

SENESCÊNCIA ERITROCITÁRIA: INTERACÇÕES LIPO-PROTEICAS DA MEMBRANA GLOBULAR

CARLOTA SALDANHA, J. MARTINS E SILVA

Instituto de Bioquímica, Fac. Medicina de Lisboa. 1600 Lisboa Portugal.

I — PREÂMBULO

As causas do envelhecimento têm desde sempre preocupado o homem em geral e os cientistas em particular. E, embora tenham sido registados nos últimos decénios progressos espectaculares na redução da mortalidade infantil e aumento da perspectiva de vida humana, esses benefícios pouco ou nada têm a ver com a modulação dos mecanismos de envelhecimento. O aumento da vida média humana tem sido conseguido quase exclusivamente através da minimização de vários flagelos, tais como as infecções, parasitoses e, em data mais recente, pela redução de alguns factores de risco cardiovascular.

Todavia, as causas de perda de memória e limitação de outras capacidades psíquicas, da incapacidade em executar funções vitais e outras características de envelhecimento que culminam, em período mais ou menos tardio, na morte, continuam por esclarecer. Os mecanismos subjacentes a esse processo natural como que estão exacerbados em determinadas situações patológicas, como na doença de Alzheimer, em que se assiste a envelhecimento celular prematuro.

Em contraste, uma das doenças que actualmente mais contribui para a mortalidade da espécie humana — o cancro — caracteriza-se pela proliferação explosiva e incontrolável de células que não envelhecem.

Face a este paradoxo, não são de estranhar múltiplas investidas da ciência, em que se destacam estudos bioquímicos, visando esclarecer o envelhecimento celular e causas da morte humana.

O glóbulo vermelho apesar de desprovido do núcleo, mitocôndrias e outros organitos (próprios de todas as células humanas) permanece activo e funcional em circulação durante cerca de 120 dias. Nesse intervalo assegura a oxigenação a trocas gasosas teciduais, contribui para o controlo do pH corporal e, aparentemente, está envolvido no transporte de diversos mediadores hormonais para células-alvo. Ao fim daquele prazo, os glóbulos são eliminados da circulação, dando lugar a glóbulos jovens por estimulação permanente e controlada da eritropoiese medular.

O mecanismo que determina a vida média global é desconhecido. Todavia, e em comum com os restantes tipos de células corporais, o eritrócito apresenta um revestimento estruturalmente muito semelhante. Tendo como base hipóteses que atribuem à membrana citoplásmica participação determinante no envelhecimento, parece legítimo utilizar o glóbulo vermelho — facilmente acessível e sem outras estruturas internas — para esclarecimento das causas de envelhecimento celular, numa primeira fase do estudo daquele problema.

II — CARACTERÍSTICAS DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA

Desde que o envelhecimento eritrocitário começou a ser estudado sistematicamente, várias hipóteses têm sido formuladas para explicar aquele fenómeno. Na generalidade, essas hipóteses reportam-se a alterações morfológicas e/ou metabólicas que progridem com a idade global e que acabam por afectar a capacidade de deformação eritrocitária à acção constrigente da microcirculação.

Por sua vez, as propriedades físico-químicas do fluxo sanguíneo, assim como a remoção e subsequente destruição de glóbulos anormais ou senescentes da circulação, dependem de vários factores, com destaque para a agregação e, sobretudo, para a deformabilidade eritrocitária (revisão em 1 e 2).

A deformabilidade eritrocitária é influenciada pela relação área/volume, propriedades viscoelásticas da membrana e viscosidade interna³. As duas primeiras variáveis são afectadas pela natureza química e estrutural da membrana e interacções moleculares implícitas.

Assim, verifica-se que a composição lipídica e relação colesterol/fosfolípidos influenciam a fluidez da membrana (e por conseguinte a deformabilidade eritrocitária⁴, enquanto a distribuição assimétrica dos fosfolípidos na membrana eritrocitária contribui para a manutenção do potencial da membrana, assegura a integridade celular e influencia a actividade de algumas enzimas^{5,6}. A assimetria lipídica é afectada pelo colesterol⁷ e proteínas do citoesqueleto^{5,5}. Estas proteínas (extrínsecas) da face interna da membrana eritrocitária, estabelecem interacções com os fosfolípidos⁸ e com as proteínas intrínsecas⁹ e citoplásmicas¹⁰.

