

O CITOESQUELETO DA MEMBRANA DA HEMÁCIA NA ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA



Caso clínico

Um adolescente foi admitido no hospital com fraqueza generalizada, dor de garganta, icterícia e dor no abdome. Estava ligeiramente febril há vários dias e tinha observado que a cor da sua urina tinha ficado escura. Sua temperatura era de 38°C. O médico encontrou ao exame físico, além da conjuntiva pálida e icterica, a mucosa da faringe inflamada, gânglios cervicais e esplenomegalia (aumento do baço) moderada. Os exames de laboratório indicaram anemia hemolítica com valor de hemoglobina de 9g/dL (valores normais entre 14 e 18), 10% de reticulócitos (valores normais < 2,4%) e bilirrubina sérica de 100µmol/L (valores normais de 3,4-20,5µmol/L). O esfregaço sanguíneo mostrava anisocitose (tamanho variável das hemácias) moderada e aumento do número de microsferócitos (hemácias globulares pequenas). Apresentava ainda leucocitose de 12.000cm³ (valores normais 4.000-10.000cm³). Foi mantido internado no hospital durante 10 dias, quando a maior parte dos sintomas relacionados com a infecção associada à crise hemolítica desapareceu. Persistia, entretanto, uma leve anemia (11g/dL) com reticulocitose (5%), pequena icterícia (50µmol/L) e moderada esplenomegalia, sugerindo um quadro basal de hemólise continuada. Foi diagnosticada a existência de esferocitose hereditária e recomendada esplenectomia (retirada cirúrgica do baço). Dois meses depois da operação, não havia mais indícios de hemólise.

Fundamentação bioquímica

A hemácia é um tipo celular que sofreu um enorme processo de seleção natural direcionada por formas graves da malária. O agente causal da doença, o *Plasmodium falciparum*, desenvolve grande parte do seu ciclo vital no interior das hemácias e, por alguma razão ainda não muito clara, isso permite que certas mutações nas hemácias (tanto nas proteínas da membrana quanto na molécula da hemoglobina) fossem selecionadas na forma de heterozigotos que possuiriam alguma vantagem evolutiva em relação aos organismos homozigotos. Esses acabariam desenvolvendo ou uma doença grave da hemácia (homozigoto para o gene mutado) ou malária (homozigoto normal) e acabariam morrendo, enquanto os organismos heterozigotos seriam selecionados, o que aumentaria a porcentagem dos indivíduos com genes mutados na população. Alguns pesquisadores (Mohandas e Gallagher, 2008) estimam que cerca de um sexto da atual população mundial apresente algum tipo de mutação nos constituintes da hemácia. (A anemia falciforme e a esferocitose hereditária seriam apenas dois dos exemplos das doenças herdáveis mais abundantes dessa célula.) A riqueza de defeitos moleculares no citoesqueleto da membrana das hemácias estimulou ainda estudos sobre a estrutura da sua membrana, que logo acabou tornando-se a mais bem conhecida.

A estrutura da membrana plasmática das hemácias

A membrana celular das hemácias é composta principalmente de uma **bicamada lipídica e de proteínas** (Nelson e Cox, 2008). Sua organização é mostrada na **Fig. 5.1**. Os principais componentes lipídicos são o colesterol e os fosfolipídios presentes em quantidades aproximadamente equimoleculares. O colesterol e os fosfolipídios: fosfatidilcolina e esfingomiéline são mais encontrados na camada externa da bicamada e os fosfolipídios: fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina estão mais concentrados na camada interna. A composição lipídica da membrana é responsável pela fluidez da matriz da membrana onde residem as proteínas transmembranas. Pelo menos **12 proteínas principais** podem ser separadas por SDS-PAGE (**Fig. 5.1B**) e são classificadas em dois grupos: **integrals** e **periféricas**. As proteínas integrals penetram ou estão embebidas na bicamada lipídica e são fortemente ligadas aos lipídios de membrana por meio de interações hidrofóbicas.

