

Topologia das principais proteínas da membrana e do citoesqueleto eritrocitário

Topology of the main proteins of erythrocyte membrane and cytoskeletal

Wagner de Jesus Pinto¹, José Eduardo de Marialva², Silvana Maria Guida Cardoso³, Miguel Arcanjo Areas⁴

¹Mestrado e Doutorado em Biologia Funcional e Molecular UNICAMP, Professor Adjunto, UFAC; ² Mestrado em Ciências Biológicas (Fisiologia) pela UNICAMP. Professor - USJT; ³Mestrado em Fisiologia e Biofísica e Doutorado em Biologia Funcional e Molecular pela UNICAMP; ⁴Mestrado em Ciências Biológicas (Fisiologia) pela UNICAMP e Doutorado em Ciências de Alimentos UNICAMP. Professor, UNICAMP

Resumo

A membrana eritrocitária está ligada a um esqueleto subjacente via proteínas de membrana integrais, as quais, juntamente com as proteínas esqueléticas atuam no sentido de estabelecer a forma e as propriedades mecânicas da célula. Os eritrócitos constituem um mecanismo eficaz de transporte de gases no sangue, função essa facilitada por sua geometria discoide e bicôncava. São células sujeitas a altas pressões impostas pelo sistema artério-venoso e sujeitas a grandes deformações em decorrência ao passarem através de capilares com 2 a 3 µm de diâmetro. A membrana plasmática e o citoesqueleto eritrocitário apresenta papel extremamente importante na capacidade de deformação celular do eritrócito e na manutenção da integridade estrutural da célula. Anormalidades na fração proteica que compõem a membrana e o citoesqueleto eritrocitário (glicoforina, proteína de banda 3, espectrinas, proteína 4.1, anquirina dentre outras) tem impacto direto na deformidade celular. Defeitos nessas proteínas alteram as funções eritrocitárias e a morfologia celular causando esferocitose, estomatocitose, eliptocitose dentre outras alterações do formato celular. O estudo topológico das proteínas que estão presentes na membrana do eritrócito e em seu citoesqueleto constitui uma fonte rica de informações para compreender de forma mais plena a função desses elementos na fisiologia celular e também nas disfunções celulares.

Palavras-chave: Eritrocito. Topologia. Membrana. Citoesqueleto. Proteínas.

Abstract

The erythrocyte's lipid bilayer is linked to an underlying membrane skeleton via integral membrane proteins, which together with the skeletal proteins help establish the shape and mechanical properties of the cell. Erythrocytes are an effective mechanism for transport of gases in the blood, this function is facilitated by its geometry and discoid biconcave form. Cells are subjected to high pressures caused by arterial and venous system and subject to large deformations due to pass through capillaries with a diameter of 2-3 µm. The erythrocyte plasma membrane has important role in cell deformability of red blood cells and in maintaining the structural integrity of the cell. Abnormalities in protein fraction comprising the erythrocyte membrane (glycophorin, band 3, cytoskeletal proteins such as spectrins, protein 4.1, ankyrin and others) have a direct impact on erythrocyte deformity. Defects in these proteins alter the functions and erythrocyte cell morphology causing spherocytosis, elliptocytosis stomatocytosis among others. The topological study of proteins that are present in the red blood cell membrane and its cytoskeleton constitutes a rich source of information to understand more fully the functions of these elements in cellular physiology and also in cellular dysfunctions.

Key words: Erythrocyte. Topology. Membrane. Cytoskeletal. Proteins.

INTRODUÇÃO

A membrana plasmática do eritrócito apresenta papel chave na manutenção da forma bicôncava da célula, sendo constituída por 42% de lipídios, 52% de proteínas e 7% de carboidratos¹. É funcionalmente semelhante às demais membranas celulares, apresenta as mesmas propriedades biofísicas das de outras células, tais como: define os limites da célula, mantém a assimetria entre as concentrações de íons presentes no citosol e no meio

externo, é seletivamente permeável, exerce função de reconhecimento molecular, constitui a interface entre o meio externo e o citosol¹. A membrana eritrocitária compõe parte do citoesqueleto, e confere à célula flexibilidade e resistência, propriedades necessárias já que as células do sangue estão constantemente submetidas a traumas inerentes à dinâmica do sistema cardiovascular.

As proteínas ancoradas na membrana eritrocitária podem ser classificadas em integrais e periféricas ou extramembranárias. As proteínas integrais são aquelas que estão imersas na bicamada lipídica enquanto que as periféricas, que constituem o citoesqueleto, encontram-se dispostas na face interna da bicamada lipídica, interagindo entre si (Figura 1). As proteínas periféricas são as espectrinas (alfa e beta), anquirinas, bandas 4.1,

Correspondência / Correspondence: Prof. Dr. Wagner de Jesus Pinto- Universidade Federal do Acre, Centro de Ciências da Saúde e Desporto, sala 107- Campus Universitário Áulio Gélvio-BR 364, Km 4-Distrito Industrial-CEP: 69920-900-Rio Branco, Acre. Telefone (68) 3901-2500 E-mail: wagner.wjp@gmail.com

4.2, demantina, actina, aducina, bandas 6 e 7. A interação dessas proteínas do citoesqueleto com a bicamada lipídica e com as proteínas integrais da membrana são responsáveis pela flexibilidade e deformabilidade do eritrócito. Dentre as diversas proteínas que encontram-se ancoradas à membrana plasmática eritrocitária destacam-se a proteína de banda 3 ou proteína de troca de íons (anion exchanger 1, AE1) um transportador de membrana cuja função é promover trocas de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ possibilitando aumento da capacidade eritrocitária de transportar CO_2 já que mais de 60% desse gás é transportado no interior do eritrócito na forma de HCO_3^- , fenômeno esse chamado fuga de cloreto.

Outras proteínas da membrana eritrocitária incluem as glicoforinas A, B, C, D, que possuem receptores de membrana e antígenos que atuam no reconhecimento célula-célula em sua porção extracelular além de estabilizar o citoesqueleto através de ligações com a proteína 4.1 na face interna da membrana plasmática² (Figura 1). Os principais componentes de membrana associados ao citoesqueleto são as proteínas espectrina e

actina. Quatro a seis moléculas de espectrina estendem-se radialmente a partir de cada protofilamento de actina central formando um complexo supramolecular chamado “complexo juncional”.

Estes complexos juncionais são ainda formados por proteínas adicionais, incluindo tropomodulina, tropomiosina, proteína de banda 4.1, a proteína de banda 4.2 e aducina, que individual ou coletivamente desempenham um papel essencial na formação de pontes entre o citoesqueleto e a bicamada lipídica, aumentando as interações espectrina-actina no complex juncional^{2, 3}.

Essas proteínas do citoesqueleto membranário formam uma verdadeira malha, que constitui quase uma concha para o material intracelular. Este esqueleto é responsável pela forma, bicôncava normal ou anormal, em caso de defeitos genéticos, dos glóbulos vermelhos, e representa por si só 60% da massa protéica de toda a membrana³. A Tabela 1 mostra os efeitos decorrentes de falhas genéticas na síntese de proteínas de membrana ou do citoesqueleto eritrocitário.

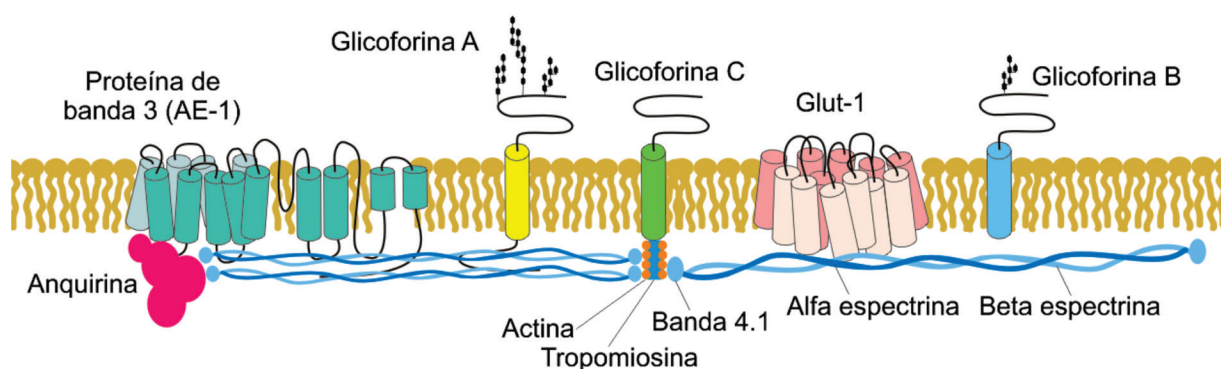


Figura 1. Arquitetura da membrana eritrocitária mostrando a disposição de importantes proteínas integrais e também proteínas que formam o citoesqueleto celular.

Tabela 1. Transportadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e suas propriedades.

Proteína	Efeitos decorrentes da alteração genética
Anquirina	Esferocitose dominante em aproximadamente 50% dos casos.
β -Espectrina	Esferocitose dominante em aproximadamente 50% dos casos. Esferocitose dominante (presença de esferocantócitos em aproximadamente 30% dos casos). Raramente esferocitose recessiva. Eliptocitose em aproximadamente 5% dos casos.
α -Espectrina	Eliptocitose em aproximadamente 80% dos casos.
Banda-3	Esferocitose dominante e recessivas raras com presença de esferócitos <i>pinçados</i> . Esferocitose recessiva (dupla heterozigose), rara ovalocitose do sudoeste asiático.
Banda 4.2	Esferocitose dominante recessiva rara (prevalência quase exclusiva do Japão).
Banda 4.1	Eliptocitose em 15% dos casos.
Glicoforina C	Eliptocitose rara.

