

# ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA - PREVALÊNCIA DOS DÉFICES PROTEICOS DA MEMBRANA DO ERITRÓCITO

ELISA GRANJO, PEDRO MANATA, NOÉMIA TORRES, LURDES RODRIGUES, FÁTIMA FERREIRA,  
ROSWITHA BAUERLE, ALEXANDRE QUINTANILHA

Serviço de Hematologia Clínica. Hospital de S. João. Porto. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Porto.  
Serviço de Hematologia. Centro Hospitalar de Coimbra. Coimbra. Serviço de Hematologia. Hospital de Matosinhos. Matosinhos.  
Serviço de Medicina Interna. Hospital de Viana do Castelo. Viana do Castelo

## RESUMO/SUMMARY

A Esferocitose Hereditária (EH) é uma anemia hemolítica congénita que resulta de alterações quantitativas e/ou qualitativas das proteínas da membrana do eritrócito. A fim de identificar as alterações proteicas e procurar relacioná-las com o fenótipo clínico estudaram-se 25 famílias com Esferocitose Hereditária (EH), da região Norte de Portugal, pela técnica de electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Nas 25 famílias estudadas detectaram-se 18 com uma redução primária de anquirina, sendo que 16 apresentavam um modo de transmissão dominante, uma era recessiva e numa não foi possível demonstrar o modo de transmissão. Em cinco famílias foi encontrada uma redução primária de banda 3, todas com um padrão dominante. Encontrou-se ainda uma família com redução de proteína 4.2 (esferocitose leve) com transmissão recessiva e uma outra com redução primária de espectrinas (esferocitose leve) em que não foi possível demonstrar o modo transmissão. De 15 doentes com défice de anquirina, estudados numa situação de pré-esplenectomia, dez tinham uma esferocitose leve (um dos quais com hemólise compensada) e cinco tinham um fenótipo de esferocitose moderada. Nas famílias com défice de banda 3, dez indivíduos foram também estudados numa situação pré-esplenectomia, sendo que sete apresentavam uma esferocitose leve (dois dos quais tinham uma hemólise compensada) e três uma esferocitose

## HEREDITARY SPHEROCYTOSIS – PREVALENCE OF ERYTHROID CYTOSKELETAL PROTEIN DEFECTS

The authors studied the relative prevalence of erythroid cytoskeletal protein defects and their relationship with the clinical course of Hereditary Spherocytosis (HS) in 39 Portuguese patients of North of Portugal (25 families). This study showed that, in the North of Portugal, HS is primarily due to anquirin deficiency (72%), followed by band 3 (20%). These findings are similar to the published data in other Caucasian populations. Anquirin primary defects have been difficult to diagnose before splenectomy, due to high reticulocytes counts.

*Key Words: Hereditary Spherocytosis, haemolytic anaemia, red-cell membrane protein, SDS-PAGE, protein deficiency.*

moderada. Nas 25 famílias estudadas verificou-se uma predominância do déficit de anquirina (72%) seguido pelo déficit de banda 3 (20%), proteína 4.2 (4%) e de espectrinas (4%). Estes resultados estão assim de acordo com estudos previamente realizados.

*Palavras-chave: Esferocitose Hereditária, anemia hemolítica, proteínas da membrana do eritrócito, SDS-PAGE, déficit proteico.*

## INTRODUÇÃO

A Esferocitose Hereditária (EH) é a anemia hemolítica congênita mais comum dos Caucasianos. Resulta de alterações quantitativas e/ou qualitativas das proteínas da membrana do eritrócito. Caracteriza-se por uma anemia de gravidade variável, com icterícia intermitente, presença de esferócitos no esfregaço de sangue periférico, fragilidade osmótica aumentada, esplenomegalia e com uma resposta favorável à esplenectomia-SPL<sup>1</sup>.

As proteínas do esqueleto proteico interagem com a bicamada lipídica e com as proteínas transmembranares fornecendo assim à membrana do eritrócito rigidez e integridade (Figura 1). Alterações de determinadas proteínas da membrana como a anquirina, espectrinas, banda 3 e proteína 4.2 estão na origem da diminuição da resistência osmótica dos esferócitos. A microvesiculação destas células resulta na perda de área de superfície sem qualquer redução substancial de volume celular. Os esferócitos perdem resistência, elasticidade e capacidade de deformação, reduzindo a sua capacidade de atravessar os orifícios entre as células endoteliais, assim como as células que formam a parede dos cordões esplênicos e da

polpa vermelha dos seios esplênicos, verificando-se uma congestão acentuada desta última. A descida do pH, glicose e ATP, bem como a elevada concentração de radicais livres produzidas pelos macrófagos adjacentes agravam a lesão da membrana dos eritrócitos.

