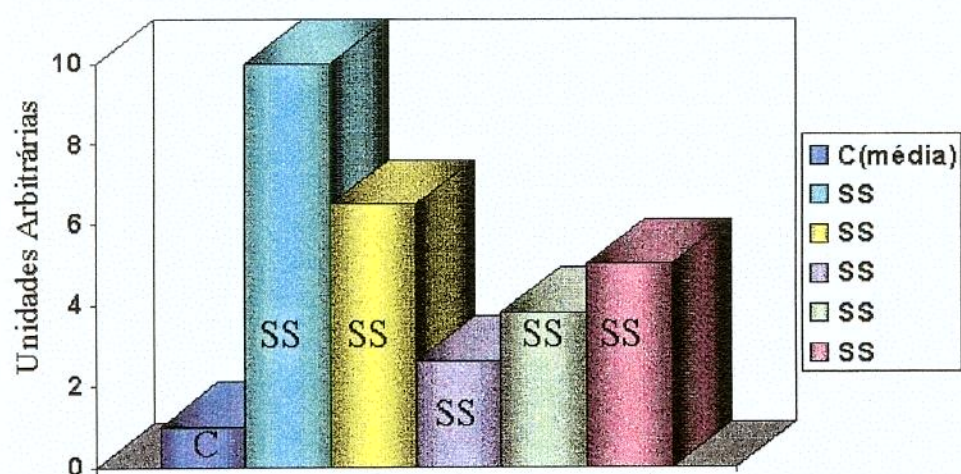
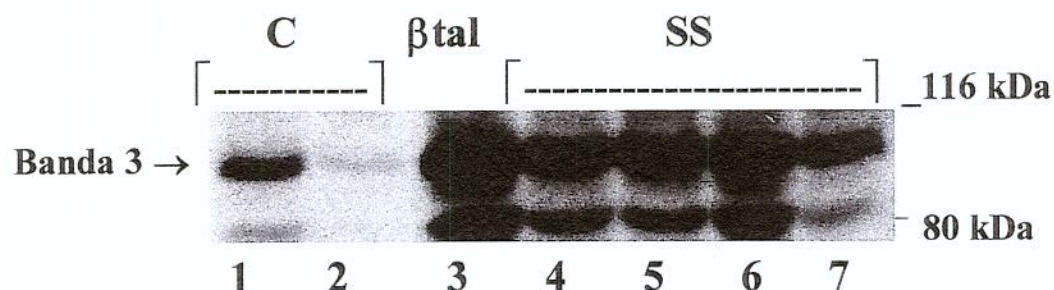


Fig.8. Fosforilação em Tirosina da Banda 3 em células intactas de pacientes com hemoglobinopatias, analisadas por imunoblotting. (A): 1,2)Controles; 3-7)Anemia Falciforme. As membranas intactas foram tratadas como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS. As células foram lavadas 3 vezes em PBS gelado com 10mM de ortovanadato de sódio, solubilizadas em Tampão Laemmli e fervidas durante 4 min com 100mM DTT; 40 μ l dessa mistura resolvidos em 8% SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose. As membranas foram blotadas com anticorpo antifosfotirosina (A) e marcadas com 125 I-proteína A e submetidas a autoradiografia.

A) Blot: α PY



B) Fosforilação em Tyr da Banda 3

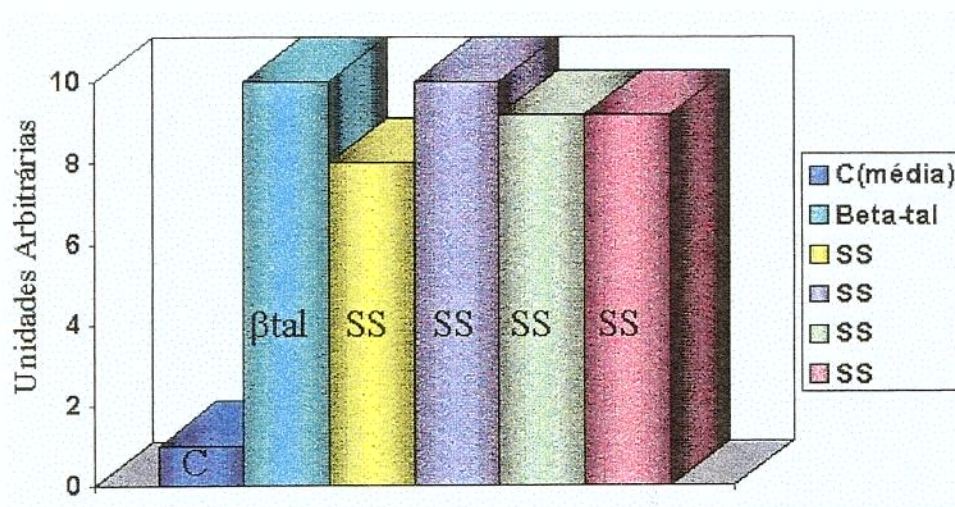
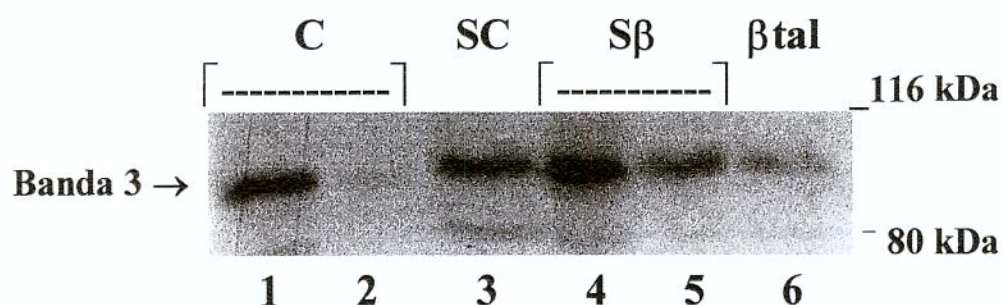


Fig.9. Fosforilação em Tirosina da Banda 3 em células intactas de pacientes com hemoglobinopatias, analisadas por immunoblotting. (A): 1,2) Controles; 3) β talassemia; 4-7) Anemia Falciforme. As membranas intactas foram tratadas como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS. As células foram lavadas 3 vezes em PBS gelado com 10mM de ortovanadato de sódio, solubilizadas em Tampão Laemmli e fervidas durante 4 min com 100mM DTT; 40 μ l dessa mistura resolvidos em 8% SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose. As membranas foram blotadas com anticorpo antifosfotirosina (A) e marcadas com 125 I-proteína A e submetidas a autoradiografia.