O eritrócito como transportador de CO₂

Quase todo o CO₂ gerado pelo metabolismo tissular é transportado no interior dos eritrócitos na forma quimicamente modificada de HCO₃⁻. A enzima anidrase carbônica presente em altas concentrações no interior dos eritrócitos catalisa a hidratação do CO₂ para formar H₂CO₃. Essa reação é dirigida para a direita, pela ação das massas, visto que o CO₂ está em constante produção por parte dos tecidos. Nos eritrócitos o H₂CO₃ se dissocia em H⁺ e HCO₃⁻. O próton de hidrogênio (H⁺) permanece no interior do eritrócito onde será tamponado pela desoxihemoglobina, e transportado, para o sangue, nessa forma. Nos alvéolos, a ligação do O₂ ao centro heme da hemoglobina promove a liberação de H⁺ da molécula de hemoglobina cumprindo assim uma função ácida. Essa reação desencadeia o deslocamento do CO₂ em suas formas carbamino-hemoglobina e HCO₃⁻ esse processo é conhecido como Efeito Haldane. Já o HCO₃⁻ é transportado para o plasma trocado pelo Cl⁻, fenômeno chamado fuga de cloreto que é realizado por uma proteína trocadora de ânions chamada de proteína de banda três ou eAE1. A troca Cl⁻ / HCO₃⁻ ocorre no sentido de manter o balanço das cargas elétricas. Se o H⁺ produzido por essas reações permanecesse livre em solução, acidificaria os eritrócito e o sangue venoso com efeitos deletérios para o organismo. A entrada de cloreto é acompanhada pelo deslocamento de água para o interior do eritrocitário promovendo um efeito de turgescência no eritrócito. Cerca de 21% dos CO₂ intraeritrocitário é transportado ligado a terminais NH₂ de resíduos de aminoácidos das subunidades alfa e beta da hemoglobina e uma pequena fração de cerca de 5% é transportado na forma física no citosol eritrocitário (Figura 2).

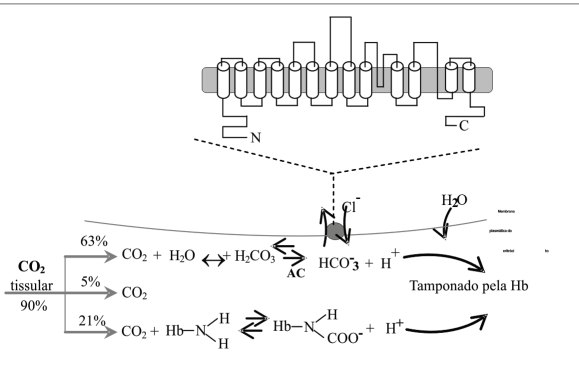


Figura 2. Formas de transporte de CO₂ no interior dos eritrócitos. Cerca de 90% do CO₂ tissular é transportado no interior dos eritrócitos e desse valor aproximadamente 63% reage com a água para formar H₂CO₃ (ácido carbônico) que é dissociado pela anidrase carbônica para dar origem ao HCO₃⁻ que é extrudido para o meio extracelular em troca com o cloreto. Essa operação é realizada pelo antiportador eAE1.

Proteína de banda 3 ou AE1

A proteína AE1 recebe também o nome de proteína de banda 3 em função de seu posicionamento no gel de eletroforese, compreende 25% do total de proteínas presentes na membrana do eritrócito e faz parte da família dos transportadores de HCO₃⁻ cujos membros apresentam significativas diferenças entre si tais como, distribuição tecido-específica (epitélio apical ou basolateral, eletrogenicidade, regulação e funções fisiológicas⁴. Essas proteínas estão implicadas em uma grande variedade de doenças como, por exemplo, hipertrofia cardíaca, esferocitose eritrocítica hereditária, acidose tubular renal distal e proximal epilepsia, bócio, síndrome de Pendred e fibrose cística⁵. Os transportadores de bicarbonato são expressos por duas famílias distintas de genes, SLC4A e SLC26A (Figura 3).

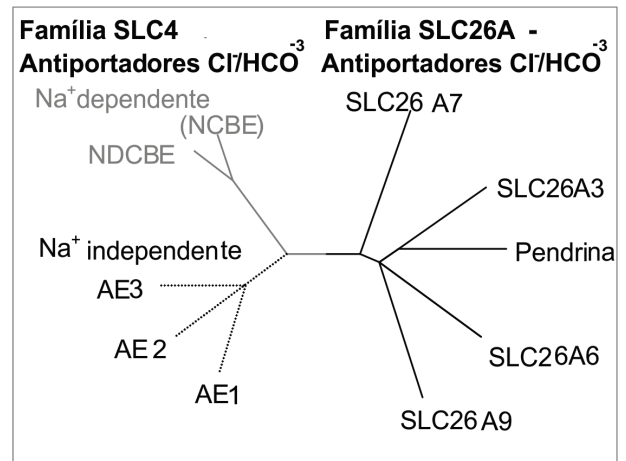


Figura 3. Dendrograma filogenético de antiportadores Cl⁻/HCO₃⁻. A sequência de resíduos de aminoácidos correspondente ao gene humano do transportador Cl⁻/HCO₃⁻ foi alinhada usando o programa Clustal W (<http://align.gonome.jp/>). O comprimento de cada linha indica a relativa distância evolucionária de cada transportador. Os transportadores estão divididos em duas grandes famílias, SLC4A e SLC26A sendo a família SLC4A subdividida em duas subfamílias, sódio dependente e sódio independente. Na subfamília sódio dependente NCBE está entre parênteses porque foi proposto que esse transportador fosse um Na⁺/HCO₃⁻ em vez de um antiportador Cl⁻/HCO₃⁻.

Fonte: Pamela T. Bonar and Joseph R. Casey. Plasma membrane Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers Structure, mechanism and physiology. Channels 2:5, 337-345; September/October 2008.

A seqüência de DNA do gene que codifica a AE1 é composta de 20 éxons e 19 introns estando localizada no cromossomo 17q12-q21 e constituída de 17 kb no total⁶. O gene da banda 3 era comumente chamado de AE1 (anion exchanger 1 gene), porém, foi recentemente renomeado como SLC4A1 (Solute Carrier Family 4, Anion Exchanger, Member 1), pelo comitê de nomenclatura do mapeamento genético humano (Human Gene Mapping – HGM). Esses transportadores tem sido intitulados pela

HUGO (Human Genome Organization) como “proteínas soluto carreadoras” (SLC). A família SLC4A contém os co-transportadores sódio-bicarbonato (NBCs), transportadores Cl-/HCO₃⁻ sódio dependentes (NDCB e NCBE), e transportador cloreto-bicarbonato sódio independente (AE1, AE2 e AE3). Já a família SLC26A congrega transportadores Cl-/HCO₃⁻ que apresentam em certos casos mecanismos de funcionamento eletrogênicos. Há cinco diferentes transportadores Cl-/HCO₃⁻ nessa família (SLC26A3, Pendrina, SLC26A6, SLC26A7 e SLC26A9).

A nomenclatura um tanto caótica dos transportadores de Cl-/HCO₃⁻ pertencentes às famílias SLC4A e SLC26A deve-se em parte ao fato de que esses antiportadores foram descobertos a mais de vinte anos atrás⁷. Em muitos casos, a mesma proteína foi descoberta por pesquisadores diferentes e de forma independente sendo que lhes atribuíram nomes distintos. A Tabela 2 elenca todos os transportadores de ânions e seus respectivos nomes bem como sua distribuição tissular dentre outras informações relevantes. A especificidade e eletrogenicidade de alguns transportadores Cl-/HCO₃⁻ ainda é um ponto de celeuma entre a comunidade científica de modo que, as informações presentes na Tabela 2 são decorrentes de nossa interpretação dos dados presentes na literatura especializada.

O domínio transmembranar da proteína AE1-3 é que apresenta a função carreadora Cl-/HCO₃⁻ e é formada por cerca de 500 resíduos de aminoácidos, essa região apresenta aproximadamente de 80% de homologia com os carreadores AE2 e AE3¹¹. O exato número de alças transmembranares é incerto, mas, através de análise da sequência de aminoácidos de proteína AE1 de ca-

mundongos hipotetizou-se a presença de 12 a 14 segmentos transmembrânicos⁸ (Figura 4). O antiportador AE1 é expresso por um gene localizado no cromossomo 17q21-q22 sendo composto por 911 resíduos de aminoácido em sua sequência possuindo, 13 hélices transmembrânicas com e suas porções amino e carboxiterminal orientadas para o meio intracelular (Figura 3)⁴. É considerado a principal proteína integral dos eritrócitos com peso molecular de 102KDa respondendo por cerca de 25 a 30% de toda massa protéica da membrana eritrocitária¹¹. A A1E apresenta um sítio de glicosilação em um resíduo de asparagina (aminoácido 642) enquanto que as outras isoforma, AE2 e AE3 apresentam sítios de glicosilação na terceira hélice transmembranar¹². O primeiro gene de transportadores Cl-/HCO₃⁻ a ser clonado foi do antiportador A1E em 19858, subsequentemente os genes dos transportadores AE2 e AE3 foram também clonados usando-se sondas específicas⁹. Os transportadores AE1, AE2 e AE3 são Na⁺ independentes e transportam Cl-/HCO₃⁻ reversivelmente seguindo um gradiente de concentração¹⁰. Os três antiportadores são compostos por três domínios, um transmembranar um carboxiterminal e um aminoterminal, esses dois últimos estão orientados para o meio intracelular e variam de tamanho de acordo com a isoforma. Todos os antiportadores da classe SLC4A apresentam cerca de 40 resíduos de aminoácidos que interagem com a anidrase carbônica.

Além dos eritrócitos está presente ainda na membrana basolateral das células intercaladas, nos túbulos contorcidos distais dos néfrons, na alça de Henle. No eritrócito, sua principal função é atuar como antiport-

Tabela 2. Transportadores Cl-/HCO₃⁻ e suas propriedades.