As principais proteínas integrals são a da banda 3 e as glicoforinas. Essas proteínas atravessam a membrana e possuem domínios estruturais e funcionais distintos, tanto dentro da bicamada quanto nos dois lados da membrana. A **proteína da banda 3** é a principal proteína integral, perfazendo 25% do total das

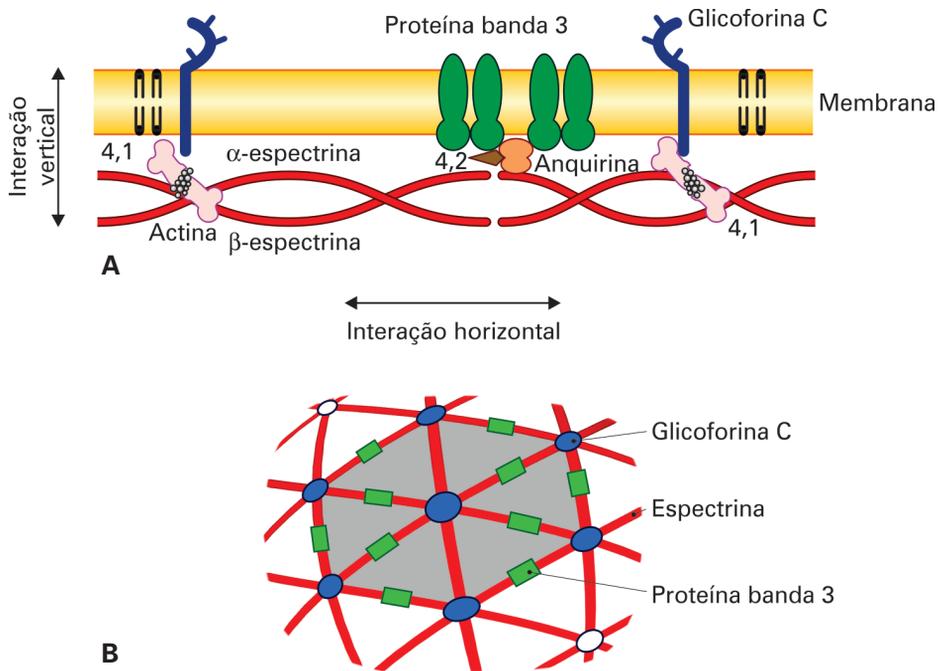


Figura 5.1. Esquema da membrana da hemácia em corte longitudinal (A, modificado de Bennett e Healey, 2008) e em corte transversal (B) mostrando o mosaico hexagonal do esqueleto da membrana.

proteínas da membrana. Sua principal função é permitir a troca de Cl^- por HCO_3^- através da membrana, que é um processo essencial para o transporte de CO_2 dos tecidos para os pulmões (ver os casos clínicos: “O alosterismo da molécula da hemoglobina na anemia falciforme” e “A deficiência da insulina na cetoacidose diabética”).

Entre as outras proteínas integrais há **quatro glicoforinas** ricas em ácido siálico (as glicoforinas A a D). A glicoforina A carrega a especificidade do grupo sanguíneo MN; a B, a do grupo Sc; e a C, a do grupo sanguíneo Gerbich. A presença de ácidos siálicos confere uma forte carga negativa líquida à superfície do eritrócito, o que é funcionalmente importante na redução das interações entre células iguais e as entre o eritrócito com outras células sanguíneas ou o endotélio vascular.

O citoesqueleto da membrana

As **proteínas periféricas da membrana** estão localizadas na superfície citoplasmática da bicamada lipídica e são associadas entre si formando uma rede filamentosa flexível que fornece estabilidade mecânica à membrana e é a deter-

minante principal da forma da hemácia e da sua capacidade de se deformar para enfrentar várias tarefas onde for necessário. Essa rede filamentosa é geralmente conhecida como **citoesqueleto da membrana** (Alberts et al., 2006; Ideguchi, 2007).