A) Blot: α PY



B) Fosforilação em Tyr da Banda 3

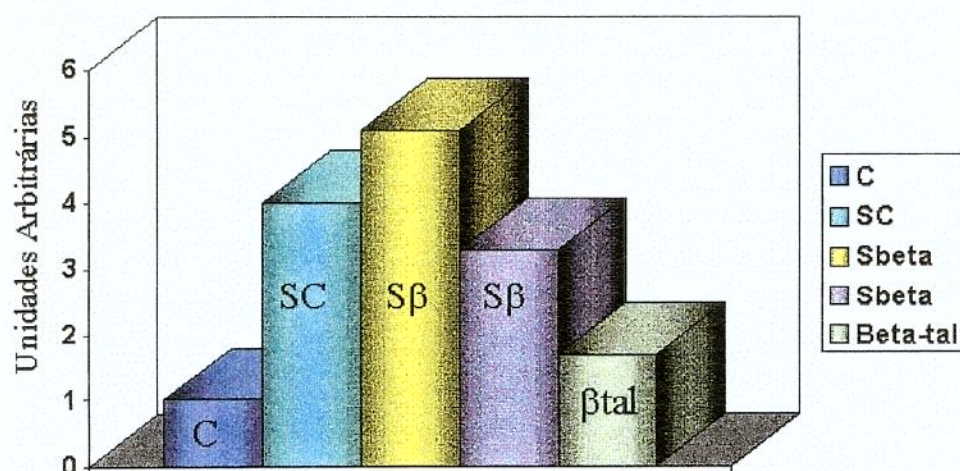
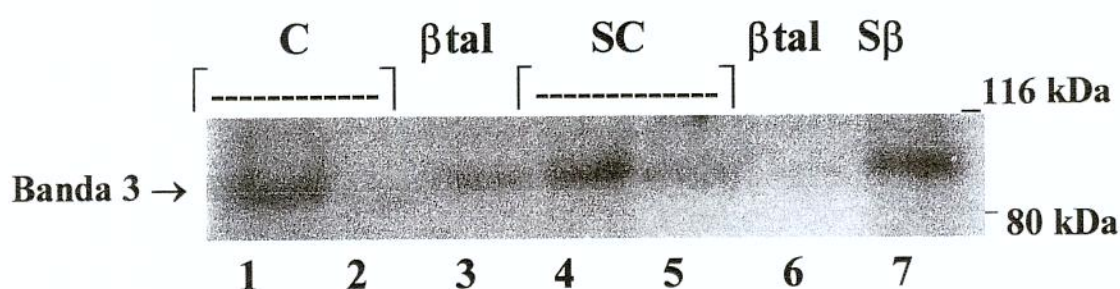


Fig.10. Fosforilação em Tirosina da Banda 3 em células intactas de pacientes com hemoglobinopatias, analisadas por imunoblotting. (A): 1,2)Controles; 3)Hemoglobinopatia SC; 4-5)S β talassemia; 6) β talassemia. As membranas intactas foram tratadas como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS. As células foram lavadas 3 vezes em PBS gelado com 10mM de ortovanadato de sódio, solubilizadas em Tampão Laemmli e fervidas durante 4 min com 100mM DTT ; 40 μ l dessa mistura resolvidos em 8% SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose. As membranas foram blotadas com anticorpo antifosfotirosina (A) e marcadas com 125 I-proteína A e submetidas a autoradiografia.

A) Blot: α PY



B) Fosforilação em Tyr da Banda 3

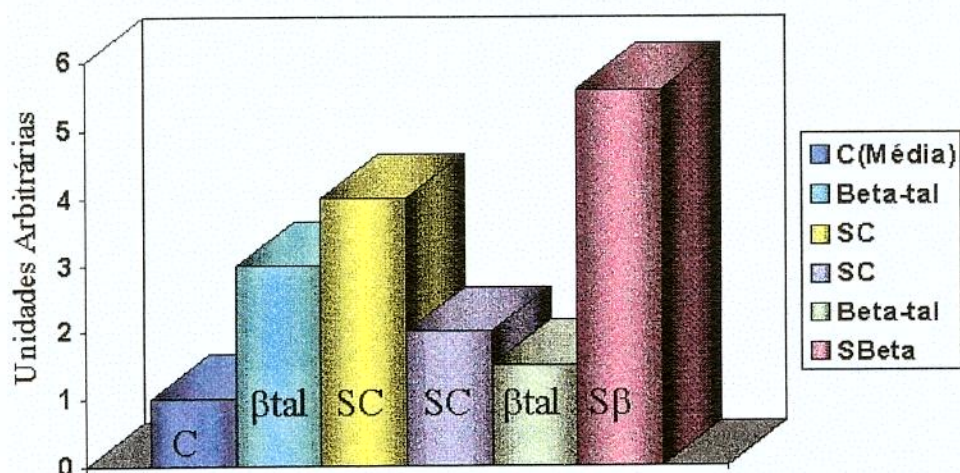
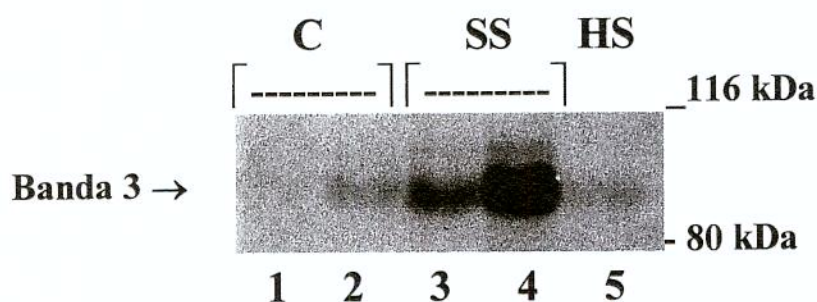


Fig.11. Fosforilação em Tirosina da Banda 3 em células intactas de pacientes com hemoglobinopatias, analisadas por imunoblotting. (A): 1,2)Controles; 3) β talassemia; 4-5) Hemoglobinopatia SC; 6) β talassemia; 7) S β talassemia. As membranas intactas foram tratadas como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS. As células foram lavadas 3 vezes em PBS gelado com 10mM de ortovanadato de sódio, solubilizadas em Tampão Laemmli e fervidas durante 4 min com 100mM DTT ; 40 μ l dessa mistura resolvidos em 8% SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose. As membranas foram blotadas com anticorpo antifosfotirosina(A) e marcadas com 125 I-proteína A e submetidas a autoradiografia.