Transportador	Nomenclaturas	Distribuição tissular / Localização epitelial	Mecanismo/Eletrogenicidade
AE1	SLC4A1, Band 3, kAE1, eAE1	Eritrócitos, rins, coração / KAE1 Membrana basolateral das células dos ductos coletores renais.	Cl ⁻ , /HCO ₃ ⁻ antiportador/eletroneuro
AE2	SLC4A2	Membranas basolaterais de uma forma geral	Cl ⁻ , /HCO ₃ ⁻ antiportador/eletroneuro
AE3	SLC4A3 AE3c, AE3fl	Cérebro, coração, retina, hipófise, adrenais; Não epithelial.	Cl ⁻ , /HCO ₃ ⁻ antiportador/eletroneuro
NDCBE	SLC4A8, NDAE1, kNBC-3	Córtex pré-frontal, testículos, miócitos cardíacos, oócitos	Na ⁺ dependente Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻
NCBE	SLC4A10 NBCn2	Miócitos cardíacos, neurônios, rins, útero, córtex adrenal, plexo coroidal/ Basolateral	Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ cotransporte ou Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ Na ⁺ dependente / eletroneuro
SLC26A3	DRA, CLD	Cólon, ileo, miócitos cardíacos, glândulas sudoríparas écrinas / Apical	Cl ⁻ , /HCO ₃ ⁻ / eletroneuro
Pendrina	SLC26A4, PDS	Tireóide, ouvido interno, rins, próstata / Apical	Cl ⁻ , /HCO ₃ ⁻ também I ⁻ / eletroneuro
SLC26A6	PAT-1, CFEX	Rins, coração, epitélio brônquico, pâncreas, próstata, timo, intestinos/Apical	Cl ⁻ , /HCO ₃ ⁻ também oxalato e formato eletroneuro
SLC26A7	SLC26A7	Tireóide, rins, estômago retina, epitélio olfatório /Basolateral	Cl ⁻ , /HCO ₃ ⁻ antiportador/eletrogênico
SLC26A9	SLC26A9	Glândulas salivares, coração, cérebro, estômago, traquéia, rins, epitélio pulmonar / Apical	Cl ⁻ , /HCO ₃ ⁻ antiportador/eletrogênico

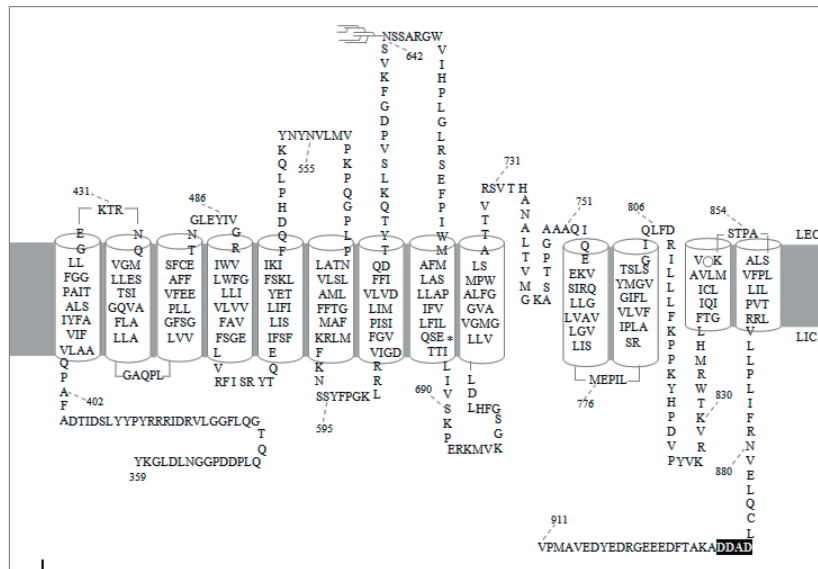


Figura 4. Topologia do transportador eritrocitário AE1 (eAE1). A proteína eAE1 realiza um transporte do tipo antiporte extrudindo um ânion HCO_3^- ao mesmo tempo que transporta Cl^- do meio externo para o meio intracelular. O resíduo E681 está envolvido na barreira de permeabilidade, a via de translocação iônica está realçado por um *, e os resíduos DADD são locais de interação com a anidrase carbônica II e estão destacados em preto. A estrutura estendida é mostrada na região 806-835 não é para implicar dobramento da proteína no modelo. Uma vez que existe uma grande quantidade de conservação da sequência entre os membros SLC4A, o modelo provavelmente reflete a topologia dos outros membros SLC4A. SLC26A proteínas, no entanto, não têm o suficiente conservação da sequência com a família SLC4A para ter certeza de sua topologia, embora a análise sugere hidropatia 14/12 TMs.

Indica sítios de glicação que carregam parte dos antígenos do sistema ABO.

tador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, mas tem com outras funções no eritrócito tais como, metabolismo da glicose eritrocitária, manutenção da morfologia celular e remoção de células senescentes¹¹. O Cl^- é transportado um milhão de vezes mais rápido que seu cátion correspondente, o K^+ e apenas mil a dez mil vezes mais rápido que qualquer outro ânion bivalente como, por exemplo, o sulfato¹¹. Sua porção citossólica atua como uma grande subunidade organizadora integralizadora interagindo com muitas outras proteínas periféricas ou ligantes tais como, anquirina (a maior ponte para o citoesqueleto espectrina-actina), proteína 4.1, proteína 4.2, a enzima aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD), fosfofrutocinase (PFK), desoxihemoglobina, tirosina-cinase p72syk e hemícrimos, que regulam a interação do citoesqueleto com enzimas da via glicolítica^{13,11}.

Essa interação com a anidrase carbônica forma HCO_3^- e dá origem a um metabólito. Um metabólito é um complexo estrutural-funcional temporário formado entre enzimas sequenciais de uma dada via metabólica, unidas por interações não covalentes, e elementos estruturais da célula, como, por exemplo, proteínas de membrana integrais e proteínas do citoesqueleto¹⁴. A formação de metabólitos permite conduzir o produto metabólico intermediário de uma enzima diretamente

como substrato para o sítio ativo da enzima subsequente em uma determinada via metabólica. No caso do transportador AE1 a formação do metabólito permite a conversão eficiente de H_2CO_3 em H^+ e HCO_3^- por parte da anidrase carbônica.

Durante o funcionamento do metabólito a quantidade de água necessária para hidratar as enzimas envolvidas em uma dada via metabólica é reduzida e a atividade da enzima é aumentada, de fato a formação de metabólito para a geração de HCO_3^- por parte de AE1 aumenta o fluxo de HCO_3^- em cerca de 40%¹⁵. O transportador AE1 é expresso em duas isoformas diferentes eAE1 com 911 resíduos de aminoácidos e presente nos eritrócitos e kAE1 com 846 resíduos de aminoácidos expresso na superfície basolateral das células α -intercaladas presentes nos ductos coletores renais. Essas duas isoformas diferem entre porque a eAE1 apresenta adicionais 65 resíduos de aminoácidos necessários para sua interação com o citoesqueleto eritrocitário^{16,4}. Os eritrócitos apresentam cerca de 106 cópias de transportadores AE1 compondo assim, mais de 50% de todas as proteínas integrais da membrana eritrocitária.

A principal função da proteína AE1 é sem dúvida o antiporte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, no entanto, uma segunda e importante função é exercida pela AE1, agir como âncora

do citoesqueleto eritrocitário. Essa interação de AE1 com o citoesqueleto lhe fornece a flexibilidade necessária para deformar-se em seu trânsito pelos capilares ⁴. A AE1 existe no eritrócito em duas formas possíveis, dímeros e tetrâmeros, sendo que, em sua forma tetramérica seu domínio N-terminal interage com a proteína anquirina e através da anquirina liga-se a outras proteínas celulares tais como, proteína α e β -espectrina ^{16, 17, 18}. O domínio N-terminal é ainda capaz de agir com enzimas da via glicolítica, hemoglobina, proteína 4.1 e 4.2. Contudo, essas interações são dependentes do estado fosforilado do domínio N-terminal. As interações moleculares de AE1 com proteínas do citoesqueleto são de particular interesse clínico uma vez que, a esferocitose hereditária uma das disfunções mais comuns da membrana do eritrócito decorre de mutações em AE1 que acaba por criar defeitos de interação com proteínas do citoesqueleto ¹⁹.

A esferocitose hereditária é um tipo de anemia de transmissão hereditária que se traduz pela presença de eritrócitos microcíticos e hiperocrômicos, de forma esférica e sem palidez central e osmoticamente frágeis. Clinicamente, os pacientes podem apresentar desde condições assintomáticas até quadros graves de anemia hemolítica. Nessa condição os eritrócitos que, normalmente vivem até 120 dias, passam a ter vida média mais curta em função das alterações estruturais da membrana eritrocitária. Concomitantemente a hemocaterese aumenta o que explica a esplenomegalia e a icterícia na esferocitose hereditária ²⁰. Outra condição clínica

ca que envolve desordem da membrana eritrocitária é a estomatocitose que decorre de pontos de mutação em segmentos transmembranares de AE1 conferindo-lhe atividade de canal catiônico²¹. A estomatocitose também conhecida por hidrocitose, e xerocitose hereditária é um grupo heterogêneo de doenças de membrana do eritrócito. Caracterizam-se por causarem discreto a moderado graus de anemia hemolítica, alteração na permeabilidade da membrana a cátions, e sua herança é do tipo autossômica dominante. Na estomatocitose hereditária os eritrócitos são afetados por aumento da permeabilidade e do fluxo de sódio e potássio, resultando no aumento do conteúdo de água e turgescência do eritrócito. Diante desse processo ocorre aumento do sódio e diminuição do potássio no eritrócito, pois o defeito na permeabilidade do sódio é maior que a do potássio. No sangue periférico, os eritrócitos túrgidos se apresentam com uma fenda na região central, semelhante a uma “boca”, que em grego significa “stomatos”, daí o termo estomatocitose¹⁹.

Gliforinas

As glicoforinas são proteínas transmembranares unipasso, ou seja, atravessam a membrana plasmática uma única vez em forma de alfa hélice. A principal glicoforina presente na membrana eritrocitária é a glicoforina A, mostrada na figura 5 outras três glicoforinas identificadas por B, C, e E também fazem parte da membrana, porém em baixíssimas concentrações. A figura 6 mostra