Os principais componentes do citoesqueleto da membrana são a espectrina α (banda 1) e a espectrina β (banda 2), a actina (banda 5) e a proteína da banda 4.1 (**Fig. 5.2**). As **espectrinas** são proteínas altamente flexíveis compostas de dois polipeptídios de 240.000 (α) e 220.000 (β) dáltons. Essas cadeias são alinhadas lado a lado na forma de um heterodímero $\alpha\beta$. Os dímeros unem-se pelas extremidades para formar tetrâmeros $(\alpha\beta)_2$. As outras extremidades dos tetrâmeros estão associadas com filamentos curtos de actina compostos de 12 monômeros. Embora a associação espectrina-actina seja fraca, cada junção é grandemente estabilizada pela formação de um complexo ternário com a proteína da banda 4.1. Essa estabilização ocorre por meio da interação direta da banda 4.1 com a cadeia da espectrina β em sítios próximos da região onde a espectrina interage com os oligômeros de actina. Dessa forma, seis terminais da espectrina formam um complexo com cada oligômero da actina para formar uma rede com um mosaico aproximadamente hexagonal (**Fig. 5.1B**).

A ancoragem do esqueleto da membrana à bicamada lipídica é feita de duas maneiras principais: (a) por meio da ligação com a proteína da banda 3 através da **anquirina** (banda 2.1) e possivelmente da proteína da banda 4.2; e (b) da interação com a **glicoforina C**, através da proteína da banda 4.1. Através dessas duas interações a bicamada de lipídio fica mecanicamente acoplada ao citoplas-

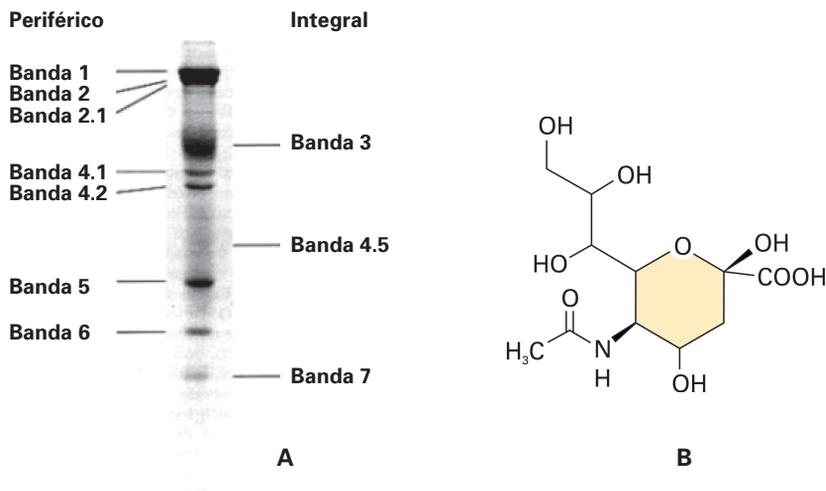


Figura 5.2. Padrão eletroforético das proteínas de membrana da hemácia em gel de poliácridamida – SDS (A) e a estrutura do ácido siálico (B).

ma celular pelo esqueleto da membrana, formando uma estrutura que é a principal responsável pela propriedade das hemácias em mudar sua forma. Durante a circulação das hemácias pela corrente sanguínea, elas sofrem ciclos de alongamento e relaxamento para atravessar capilares e favorecer as trocas de gases (O_2 e CO_2) que transportam. Essas mudanças de forma são mediadas por interações entre as várias proteínas que constituem o **citoesqueleto da membrana** e devem ser reguladas por mecanismos moleculares ainda não de todo esclarecidos.

Lesões moleculares das hemácias na esferocitose hereditária

Embora a esferocitose hereditária tivesse sido clinicamente descrita já no final do século XIX por Vanlair e Masius (1871), ela começou a ser entendida, do ponto de vista molecular, apenas na década de 1980, quando pesquisadores descreveram um tipo de doença semelhante à esferocitose hereditária em camundongos que apresentavam uma deficiência de espectrinas nas suas hemácias. Logo em seguida, Agre et al. (1982) detectaram em dois pacientes uma grande diminuição no conteúdo de espectrina nas suas hemácias. (Peter Agre por suas relevantes contribuições ao estudo da membrana, principalmente a descrição das aquaporinas, recebeu o Prêmio Nobel de Química de 2003.)