A) Blot: α PY



B) Fosforilação em Tyr da Banda 3

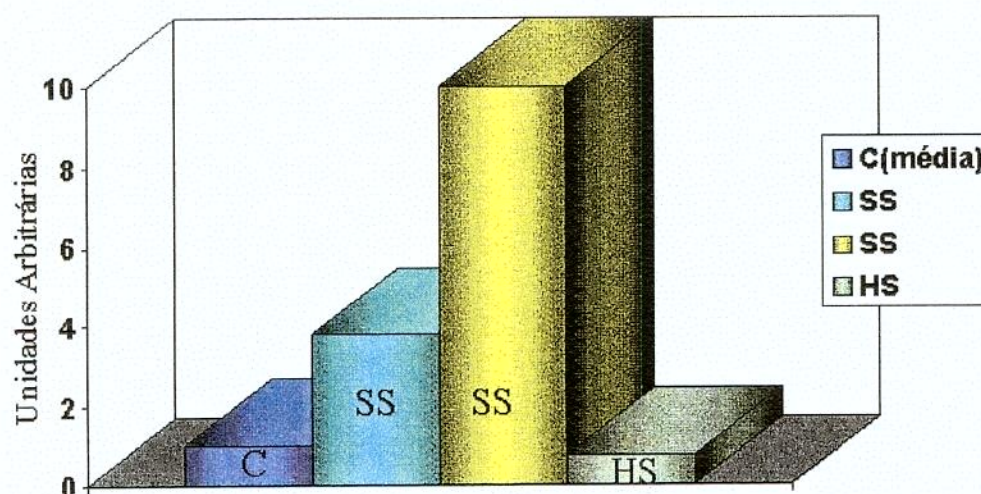


Fig.12. Fosforilação em Tirosina da Banda 3 em células intactas de pacientes com hemoglobinopatias, analisadas por immunoblotting. (A): 1,2)Controles; 3-4)Anemia falciforme, 5) Esferocitose hereditária. As membranas intactas foram tratadas como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS. As células foram lavadas 3 vezes em PBS gelado com 10mM de ortovanadato de sódio, solubilizadas em Tampão Laemmli e fervidas durante 4 min com 100mM DTT ; 40 μ l dessa mistura resolvidos em 8% SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose. As membranas foram blotadas com anticorpo antifosfotirosina (A) e marcadas com 125 I-proteína A e submetidas a autoradiografia.

6. Discussão

A caracterização do esqueleto da membrana eritrocitária forneceu considerável informação a respeito da composição esquelética, ultraestrutura, associações proteína-proteína, ancoragem da membrana e defeitos moleculares. Baseado nesse conhecimento, especial atenção tem sido direcionada para o estudo de pós-tradução ou modificações regulatórias da membrana. As proteínas da membrana eritrocitária são afetadas por um ou vários tipos de modificações, tais como oxidação, proteólises, fosforilação e outras (Cohen & Gascard, 1992).

Uma variedade de fatores pode levar a geração de radicais oxidantes no eritrócito tais como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil ($\cdot OH$). A principal origem de tais radicais é a hemoglobina. O eritrócito contém superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, as quais podem prevenir a oxidação. No entanto, em certas doenças como anemia falciforme e certas hemoglobinopatias instáveis, a ação dessas enzimas pode estar inadequada, levando as proteínas da membrana a sofrerem danos oxidativos (Cohen & Gascard, 1992).

Nas doenças falciformes e talassemias ocorrem alterações das propriedades da membrana, possivelmente pela oxidação (Nash et al., 1984; Evans & Mohandas, 1987; Advani et al., 1992 a; 1992 b). O excesso de oxidação na superfície da membrana (Friedman, 1980; Saklai et al., 1981; Reiss et al., 1982; Waugh & Low, 1985) poderia causar redistribuição das proteínas do citoesqueleto (Low & Waugh, 1985).

No presente estudo nós demonstramos que a fosforilação em tirosina da banda 3 está aumentada em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, hemoglobinopatia SC e S β talassemia, assim como em β talassemia intermediária. Fosforilação em resíduos de tirosina é importante na regulação da proliferação celular, diferenciação e metabolismo celular (Harrison et al., 1991). Desse modo, células eritroleucêmicas de rato (MEL), tratadas com DMSO, um típico agente indutor eritróide, apresentam drástica diminuição ou desaparecimento do conteúdo de fosfotirosina em um estágio primário da diferenciação eritróide. Por outro lado, a adição do inibidor específico da fosfotirosina fosfatase, ortovanadato (Na_3VO_4), previniu a diferenciação eritróide. Esses resultados indicam que desfosforilação de resíduos fosfotirosina de proteínas celulares são acoplados com as reações responsáveis pelo desencadeamento da diferenciação de células MEL.

(Watanabe et al., 1992). Entretanto, o significado do aumento da fosforilação em células anucleadas, como a hemácia, ainda não está claro.

Pouca fosfotirosina é usualmente detectada em células intactas mas, um significativo aumento pode ser alcançado pelo uso de componentes que inibem tirosina fosfatases. A proteína banda 3 é a principal proteína eritrocitária que é fosforilada por tirosina quinase (Phan-Dinh-Tuy et al., 1985) e, conforme observado em nosso estudo, sua fosforilação está presente em *ghosts* e em células intactas quando ortovanadato está presente.

A tirosina quinase aparentemente associa-se com a membrana via N-terminal da banda 3 porque sua associação com a membrana e a fosforilação da banda 3 podem ser reduzidas por G3PD, a qual se liga à banda 3 na região da Tyr 8. Essa tirosina quinase é reversivelmente ligada a membrana através de interações eletrostáticas com a sequência poliácida próxima da tirosina 8 que éceptor de fosfato da banda 3 (Mohamed & Steck, 1986). Harrison et al (1991) sugeriram que a proteína tirosina quinase, presente no eritrócito, poderia ser responsável pela regulação da glicólise através da fosforilação da tirosina da banda 3, visto que quando a fosforilação da Tyr da banda 3 aumentava, através do bloqueio tirosina fosfatase, havia aumento da glicólise.

Vários estudos indicam uma fosforilação anormal da banda 3 em anemia falciforme. Inicialmente, a fosforilação anormal foi vista em *ghosts* (Hosey & Tao, 1976) e em células intactas incubadas com ^{32}P (Dzandu & Johnson, 1980). Por outro lado Jonhson et al (1986), mostraram uma fosforilação normal da espectrina mas um substancial aumento no ^{32}P nas sialoproteínas de eritrócitos falciformes.

No presente trabalho, estudamos a fosforilação da banda 3, não só em anemia falciforme como também, pela primeira vez, em hemoglobinopatias como SC, S β e β talassemia intermediária e, os resultados demonstraram aumento da fosforilação em 30 dos 34 pacientes estudados.