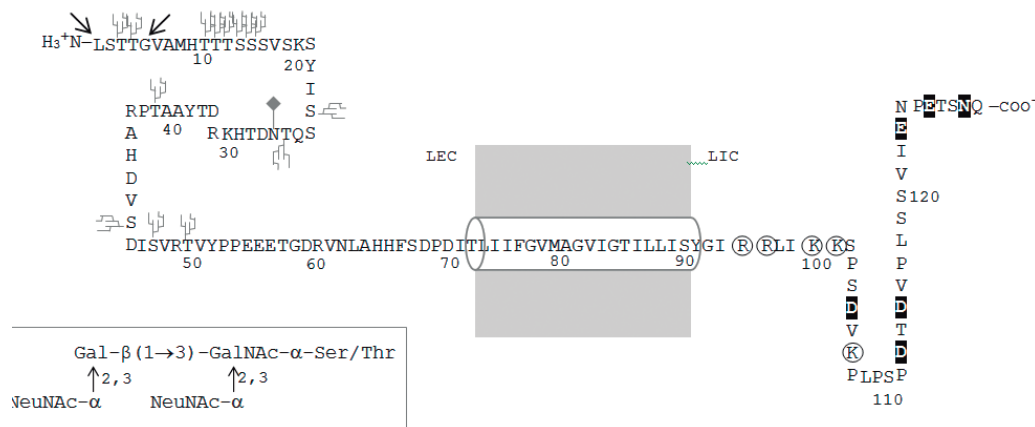


Figura 5. Estrutura da glicoforina A de eritrócito humano. A glicoforina A apresenta massa de aproximadamente 60% de carboidratos, sustenta 15 oligossacarídeos O-ligados (\rightarrow) e um N-ligado (\rightarrow). Na caixa abaixo, mostra a seqüência predominante dos oligossacarídeos O-ligados. Sua porção carboxiterminal está orientada para o meio intracelular é rica em resíduos de aminoácidos aniônicos (destacados em preto) e catiônicos (inseridos nos círculos). A proteína apresenta uma única alça transmembrânica com 19 resíduos de aminoácidos predominantemente hidrofóbicos. Existem duas variantes genéticas comuns da glicoforina A: a glicoforina AM que possui Ser e Gli respectivamente nas posições 1 e 5 e a glicoforina AN que apresenta L e E (setas) nessas posições. Na face citossólica existem quatro resíduos de aminoácidos positivamente carregados que formam ligações iônicas com grupos negativamente carregados presentes nas cabeças polares dos fosfolipídeos adjacentes. A porção extracelular da glicoforina A apresenta cadeias osídicas e somente 1 dos 16 oligossacarídeos é uma cadeia pequena O-ligada (a exceção é um grande oligossacarídeo ligado a um resíduo de asparagina na posição 26. LEC, Líquido extracelular; LIC, Líquido intracelular.

o alinhamento entre todas as glicoforinas. A glicoforina A se projeta para a parte externa da célula, apresenta-se com maior concentração, é altamente glicada, e é responsável pela determinação do grupo sanguíneo ABO, de fato, a quantidade de carboidratos é tão alta que é responsável por cerca de 60% do peso da molécula. As glicoforinas são extensamente sialisadas, ou seja, apresentam grande quantidade de ácido siálico o que lhes confere grande eletronegatividade sendo, portanto, responsáveis por 80% da eletronegatividade eritrocitária. Em função dessas cargas negativas os eritrócitos repelem-se mutuamente evitando assim adesão celular¹⁹. Entretanto, verificou-se que indivíduos que apresentam deficiências em glicoforinas não apresentam adesão celular clinicamente importante, entretanto, deve-se destacar que nesses indivíduos a proteína AE1 apresenta-se mais intensamente glicada o que aparentemente compensa a falta de cargas negativas necessárias para prevenir a interação célula-célula²².

Glicoforina A (GPA) - é a maior sialoglicoproteína eritrocitária correspondendo a cerca de 2 a 4% das proteínas de membrana eritrocitárias, apresenta peso molecular de 16Da. A GPA é suscetível à clivagem pela tripsina, ficina e papaína em seu domínio próximo à membrana eritrocitária¹¹. A glicoforina A está presente de forma maciça em todas as fases de diferenciação eritrocitária desde eritroblastos até normoblastos²³. Os domínios extracelulares de GPA e proteínas AE1 são extremamente polimórficos. A associação de glicoforina A e proteína AE1 além de contribuir com as propriedades mecânicas da membrana eritrocitária ainda apresenta relação com o grupo sanguíneo Wrb, um par de antígenos do sistema Diego. O polimorfismo Wra/Wrb foi descrito em 1995, quando foi demonstrado que a troca de um resíduo de aminoácido na posição 658 da proteína AE1 determinaria a expressão dos antígenos Wra ou Wrb, caso apresentasse, lisina ou ácido glutâmico, respectivamente, naquela posição²⁴. A porção aminoterminal da glicoforina A apresenta ainda receptores de lecti-

na utilizados como elementos receptores utilizados pelos protozoários (*P. falciparum*) da malária e para o vírus sendai para se fixarem e penetrarem no eritrócito²⁵. Dessa forma, admite-se que indivíduos que apresentam carência de glicoforinas na composição da membrana eritrocitária são resistentes às infecções de plasmódios da malária²².

Glicoforina B - Trata-se de uma glicoproteína de 10 kDa codificada pelo gene situado no cromossomo 4q28-31. Expressa determinantes para os antígenos S e s. está presente na membrana de todos os eritrócitos e suas formas precursoras. Ao que parece a deficiência de glicoforina A e B não parece causar deficiências nas funções desempenhadas pelos eritrócitos. Os indivíduos com fenótipo nulo MN: Em(a-) são totalmente resistentes à infecções por *Plasmodium falciparum*²⁶.

Glicoforina C - A glicoforina C é codificada pelo gene GYPC situado no cromossomo 2. Esse mesmo gene codifica uma forma truncada da glicoforina C conhecida como glicoforina D. A glicoforina C é a o menor componente protéico presente na membrana eritrocitária e apresenta 35kDa. As glicoforinas C e D definem os grupos sanguíneos Gerbich: Gel:1, Gel:2, Gel:3 e Gel:4. A maioria dos fenótipos expressa os 4 antígenos, contudo alguns indivíduos mutantes podem expressar fenótipos raros como, por exemplo, o fenótipo Leach (Gel: 2,3 e 4) no qual há deficiência completa tanto de glicoforina C quanto de glicoforina caracterizado pela estabilidade mecânica eritrocitária reduzida, distorção na forma discóide dos eritrócitos e níveis variados de eliptocitose. Além dos eritrócitos, as GPC e GPD estão expressas em fígado fetal, endotélio renal, cerebelo e íleo, porém em menores quantidades e com diferentes níveis de glicosilação; sugere-se que nesses tecidos desempenham funções análogas ao já descrito para linhagem eritróide²⁷. Todos os indivíduos do fenótipo Leach apresentam eliptocitose hereditária, destacando o papel importante da glicoforina C e da proteína 4.1 no complexo juncional²⁸. Inicialmente acreditava-se que a invasão eritroci-

1	MYGKII FVLLSEIVSISASSTTGVMAMHTSTSSSVTKSYISSQTNDRDTHKRDTYAATPRAH	60	GLPA_HUMANA
1	MYGKII FVLLSEIVSISALSTTEVAMHTSTSSSVTKSYISSQTNGET-----	48	GLPB_HUMANA
1	-----MWSTRSPNST-AWPLS-----LEPDPGMA	23	GLPC_HUMANA
1	MYGKII FVLLSGIVSISASSTTGVMAMHTSTSSSVTKSYISSQTNGITLINWVA-----	54	GLPE_HUMANA
	* : : * . * : : *		
61	E-VSEISVRTVYPPEETGERVQLAHHFSEP---ITLITIFGVMAIGVIGTILLISYGIIR	115	GLPA_HUMANA
49	-----GQLVHRFTVPAPVVIILITLIVMAGIIGTILLISYSIR	86	GLPB_HUMANA
24	SASTTMHTTTI-AEPDGMGWPDRMETSTPTIMDIVVIAGVIAAVAIVLVSLLFVML	81	GLPC_HUMANA
55	-----MARVIFEVMLVVVGMILLISYICIR	78	GLPE_HUMANA
	: : * * : : : : : :		
116	RLIKKSPSDVKPLPSPDTPVPLS--SVEIENPETSQ-----	150	GLPA_HUMANA
87	RLIKA-----	91	GLPB_HUMANA
82	RYMYRHKGTYHTNEAKGTEFAESADAALQGDALQDAGDSSRKEYFI	128	GLPC_HUMANA
79	-----	78	GLPE_HUMANA

Figura 6. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos que formam a glicoforina A (GLPA), B (GLPB), C (GLPC) e E (GLPE). Existe 3.593% de similaridade entre as glicoforinas alinhadas sendo as porções similares indicadas por asteriscos enquanto que dois pontos indicam que somente um resíduo varia naquela posição para as quatro proteínas.

Alinhamento realizado através do programa Clustalo, disponível em www.uniprot.org.

tária pelo *Plasmodium falciparum* dava-se apenas por interação desse parasito com a glicoforina A ou B, no entanto, foi demonstrado que a glicoforina C representa uma terceira via para a invasão²⁹.

Outras proteínas presentes na membrana eritrocitária - A membrana eritrocitária apresenta outras proteínas que tem função de receptores hormonais e transportadores de glicose dentre outras. O citoesqueleto da membrana é formado por proteínas periféricas dentre elas espectrina, actina, anquirina, proteína 4.1 e 4.9 sendo que dessas três principais destacam-se como mantenedoras essenciais da estrutura membranar, são elas, espectrina, actina e banda 4.1. De fato, a remoção das demais proteínas por meio de tratamentos com detergentes não promove perda da arquitetura da membrana uma vez que essas três proteínas são capazes de manter o formato discóide do eritrócito.

Glut 1 - A glicose é a principal fonte de energia para todos os tipos celulares de mamíferos, nos quais é responsável pelo provimento de ATP tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas. A glicose é uma molécula polar, insolúvel na membrana plasmática, e o seu transporte é realizado através de difusão facilitada, portanto a favor de seu gradiente de concentração, e dependente da presença de proteínas transportadoras (GLUTs) na superfície de todas as células. A expressão dos transportadores de glicose nos tecidos está ligada aos diferentes metabolismos destes, conforme a demanda e utilização a quantidade de transportadores pode variar. Cada grupo de transportadores possui propriedades cinéticas únicas, caracterizando suas funções e sua distribuição por diferentes tecidos. A maioria das células expressa um número diferente de GLUT's em proporções distintas.

Atualmente é proposta a presença de doze tipos de transportadores de glicose, e mais estão sendo descobertos. O GLUT-1 está presente em todos os tecidos humanos e possui regulação insulino-independente. Ele parece mediar a capacitação da glicose basal, já que tem uma alta afinidade pela glicose e é capaz de transportá-la mesmo nas baixas concentrações encontradas no estado basal. Apresenta difusão facilitada nos eritrócitos, e sua presença em abundância no interior dessas células tem conseqüências fisiológicas importantes. A glicose difunde-se muito rapidamente através das membranas dos eritrócitos, e sua utilização glicolítica é cerca de 17.000 vezes menor que a taxa de transporte, o que permite manter concentrações glicêmicas bem similares entre o plasma e o citosol do eritrócito. Apresenta 12 alças transmembrânicas sendo que 5 dessas hélices são anfipáticas formando um canal hidrofílico hidratado através da membrana plasmática do eritrócito o que permite o trânsito da molécula de glicose³⁰. As porções amino e carboxiterminal estão orientadas para o meio intracelular (Figura 7).

