

Eletroforese de proteínas de membrana eritrocitária no diagnóstico de doença hemolítica por defeito de membrana*

► Paulo Roberto Favero¹, Maria Suely Soares Leonart²,
Aguinaldo José do Nascimento³

1. Professor Adjunto do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa - PR.

2. Professora Titular do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná.

3. Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

* Trabalho realizado no Laboratório de Citologia e Hematologia do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, como parte de Dissertação de Mestrado do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR; Apoio: CAPES e UFPR.

Este trabajo ha sido publicado en la Revista Brasileira de Análises Clínicas, 2003; 35(1): 45-7.

Resumo

A membrana eritrocitária contém as proteínas do citoesqueleto, e proteínas integrais, imersas na bicamada lipídica, todas importantes para a manutenção da integridade e da forma celular. Neste trabalho, estudou-se 14 pacientes portadores de doença hemolítica, atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) em relação a grupo controle de 20 voluntários saudáveis. Amostras de sangue venoso foram coletadas em citrato-fosfato-dextrose (CPD). Após o isolamento das membranas [Dodge *et al.*, Arch.Biochem.Biophys. 100:199, 1963] e a determinação da concentração de proteínas [Lowry *et al.*, J. Biol. Chem. 193: 265, 1951], as proteínas foram submetidas à eletroforese vertical em SDS-Page [Laemmli, Nature 227: 680, 1970]. Os valores obtidos no grupo controle (%; n = 10), foram: espectrinas = $29,67 \pm 4,14$; anquirinas = $3,97 \pm 1,84$; banda 3 = $38,70 \pm 4,96$; banda 4.1 = $6,79 \pm 1,60$; banda 4.2 = $5,00 \pm 1,43$; banda 4.5 = $1,89 \pm 0,96$; banda 4.9 = $1,83 \pm 1,22$; banda 5 = $6,54 \pm 3,13$; banda 6.0 = $2,70 \pm 1,24$; banda 7.0 = $2,36 \pm 1,33$. Os valores médios para os portadores de esferocitose foram 24,4% para espectrina e 35,8% para banda 3 (teste t; $p < 0,05$). A observação de esferócitos ou eliptócitos no sangue periférico, associados a um perfil eletroforético com deficiência de espectrina e/ou proteína 3 sugere esferocitose ou eliptocitose hereditária, respectivamente. Portadores assintomáticos de defeitos moleculares de membrana eritrocitária podem ser também detectados através de SDS-Page.

Palavras chave: proteínas de membrana eritrocitária * eliptocitose hereditária * esferocitose hereditária * morfologia eritrocitária * doenças hemolíticas.

Como consecuencia de la política de integración de la Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica –COLABIOCLI– en el área científica, el Comité de Redacción de *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* ha concretado la iniciativa creando la Sección Permanente Latinoamericana, con los trabajos más relevantes de las distintas publicaciones de la región. La reimpresión de los mismos ha sido autorizada por el Consejo Editorial de las respectivas publicaciones oficiales.

Summary

ELECTROPHORESIS OF ERYTHROCYTE MEMBRANE AND HEMOLYTIC DISEASES CAUSED BY MEMBRANE ABNORMALITIES

The erythrocyte membrane contains a net of proteins, forming the cell backbone, and the integral proteins, immersing in the lipid bilayer, both important for the integrity maintenance and for the cellular activity. We studied 14 patient carriers of hemolytic diseases, assisted in the Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) in relation to control group of 20 healthy volunteers. Samples of venous blood were collected in citrate-phosphate-dextrose (CPD). The membranes were isolated [Dodge et al., Arch. Biochem. Biophys. 100:199, 1963], the protein concentration was determined [Lowry et al., J. Biol. Chem. 193: 265, 1951] and were submitted to the vertical electrophoresis (SDS-Page) [Laemmli, Nature 227: 680, 1970]. The values obtained in the control group (%; n = 10) were: spectrins = 29.67 ± 4.14 ; ankyrins = 3.97 ± 1.84 ; band 3 = 38.70 ± 4.96 ; band 4.1 = 6.79 ± 1.60 ; band 4.2 = 5.00 ± 1.43 ; band 4.5 = 1.89 ± 0.96 ; band 4.9 = 1.83 ± 1.22 ; band 5 = 6.54 ± 3.13 ; band 6.0 = 2.70 ± 1.24 ; band 7.0 = 2.36 ± 1.33 . The mean value for the spherocytosis carriers was 24.4% for spectrin and 35.8% for band 3, (t tests; $p < 0.05$). The observation of blood spherocytes or elliptocytes, associated to an electrophoretic profile with deficiency of spectrin or band 3 suggests spherocytosis or hereditary elliptocytosis, respectively. Assymptomatic carriers of erythrocyte membrane molecular abnormalities can also be detected through SDS-Page.