Hoje se sabe que a esferocitose hereditária é uma doença que afeta 1 em cada 2.000 recém-nascidos. Do ponto de vista causal, ela é bastante heterogênea, pois, além das mutações nas moléculas das espectrinas α e β , pode também afetar as moléculas da anquirina, da proteína da banda 4.2, e da banda 3 (**Quadro 5.1**). Apesar dessa heterogeneidade, o que todas essas mutações têm em comum é **não propiciarem** uma ancoragem adequada do citoesqueleto da membrana à bicamada de lipídio. O defeito deve-se principalmente a uma diminuição de interações moleculares da proteína mutada, o que leva a uma **fixação vertical insuficiente** do citoesqueleto à bicamada de lipídio (**Fig. 5.1A**). Em decorrência desse defeito, há uma tendência de a bicamada de lipídio se descolar do citoesqueleto, formando

Quadro 5.1. Base molecular da esferocitose hereditária.

Gene defeituoso	Cromossomo	Expressão clínica	Prevalência
Anquirina	8	Suave a grave	50-60%
Proteína da banda 3	17	Suave a moderada	20-30%
Espectrina β	14	Suave a moderada	10%
Espectrina α	1	Grave	Rara
Proteína da banda 4.2	15	Suave a moderada	Rara

microvesículas que acabam separando-se da célula. O resultado final é uma grande redução da superfície da hemácia (originalmente um disco bicôncavo) que, não podendo mais se deformar e ultrapassar especialmente os capilares mais estreitos (como os do baço), acaba perdendo essa superfície extra para adquirir a forma pouco flexível de esfera (daí o nome **esferocitose** da doença). Com isso, a principal função da membrana da hemácia fica enormemente prejudicada.

As outras doenças do citoesqueleto de membrana das hemácias (**eliptocitose** e **piropoiquilocitose hereditárias**), que não serão aqui desenvolvidas, envolvem em geral uma interação defeituosa **horizontal** (Fig. 5.1A) entre as proteínas da malha do citoesqueleto, principalmente entre as espectrinas (Tse e Lux, 2001).

Recentemente foram observados defeitos das proteínas do citoesqueleto de membrana em outros tipos celulares (que não as hemácias) envolvendo a anquirina e a espectrina (ataxia espinocerebelar do tipo 5 e arritmia cardíaca) (Bennett e Healey, 2008).

Destruição das hemácias lesadas no baço

Além da perda da superfície do eritrócito pelo descolamento da bicamada da membrana do citoesqueleto (que ocorre principalmente no baço), as características anatômicas do sistema vascular desse órgão formam um grande filtro que