Além dos eritrócitos, o GLUT-1 está presente no tecido nervoso central, de fato a redução na população

de GLUT-1 presente células nervosas foi descrita pela primeira vez em duas crianças de aproximadamente dois meses de idade³⁰. Essas crianças apresentavam quadro convulsivo intenso, que não respondia a terapêutica anticonvulsivante convencional, com hipoglicorraquia na vigência de normoglicemia e sem aumento do lactato líquido, o que indica não estar correndo aumentado consumo da glicose líquórica. Este quadro ficou registrado como Síndrome de De Vivo e Propõe-se que o quadro convulsivo seja decorrente da falta de substrato energético proveniente da metabolização da glicose no SNC, sendo interessante observar que todos os pacientes diagnosticados interromperam o quadro convulsivo com a introdução de uma dieta cetogênica. Considerando-se que o SNC, especialmente em recém-nascidos, tem grande capacidade de oxidar corpos cetônicos utilizando-os como fonte de energia, o diagnóstico de deficiência de GLUT1 subsidia a utilização terapêutica dessa dieta³⁰.

Banda 4.1 - A banda 4.1 é uma proteína do citoesqueleto com genética e localização típicas e diversas. Esta proteína pode ser encontrada, além da membrana plasmática, em outras localizações intracelulares e no núcleo. Possui peso molecular de 97kDa e está presente numericamente em 2×10^5 cópias por célula³¹. Os mecanismos de adesão celular são importantes não só para o mecanismo em si, mas também para a manutenção da morfogênese do tecido. A banda 4.1 é integrante de uma família de proteínas definidas sobre a membrana do eritrócito como "organizadores" do sistema de aderência (Figura 8). Seu estudo eletroforético também mostra subunidades denominadas 4.1a e 4.1b.

A subunidade 4.1b está localizada no compartimento basal, região de adesão da espermatogônia³². Estudos demonstram que o maior ponto de ligação da banda 4.1 na membrana do eritrócito é com a glicoforina C (GPC) e D (GPD), e que a banda 4.1 purificada pode se ligar a dois locais distintos nas glicoforinas C/D. Uma destas interações é direta, envolvendo resíduos 82-98 na GPC (61-77 na GPD), enquanto a outra interação é medida pela p55, outra proteína periférica de membrana.

A proteína p55 também se liga à GPC. Não existem evidências de que ocorra interação da banda 4.1 com a banda 3 também.

Acredita-se que a distribuição nas ligações das três proteínas a uma membrana normal seja correspondente a 40% para p55, 40% para GPC/D e 20% para a banda 3. Uma mesma região da banda 4.1 liga GPC/D e banda 3, enquanto o local de ligação da p55 é diferente.

A interação envolvendo a banda 4.1 com p55 e esta com GPC/D são de alta afinidade, enquanto a GPC/D com banda 3 é de baixa afinidade³³. A tabela 3 mostra as propriedades das principais proteínas do citoesqueleto eritrocitário.

Banda 4.2 ou palidina - Proteína de peso molecular de 80kDa, está representada 100 mil vezes em cada

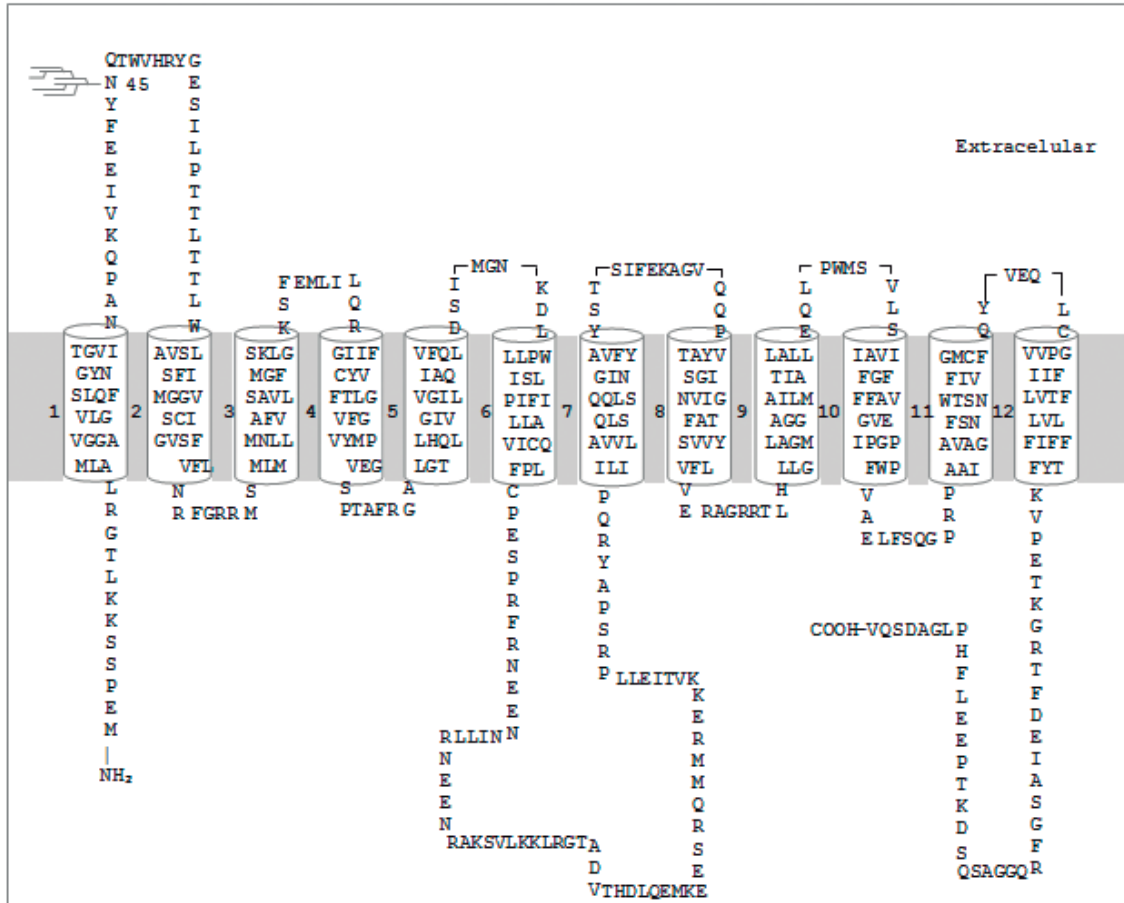


Figura 7. Topologia do transportador eritrocitário de glicose (GLUT 1). Note que o Glut 1 apresenta 12 alças transmembranares e suas porções amino e carboxiterminais estão orientadas para o meio intracelular. O Glut 1 apresenta cerca de 5 hélices transmembranares alguns formando verdadeiras dispondendo-se perpendicularmente ao longo do plano da membrana plasmática, que representam verdadeiros poros ou canais através dos quais a molécula de glicose pode cruzar a membrana. Esses domínios são conectados por segmentos hidrofílicos extra e intracelulares.

O resíduo de asparagina 45 apresenta-se glicosilado.



Figura 8. Sequência dos 691 resíduos de aminoácidos que formam a proteína 4.1. Em destaque os resídeos e sequências relevantes para sua função e interação com outras moléculas.

eritrócito e liga-se com a banda 3 e com anquirina, desempenhando um papel organizacional na membrana eritrocitária³⁴. É um importante componente no citoesqueleto da membrana eritrocitária porque regula a estabilidade e flexibilidade dos eritrócitos (Figura 9)³⁵.

A função exata da banda 4.2 ainda não está plenamente elucidada, mas, estudos envolvendo eritrócitos beta talassêmicos mostram que essa proteína é essencial para a plena função da célula¹⁹. De fato, a ausência da proteína de banda 4.2 causa redução da meia vida da célula e pronuncia anormalidades tais como eferocitose e ovalocitose¹⁹.

Espectrina - A espectrina, recebe esse nome por ser responsável pelo fenômeno de ghost eritrocitário, trata-se de uma proteína longa, fina, em forma de bastão, sendo o principal componente do citoesqueleto subjacente à membrana, mantendo a integridade estrutural e a forma bicôncava eritrocitária, é a mais abundante proteína periférica do citoesqueleto e encontra-se em número de 105 cópias¹¹. A espectrina é um heterodímero de aproximadamente 100 ângstrons de comprimento que apresenta tanto flexibilidade quanto elasticidade. Apresenta peso molecular de 285kDa e é formada por duas cadeias peptídicas que se enovelam uma sobre a outra, α com peso molecular de 240kDa e β com peso de 220kDa (Figura 10). Duas dessas moléculas dímeras unem-se entre si por meio de suas extremidades formando um filamento tetramérico de 200 ângstrons²² que dão origem a “nós” na malha do citoesqueleto eritrocitário.

A espectrina prende-se à face interna da membrana eritrocitária por ligações não covalentes com outra proteína periférica, a anquirina que por sua vez interage também de forma não covalente com o domínio citossólico da AE122,11. Os filamentos de espectrina organizam-se na face interna da membrana formando estruturas hexagonais ou pentagonais. Esse tipo de arranjo é constituído pela ligação de ambas as extremidades de cada filamento de espectrina a um grupamento de proteínas que inclui a actina e a tropomiosina tipicamente envolvidas em atividades contráteis. Um determinado número de doenças genéticas (anemias hemolíticas) caracterizadas por eritrócitos frágeis com formato anormal foi relacionado com mutações que alteram a estrutura ou a função da anquirina ou da espectrina¹⁹.

De fato, a resposta elástica da célula para as grandes distorções que experimenta na circulação deriva da rede de espectrina e mutações em qualquer uma das unidades de espectrina (α ou β -espectrina) conduz à formação defeituosa do tetrâmero de espectrina levando ao enfraquecimento do complexo juncional o que resulta na diminuição da estabilidade da membrana e fragmentação mecânica das células in vivo. Durante muito tempo a espectrina foi considerada uma proteína específica de eritrócitos, no entanto, já se sabe que ela está presente em muitos outros tecidos tais como células do sistema nervoso central e camada ciliar do intestino¹¹. A

espectrina sofre cisão pela tripsina em cinco segmentos: domínios α I, II, III, IV e V partindo da extremidade N-terminal¹¹. Na cadeia beta a ação da tripsina dá origem aos domínios denominado de β I a β IV. Ambas as cadeias α e β possuem 30% de homologia entre si (Tabela 4) e estão dispostas de forma antiparalela de modo que o grupamento NH₂ - terminal α da cabeça do domínio α -I fica face ao grupo C- terminal do domínio β -I. Os dímeros da espectrina são associados *in vitro* sobre a forma de tetrâmeros dependendo da força iônica e temperatura. A zona de interação do tetrâmero, que é também a forma fisiológica, é constituída pela região N-terminal de uma cadeia α que está de frente para a região C-terminal de uma cadeia β do dímero oposto.