Recentemente, Platt e Falcone (1995) relataram nenhuma diferença de fosforilação de tirosina *in vivo* entre células normais e falciformes. A única diferença foi vista quando ortovanadato foi incluído e peróxido excluído da mistura de incubação. Sob essas circunstâncias, a quantidade de fosfotirosina nas células falciformes foi marcadamente aumentada. De fato, uma fosfatase citosólica tem sido parcialmente purificada de eritrócitos e contém atividade fosfotirosina fosfatase contra o

domínio citoplasmático da banda 3 (Boivin & Galant, 1986; Clari et al., 1986). Estima-se que a atividade da fosfotirosina fosfatase, associada à membrana, seja responsável por 15% do total da atividade fosfotirosina fosfatase celular (Clari et al., 1987). Então, o aumento de fosforilação da banda 3 é claramente observado quando ortovanadato, um inibidor de fosfatase, é usado. A recente caracterização de uma fosfotirosina fosfatase neutra (PTP) associada com a banda 3 corrobora estes estudos (Zipser & Kosower, 1996). Essa PTP é ativada pelo Mg^{2+} e inibida pelo Mn^{2+} e ortovanadato. A PTP é ativa em células intactas e membranas isoladas. A maior fração da PTP é firmemente ligada à membrana e pode ser extraída por Triton X-100; uma menor parte está associada com o citoesqueleto insolúvel ao Triton X-100. O procedimento de extração da PTP é semelhante ao da banda 3, cuja maior fração é extraída por detergentes, sendo a menor fração ancorada ao esqueleto (Bennett & Stenbuck, 1979; Casey & Reithmeier, 1991; Zipser & Kosower, 1996). Ambas banda 3 e PTP são co-precipitadas quando imunoprecipitação é realizado (Zipser & Kosower, 1996). Então, não é surpresa que nenhuma fosforilação foi observada quando ortovanadato não foi usado. Esses resultados não excluem a possibilidade de que a fosforilação da tirosina da banda 3 *in vivo* seja realmente aumentada em anemia falciforme.

O possível efeito da idade de eritrócito deve ser considerado em estudos de pacientes com anemia falciforme. Células falciformes ou β talassêmicas são jovens e as fosforilações anormais observadas podem simplesmente ser uma propriedade do eritrócito jovem. No entanto, nosso estudo não mostrou uma fosforilação anormal de células de pacientes com esferocitose hereditária e reticulocitose. Além disso, na separação de reticulócitos por gradiente Percoll, o aumento da fosforilação foi observado na fração superior tanto quanto na fração inferior de hemácias falciformes.

Corroborando esses resultados, Johnson et al (1986) relataram que a expectativa da diferença de idade entre frações de células falciformes não são significativas, uma vez que todas são relativamente jovens e que a fosforilação das células falciformes separadas por gradiente Stractam foram similares. Esses resultados sugerem que o aumento de fosforilação é uma característica da doença e não uma consequência da idade da célula.

Uma possível explicação para o aumento da fosforilação observado nesse estudo é o estresse oxidativo anormal em eritrócitos de pacientes com hemoglobinopatias. Auto-oxidação espontânea de hemoglobina normal produz radicais livres de oxigênio (Misra & Fridovich, 1972) os quais são

neutralizados pelas vias metabólicas auto-oxidantes normais. Hemácias contendo hemoglobinas anormais estão sob condições de alto estresse oxidativo (Winterbourn et al., 1976). Oxidantes leves estimulam a fosforilação da tirosina da banda 3 (Harrison et al., 1991), possivelmente por inibir uma PTP (Heffetz et al., 1990) ou alterar o estado redox na presença de ortovanadato e H_2O_2 (O'Shea et al., 1992; Harrison et al., 1994). Ambos peróxido de hidrogênio e ortovanadato são conhecidamente inibidores de tirosina fosfatase, e a combinação gera peróxidos de vanadato, os quais são potentes inibidores da desfosforilação de fosfotirosina (Heffetz et al., 1990). Em eritrócitos humanos, vanadium V (vanadato) é reduzido para vanadium IV(pervanadato) pela glutathione. O vanadium IV resultante se liga fortemente a hemoglobina (Macara et al., 1980). Então a presença de um agente oxidante tal como peróxido de hidrogênio pode prevenir a inativação do vanadato visto em eritrócito (Harrison et al., 1994). Sabe-se que $p72^{syk}$ é responsável no mínimo em parte, pela fosforilação da Tyr da banda 3 em eritrócitos humanos, mas o mecanismo molecular da ativação da $p72^{syk}$ por pervanadato é desconhecido (Harrison et al., 1994). A ativação da $p72^{syk}$ por intermediários de oxigênio livres endógenos em neutrófilos humanos foi observada (Brumell et al. 1996). O efeito do peróxido de hidrogênio na fosforilação da tirosina da banda 3 é de interesse visto que em células SS, as defesas autooxidantes estão enfraquecidas e geram espontaneamente duas vezes a quantidade normal de espécies de oxigênio ativado (Hebbel et al., 1982). Atividade de p-nitrofenilfosfatase ligada à membrana também tem sido descrita e foi observada estar diminuída ou alterada em membranas de indivíduos com anemia falciforme, anemia hemolítica congênita e talassemias (Delaunay et al., 1979; Morlé et al., 1982; Brissette et al., 1991). Várias mudanças intracelulares em eritrócitos humanos talassêmicos poderiam gerar danos oxidativos em seus componentes da membrana como oxidação do excesso de subunidades α -globina e excesso de íon intracelular, os quais resultariam no aumento da formação de radicais de oxigênio livres (Rachmilewitz, 1982).

Nossos resultados mostraram também um aumento de fosforilação de uma proteína com cerca de 80 kDa, em eritrócitos falciformes e β talassêmicos quando comparados com controles normais e um paciente com esferocitose hereditária. A proteína de peso 80 kDa é supostamente a proteína 4.1(Subrahmanyam et al., 1991), visto que a mesma possui peso em torno de 80 kDa, entretanto, não obtivemos anticorpos anti-proteína 4.1 para confirmação desta hipótese.

A proteína 4.1 é fosforilada por mais de uma proteína quinase e sua fosforilação diminui em 5 vezes sua afinidade pela espectrina (Eder et al., 1986) produzindo diferentes efeitos na sua ligação

com a membrana e ainda, sugere que seja um provável mecanismo para manutenção do relaxamento e flexibilidade da estrutura do citoesqueleto essencial para o funcionamento normal da membrana eritrocitária (Chao & Tao, 1991). No entanto, pouco se sabe da possível fosforilação do resíduo de Tyr na proteína 4.1.