A integridade química e estrutural do citoesqueleto afigura-se fundamental para a manutenção da deformabilidade eritrocitária. Na constituição do citoesqueleto participam a espectrina, actina e proteína 4.1. A espectrina é formada por 2 cadeias (α e β), referenciadas como as bandas 1 e 2 da nomenclatura de Fairbanks¹¹; ao associarem-se entre si, topo a topo, formam dímeros e tetrâmeros em equilíbrio relativo; *in vitro* predominam os heterotetrâmeros¹².

A espectrina, ao ligar-se à actina (banda 5) e proteína 4.1 constitui um monómero que, por repetição, forma a malha ou rede que reveste a face interna da membrana eritrocitária.^{9, 13, 14}

A proteína 2.1 (designada por anquirina) estabelece a ligação entre a espectrina e a proteína intrínseca banda 3 (canal aniónico)⁹. A esta glicoproteína ligam-se as seguintes proteínas: hemoglobina, aldolase, fosfogliceratocinase, gliceráldeído-fosfato-desidrogenase e fosfofrutocinase¹⁵. Também associadas à banda 3 parecem estar as enzimas Na⁺,

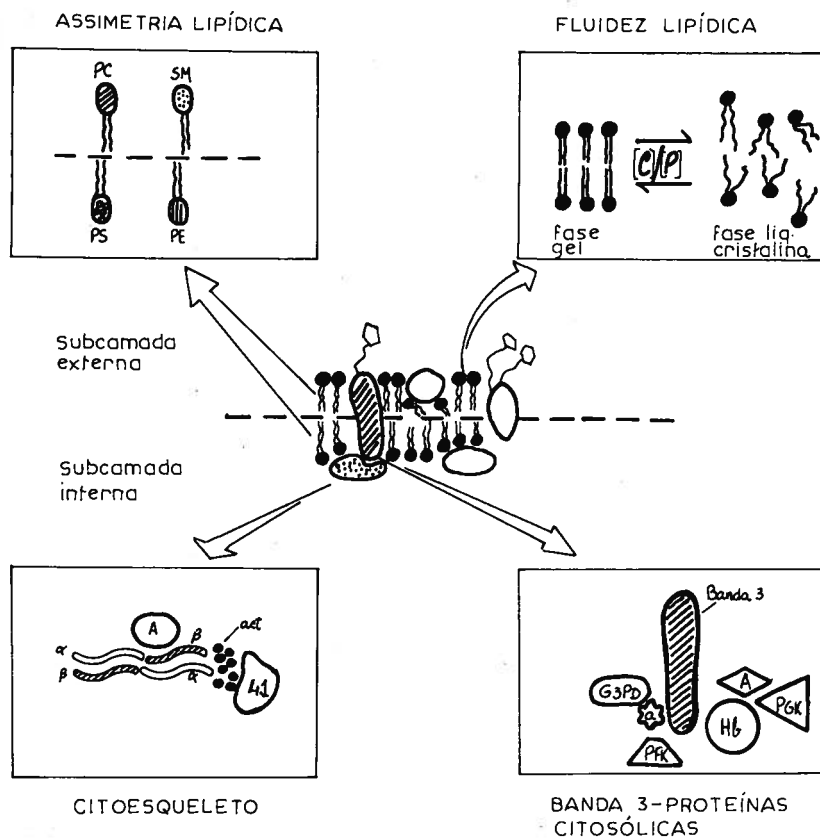


Figura 1: A membrana eritrocitária apresenta assimetria lipídica com predomínio de fosfatidilcolina (PC) e esfingomiélin (SM) na subcamada externa. A fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) existem em maior quantidades na subcamada interna. A fluidez lipídica é influenciada pelo comprimento, grau de insaturação dos ácidos gordos e razão de concentrações colesterol/fosfolípidos ([C]/[P]). A glicoproteína banda 3 ligam-se: (i) proteínas citosólicas, tais como hemoglobina (Hb), aldolase (a), fosfofrutocinase (PFK), fosfoglicerato cinase (PGK) e gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase (G3PD); (ii) proteína extrínseca anquirina (A), que estabelece a ponte com o citoesqueleto. Este polímero é constituído por espectrina (cadeias α e β), acima (act) e proteína 4.1.