Banda 4.9 ou dematina - A Banda 4.9 é fosforilada por várias proteínas cinases (PK) do eritrócito e apresenta peso molecular de 46kDa (Figura 11).

Ao realizar cromatografia das proteínas da membrana do eritrócito, duas proteínas com similares mobilidades no gel de eletroforese foram encontradas: a primeira com peso molecular de 49kDa e pH básico, e a segunda, com peso molecular de 50,5kDa, pH ácido. Foi verificado que a proteína de 49kDa se liga a filamentos de actina³⁶. Para demonstrar a versatilidade de atuação da banda 4.9, realizou-se um estudo no qual os autores usaram a técnica de immunoblotting revelando-a com um anticorpo antibanda 4.9, purificado e marcado. Demonstrou-se e quantificou-se a presença de uma forma de reação imune na banda 4.9 nos cérebros e cristalino de aves e bovinos, no coração de aves, tanto quanto em plaquetas humanas e de mamíferos, aves, peixes e eritrócitos de anfíbios. A banda 4.9 foi encontrada, ainda, em fibras corticais de cristalino e em neurônios cerebrais de aves³⁷.

Banda 5 ou actina - A banda 5 ou actina é o maior componente protéico do citoesqueleto da maioria das células eucariontes. É abundante e localiza-se logo abaixo da membrana citoplasmática. É uma proteína de 33kDa que forma o denominado complexo juncional composto por 12 moléculas de actina associadas à banda 4.1, aducina e tropomiosina. Este complexo fortalece a ligação da actina com a espectrina. Existem dois tipos de actina: actina G (Figura 12) (globular) e actina F (funcional), sendo esta última a que se compacta para formar o complexo juncional³⁴.

Banda 6 - Corresponde à enzima gliceraldeído-fosfato desidrogenase (GAPD) de peso molecular de 36kDa que se liga à banda 3 no mesmo local da hemoglobina (Figura 13). A GAPD catalisa a etapa seis da via glicolítica, ou seja a conversão de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato. O mecanismo de ação da gliceraldeído fosfato desidrogenase é muito complexo. Primeiramente, o substrato reage com um grupo -SH de um resíduo de cisteína essencial presente no sítio ativo da enzima. A enzima promove então a transferência de um íon hidreto do substrato ligado covalentemente para o NAD⁺, também firmemente ligado ao sítio ativo. Com isso



Figura 9. Sequência de resíduos de aminoácidos que compõem a banda 4.2 (palidina), uma proteína pertencente ao citoesqueleto eritrocitário que em humanos é codificada pelo gene EPB42.

Tabela 3. propriedades das principais proteínas do citoesqueleto eritrocitário

Migração eletroforética	Outras denominações	Peso molecular (kDa)	Interações
Banda 1	Espectrina α	240	Anquirina, banda 4.1
Banda 2	Espectrina β	220	Actina
Banda 2.1	Anquirina ou sindeína	434	Espectrina, banda 3
Banda 4.1a		80	Espectrina, actina
Banda 4.1b		78	Actina, glicoforinas
Banda 4.9	Dematina	46	Actina
Banda 5	Actina	33	Espectrina, banda 4.1
Banda 7	Tropomiosina, estomatina	32	?

Fonte: Modificada de Pamela T. and Joseph R. Casey. Plasma membrane Cl-/HCO3- exchangers Structure, mechanism and physiology. Channels 2:5, 337-345; September/October 2008.

Tabela 4. Cisão da espectrina pela tripsina. Grau de homologia das subunidades geradas pela cisão enzimática.

Dominios	Peso molecular (kDa)	Dominios	Peso molecular (kDa)
α I	80	β I	28
α II	46	β II	65
α III	52	β III	33
α IV	41	β IV	74
α V	41	-	-

Fonte: Modificada de Pamela T. and Joseph R. Casey. Plasma membrane Cl-/HCO3- exchangers Structure, mechanism and physiology. Channels 2:5, 337-345; September/October 2008.

forma-se um complexo covalente acil-enzima de “alta energia”, que reage então com fosfato inorgânico e libera o 3-fosfoglicerol fosfato, regenerando a enzima livre.

O NADH formado necessita ser reoxidado a NAD+ novamente, pois só assim ele poderá participar na degradação a piruvato de muitas moléculas de glicose.

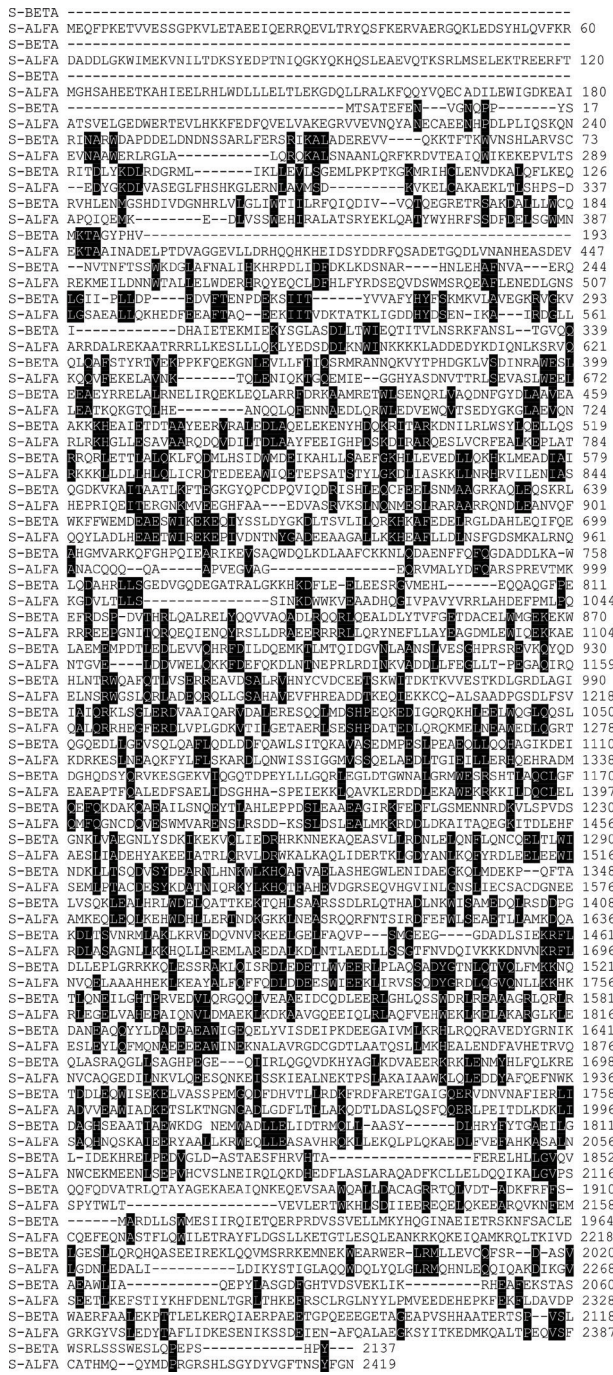


Figura 10. estrutura da espectrina, proteína do citoesqueleto eritrocitário formada por duas cadeias peptídicas, uma alfa e outra beta que se enovelam uma sobre a outra. As regiões em destaque mostram a similaridade de resíduos de aminoácidos entre as duas cadeias. Alinhamento realizado através do programa Clustalo, disponível em www.uniprot.org.

Como o NAD+ ocorre em quantidades limitadas na célula, a glicólise logo cessaria por falta de NAD+ caso o mesmo não possa ser reoxidado. A enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase é inibida por iodoacetato, o qual se combina com o grupo -SH essencial da enzima e impede sua participação na catalíse. Esta descoberta foi de extre-

```

FLSAKKKLE
N
R
K
W
L
A
S
R
L
K
P
S
T
L
K
P
K
S
T
L
R
R
AKDKPIAALDKYGLQVN P E K K
K
T
I
D
S
I
R
G
A
S
L
SGPSTLPQL M L I R F
S
L
D
V
Q
K
S
L
I
E
R
P
I
S
MEREK A R D P E
R
H
E
P
V
E
E
L
P
Q
G
F
R
SRDSSVPGSPSSI R I S S
R
A
H
P
S
L
K
M
A
G
E
H
DLMIYEPHFTYSLLEHVELPR H E A
R
E
P
K
M
T
M
E
ETSRPDSNIYKPPPIYKQRESVGGSPQT E V
D
E
E
R
E
E
E
D
D
D
S
G
E
E
M
K
A
L
R
E
R
Q
R
E
E
L
S
K
V
T
S
N
L
G
K
M
I
L
K
S
F
NSLPCVLEQKIYPYEMLVVTNKGRTKLPPGVDRMLRHLRHSAD
    
```

Figura 11. Sequência de resíduos de aminoácidos da proteína demantina (banda 4.9). Trata-se de uma proteína do citoesqueleto eritrocitário envolvida na interação dos filamentos de actina

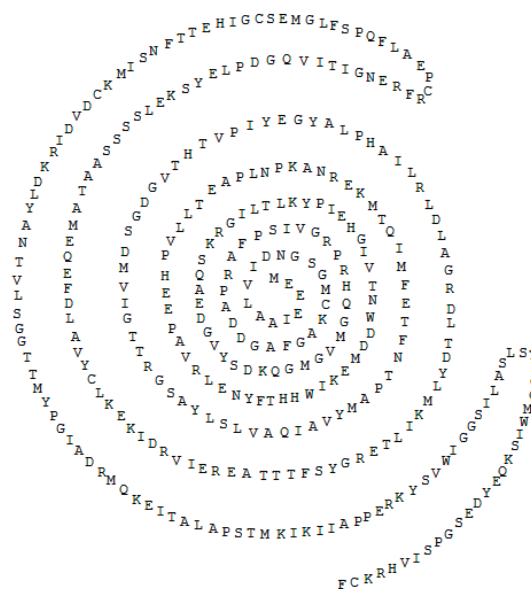


Figura 12. Sequência da G actina. Os monômeros de G-actina polimerizam-se para formar filamentos de actina que estão presentes no citoesqueleto do eritrócito.

```

10 20 30 40 50 60
MGKVKVGVNG FGRIGRLVTR AAFNSGKVDI VAINDPFDIL NYMVVMFYD STHGKFHGTV
70 80 90 100 110 120
KAENGLVIN GNPITIFQER DPSKIKWGD GA EYVVESTG VFTTMEKAGA HLQGGAKRVI
130 140 150 160 170 180
ISAPSADAPM FVMGVNHEKY DNSLKIISNA S C T T N C L A P L AKVIHDFNGI VEGLMTTVHA
190 200 210 220 230 240
ITATQKTVDG PSGKLRDGR GALQNIIPAS T G A A K A V G K V IPELNGKLTG MAFRVPTANV
250 260 270 280 290 300
SVVDLTCRL E KPAKYDDIKK VVKQASEGPL KGILGYTEHQ VVSSDFNSDT HSSTFDAGAG
310 320 330
IALNDHFVKL ISWYDNEFGY SNRVVDMAH MASKE
    
```