As alterações moleculares subjacentes à doença são muito heterogêneas.

A anquirina é a proteína que promove a ligação do esqueleto proteico à bicamada lipídica através de interações com a proteína transmembranar banda 3. O defeito mais comum nos indivíduos com EH deve-se a alterações nesta proteína. Nos défices de anquirina podem existir reduções secundárias de espectrinas e proteína 4.2, sendo o padrão de hereditariedade autossômico dominante o mais frequente<sup>2</sup>.

A banda 3 medeia interações dentro do esqueleto membranar via ligação com as proteínas 4.2 e 4.1 e com a anquirina pelo terminal amino do domínio citoplasmático. Indivíduos com déficit de banda 3 têm reduções proteicas na ordem de 20 a 40%, com défices secundários de proteína 4.2. O padrão de transmissão é dominante e o quadro clínico é de uma anemia ligeira ou moderada. Nos portadores de deficiência de banda 3, observam-se no esfregaço de sangue periférico, alguns eritrócitos com a forma de “cogumelo”. Estes eritrócitos são muito específicos neste subgrupo da esferocitose hereditária e desaparecem pós-esplenectomia.

Deficiências de proteína 4.2 e espectrinas são mais raras, sendo o padrão de hereditariedade autossômico recessivo e dominante, respectivamente<sup>2,4</sup>.

Do ponto de vista fenotípico, a expressão da EH é também muito heterogênea, podendo variar de formas assintomáticas até situações clínicas de anemia grave,

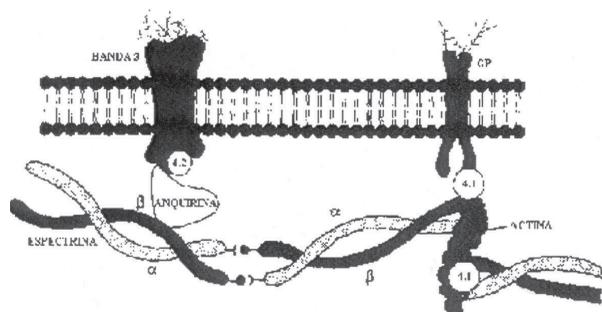


Fig. 1 - Proteínas da membrana do eritrócito.

dependentes de transfusões. Na forma «típica», os doentes apresentam uma anemia moderada desde o período neonatal, esplenomegalia e referem uma história familiar de EH. A anemia é muito bem tolerada, sendo contudo perceptível nos propósitos a icterícia conjuntival e a esplenomegalia. Na EH de expressão ligeira, o grau de anemia é leve, podendo a hemólise ser totalmente compensada. Do ponto de vista laboratorial, é de referir que a bilirrubina sérica e percentagem de reticulócitos é normal ou ligeiramente aumentada. Geralmente, os portadores deste tipo de EH detectam-se durante os períodos de infecção por mononucleose infecciosa, geralmente com aumento marcado da esplenomegalia e em situações de infecção por parvovirus 19, que leva a uma supressão da eritropoiese medular<sup>5</sup>.

Os portadores assintomáticos são diagnosticados no decorrer de estudos familiares de doentes com a forma típica de esferocitose. Do ponto de vista laboratorial, a concentração de hemoglobina, bilirrubina total, e percentagem de reticulócitos, é normal. Apenas a fragilidade osmótica eritrocitária está aumentada, por vezes apenas após incubação a 37°C.

Os pacientes com a forma grave de EH são dependentes de transfusões e a esplenectomia só corrige a anemia parcialmente. Está associada a défices muito acentuados de espectrinas, com padrão de hereditariedade recessiva, e nas deficiências combinadas de anquirina e espectrinas.

No presente estudo os autores analisaram a prevalência do défice proteico em 39 indivíduos, estabelecendo uma correlação com o fenótipo clínico e determinação do padrão de hereditariedade.

## MATERIALE MÉTODOS

Foram estudados 39 doentes (de idade compreendida 6 meses – 77 anos; 24 pacientes do sexo masculino e 15 do sexo feminino) com E.H., pertencentes a 25 famílias do Norte de Portugal.