K^+ -ATPase e a acetilcolinesterase.^{16, 17} Enquanto para a primeira, a função está perfeitamente esclarecida, (hidrólise do ATP associada, ao transporte activo de sódio e potássio), a da segunda continua desconhecida. A actividade de ambas as enzimas é fortemente influenciada pelos lípidos.^{18, 19}

As interacções lipoproteicas podem ser agrupadas em hidrofóbicas ou electrostáticas, e o seu conhecimento ser abordado pelo estudo do comportamento alostérico da acetilcolinesterase.¹⁹

A fluidez lipídica é um regulador fisiológico do carácter alostérico das enzimas ligadas à membrana.²⁰ Assim, o estudo da influência das alterações da membrana no comportamento cooperativo das enzimas integrais é um processo que conduz à confirmação das interacções lipoproteicas.

A composição química, estrutura, metabolismo, propriedades e funções do eritrócito estão perfeitamente interligadas, interdependentes e reguladas. Será de esperar que em situações patológicas e/ou pelo envelhecimento ocorram disfunções em qualquer ou todos os parâmetros.

III — ENVELHECIMENTO DO ERITRÓCITO

O envelhecimento eritrocitário começou a ser estudado em 1938, por Stephens²¹ e desde então várias hipóteses têm sido apresentadas para o explicar.

O estudo de Rouss²² demonstrou que dos eritrócitos normais *in vivo* são removidas porções da membrana, por fragmentação mecânica, sem perda de hemoglobina. Este processo induz, com o tempo, aumento da rigidez celular que compromete a sobrevivência a nível da microcirculação.

Um segundo mecanismo também baseado no decréscimo da deformabilidade ao longo do tempo baseia-se nas interacções entre o cálcio e a membrana moduladas pelo ATP.²³ A concentração do ATP diminui com a idade celular,²⁴ com consequente aumento da interacção entre o cálcio e as proteínas da membrana. Concomitantemente resulta menor flexibilidade e deformabilidade das células senescentes.

Estes dois mecanismos foram simulados e confirmados *in vitro*.²⁵

Durante o envelhecimento do eritrócito, as dimensões²⁵ a fragilidade osmótica²⁶ e a flexibilidade mecânica²⁷ decrescem em conjunto com o declínio das actividades de algumas enzimas.²⁸ A piruvato-cinase do eritrócito apresenta duas formas moleculares (R^1 e R^2) cuja acção R^2/R^1 aumenta com o envelhecimento globular.²⁶ A transformação de R^1 em R^2 é acompanhada por acréscimo da capacidade de fosforilação e diminuição da afinidade para o fosfoenolpiruvato.³⁰ A actividade enzimática da acetilcolinesterase da membrana eritrocitária diminui com a idade globular.³¹ Estudos cinéticos revelaram que o valor da constante de afinidade da enzima para o substrato (km) não é afectado pela idade, embora a velocidade máxima diminua com a senescência.³²

O reconhecimento imunológico é alterado no envelhecimento por exposição de receptores antigénicos na superfície globular,³³ e aumento de ligação da I⁸ G.³⁴

Os glóbulos envelhecidos são mais receptíveis à acção do peróxido de hidrogénio, *in vitro*, com consequente agregação das proteínas de alto peso molecular.³⁵ A ocorrência destes agregados proteicos pode também resultar de uma simulação de envelhecimento eritrocitário por depleção metabólica (diminuição da concentração de precursores de ATP e GSH).³⁶