A habilidade da anquirina de se ligar, tanto com a espectrina como com a banda 3, está reduzida na anemia falciforme (Platt & Falcone, 1995).. Esse defeito funcional pode estar relacionado com o aumento da fosforilação da tirosina, visto que ligação da anquirina inibe fosforilação da Tyr 8 e Tyr 21 da banda 3 (Willardson et al, 1989; Platt & Falcone, 1995). Em adição, a geração *in vitro* de radicais livres induz a fosforilação da banda 3 em tirosina tão bem como reversível translocação de G3PD da membrana para o citoplasma, sugerindo que um mecanismo de regulação metabólica em hemácias poderia modificar a produção de energia durante um ataque de radicais livres (Mallozzi et al., 1995). Danos de proteínas da membrana de hemácias falciformes não é um processo difuso, e sim confinado a regiões da membrana próximas dos sítios de associação da hemoglobina, ou seja, domínio de ligação da anquirina com espectrina e domínio de ligação da anquirina com banda 3 (Platt & Falcone, 1995). Entretanto, os mecanismos desses danos que provocam instabilidade na membrana ainda precisam ser esclarecidos.

Em conclusão, as consequências do aumento da fosforilação em tirosina em hemoglobinopatias ainda não estão claras, mas além da ativação da glicólise, é possível uma ligação inadequada da banda 3 com anquirina, com instabilidade do esqueleto. Os mecanismos desta lesão necessitam de maior investigação.

7. Conclusões

- Concluimos no presente estudo, que o grau de fosforilação em tirosina da banda 3 de hemácias de pacientes com hemoglobinopatias está aumentado.
- As conseqüências do aumento da fosforilação em tirosina em hemoglobinopatias ainda não estão claras, mas os mecanismos desta lesão necessitam de maior investigação.

8.Summary

The band 3 protein is the main erythrocyte protein phosphorylated by tyrosine kinase and this phosphorylation is observed in ghost and intact cells when vanadate is present. The major phosphate acceptor site is at tyrosine residue 8 in the N-terminus of band 3. This region of the cytoplasmic domain has high affinity binding sites for several proteins including haemoglobin. With the aim to investigate the tyrosine phosphorylation of band 3, we performed immunoblotting of intact red cells using anti-phosphotyrosine antibody of 21 patients with sickle cell disorders (11 SS, 5 S β , 5 SC), 7 patients with β thalassaemias (5 β thal intermedia, 2 $\delta\beta$ thal), 10 normal controls and one patient with hereditary spherocytosis. They had not received transfusion for the last 4 months and all were clinically stable. Our results showed an increased tyrosine phosphorylation of two proteins, in the 100kD and 80kD regions, in sickle cell and β -thalassaemic red cells when compared to the normal controls and to the patient with hereditary spherocytosis. Immunoprecipitation of the lysed red cells with anti-band 3 antibody and immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibody confirm that the 100kDa tyrosine phosphorylated protein was band 3. In the sickle cell disease group, the band 3 tyrosine phosphorylation varied from 2 to 10 fold increase compared to control (SS= 7.8 ± 2.7 fold; SC= 3.8 ± 1.3 fold; S β = 5.2 ± 2.0 fold). It was also higher in the β -thalassaemic group (β -thal= 4.3 ± 3.7 fold). There was no significant difference in tyrosine phosphorylation among the various groups tested, except when we compared the phosphorylation in intact red cells of patients with sickle cell anaemia and haemoglobinopathy SC (U=6, $p<0.02$). The tyrosine phosphorylation of band 3 was increased in Haemoglobinopathies even in the absence of high reticulocyte count. At least two mechanisms might be involved in the increased tyrosine phosphorylation of band 3 in these haemoglobin disorders, probably related to the endogenous reactive oxygen intermediates generated by the abnormal erythrocyte: an inhibition of protein tyrosine phosphatase activity or an activation of the protein tyrosine kinase p72syk.

9.Referências bibliográficas

Advani, R., Sorenson, S., Shinar, E., et al. - Characterization and comparison of the blood red cell membrane damage in severe human α and β thalassemia. **Blood** 79:1058-1063, 1992a.

Advani, R., Rubin, E., Mohandas, N., et al. - Oxidative red blood cell membrane injury in pathophysiology of severe mouse β thalassemia. **Blood** 79: 1064 - 1067, 1992b.

Alper, S. L. - The Band 3- Related anion exchanger (AE) gene Family. **Annu Rev. Physiol.** 53: 549-564, 1991.

Apovo, M., Gascard, P., Rhoda, M. D., Beuzard, Y. and Girand F. - Alteration in protein Kinase C activity and subcellular distribution in sickle erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta** 984:26-32, 1989 .

Bennett, V. & Stenbuck, P. J. – The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes. **Nature** 280: 468 - 473, 1979.

Beutler, E., Guinto, E. ,Johnson, C. - Human red cell protein kinase in normal subjects and patients with hereditary spherocytosis, sickle cell disease, and autoimmune hemolytic anemia. **Blood** 48:887-898, 1976.

- Boivin, P. & Galant, C. – The human red cell acid phosphatase is a phosphotyrosine protein phosphatase which dephosphorylates the membrane protein band 3. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 134: 557-564, 1986.
- Brissette, R.E., Swislocki, N.I., Cunningham, E.B. - A *p*-nitrophenylphosphatase Activity associated with the human erythrocyte membrane. **Am. J. Hematol.** 38:166-173, 1991.
- Brumell, J.H., Burkhardt, A.L., Bolen, J.B., Grinstein, S. - Endogenous reactive oxygen intermediates activate tyrosine kinases in human neutrophils. **J. Biol. Chem.** 271: 1455-1461, 1996.
- Casey, J.R. & Reithmeier, R.A F.- Analisis of Oligomeric State of Band 3, the Anion Transport Protein of the Human Erythrocyte membrane, by Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography. **J. Biol. Chem.** 266: 15726-15737, 1991.
- Chao, T. S. & Tao, M. – Modulation of Protein 4.1 to inside - out membrane Vesicles by phosphorylation. **Biochemistry** 30: 10529-10535, 1991.
- Chétrite, G. & Cassoly, R. - Affinity of hemoglobin for the cytoplasmic fragment of human erythrocyte membrane band 3. Equilibrium measurements at physiological pH using matrix – bound proteins: the effects of ionic strength, deoxygenation and of 2,3-diphosphoglycerate. **J. Mol. Biol.** 185: 639-44, 1985.

Clari, G. , Brunati, A.M. , Moret, V. - Partial purification and characterization of Phosphotyrosil - protein phosphatase(s) from human erythrocyte cytosol. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 137: 566-572, 1986.

Clari, G., Brunati, A. M. , Moret, V. – Membrane - bound phosphotyrosil-protein phosphatase activity in human erythrocytes. Dephosphorylation of membrane band 3 protein. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 142: 587-594, 1987 .

Cohen, C.M. & Foley, S.F.- Phorbol ester- and Ca^{2+} -dependent phosphorylation of human red cell membrane skeletal proteins. **J. Biol. Chem.** 261:7701-7709, 1986.