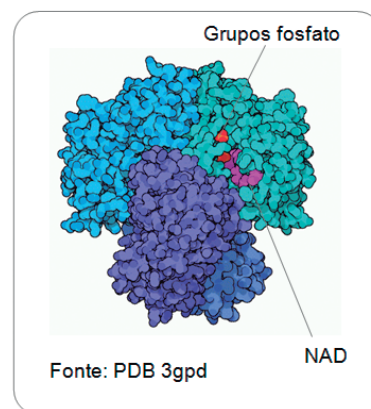


Figura 13. Sequência da enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase que catalisa a etapa 6 da glicólise, catalisa a oxidação e a fosforilação do gliceraldeído-3-fosfato convertendo-o em 1,3-bifosfoglicerato. O resíduo de cisteína marcado em negro corresponde ao sítio ativo. Os resíduos marcados por um retângulo de cantos arredondados indicam os locais de interação do gliceraldeído-3-fosfato. As setas mostram os locais de ligação do NAD. A estrutura espacial da enzima é mostrada à direita. Alinhamento realizado através do programa Clustalo, disponível em www.uniprot.org.

ma importância para o estudo de sistemas enzimáticos.

Banda 7 - É uma banda composta principalmente por tropomiosina de peso molecular de 32kDa (Figura 14). Para serem visualizadas no estudo eletroforético, o extrato membranário deve ser tratado com MgCl₂. Essa proteína integra o complexo juncional associado à actina^{11,34}.

Aducina - É um heterodímero constituído de três subunidades: aducina alfa, com peso molecular de 84kDa, aducina beta com 81kDa e aducina gama, com 79kDa.

Estima-se que cada eritrócito apresente cerca de 30.000 cópias de aducina, suas subunidades são codificadas por três genes relacionados: ADD1 para α-aducina (737 resíduos de aminoácidos), ADD2 para β-aducina (726 resíduos de aminoácidos) e por ADD3 γ-aducina (706 resíduos de aminoácidos)³⁸ (Figura 15). As sequências de resíduos de aminoácidos e a estrutura de domínio das três isoformas são altamente conservadas, com cada subunidade contendo uma cabeça N-terminal globular domínio, um domínio do pescoço e a cauda de um

```

10      20      30      40      50      60
MAEKRHTRDS EAQLRPDSFK DSPSKGLGPC GWILVAFSFL FTVITFPISI WMCIKIKEY

70      80      90      100     110     120
ERAIIFRLGR ILQGGAKGPG LFFILPCTDS FIKVDMRTIS FDIPPQEILT KDSVTISVDG

130     140     150     160     170     180
VYYRVQNTAT LAVANITNAD SATRLLAQTT LRNVLGTKNL SQILSDREEI AHNMQSTLDD

190     200     210     220     230     240
ATDAWGIKVE RVEIKDVKLP VQLQRAMAAE AEASREARAK VIAAEGEMNA SRALKEASMV

250     260     270     280
ITESPAALQL RYLQTLTTIA AEKNSTIVFP LPIDMLQGI GAKHSHLG
    
```

Figura 14. Sequência de resíduos de aminoácidos da banda 7 eritrocitária, uma das proteínas que formam o complexo juncional.

```

Aducina ALFA - MNGDSRAAVTSPPTTAPHKERYFDRVDENNPEYLRERNMAPDLRQDFNMMEQKRVSM 60
Aducina BETA - MS---EETVPEAASPPPPQGPYDFRFSEDDPEYMLRNRAADLRQDFNLMQKRVIM 56
Aducina GAMA - MSSDAGQGVITPPPPSPHKERYFDRINENNPEYLRERNMSPDLRQDFNMMEQKRVTV 60
      *      :      *      :      *      :      *      :      *      :      *      :
Aducina ALFA - ILQSPAFCEELESMIQEKKKGNFTGLLALQQIADFMTTNVNVVYPAAPQGGMAALNMS 120
Aducina BETA - ILQSPSFREELEGLIQEQMKKGNSSNIWALRQIADFMASTSHAVFPT-----SSMN 108
Aducina GAMA - ILQSPAFREDLECLIQEQMKKGNFTGLLALQQIADYIMANSFSGFSS-----PPLS 112
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Aducina ALFA - LGMVTPVNDLRGSDSIAYDKGKLLRCKLAIFYRLADLFGWSQLIYNHITRVNSEQEHF 180
Aducina BETA - VSMMPINDLHTADSLNLAGERLMRCKISSVYRLLDLYGWAQLSDTYVTLRVSKQDHF 168
Aducina GAMA - LGMVTPINDLPADTSSVYKGEKLRCKLASLYRLVDFGWAHLANTYISVRIKQDHI 172
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Aducina ALFA - LIVPFGLLYSEVTASSLVKINLQGDIVDRGSTNLGVNQAGFTLSAIYAARPDVKCVVHI 240
Aducina BETA - LISPKGVSCSEVTASSLKVNIILGEVVEKSSCFPVDTTGFCPLSAIYAARPDVRCIHL 228
Aducina GAMA - IIPRGLSFSEATASNLKVNIIIGEVVDQGSTNLKIDHTGFSFHAAYSTRPDVKCVIHI 232
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Aducina ALFA - HTPAGAAVSAMKCGLLPISPEALSVEVAYHDYHGILLVDEEEKVLIQKNLGPCKSVLILR 300
Aducina BETA - HTPATAAVSAMKWLPLVSHNALVGDMAYYDFNGEMEQEADRINLQKCLGPTCKLVLVR 288
Aducina GAMA - HTLATAAVSSMKCGILPISQESLLGDVAYDYQGSLEEQEERIQLQKVLGSPCKVLVLR 292
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Aducina ALFA - NHGLVSVGSEVEAFYIHNLVVACEIQVRTLASAGGPDNLVLLNPEKYKAKSRSPGSPV 360
Aducina BETA - NHGVVALGDTVEEAFYKIFHLQAACEIQVLSALSSAGGVENLILLEQKHPHE--VGSV 346
Aducina GAMA - NHGVVALGETLEEAFYIFNVQLACEIQVQALAGAGVDNLHVLDQKQKAFYTYVAASG 352
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Aducina ALFA - --GEGTGSPPKWQIGEQEFAELMRMLDNLGYRTGYPRYPALREKSKKYSQVVEVPASVTG 418
Aducina BETA - WAGSTFGPMQKSRLGEHFEALMRMLDNLGYRTGYTRHPVQEKTKKSEVEIPATVTA 406
Aducina GAMA - GGVNMGSHQKWKVGEIEFEGMLRMLDNLGYRTGYAYRHLIREKPRKSDVEIPATVTA 412
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Aducina ALFA - YSFASDGDGSGTCSPLRHSFQKQREKTRWLNLSGRGD---EASEEGQNGSSPKSKTKWTK 474
Aducina BETA - FVFEEDG--APVPALRQHAQKQKQKTRWLNTPNTYLRVNWAVEVORSMSGSRPKTTWTK 464
Aducina GAMA - FSEDDT--VPLSPLKYMAQRQREKTRWLNTPNTYMKVNVPEESRNGETSPTKTIWTK 470
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Aducina ALFA - EDGHRSTSTSTST---AVPNLFVPLNTNPKEVQEMRNKIREQNLQDIKTAGPQSQVLGGVV 528
Aducina BETA - ADEVEKSSSGMPIRIENFNQFVPLTDPQEVLEMRNKIREQNRQDKSAGPQSQLL SVI 524
Aducina GAMA - AEDSSKVGSGTPIKIEDPNQFVPLNTNPVELEKRNKIREQNRVYDLKTAGPQSQLLAGIV 530
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Aducina ALFA - MDRSLVQGELVTASKAIEKEYQPHVIVSTTGNPFTTLDRELEEYRREVERKQKGSSE 588
Aducina BETA - AEKSRSPST--ESQLMSKGDDEDTKDDSEETVVPNPSQLTDQLEEYKKEVERKLELDG 581
Aducina GAMA - VDKPSTMQ-----PEDDDHGPPAPPNPFSLHTEGELEEYKRTIERKQOGLD 578
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Aducina ALFA - NLDEAREQKEKSPDPQAVPHPPPSTPIKLEE-DLVPEPTTGDDSDAATFKPTLPDLSPD 647
Aducina BETA - EKETAPEEPGSPAKSAPASPVOSPAKEAETKSLVSPSKSLEEG--TKKTETSKAATTEP 639
Aducina GAMA - AQQLLSDDASSV----SQIQS----QTQSPQNVPEK-LEEN--HELP-----SKSF 619
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Aducina ALFA - EPSEALGFPMLEKEEEAHRPPSPTEAPTEASPEPAPDPAPVAEAAAPSAAVEEGRAADPGS 707
Aducina BETA - ETTQPEGVVWNGREEEQTAEEILSKGLSOMT----TSADTVDVTSKDKTESVTSGMSP 694
Aducina GAMA - ISMEVPMVWNGKDDHDEDELAKRVSRLS----TSTTIENIEITIKSPEKIEEVLSP 674
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Aducina ALFA - DGSPPKSPSKKKKFRTPSFLKSKKKKSDS-- 737
Aducina BETA - EGSPPKSPSKKKKFRTPSFLKSKKKKERVE 726
Aducina GAMA - EGSPPKSPSKKKKFRTPSFLKSKKKKERVE 706
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
    
```

Figura 15. Alinhamento da alfa, beta e gama aducina. As três isoformas são altamente conservadas e compartilham 196 resíduos de aminoácidos com similaridade de 36,3% entre as três proteínas. Os resíduos similares estão indicados por asteriscos. Alinhamento realizado através do programa Clustalo, disponível em www.uniprot.org.

domínio C-terminal (Figura 16). A função do domínio de cabeça tem não está plenamente elucidada. Entretanto, algumas observações sugerem que pode participar no processo de dimerização das demais subunidades³⁹. O domínio do “pescoço” está claramente envolvido na associação de monômeros de aducina para formar heterodímeros, que constituem a forma funcionalmente ativa da proteína³⁹. O domínio C-terminal interage com a cauda do transportador AE1 ou banda 3⁴⁰.