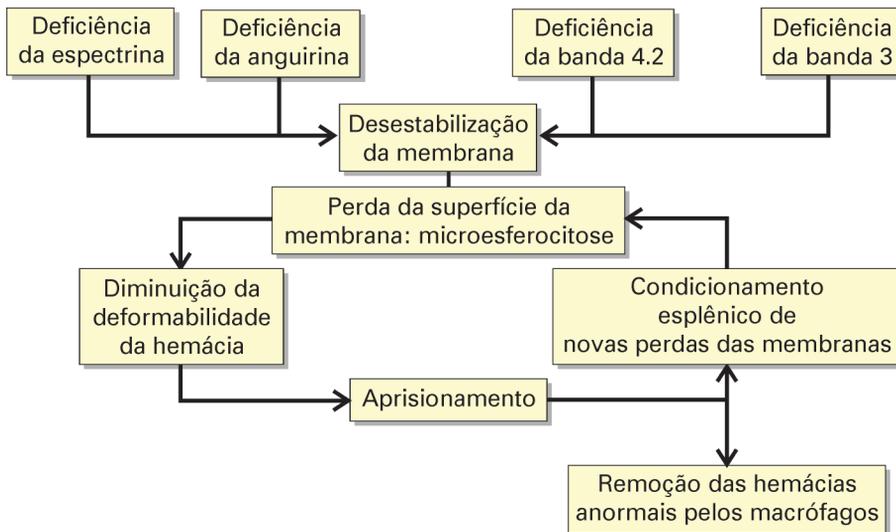


Figura 5.3. Fisiopatologia da hemólise (no baço) dos eritrócitos na esferocitose hereditária.

acaba aprisionando as hemácias no baço, aumentando o tamanho do órgão (**esplenomegalia**) e criando várias condições de estresse às hemácias lesadas (conhecidas como condicionamento esplênico).

Esse condicionamento esplênico é desencadeado pela diminuição da circulação das hemácias no órgão, o que aumentará a produção de ácido láctico das células, levando o pH intracelular a valores entre 6,5 e 7,0. Isso diminui a atividade da fosfofrutoquinase e da hexoquinase, enzimas limitantes da velocidade da glicólise, o que acabará retardando a utilização da glicose e a produção de ATP. Além disso, o contato prolongado das hemácias com outras células, especialmente os macrófagos do baço, provocará outras lesões celulares nas hemácias lesadas que se acumularão, preparando a célula para ser hemolisada, o que acabará ocorrendo ou no baço ou em outro órgão do sistema reticuloendotelial.

Características clínicas da doença

As formas clínicas da doença dependem muito do tipo e da extensão da lesão molecular (Perrota et al., 2008).

Cerca de 20 a 30% dos pacientes desenvolvem uma doença **suave** com leve aumento da hemólise no baço, sendo integralmente compensado por um aumento na produção dos eritrócitos, o que acaba evitando a instalação de um quadro de anemia. Em geral, são pacientes assintomáticos e apenas uma observação clínica mais cuidadosa levaria à formação do diagnóstico correto.

Cerca de 60 a 70% dos pacientes desenvolvem uma doença **moderada**, frequentemente já diagnosticada na infância e caracterizada por apresentar esplenomegalia, anemia e icterícia moderadas.

Em cerca de 10% dos pacientes, instala-se uma doença **moderadamente grave** que apresenta um grau de hemólise mais elevado. Essa parece ser a situação do paciente descrito neste caso clínico. A concentração da hemoglobina sanguínea chegou a atingir valores de 9g/dL, o que induziu a um aumento na produção de reticulócitos (atingindo valores acima de 10% das células sanguíneas) e da taxa de degradação da hemoglobina com o conseqüente aumento da bilirrubina sanguínea para valores maiores de 100 μ mol/L.

Finalmente, em cerca de 5% dos pacientes instala-se uma forma **grave** da doença, com um grau de anemia que ameaça a vida dos pacientes, apresentando uma taxa de hemoglobina que necessita de transfusões sanguíneas regulares para manter um valor mínimo de 6g/dL. O grau elevado de bilirrubina no sangue pode provocar a formação de pedras na vesícula biliar, o que representará uma complicação para esses pacientes.

De maneira geral, o quadro clínico de qualquer dos pacientes acima descritos pode agravar-se em períodos de **crise**, com um aumento acentuado do nível de anemia. Duas espécies de crises são conhecidas: a **hemolítica** e a **aplástica**. Ambas são desencadeadas por algumas infecções virais. As mais comuns e menos graves são as hemolíticas, que se caracterizam pelos aumentos tanto da destruição das hemácias como da produção compensatória de reticulócitos. Na aplástica, o quadro destrutivo é o mesmo, mas não há uma resposta compensatória na produção de reticulócitos, o que torna o caso mais grave (e felizmente mais raro). Possivelmente o paciente descrito neste caso clínico de esferocitose hereditária apresentou crise hemolítica que, após o desaparecimento da infecção, logo teve seus sintomas atenuados.