Cohen, C. M. & Gascard, P. - Regulation and post - translational modification of erythrocyte membrane and membrane-skeletal proteins. **Semin. Hematol** 29, 244-292, 1992.

Dekowski, S. A., Rybicki, A. , Drickamer, K. - A tyrosine kinase associated with the red cell membrane phosphorylates band 3. **J. Biol. Chem.** 258: 2750 - 2753, 1983.

Delaunay, J., Fischer, S. , Piau, J.-P, Tortolero, M. , Schapira G. - Properties of a membrane-bound phosphatase activity in normal and abnormal red blood cells. **Clin. Chim. Acta** 93: 15-24, 1979.

- Delaunay, J. , Alloisio, N., Morlé, L ., Pothier, B. - The red cell skeleton and its genetic disorders. **Mol. Asp. Med.** 11: 161-241, 1990.
- Dzandu, J.K. & Johnson, R.M. - Membrane protein phosphorylation in intact normal and sickle cell erythrocytes. **J. Biol. Chem.** 255: 6382-6386 , 1980.
- Eaton , J. W., Berger , E., White, ,J. G. , Jacob, H. S. ,-, Calcium,-,induced damage of ,Halmoglobin, SS and normal erythrocytes. **Br. J. Hemotol.** 38: 57-62, 1978.
- Eder, ,P..S., ,Soong, C.-J, ,Tao, M - Phosphorylation reduces the affinity of protein 4.1 for spectrin. **Biochemistry** 25: 1764 - 1770, 1986.
- Evans, E. A. & Mohandas, N. – Membrane -associated sickle hemoglobin: A major Determinant of sickle erythrocyte rigidity. **Blood** 70: 1443 - 1449, 1987.
- Fairbanks , G. & Avruch, J. - Phosphorylation of endogenous substrates by erythrocyte membrane protein kinases . Cidlicadenosine monophosphate - stimulated reactions. **Biochemistry** 13: 5514-5521, 1974.
- Fairbanks, G., Palek, J., Dino, J.E., et al. - Protein kinases and membrane protein phosphorylation in normal and abnormal human erythrocytes: Variation related to mean cell age. **Blood** 61:850-857, 1983.

- Friedman, M.J. - The red cell. **5th Ann. Arbor Conference**, *Liss, NY*: 519-531, 1980.
- Fukuda, M., Fukuda, M.N., Hakamori, S., Papayannopoulou, T. – Anomalous cell surface structure of sickle cell anemia erythrocytes as demonstrated by cell surface labeling and endo-b-galactosidase treatment. **J. Supramol. Struct. Cell Biochem.** 17: 289-297, 1981.
- Gallagher P G, Tse W T, Forget B G. – Clinical and Molecular Aspects of Disorders of the Erythrocyte Membrane Skeleton. **Semin. Perinatol.** 14:351-367, 1990.
- Green, G. A., Rehn, M. M. Kalra,V. K. – Cell - bound autologous Immunoglobulin in erythorcyte subpopulatuons from patients with sickle cell discase. **Blood** 65 : 1127-1113, 1985.
- Goodman, S.R., Krebs, K.E., Whitfield, C.F., Riederer, B.M., Zagon, I.S. – Spectrin Related molecules. **CRC Crit. Rev. Biochem.** 23: 171 - 234, 1988.
- Harris, S. J. & Winzor, D. J. – Interactions of glycolytic enzymes with erythrocyte membranes **Biochim Biophys Acta** 1038 : 306 - 314, 1990.

Harrison, M.L., Isaacson, C.C., Burg, D.L., Geahlen, R.L., Low, P.S – Phosphorylation of human erythrocyte Band 3 by endogenous p72^{syk}- **J. Biol. Chem.** 269 : 955-959, 1994 .

Harrison, M.L., Rathinavelu, P., Arese, P., Geahlen, R.L. , Low, P.S. - Role of band 3 tyrosine phosphorylation in the regulation of erythrocyte glycolysis. **J. Biol. Chem.** 266: 4106-4111, 1991.

Hebbel, R.P. & Miller, W.J. - Phagocytosis of sickle erythrocytes: Immunologic and oxidative determinants of hemolytic anemia. **Blood** 64, 733 - 740, 1984.

Hebbel, R. P., Yamada, O., Moldow, C. F., Jacob, H. S., White, J. G. , Eaton, J. W. - Abnormal adherence sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium . **J. Clin invest** 65: 154-160, 1980.

Hebbel, R.P., Eaton, J.W, Balasingam, M., Steinberg, M.H. - Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **J. Clin. Invest.** 70:1253-1259, 1982.

Hebbel, R.P – Auto - Oxidation and a membrane - associated "Fenton reagent" : a possible explanation for development of membrane lesions in sickle erythrocytes. **Clin. Haematol.** 14: 129-140, 1985.

Heffetz, D., Bushkin, I., Dror, R., Zick, Y. - The insulinomimetic agents H_2O_2 and Vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. **J. Biol. Chem.** 265: 2896-2902, 1990.

Hosey, M.M. & Tao, M. - Altered erythrocyte membrane phosphorylation in sickle cell disease. **Nature** 263 : 424-425, 1976.

Hosey, M. M. and Tao, M. – Differential phosphorylation of band 3 and glycophorin in intact and extracted erythrocyte membranes. **J. Supramol Struct.** 6: 61-75, 1977.

Jenkins, J.D., Kezdy, F.J. , Steck, T.L. - Mode of interaction phosphofructokinase with the erythrocyte membrane. **J. Biol. Chem.** 260 : 10426 – 10433 , 1985 .

Johnson, R. M., Dzandu, J. K. , Warth, J. A. - The phosphoproteins of the sickle erythrocyte membrane. **Arch. Biochem. Biophys.** 244 : 202 – 210 , 1986.

Johnson, R.M. & Dzandu, J.K. - Calcium and ionophore A23187 induce the sickle Cell membrane phosphorylation pattern in normal erythrocytes. **Biochem. Biophys. Acta** 692: 218-222, 1982.

Kanner, S.B., Kavanagh, T.J., Grossmann, A., et al. - **Proc Natl Acad Sci** 89:300-304, 1992.

- Laemmli, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-686, 1970.
- Low, P. S. & Waugh, S. M. - The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. **Science** 227 : 531 - 533 , 1985.
- Low, P.S., Allen, D.P., Zioncheck, T.F., Chari, P., Willardson, B. M., Geahlen, R.L., Harrison, M. L.: - Tyrosine phosphorylation of band 3 inhibits peripheral protein binding. **J. Biol. Chem.** 262 : 4592 - 4596, 1987.
- Lubin, B. & Chiu, D. - Abnormalities in membrane phospholipid organization in sickled erythrocytes **J. Clin. Invest.** 67: 1643-1649, 1981.
- Lux, S. E., John, K. M., Karnovsky, M. J. - Irreversible deformation of the spectric - actin lattice in irreversibly sickle cell. **J. Clin. Invest.** 58:955-963, 1976.
- Macara , I. G. , Kustin, K. , Cantley, L. C. Jr. - Glutathione reduces cytoplasmic vanadate mechanism and physiological implications. **Biochem. Biophys. Acta** 629: 95-106, 1980.
- Mallozzi , C. , Stasi , A. M. M. D. , Minetti , M. - Free radicals induce reversible Membrane - cytoplasm translocation of glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase in human erythrocytes. **Arch. Biochem. Biophys.** 321 : 345 - 352, 1995.