Key words: Red blood cell membrane proteins * hereditary elliptocytosis * hereditary spherocytosis * red blood cell morphology * hemolytic diseases.

Introdução

Dentre as anormalidades intrínsecas que acometem o eritrócito, os defeitos da membrana eritrocitária mais conhecidos incluem a esferocitose hereditária (HS), a eliptocitose hereditária (HE), a piropoiquilocitose hereditária (HPP) a acantocitose hereditária e a estomatocitose hereditária. O diagnóstico presuntivo de tais condições em geral se baseia em: exame clínico, anamnese e sinais de hemólise no hemograma, além da presença das formas eritrocitárias correspondentes e outras alterações da morfologia eritrocitária. No caso da HS há um aumento da fragilidade osmótica, em especial pela presença de esferócitos no sangue periférico. Nenhum destes dados laboratoriais, contudo, é tão específico que permita a confirmação do diagnóstico (Erslev, 1995).

A membrana eritrocitária contém uma rede de proteínas em unidades hexagonais, que formam o citoesqueleto, e as proteínas integrais imersas na bicamada lipídica, todas de fundamental importância para a manutenção da integridade e da forma celular, e classificadas pela sua mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida (Bennett, 1981; Palek e Lux, 1983).

Este trabalho teve o objetivo de estudar alterações qualitativas e quantitativas das proteínas da membrana eritrocitária em indivíduos com diagnóstico presuntivo de HS e HE.

Material e Métodos

Foram selecionados para estudo, através de critérios clínicos e laboratoriais, 14 pacientes com idades entre 3 e 50 anos, atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), com história de doença hemolítica própria e/ou de seus familiares, que apresentavam uma alteração mais das seguintes características: elevados níveis sorológicos de bilirrubina indireta, presença de eritroblastos no sangue periférico, reticulocitose, fragilidade osmótica alterada e anemia. O grupo controle foi constituído por 20 voluntários considerados saudáveis, com idades entre 20 e 50 anos.

As amostras de sangue venoso foram coletadas em Citratofosfato-dextrose (CPD), (Erslev, 1995), e as membranas isoladas segundo (Dodge et al., 1963), como segue: os eritrócitos foram lavados três vezes em NaCl 155mM, a 4 °C. (centrífuga Sorvall RC2B). O sedimento foi diluído a 1:40 em tampão fosfato 5mM contendo fluoreto de fenil metil sulfonil (PMFS) 200mM em etanol, como inibidor de proteases. Os eritrócitos foram lisados por agitação enérgica e centrifugados a 12000 x g a 4 °C durante 10 min, lavandose o estroma várias vezes até se obter sedimento de cor branca opaca. A concentração das proteínas de membrana foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). O sedimento final foi solubilizado com solução de Laemmli (1970) na proporção de 2:1, fracionado em pequenas alíquotas e congelado a 20 °C.

As membranas eritrocitárias foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida dodecil-sulfato sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). A confecção das placas de gel foi realizada em um molde formado por duas placas de vidro e separadores de acrílico. O molde foi preenchido até 1 cm da borda superior com solução de acrilamida a 12% (gel de corrida) e após a polimerização, completado com acrilamida a 4% (gel de alinhamento), no qual foram moldadas cavidades para aplicação de amostras de 100 mg de proteína. A corrida eletroforética foi de 18 h, em cuba vertical de acrílico (Permatron) contendo tampão Tris Glicina 50mM, pH 8,3, sob tensão de 25 volts e corrente de 15mA (Laurent, 1963; Davis, 1962; Weber, 1975; Sauberman, 1979). As placas de gel foram coradas com Coomassie Blue (Brilliant Blue R Sigma B 0630), 1 g; ácido acético glacial, 200 ml; álcool isopropílico, 300 ml; água bidestilada, 1.300ml durante 1 h em estufa a 56°C, descoradas em ácido acético a 10% (v/v), e conservadas em água destilada e as bandas protéicas, quantificadas por densitometria (Zênite Z-30 Turbo).