Na rotina hematológica, os hemogramas foram realizados num contador automático para determinação dos diversos parâmetros hematológicos e os esfregaços de sangue periférico, corados pelo método de May-Grunwald Giemsa.

O estudo da resistência osmótica foi realizado por dois métodos: teste da fragilidade osmótica dos eritrócitos em gradiente de soluções salinas (FO) e o teste de lise pelo glicerol acidificado (AGLT).

As proteínas da membrana do eritrócito foram extraídas por lise hipotónica segundo o método de Dodge et al.<sup>6</sup>, posteriormente quantificadas pelo método de Lowry et al.<sup>7</sup>. Depois de solubilizadas as proteínas da membrana foram estudadas pela técnica de electroforese em gel de

poliacrilamida (SDS-PAGE), em gradiente linear 5-15%, Laemmli<sup>8</sup>, e em gradiente exponencial 3.5–17%, Fairbanks et al.<sup>9</sup>. O perfil electroforético das membranas é corado com Coomassie Blue, procedendo-se de seguida à análise proteica por densitometria (Image Master Elite 1D, version 2.01 da Pharmacia Biotech). A análise quantitativa das proteínas da membrana é expressa pela razão de cada proteína relativamente à banda 3.

## RESULTADOS

O diagnóstico de EH é realizado com base nos dados clínicos e nos parâmetros laboratoriais: parâmetros hematológicos, percentagem de reticulócitos, esfregaço de sangue periférico, fragilidade osmótica, doseamento de bilirrubinas (Quadro I).

Quadro I - Classificação da Esferocitose Hereditária

		Portadores	Esferocitose Leve	Esferocitose moderada	Esferocitose moderadamente severa	Esferocitose severa
Parâmetros Laboratoriais	Hemoglobina (g/dL)	Normal	11 - 15	08 - 12	06 - 08	<6
	Reticulócitos (%)	1 - 3	3 - 8	± 8	>10	>10
	Bilirrubina (mg/L)	0 - 10	10 - 20	± 20	20 - 30	≥30
	Esfregaço de sangue Periférico	Normal	Esferócitos em número reduzido	Esferócitos	Esferócitos	Esferócitos abundantes e poiquilocitose
Fragilidade osmótica	Pré incubação	Normal	Normal ou ligeiramente aumentada	Distintamente aumentada	Distintamente aumentada	Distintamente aumentada
	Pós incubação a 37°C	Ligeiramente aumentada	Distintamente aumentada	Distintamente aumentada	Distintamente aumentada	Marcadamente aumentada

Fonte: Adaptado de Patrick G. Gallagher, Bernard G. Forget<sup>(15)</sup>.

Porém muitas vezes o diagnóstico tem-se revelado bastante difícil, mesmo com a ajuda dos parâmetros laboratoriais, sendo necessário recorrer à técnica de electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para determinar as alterações moleculares subjacentes à doença.

Nas 25 famílias estudadas 18 possuíam uma redução primária de anquirina, sendo que 16 tinham um padrão de transmissão autossómico dominante, uma um padrão autossómico recessivo e ainda uma outra em que não foi possível identificar o tipo de transmissão. Em 5 famílias foi encontrada uma redução primária de banda 3, todas com um padrão dominante. Encontrou-se ainda uma família com redução de proteína 4.2, com transmissão recessiva, e uma família com redução primária de espectrinas em que não foi possível demonstrar o modo transmissão (Quadro II).

O fenótipo clínico da EH é muito heterogéneo, podendo variar de formas assintomáticas até situações clínicas de

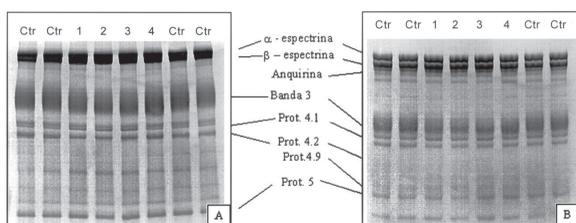
**Quadro II - Padrão de hereditariedade na Esferocitose Hereditária**

Défice proteico	Banda 3		Anquirina		$\beta$ -espectrina	Proteína 4.2
	Dominante	Dominante	Recessivo	Não provado	Não provado	Recessivo
Modo de transmissão						
Famílias	5	16	1	1	1	1
Indivíduos	10	25	1	1	1	1