McCurdy, P.R.- 32DFP and 31Cr for measurement of red cell life span in abnormal hemoglobin syndromes. **Blood** 33 : 214 - 224, 1969.

McCurdy, P.R. & Sherman, A S. – Irreversibly sickle cell and red cell survival in sickle cell anemia . **Am. J. Med.** 64 : 253 - 258, 1978.

Misra, H. P. & Fridovich, L. - The generation of superoxide radicals during the autoxidation of hemoglobin. **J. Biol. Chem.** 247 : 6960 - 6962, 1972.

Mohamed, A. H. & Steck, T. L. : - Band 3 tyrosine kinase : Association with the human erythrocyte membrane. **J. Biol. Chem.** 261: 2804-2809, 1986.

Morlé , L. , Dorléac , E. , Alloisio, N., Jaccoud , P., Colona , P., Bachir, D. , Delaunay, J. - Kinetic alterations of the red cell membrane phosphatase in α - and β - thalassemia. **Am. J. Hematol.** 13, 269-282, 1982.

Murthy, S.N.P., Liu, T., Kaul, R.K., Kohler, H. , Steck, T.L. - The aldolase - binding site of the human erythrocyte membrane is at the NH₂ terminus of band 3. **J. Biol. Chem.** 256: 11203-11208, 1981.

Nash, G.B., Johnson, C.S., Meiselman, H.J.- Mechanical properties of oxygenated red blood cell in sickle cell(HbSS) disease. **Blood** 63 : 73 - 82 , 1984.

O'Shea, J.J., McVicar, D.W., Bailey, T.L., Burns, C., Smyth, M.J. - Activation of human Peripheral blood T lymphocytes by pharmacological induction of protein - tyrosine phosphorylation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 89: 10306 - 10310, 1992.

Palek, J. - Red cell membrane disorders. In : Hoffman, R., Benz, E., J., Shattil, S., J., Furie, B., Cohen, H. J. eds. **Hematology - Basic Principles and Practice**. 1st ed., New York, Churchill Livingstone , 472 - 504, 1991.

Palek, J. and Sahrk , E. - Mutations of the red blood cell Membrane proteins : from Clinical evaluation to detection of the underlying genetic defect. **Blood** 80: 308-330, 1992.

Petz, L.D.; Yam, P., Wilkinson, L., Garraty, G., Lubin, B., Mentzer, W. - Increased, IGG molecules bound to the surface of red blood cells of patients with sickle cell anemia **Blood** 64: 301-304, 1984.

Phan - Dinh - Tuy , F., Henry, J. , Kahn , A. - Characterization of human red blood cell tyrosine kinase. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 126: 304 - 312, 1985.

Platt, O. S., Falcome, J. F, Lux, S. E. - Molecular defect in the sickle erythrocyte Skeleton : Abnormal spectrin binding to sickle inside - out vesicles. **J. Clin. Invest.** 75 : 266 - 271, 1985.

Platt, O.S & Falcone, J.F. - Membrane protein interactions in sickle red blood cells: Evidence of abnormal protein 3 function. **Blood** 86: 1992 – 1998 , 1995.

Rachmilewitz , E. A. Kornberg , A., Acker , M. - Vitamin E deficiency due to increased consumption in β -thalassemia and in Gaucher's disease. **Ann.N Y Acad. Sci.** 336-347, 1982.

Reiss, G. H., Ranney, H M. , Shaklai, N. – Association of hemoglobin C with erythrocyte ghosts. **J. Clin. Invest** 70: 946-952, 1982.

Schluter,.K. & Drenckhahn, D.-Coclustering of denatured hemoglobin with band 3: Its role in binding of autoantibodies against band 3 to abnormal and aged erythrocytes. **Proc. Natl .Acad. Sci. U. S. A.** 83: 6137 – 6141 , 1986.

Schrier, S. L. - Red Cell Membrane Biology-Introduction. **Clin. In Haelmatol.** 14: 1-12, 1985.

Shaklai, N., Sharma, V.S., Ranney, H.M . - Interaction of sickle cell hemoglobin with erythrocyte membranes. **Proc. Natl .Acad. Sci. U. S. A.**:78, 65-68, 1981.

- Subrahmanyam, G., Berties, P.J., Anderson, R.A. - Phosphorylation of protein 4.1 on tyrosine 418 modulates its function *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 88: 5222-5226, 1991.
- Towbin, H., Staehlin, J. T. , Gordon, J. - Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet : procedure and some application. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A** 76: 4350-4354, 1979.
- Tsai, I.-H., Murthy, S. N.P., Steck, T.L.: - Effect of red cell membrane binding on the catalytic activity of glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase. **J.Biol. Chem.** 257:1438-1442, 1982 .
- Vasseur, C., Piau, J. P. , Bursaux, E. - Cation dependence of the phosphorylation of specific residues in red cell membrane protein band 3. **Biochim Biophys. Acta** 899: 1-8, 1987.
- Watanabe, T., Kume, T., Oishi, M. - Alteration of Phosphotyrosine-containing Proteins at the Early Stage of Erythroid Differentiation of Mouse Erythroleukemia (MEL) Cells*. **J.Biol. Chem.** 267: 17116-17120, 1992.

- Walder, J. A. , Chatterjee, R. , Steck, T. L., Low, P. S., Musso, G. F., Kaiser, E.T., Rogers , P. H. , 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.
- Waugh, S. M. & Low, P. S. - Hemichrome binding to band 3: Nucleation of Heinz bodies on the erythrocyte membrane. **Biochemistry** 24 : 34 – 39 , 1985.
- Waugh, S. M. , Walder, J. A. , Low, P. S. - Partial characterization of the Copolymerization reaction of erythrocyte membrane band 3 with hemichromes. **Biochemistry** 26 : 1777 – 1783 , 1987.
- Waugh, S. M., Willardson, B. M., Kannan, R., Labotka, R. J., Low, P. S. - Heinz bodies induce clustering of band 3, glycophorin, and ankyrin in sickle cell erythrocytes. **J. Clin. Invest.** 78:1155 – 1160 , 1986.
- Weatherall D. I. & Clegg B. – The Thalassemia Syndromes. 3rd ed. Oxford, **Blackwell Scientific Publications**, 744-769, 1981.
- Willardson, B. M., Thevenin, B. J., Harrison M. L., Kuster, W. M., Benson, M. D. , Low, P. S. - Localization of the ankyrin -binding site on erythrocyte membrane protein band 3. **J. Biol. Chem.** 264: 15893 – 15899 , 1989.