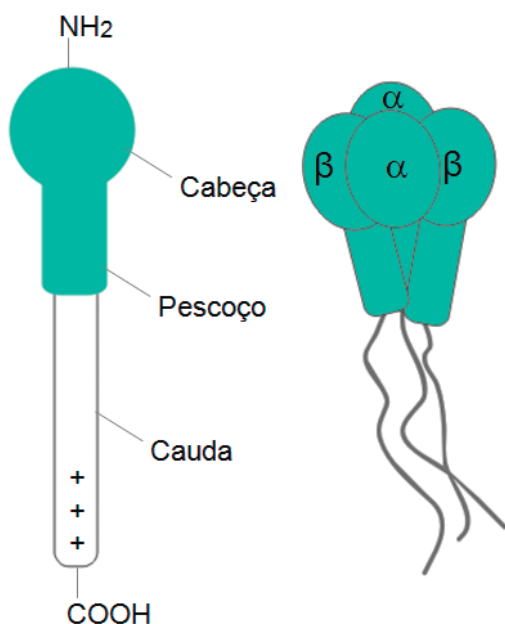


Figura 16. Modelo estrutural da aducina eritrocitária. As três aducinas, alfa, beta e gama são formadas por uma cabeça globular onde está presente a porção amina, seguida de uma estrutura alongada (pescoço) e uma cauda carboxiterminal. As subunidades alfa e beta da aducina apresentam 49% de similaridade entre si. A porção marcada com +++ na cauda apresenta uma sequência formada por 22 aminoácidos básicos e apresenta sítios de fosforilação para PKA e PKC além de conter sítios de interação para com a calmodulina.

REFERÊNCIAS

1. SALMON C.; CARTRON, J.P; ROUGER, P. **The human blood groups Part 1.** New York: Masson Publishing ,1984. cap.4, p.44-53.
2. GALLAGER, P.G.; FORGET, B.G.; LUX, S.E. Disorders of Erythrocyte Membrane. In: NATHAN, D.G.; OSKI, F.A; ORKIN, S.H. **Hematology of Infancy and Childhood.** 5 ed. Philadelphia: WB Saunders,1998. p.544-664.
3. WAJCMAN, H.; LANTZ, B.; GIROT, R. **Les Maladies du globule rouge.** Paris: Les editions INSERM. Médecine-Sciences Flammarion, 1984. cap.3, p.31-44.
4. BONAR, P.T.; CASEY, J.R. Plasma membrane Cl⁻/HCO⁻³ exchangers: structure, mechanism and physiology. **Channels.** v.2, n.5, p. 337-345, 2008.
5. CORDAT, E.; CASEY, J.R. Bicarbonate transport in cell physiology and disease. **Biochem J.** London, v.417, n.2, p.423-439, 2009.

6. ZELINSKI, T. et.al. The Diego blood group locus is located on chromosome 17q. **Genomics.**, San Diego CA. v.17, n.3, p. 665-666, 1993.
7. LOHI, H. et.al. Functional characterization of three novel tissue-specific anion exchangers: SLC26A7, A8 and A9. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, n.16, p.14246-14254, 2002.
8. KOPITO, R.R.; LODISH, H.L. Structure of the murine anion exchange protein. **J. Cell. Biochem.** New York, v.29, n.1, p.1-17, 1985.
9. KUDRYCKI, K.E.; SHULI, G.E. Primary structure of the rat kidney band 3 anion exchange protein deduced from a Cdna. **J. Biol. Chem.** Baltimore, v.14, n. p.8185-8192, 1989.
10. STERLING, D.; CASEY, J.R. Transport activity of AE3 chloride/bicarbonate anion-exchange proteins and their regulation by intracellular pH. **Biochem J.**, London, v.344, pt.1, p.221-229, 1999.
11. MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** São Paulo, v.29, n.2, p.168-178, 2007.
12. ZOLOTAREV, A.S. et.al. Proteolytic cleavage sites of native AE2 anion exchanger in gastric mucosal membranes. **Biochemistry.**, Washington, v.35, n. 32, p.10367-10376, 1996.
13. ZHANG, D. et.al. Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band. **Blood.** New York, v.96, n.9, p.2925-2933, 2000.
14. MCMURTRIE, H.L. et.al. The bicarbonate transport metabolon. **J Enzyme Inhib Med Chem.** Basingstoke, v.19, n.3, p.231-236, 2004.
15. STERLING, D.; REITHMEIER, R.A.; CASEY, J.R. A Transport Metabolon. Functional Interaction of Carbonic Anhydrase II and Chloride/Bicarbonate Exchangers. **J Biol Chem.** Baltimore, v. 276, n. 51, p.47886-47894, 2001.
16. LOW, P.S. Structure and function of the cytoplasmic domain of Band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. **Biochim Biophys Acta.**, Amsterdam, v.864, n. 2, p.145-167, 1986.
17. CASEY, J.R.; REITHMEIER, R.A.F. Analysis of the oligomeric state of Band 3, the anion transport protein of the human erythrocyte membrane, by size exclusion high performance liquid chromatography: oligomeric stability and origin of heterogeneity. **J. Biol. Chem.** Baltimore, v.266, n.24, p.15726-15737, 1991.
18. CHANG, S.H.; LOW, P.S. Identification of a critical ankyrin-binding loop on the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3 by crystal structure analysis and site-directed mutagenesis. **J Biol Chem.** Baltimore, v.278, n.9, p.6879-6884, 2003.
19. FAILACE, R. et.al. **Hemograma:** manual de interpretação. Porto Alegre: Artmed, 2007.
20. EBER, S.; LUX, S.E. Hereditary spherocytosis-defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. **Semin Hematol.**, New York, v.41, n.2, p.118-141, 2004.
21. BRUCE, L.J. Monovalent cation leaks in human red cells caused by single amino-acid substitutions in the transport domain of the band 3 chloride-bicarbonate exchanger, AE1. **Nat. Genet.**, New York, v.37, n. 11, p.1258-1263, 2005.
22. KARP, G. **Biologia Celular e molecular: conceitos e experimentos.** 3.ed. São Paulo: Manole, 2005.

23. AUFFRAY, I. et al. Glycophorin A dimerization and band 3 interaction during erythroid membrane biogenesis: in vivo studies in human glycophorin A transgenic mice. **Blood**, New York, v.97, n. 9, p. 2872-2878, 2001.
24. BRUCE, L.J. et. al. Changes in the blood group Wright Antigens Are Associated with a Mutation at Amino acid 658 in Human Erythrocyte Band 3: a Site of Interaction Between Band 3 and Glycophorin A under Certain Conditions. **Blood**, New York, v.85, n. p.542-547, 1995.
25. POOLE, J. et al. Glycophorin A mutation Ala65 - Pro gives rise to a novel pair of MNS alleles ENP (MNS39) and HAG (MNS41) and altered Wrb expression: direct evidence for GPA/band 3 interaction necessary for normal Wrb expression. **Transfusion Med.**, Oxford, v.9, n.2, p.167-174, 1999.
26. TELEN, M.J.; KAUFMAN, R. In: GREER, J.P. (Ed.) et.al. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins. 2003, p. 217-247, 2003, v.1.
27. BONIFÁCIO, S.; NOVARETTI, M.C.Z. Funções biológicas dos antígenos eritrocitário. **Rev.Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v.31,n.2, p.104-111, 2009.
28. GARRATY, G.; TELEN, M.J.; PETZ, L.D. Red cell antigens as functional molecules and obstacles to transfusion. **Hematology**, Washington, D.C., p.445-462, 2002.
29. LOBO, C.A. et.al. Glycophorin C is the receptor for the Plasmodium falciparum erythrocyte binding ligand PfEBP-2 (baebl). **Blood**, New York, v.101, n.11, p.4628-4631, 2003.
30. HESKRO, R.C. et.al. Topology of Glut1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis. **J Biol Chem.**, Baltimore v.269, n.32, p.20482-20488, 1994.
31. GASCARD, P. et al. Deciphering the nuclear import pathway for the cytoskeletal red cell protein 4.1R. **Mol Biol Cell.**, Bethesda, v.10, n.6, p.1783-1798, 1999.
32. TERADA, N. et al. Immunohistochemical study of protein 4.1B in the normal and W/W(v) mouse seminiferous epithelium. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v.52, n.6, p.769-777, 2004.
33. HEMMING, N.J. Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.270, n. 10, p.5360-5366, 1995.
34. MANDAL, D. Caspase 3-mediated proteolysis of the N- terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). **J. Biol. Chem.** Baltimore, v.278,n.52, p.52551-52558, 2003.
35. KARACAY, B.; CHANG, L.S. Induction of erythrocyte protein 4.2 gene expression during differentiation of murine erythroleukemia cells. **Genomics**, San Diego, v.59, n.1, p.6-17, 1999.
36. HORNE, W.C.; MIETTINEN, H.; MARCHESI, V.T. Erythrocyte membrane skeleton phosphoprotein: identification of two unrelated phosphoprotein in band 4.9. **Biochim Biophys Acta.**, Amsterdam, v.944, n.2, p. 135-43, 1988.
37. FAQUIN, W.C. et.al. An immunoreactive form of erythrocyte protein 4.9 is present in non-erythroid cells. **Eur J Cell Biol.**, Stuttgart, v.46, n.1, p.168-175.
38. DONG, L. et al. 35H, a sequence isolated as a protein kinase C binding protein, is a novel member of the adducin family. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.270, n.43, p.25534-25540, 1995.
39. LI, X.; MATSUOKA, Y.; BENNETT, V. Adducin preferentially recruits spectrin to the fast growing ends of actin filaments in a complex requiring the MARCKS-related domain and a newly defined oligomerization domain. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 273, n.30 p.19329-19338, 1998.
40. ANONG, W.A. et al. Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion. **Blood.**, New York, v.114, n.9 p.1904-1012, 2009.

Submetido em 15.09.2012;

Aceito em 04.04.2013.