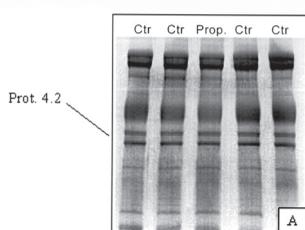
anemia grave. As alterações moleculares subjacentes à doença são também muito heterogêneas. A correlação das alterações proteicas, que ocorrem na membrana do eritrócito, com o fenótipo clínico em pacientes estudados pré-esplenectomia é referenciado no Quadro III. Nos

**Quadro III - Correlação do défice da proteína da membrana do eritrócito e o fenótipo clínico.**

Défice proteico	Esferocitose leve (hemólise não compensada)	Esferocitose leve (hemólise compensada)	Esferocitose moderada
Anquirina	9	1	5
Banda 3	5	2	3
Proteína 4.2	1	-	-



**Fig. 2 - Déficit de banda 3. Gel linear - Laemmli (A), Gel-exponencial - Fairbanks (B). Ctr - Controlo; 1 - Propósito (déficit de 22% de banda 3); 2,3 - filhas do propósito (déficit de 22 a 19% respectivamente); 4 - esposa do propósito (sem alterações das proteínas da membrana).**



**Fig. 3 - Déficit de proteína 4.2 (12%). Gel linear - Laemmli (A). Prop.- Propósito; Ctr - Controlo.**

**Quadro IV - Prevalência do défice da proteína da membrana do eritrócito nos doentes estudados pós-esplenectomia.**

Défice proteico	Tempo pós-esplenectomia	
	> 1 ano e < 10 anos	>10 anos
Anquirina	5	6
$\beta$ - Espectrina	1	-

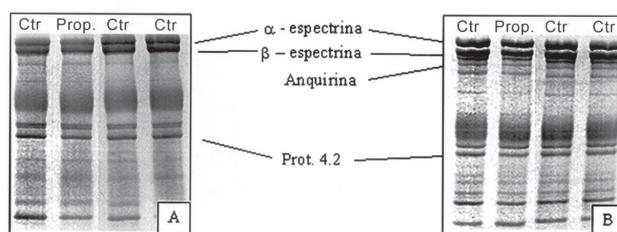
pacientes com défice de banda 3, verificou-se que apresentavam reduções primárias de 11 a 25% (Figura 2). Apenas foi analisado um único paciente com défice de proteína 4.2 com uma redução primária de 12% (Fig.3). Um paciente com défice de anquirina foi estudado numa situação de pré-esplenectomia e pós-esplenectomia (com uma redução primária de anquirina-28% e com reduções secundárias de espectrinas-24% e proteína 4.2- 5%).

Doze doentes foram analisados na situação pós-esplenectomia (Quadro IV). Nos que apresentavam défice de anquirina, a redução desta proteína variou de 16 a 50 %, com reduções secundária de espectrina de 11-19% e proteína 4.2 de 4-31% (Fig.4).

No único paciente analisado pós esplenectomia com défice de  $\beta$ -espectrina o défice encontrado foi de 11%.

**DISCUSSÃO**

De forma a aprofundar mais o conhecimento sobre as doenças de membrana do eritrócito e a sua prevalência na região Norte de Portugal, estudaram-se 39 indivíduos pertencentes a 25 famílias, com EH. Foi utilizada a técnica de electroforese em gel de poliacrilamida para identificar as alterações quantitativas e/ou qualitativas das proteínas da membrana do eritrócito. A amostragem estudada é



**Fig. 4 - Déficit de anquirina. Gel linear - Laemmli (A), Gel exponencial - Fairbanks (B). Prop. - Propósito; Ctr - Controlo. Deficiência primária de anquirina (21%), secundárias de espectrinas (18%) e proteína 4.2 (11%).**

essencialmente de adultos com fenótipo clínico de Esferocitose leve que foram observados na consulta por complicações da doença: crises hemolíticas associadas a infecções, cálculos vesiculares e/ou renais, ou por estudo familiar do propósito.

Neste grupo de indivíduos estudados verificou-se que o défice proteico mais comum foi de anquirina. O défice de anquirina é no entanto difícil de identificar, pela técnica de SDS-PAGE, nos indivíduos que não foram esplenectomizados, já que nesta situação é normal encontrar-se uma ligeira reticulocitose que é o bastante para mascarar o défice primário. Nestes casos, em que o défice primário está mascarado existem porém reduções secundárias das proteínas de ligação: proteína 4.2 e espectrinas, que são indícios de uma redução primária de anquirina. A confirmação do défice de anquirina é possível, pela mesma técnica, nos indivíduos que foram esplenectomizados. Nos doentes com défice de anquirina e reduções secundárias de proteínas 4.2 e espectrinas, estas revelaram-se mais acentuadas nos pacientes com quadro clínico de esferocitose moderada.