Os resultados obtidos foram comparados aos do grupo controle (teste t, nível de significância de 5 %).

Resultados

A Figura 1 apresenta a eletroforese em gel de poliacrilamida, realizada com as membranas eritrocitárias de indivíduos do grupo controle. Os valores de referência das frações protéicas obtidos foram (%; n = 10): espectrinas = 29,67 ± 4,14; anquirinas = 3,97 ± 1,84; banda 3 = 38,70 ± 4,96; banda 4.1 = 6,79 ± 1,60; banda

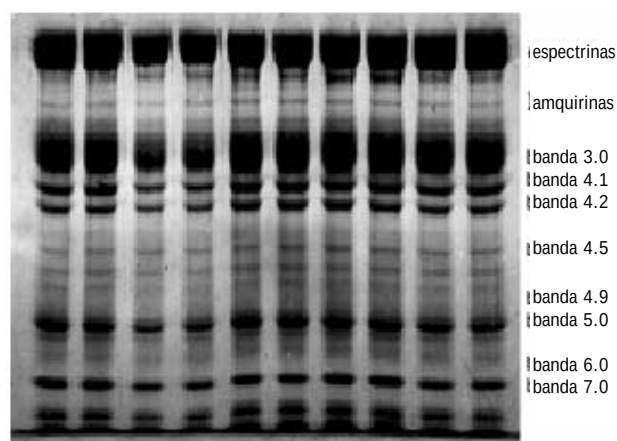


Fig. 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Fotografia de eletroforese de proteínas de membrana eritrocitária segundo Laemmli (1970). As membranas foram isoladas pelo método de Dodge et al. (1963) a partir do sangue de indivíduos do grupo controle

4.2 = 5,00 ± 1,43; banda 4.5 = 1,89 ± 0,96; banda 4.9 = 1,83 ± 1,22; banda 5 = 6,54 ± 3,13; banda 6.0 = 2,70 ± 1,24; banda 7.0 = 2,36 ± 1,33. Os valores médios para os portadores de esferocitose foram 24,4% para espectrina e 35,8% para banda 3 (teste t; p < 0,05).

A Tabela I apresenta as alterações quantitativas, caracterizadas por aumento ou diminuição em relação ao controle, para cada fração protéica da membrana eritrocitária, nos eritrócitos dos pacientes estudados.

As Figuras 2 e 3 apresentam fotomicrografias eletrônicas de varredura dos eritrócitos de pacientes com diagnósticos presuntivos de HE e de HS, respectivamente.

Tabela I. SDS-Page de proteínas de membrana de eritrócitos de portadores de esferocitose (HS) e eliptocitose hereditárias (HE). Variações estatisticamente significativas em relação ao grupo controle

Frações protéicas										
	1.0	2.1	3.0	4.1	4.2	4.5	4.9	5.0	6.0	7.0
1	+	+	-	+	0	+	0	-	-	-
2	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
3	0	+	-	-	-	+	+	-	0	+
4	0	+	+	+	0	-	-	-	-	-
5	-	0	-	-	+	+	+	+	+	+
6	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	0	0	+	+
8	-	0	0	+	+	+	+	-	+	+
9	-	+	0	+	0	0	+	-	-	-
10	-	+	-	0	-	+	+	0	+	+
11	-	+	-	+	-	+	+	0	-	0
12	+	+	0	+	0	-	-	-	-	-
13	-	+	-	+	0	+	+	0	+	+
14	-	+	-	+	-	+	+	0	+	+

0 igual ao controle, + superior ao controle, - inferior ao controle (teste t; significância estatística a nível de 5%); HS - portadores 1 a 12; HE - portadores 13-14.

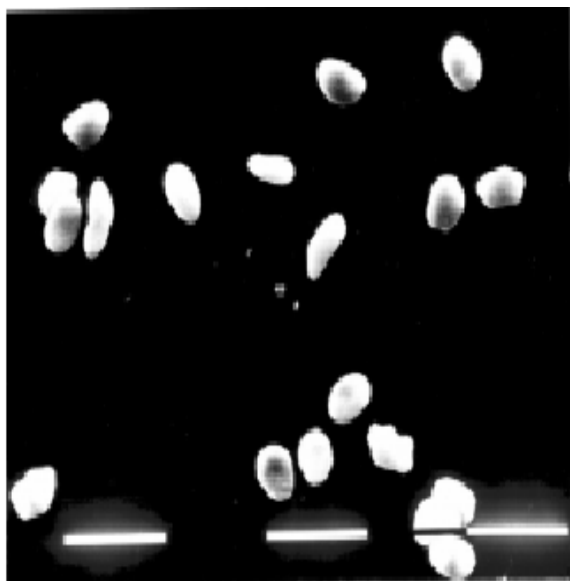


Fig. 2. *Eliptócitos* - Eritrócitos de portadora de eliptocitose hereditária (MEV 2000 X).