Os complexos proteicos são de dois tipos, de acordo com o peso molecular.³⁵ A concentração dos agregados de elevado peso molecular aumenta com o tempo de incubação, ao contrário do observado com os complexos de baixo peso molecular.³⁷ *In vivo*, este comportamento é confirmado pelo estudo de Synder e colaboradores, onde se evidencia que as fracções mais densas de eritrócitos (glóbulos mais envelhecidos) contêm agregados de espectrina e hemoglobina (cadeias α).³⁸

O conteúdo em ácido slácico dos eritrócitos diminui com a idade globular.³⁹ Experiências em ratos demonstraram que a redução de carga superficial induzida pela acção de neuraminidase é acompanhada de rápida remoção dos glóbulos em circulação.⁴⁰ No entanto, muitas propriedades bioquímicas e biofísicas mantêm-se inalteradas: deformabilidade,⁴² fragilidade osmótica,¹⁶ concentração de ATP,¹⁶ nível de lactato,⁴¹ actividade enzimáticas (piruvato-cinase,⁴⁰ glicose 6-fosfato — desidrogenase)⁴¹ e índices celulares.¹⁶

A acção das proteases de membrana, o processo de vesiculação ou diminuição do pH podem conduzir ao mesmo estado deficitário de carga.^{43, 44, 45} Incubações de eritrócitos em meio contendo cálcio e magnésio mas desprovido de glicose conduzem ao envelhecimento eritrocitário, demonstrado por depleção em ATP, transformação de discócitos em equinócitos e libertação de vesículas.⁴⁵

Estas transformações originam diminuição do conteúdo em ácido slácico na forma ligada a glicopéptidos e/ou vesículas.⁴⁵ O cálcio reforça a saída de sialoglicopéptidos, induzida por diminuição de pH ou depleção metabólica.⁴⁵

O Mg²⁺ e o ATP regulam a forma do eritrócito, por estimulação de uma cinase independente do AMPc, que fosforila a espectrina (cadeia β).⁴⁶ O Ca²⁺ inibe a cinase e por conseguinte diminui a fosforilação da espectrina.⁴⁷

Além destas, são conhecidas várias alterações bioquímicas e biofísicas do eritrócito, induzidas pela depleção em ATP ou aumento da concentração intracelular em Ca.²⁺

Todavia, em conjunto, não há uma resposta conclusiva sobre as causas de envelhecimento globular e, muito menos, se este fenómeno afecta a evolução clínica de algumas situações patológicas banais, quer directamente quer por reflectir uma situação comum a outras células corporais.