Foram ainda encontradas, para além de reduções de anquirina, reduções de banda 3, proteína 4.2 e espectrinas. A prevalência dos défices, assim como o modo de transmissão hereditária encontrado, estão de acordo com estudos previamente publicados.

Devido à amostragem ser muito pequena em cada grupo de défice proteico, não foi possível estabelecer uma correlação entre a percentagem do défice proteico e o fenótipo clínico. Porém a técnica utilizada neste estudo mostrou-se muito útil, como ferramenta de auxílio, em alguns casos de difícil diagnóstico<sup>10</sup>.

## CONCLUSÃO

Os autores salientam que este estudo evidenciou que a deficiência proteica mais comum nos doentes com EH no Norte de Portugal é de anquirina, seguida de banda 3, proteína 4.2 e  $\beta$ -espectrina., o que está de acordo com a bibliografia<sup>11-14</sup>.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Leticia Ribeiro e a José Barbot a valiosa contribuição clínica e científica, a Helena Almeida, Sra. D. Umbelina Rebelo, Sr. Luís Relvas e Sr. Elísio Costa a

excelente colaboração técnica, e às Sras. D. Susana Catou e D. Ana David a preparação do manuscrito.

O estudo das proteínas da membrana do eritrócito foram realizados no laboratório da Unidade de Hematologia Molecular do Centro Hospitalar de Coimbra.

## BIBLIOGRAFIA

1. DELAUNAY J, ALLOISIO N, MORLÉ L, CARRÉ G: La sphérocytose héréditaire en 1995: l'apport de la génétique moléculaire. *Hématologie* 1995; 2:115-22
2. TSE WT ET LUX SE: Red blood cell membrane disorders. *Br J Haematol.* 1999; 104:2-13
3. LESLEY J, MICHAEL JA: Erythroid band 3 variants and disease. *Baillieres Clin Haematol.* 1999; 12 (4):637-654
4. AGRE P, ASIMOS A, CASELLA JF, MCMILLAN C: Inheritance pattern and clinical response to splenectomy as a reflection of erythrocyte spectrin deficiency in hereditary spherocytosis. *N Eng J Med.* 1986; 315:1579-83
5. TOSHIBA S, DAISUKE U, SHIN-ICHIRO S, KEIJI H, SHUNZO C, TOHRU K: Pancytopenia with hemophagocytosis secondary to parvovirus B19 infection in a family with hereditary spherocytosis. *Pediatr Int.* 1999;41:561-564
6. DODGE, JT et al: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes *Arch Biochem Biophys.* 1963;100:119-130
7. LOWRY OH, ROSEBROUGH JN, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurements with the Folin reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275
8. LAEMMLI UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685
9. FAIRBANKS et al: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry.* 1971; 10:2606-2671
10. MANATA P, ALMEIDA H, REBELO U, BAIO A, GRANJO E, RIBEIRO ML: Estudio de las proteínas de la membrana del glóbulo rojo en la población portuguesa – experiencia de la Unidad de Hematologia Molecular, *Haematologica.* 2000; 85 supl 3:38
11. HASSOUN H, PALEK J: Hereditary spherocytosis: a review of the clinical and molecular aspects of the disease. *Blood Rev.* 1996; 10:129-47
12. COSTA FF, AGRE P, WATKINS PC et al: Linkage of dominant hereditary spherocytosis to the gene for the erythrocyte membrane-skeleton protein ankyrin. *N Engl J Med.* 1990;323:1046-50
13. LANCIOTTI M, PERUTELLI P, VALETTO A, DI MARTINO D, MORI PG: Ankyrin deficiency is the most common defect in dominant and non dominant hereditary spherocytosis. *Haematologica.* 1997;82:460-2
14. GRANJO E, MANATA P, ALMEIDA et al: Hereditary spherocytosis and elliptocytosis in the north of Portugal. *Int J Hematol* 2000. 72 supl 1:121
15. GALLAGHER PG, FORGET BG: Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and related disorders. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology.* 6th rev. New York: MacGraw-Hill, 2001:503-518