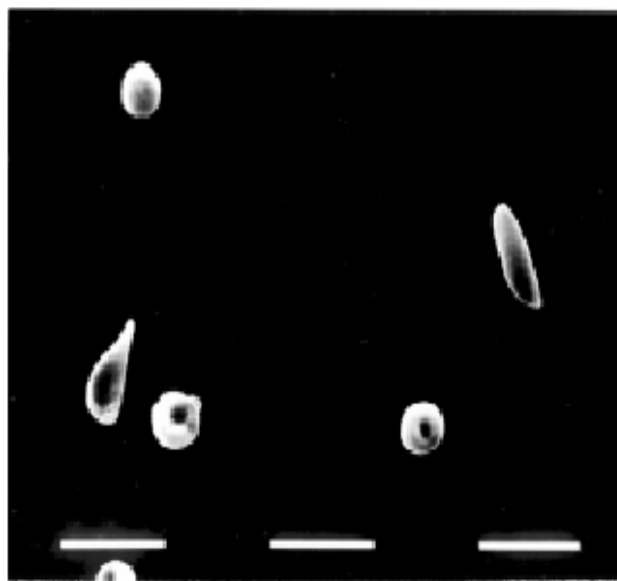


Fig. 3. *Dacriócitos e esferócitos* - Eritrócitos de portador de esferocitose (MEV 2000 X).

Discussão

A eletroforese de proteínas de membrana em gel de poliacrilamida tem sido indicada para o diagnóstico de doenças hemolíticas por defeito de membrana (Laemmli, 1970; Agre *et al.*, 1985; Silveira, 1992).

As alterações da morfologia eritrocitária observadas foram bastante variáveis. A presença de esferócitos na maioria dos pacientes com deficiência de espectrina e/ou de proteína 3 sugere uma possível relação com a HS. Diversos autores propõem que a formação dos esferócitos está relacionada com a perda de lipídios e/ou proteínas de membrana, na forma de microvesículas (Rumsby *et al.*, 1977; Shukla *et al.*, 1978; Chasis *et al.*, 1988). Outra hipótese sugerida para a formação de esferócitos afirma que uma deficiência de proteína 3 pode deixar espaços vazios na bicamada lipídica, levando a um desacoplamento das unidades do citoesqueleto protéico, liberando lipídios da membrana em forma de microvesículas (Jarolim *et al.*, 1994). Um terceiro mecanismo estaria relacionado com o enfraquecimento da ligação da proteína 3 com as proteínas do citoesqueleto, com perda dessa proteína e dos lipídios que a rodeiam (Jarolim *et al.*, 1994).

Em alguns pacientes, observouse esferócitos associados à deficiência em espectrina e/ou banda 3 e de proteína 4.1, responsável pela estabilização do complexo juncional. Uma vez que cada dímero de espectrina se associa a uma molécula de proteína 4.1, a deficiência da primeira poderia acarretar a perda da segunda, aumentando a instabilidade da membrana, com forma-

ção de esferócitos (Cohen, 1983). Um dos pacientes apresentou 42% de esferócitos, com apenas 41,5% de proteína 3 em relação ao controle normal. Outro paciente, com 13,6% de esferócitos, apresentou espectrina normal, 91% do normal de proteína 3, 86% de proteína 4.1 e 62% do normal de proteína 4.2, com fragilidade osmótica normal.

Em eliptocitose, quando a eletroforese demonstra valores quantitativos normais, deve-se considerar a possibilidade de alterações apenas funcionais (Ideguchi *et al.*, 1993).