BIBLIOGRAFIA

- SCHMID-SCHONBEIN, H., WELLS, R., GOLDSTONE, J. — Influence of deformability of human red cells upon blood viscosity. *Circ. Res.* 25: 131, 1969.
- WEED, R. I. — The importance of erythrocyte deformability. *Am. J. Med.* 49: 147, 1970.
- CHIEN, S. — Determinants of blood viscosity and red cell deformability. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 41: (suppl. 156), 7; 1981.
- COOPER, R. A., LESLIE, M. H., FISCHKOFF, S., SHINITSKY, M., SHATTIL, S. J. — Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes *in vitro*: Production of red cell possessing more than two cholesterol per phospholipids. *Biochem.* 17: 327, 1978.
- HAEST, C. W. M., BEUTICKE, B. — Experimental alteration of phospholipid protein interaction within the human erythrocyte membrane. Dependence on glycolytic metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 401: 468, 1975.
- LANGE, L. C., VAN MEER, G., OPDENKAMP, J. A. F., VAN DUNEN, L. L. M. — Hemolysis of rat erythrocytes by replacement of the external phosphatidylcholine. *Eur. J. Biochem.* 110: 115, 1980.
- MOHANDA, N., WYATT, J., MEL, S. F., ROSSI, M. E., SHOHET, S. B. — Lipid translocation across the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 257: 6537, 1982.
- DRESSLER, V., HAEST, C. W. M., PLASE, G., DEUTICKE, B., ERUSALINSKY, J. D. — Stabilizing factors of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 775: 189, 1984.
- BENNETT, V., STENBUCK, P. J. — The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes. *Nature* 280: 468, 1979.
- SAUBERMAN, N., FORTIER, W., PIOTROWSKI, J. Y., SNYDER, L. M. — Spectrin haemoglobin crosslinkages associated with *in vitro* oxidant hypersensitivity in pathologic and artificially dehydrated red cells. *Brit. J. Haematol.* 54: 15, 1983.
- FAIRBANKS, G., STECK, T. L., WALLACH, D. F. H. — Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem.* 10: 2606, 1971.
- MARCHESI, V. T. — Spectrin present status of a putative cytoskeletal protein of the red cell membrane. *J. Memb. Biol.* 51: 101, 1979.
- LUX, S. E. — Dissecting the red cell membrane skeleton. *Nature* 281: 426, 1979.
- GOODMAN, S. R., NEIDER, S. A. — Binding of spectrin, tetramers to human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 255: 8082, 1980.
- BOIVIN, P., GARBARZ, M. — Interactions des enzymes cytosoliques avec la membrane du globule rouge. *C. R. Soc. Biol.* 174: 605, 1980.
- FOSEL, E. T., SOLOMON, A. K. — Relation between red cell membrane (Na⁺, K⁺) ATPase and band 3 protein. *Biochim. Biophys. Acta* 649: 557, 1981.
- SIHOTANG, K. — Acetylcholinesterase and its association with lipid. *Eur. J. Biochem.* 63: 519, 1976.
- TANAKA, R., SAKAMOTO, T. — Molecular structure in phospholipid essential to activate (Na⁺, K⁺, Mg²⁺) dependent ATPase and (K⁺-Mg²⁺) dependent phosphatase of bovine cerebral cortex. *Biochim. Biophys. Acta* 193: 384, 1969.
- BLAUREGARD, G., RONFAGALIS, B. D. — The role of tightly bound phospholipid in the activity of erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochem. Biophys. R. Comm.* 77: 211, 1977.
- BIOJ, G., MORERO, R. D., FARIAS, R. N., TRUCCO, R. E. — Membrane lipid fatty acid and regulation of membrane bound enzymes. Allosteric behaviour of erythrocyte Mg²⁺ ATPase (Na⁺, K⁺) — ATPase and AChE from rats fed different fat supplemented diets. *Biochim. Biophys. Acta* 311: 67, 1973.
- STEPHENS, J. G. — Stratified blood sedimentation. Isolation of immature red cells. *Nature* 141: 1058, 1938.
- ROUSS, P., ROBERTSON, O. H. — The normal fate of erythrocytes. The findings in healthy animals. *J. Exp. Med.* 25: 651, 1917.
- WEED, R. I., LA CELLE, P. L., MERRIL, E. W. — Metabolic dependence of red cell deformability. *J. Clin. Invest.* 48: 795, 1969.
- RAMOT, B., BROK, F., BEN BASSET, I. — Alterations in the metabolism of human erythrocytes with aging. XII Cong. Int. Soc. Hematol. N.Y. p. 169, 1968.
- LA CELLE, P. L., KIRKPATRICK, F. H., VDKOW, M. P., ARKIN, B. — Membrane fragmentation and Ca²⁺ membrane interaction: potential mechanisms of shape in the senescent red cell. *Nouv. Rev. Franc. Hem.* 6: 789, 1972.
- RIFKING, Y. M., ARAKI, K., MADLEY, E. — The relationship between the osmotic fragility of human erythrocytes and cell age. *Arch. Biochem. Biophys.* 22: 582, 1983.
- WEED, R. I., LA CELLE, P., MERRIL, E. W. — Metabolic dependence of red cell deformability. *J. Clin. Invest.* 48: 795, 1969.
- PIOMELLI, S., WYSS, S. R. — Metabolic death of the RBC. *Blood* 38: 832, 1971.
- NAKASJIMA, K. — Further evidence of molecular alteration and abnormalities of erythrocyte pyruvate kinase. *Clin. Chim. Acta.* 55: 245, 1974.
- FUJII, S. — Molecular aging and phosphorylation of erythrocyte pyruvate kinase. *Bull. Yamaguchi, Med. Sch.* 27: 107, 1980.
- ALLISON, A. C., BURN, G. P. — Enzyme activity as a function