Winterbourn, C.C., McGrath, B.M., Carrel, R.W. - Reactions involving superoxide and normal and unstable haemoglobins. **Biochem. J.** 155: 493-502, 1976.

Yannoukakos, D., Vasseur, C., Piau, J.P., Wajeman, H., Bursaux, E. – Phosphorylation sites in human erythrocyte band 3 protein. **Biochim. Biophys. Acta** 1061: 253-266, 1991.

Zipser, Y. & Kosower, N.S. -Phosphotyrosine phosphatase associated with band 3 protein in the human erythrocyte membrane. **Biochem. J.** 314: 881-887, 1996.

10. Anexos

ANEXO 1

Tabela I. Fosforilação de tirosina da banda 3 em membranas isoladas(ghosts) de pacientes com hemoglobinopatias.

Pacientes	Diagnóstico	Fosforilação em ghost (P/C)
(1) F.S.A.	SS	3.7
(2) M.A.G.	SS	3.4
(3) J.P.A.	SS	3.2
(4) S.S.O.E.	SS	2.9
(5) M.S.C.	SS	3.6
(6) R.C.C.	SS	4.8
(7)A.A.M.F.	SS	10
(8) L.V.	Sβ	4.0
(9) A.V.M.	Sβ	5.0
(10)M.E.G.L	SC	1.4
(11) M.L.R.	β Talassemia	6.8

ANEXO 2

Tabela II. Fosforilação de tirosina da banda 3 em hemácias intáctas de pacientes com hemoglobinopatias.

Pacientes	Diagnóstico	Fosforilação em hemácia intacta(P/C)
(1) D.C.	SS	10
(2) M.A.G.	SS	6.5
(3) R.P.S.	SS	2.6
(4) C.B.S.	SS	3.8
(5) A.C.S.L.	SS	5.0
(6) M.S.C.	SS	8.0
(7) W.S.	SS	10
(8) I.M.S.	SS	9.2
(9) E.B.L.	SS	9.2
(10) M.C.G.	SS	10
(11) A.A.M.F	SS	10
(12) B.V.	S β	3.2
(13) L.V.	S β	5.1
(14) S.S.	S β	3.3
(15) M.A.S.R	S β	5.6
(16) R.Z.	S β	8.7
(17) M.A.F.	SC	6.0
(18) C.A.C.	SC	3.0
(19) R.S.S.	SC	4.0
(20) J.P.S.	SC	4.0
(21) M.L.S.B	SC	2.0
(22) M.A.MS	β Talassemia	1.0
(23) M.A.S.	β Talassemia	10
(24) F.C.	β Talassemia	3.0
(25) E.S.S.	β Talassemia	1.7
(26) D.F.	β Talassemia	3.0
(27) M.M.F.	β Talassemia	1.5
(28) M.L.R.	β Talassemia	10

ANEXO 3

Tabela III. Dados clínicos e hematológicos dos pacientes participantes deste estudo.

Pacientes(SS)	Idade (anos)	Hb(g/dl)	HbA2(%)	HbF(%)	VCM(fl)	HCM(pg)
D.C.	22	8,2	2,8	8,1	96,9	30,7
M.A.G	21	7,2	1,1	7,2	101,2	32,9
R.P.S.	21	6,4	2,3	6,3	95,2	30,5
C.B.S.	32	10,3	2,5	2,2	111	27,8
A.C.S.L.	34	8,9	2,5	16	94,6	32,9
M.S.C.	17	10,5	1,4	10,4	96,2	33,3
W.S.	21	8,2	2,8	11	89,7	30,4
I.M.S.	29	9	1,7	7,7	82	27,7
E.B.L.	23	10,2	2,8	0,42	89	29,3
M.C.G.	34	6,8	2,5	3,4	92	32,2
A.A.M.F.	21	6,6	3	4,1	87,7	27,8
F.S.A	33	5,9	2	2,8	99	32,8
J.P.A	23	7,1	2,5	7	97	36
S.S.O E	38	7,3	2,3	16,9	101	34,1
R.C.C.	38	6,8	2,1	10,7	97	31,3
média	27,13333	8,026667	2,286667	7,614667	95,3	31,31333
DesvPad	7,099966	1,478642	0,543621	4,797091	6,833322	2,46949
Pacientes(Sβ)	Idade (anos)	Hb(g/dl)	HbA2(%)	HbF(%)	VCM(fl)	HCM(pg)
B.V.	37	8,3	4,4	7,8	68	21,4
L.V.	21	9,5	3,6	1,7	59	19,3
S.S.	16	7,5	2,5	18,6	66	22,1
M.A.S.R.	36	7,8	5	3,3	76,8	23,8
R.Z.	23	10,2	4	5,3	56	18
A V.M.	26	8,6	3,6	6,4	72	20,9
média	26,5	8,65	3,85	7,183333	66,3	20,91667
DesvPad	8,408329	1,029077	0,847939	6,000472	7,81153	2,052722
Pacientes(SC)	Idade (anos)	Hb(g/dl)	HbA2(%)	HbF(%)	VCM(fl)	HCM(pg)
M.A.F.	34	11,1	—	0,5	90,2	27
C.A.C.	29	10,8	—	2,4	83	26,1
R.S.S.	20	9,6	—	2	82,9	28,6
J.P.S.	38	14,7	—	1,1	80	28,2
M.L.S.B.	49	10,6	—	—	93	32,5
M.E.G.L.	21	11,8	—	1,2	68	21,9
média	31,83333	11,43333		1,44	82,85	27,38333
DesvPad	10,98029	1,753473		0,756968	8,783109	3,469534
Pacientes(βtal)	Idade (anos)	Hb(g/dl)	HbA2(%)	HbF(%)	VCM(fl)	HCM(pg)
M.A.M.S.	28	8,2	1,5	61,8	71	23,2
M.A.S.	38	7,9	2,8	81	79	25,9
F.C.	17	5,5	2,4	37	72	22,6
E.S.S.	39	7,6	7,8	23,3	66	20,5
D.F.	20	7,8	1,5	98,5	77	25,3
M.M.F.	37	7,3	4	6,7	61	21,3
M.L.R.	35	9,9	4,5	20,9	68	21,4
média	30,57143	7,742857	3,5	47,02857	70,57143	22,88571
DesvPad	9,034326	1,299817	2,2151	34,14253	6,241184	2,061899