Conclusões

A análise do perfil eletroforético das proteínas de membrana eritrocitária em portadores de HS e HE, permite concluir que:

- a) a SDSPAGE é útil para o diagnóstico de HS e HE;
- b) esferócitos ou eliptócitos no sangue periférico, associados à deficiência de espectrina e/ou proteína 3, sugere diagnóstico de HS ou HE, respectivamente;
- c) deficiência de espectrina se acompanha, em geral, de deficiência de proteína 3, independentemente do diagnóstico mais provável;
- d) devido às várias interações entre as proteínas do citoesqueleto, é possível que a deficiência de uma proteína possa causar a perda de outra proteína;

- e) portadores assintomáticos podem ser detectados se apresentarem deficiências de proteínas integrais e/ou do citoesqueleto, associadas a alterações morfológicas de eritrócitos.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Profª MARIA SUELY SOARES LEONART
Laboratório de Citologia e Hematologia do Curso
de Farmácia da Universidade
Federal do Paraná - CURITIBA, PR
E-mail: msue@ufpr.br

Referências

1. **Agre, P.; Casella, J. F.; Zinkham, W. H.; Mc Millan, C.; Bennett, V.** Partial deficiency of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis. *Nature*. 314:380-383, 1985.
2. **Bennett, V.** Proteins involved in membrane-cytoskeleton association in human erythrocytes: spectrin, ankyrin, and band 3. *Meth. Enzymol.* 96:313-324, 1981.
3. **Chasis, J. A.; Agre, P.; Mohandas, N.** Decreased membrane mechanical stability and in vivo loss of surface area reflect spectrin deficiencies in hereditary spherocytosis. *J. Clin. Invest.* 82:617-623, 1988.
4. **Cohen, C. M.** The molecular organization of the red cell membrane skeleton. *Semin. Hematol.* 20:141-158, 1983.
5. **Davis, B. J.** Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *An. N. Y. Acad. Sci.* 2:404-425, 1962.
6. **Dodge, J. T.; Mitchell, C.; Hanahan, D. J.** The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 100:119-130, 1963.
7. **Erslev, A. J.** Clinical manifestations and classification of erythrocyte disorders. In: *Williams Hematology*, 5th ed., New York, Mc Graw-Hill Inc., 1668p. 1995.
8. **Ideguchi, H.; Yamada, Y.; Kondo, S.; Tamuka, K.; Makino, S.; Hamasaki, N.** Abnormal erythrocyte band 4.1 protein in myelodysplastic syndrome with elliptocytosis. *Br. J. Haematol.* v.85, p. 387-392, 1993.
9. **Jarolim, P.; Rubin, H. L.; Liu, S. C.; Cho, M. R.; Brabec, V.; Derick, L. H.; Yi, S. J.; Saad, S. T. O.; Alper, S.; Brugnara, C.; Golan, D. E.; Palek, J.** Duplication of 10 nucleotides in the erythroid band 3 (AE1) gene in a kindred with hereditary spherocytosis and band 3 protein deficiency (Band 3^{Prague}). *J. Clin. Invest.* 93:121-130, 1994.
10. **Laemmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685, 1970.
11. **Laurent, T. C.; Killander, J.** A theory of gel filtration and its experimental verification. *J. Chromatol.* 14:317-330, 1964.
12. **Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
13. **Palek, J.; Lux, S.** Red cell membrane skeleton defects in hereditary and acquired hemolytic anemias. *Semin. Hematol.* 20:189-224, 1983.
14. **Rumsby, M. G.; Trotter, J.; Allan, D.; Michell, R. H.** Recovery of membrane micro-vesicles from human erythrocytes stored for transfusion: a mechanism for the erythrocyte discocyte-to-spherocyte shape transformation. *Biochem. Soc. Trans.* 5:126-128, 1977.
15. **Sauberman, N.; Fortier, N. L.; Fairbanks, G.; O'Connor, R. J.; Snyder, M.** Red cell membrane in hemolytic disease studies on variables affecting electrophoretic analysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 556:292-313, 1979.
16. **Shukla, S. D.; Berriman, J.; Coleman, R.; Finean, J. B.; Michell, R. H.** Membrane protein segregation during release of microvesicles from human erythrocytes. *Febs. Letters.* 90:289-292, 1978.
17. **Silveira, P. A. A.** Contribuição ao estudo das anemias por defeito protéico da membrana eritrocitária com o uso da eletroforese em gel de poliacrilamida. São Paulo, 1992. 94p. [Tese-Doutoramento. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo].
18. **Weber, K.; Osborn, M.** Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. In: *The Protein*, v.1, 3th ed., Edited by Hans Neurath and Rotberg L. Hill, Academic Press Inc., New York, 1975.