- of age in the human erythrocyte. *Brit. J. Haematol.* 1: 291, 1955.
32. GALBRAITH, D. A., WATTS, D. C. — Human erythrocyte acetylcholinesterase in relation to cell age. *Biochem. J.* 195: 221, 1981.
 33. GATTEGNO, L., BLADIER, D., GARNIER, M., CORNILLOT, P. — Changes in carbohydrate content of surface membrane of human erythrocyte during aging carbohydrate. *Research* 52: 197, 1976.
 34. KAY, M. M. B. — Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72: 3521, 1975.
 35. SAUBERMAN, N., PIOTROWSKI, J., JOSHI, W., FORTIER, N., SNYDER, L. M. — Irreversible spectrin hemoglobin crosslinkages associated with oxidant hypersensitivity in pathologic or artificially dehydrated red cells. *Blood* 58: 34 a, 1981.
 36. BROVELLI, A., SUHAIL, M., PALLAVICINI, G., SINIGLIA, F., BALDUINI, C. — Self digestion of human erythrocyte membranes. Role of ATP and GSH. *Biochem. J.* 164: 469, 1977.
 37. BROVELLI, A., SEPPI, C., BALDUINI, C. — Modification of membrane protein organization during in vitro aging of human erythrocyte. *Int. J. Biochem.* 16: 1115, 1984.
 38. SNYDER, L. M., LELO, L., PIOTROWSKI, J., SAUBERMAN, S., LIU, C., FORTIER, N. L. — Irreversible spectrin haemoglobin condensing in vivo: a marker for red cell senescence. *Brit. J. Haematol.* 53: 379, 1983.
 39. GREENWALT, T. Y., STEANE, E. A. — Quantitative haemagglutination IV. Effect of neuraminidase treatment on agglutination by blood group antibodies. *Br. J. Haematol.* 25: 207, 1973.
 40. STEPHEN, A., TENFORDE, L. T., SCHOOLEY, J. C. — Decreased surface charge and accelerated senescence of red blood cells following neuraminidase treatment. *J. Lab. Clin. Med.* 89: 581, 1977.
 41. DUROCHER, J. R., PAYNE, R. C., CONRAD, M. E. — Role of sialic acid in erythrocyte survival. *Blood* 45: 11, 1975.
 42. GILCHER, R., CONRAD, M. — The relationship of RBC surface charge to RBC deformability. *Blood* 38: 807, 1971.
 43. ALLEN, D., BILLAH, M., FIMAN, Y. B., MICHELL, R. H. — Release of diacylglycerol enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular Ca^{2+} . *Nature* 261: 58, 1976.
 44. LUTZ, H. V., LIU, S. C., PALEK, J. — Release of spectrin free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. I Characterization of spectrin-free vesicles. *J. Cell. Biol.* 73: 548, 1977.
 45. BOCCI, V., PESSINE, P., PAULESU, L., PACINI, A., MUSCETTOLE, M. — Studies of factors regulating the aging of human erythrocytes I the role of pH and of divalent cations. *Int. J. Biochem.* 10: 19, 1979.
 46. BOIVIN, P., GARBAR, M., DHELMY, D., GALAND, C. — In vitro phosphorylation of the red cell cytoskeleton complex by cyclic AMP dependent protein kinase from erythrocyte membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 647: 1, 1981.
 47. QUIST, E. E. — Regulation of the shape of unsealed erythrocyte membrane by Mg^{2+} ATP and Ca^{2+} . *Arch. Biochem. Biophys.* 203: 123, 1980.

Pedidos de Separatas:

J. Martins e Silva
 Instituto de Bioquímica
 Faculdade de Medicina de Lisboa
 Lisboa.