Diagnóstico

O diagnóstico é estabelecido pela constatação laboratorial das principais características clínicas da doença (anemia, aumento do número de reticulócitos, icterícia e aumento do baço), associadas à presença de esferócitos no sangue.

O teste comprobatório mais comum da doença é o da **fragilidade osmótica** das hemácias (Emerson et al., 1956). As hemácias (frescas ou envelhecidas durante 24 horas à temperatura ambiente, que são mais sensíveis) são incubadas em soluções salinas de concentrações crescentes, por certo período de tempo, após o qual se determina o grau de hemólise que sofreram. O resultado típico desse exame pode ser observado no gráfico da **Fig. 5.4**: onde as hemácias dos pacientes com esferocitose hereditária são significativamente mais frágeis que as normais. Isso se deve à perda de grande parte da superfície celular que acomodaria parte dos reajustes que as células teriam de fazer diante das soluções salinas distantes das fisiológicas. Entretanto, uma porcentagem próxima de 20% dos pacientes com esferocitose hereditária pode apresentar valores confundíveis com os valores apresentados pelas hemácias normais.

Outros exames mais específicos poderão ser realizados em laboratórios especializados e equipados para a pesquisa científica dessa doença. Entre eles os mais comuns são a eletroforese (SDS-PAGE) das proteínas da membrana das hemácias (que acaba detectando a doença em cerca de 80% dos pacientes) e a hibridização do DNA do paciente com sondas especiais de genes alterados das proteínas do citoesqueleto de membrana.

Finalmente, uma das complicações frequentes nos casos de esferocitose hereditária é o aparecimento de pedras de bilirrubina na vesícula biliar. Como elas podem agravar o quadro do paciente, especialmente durante as crises da doença, um exame ultrassonográfico poderá ser recomendado anualmente.

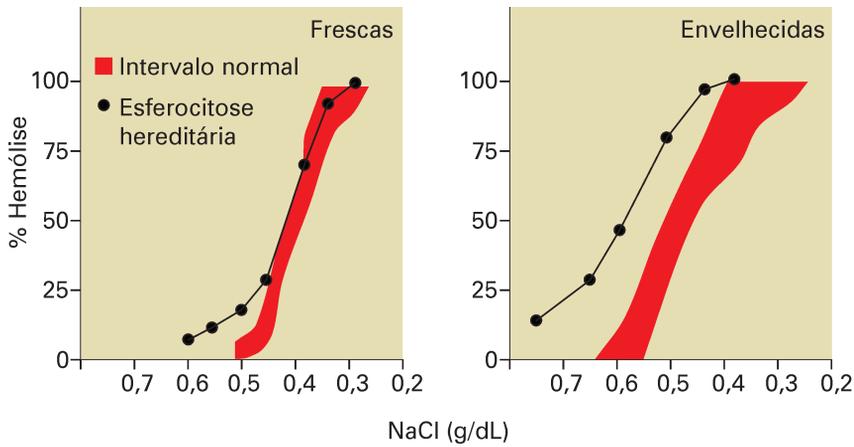


Figura 5.4. Teste da fragilidade osmótica das hemácias.

Tratamento

As formas mais brandas da doença geralmente não necessitam de tratamento especial, exceto quando agravadas por alguma infecção viral concomitante, quando o procedimento médico poderá adotar algumas das providências mencionadas a seguir.

Nas formas mais graves da doença, o grau da anemia hemolítica instalada necessitará de: **(a)** transfusões de sangue, para repor o nível basal de hemoglobina e garantir a eficiência do transporte de gases; **(b)** eventual eliminação do ferro (por agentes quelantes), para evitar a formação de depósitos anormais do metal em vários órgãos por causa da exagerada degradação da hemoglobina; **(c)** retirada da vesícula biliar; e finalmente **(d)** esplenectomia (Abdullah et al., 2009), ou seja, a retirada cirúrgica do baço que na maioria das vezes tem um caráter curativo, senão grande atenuador dos sintomas. Essa medida cirúrgica deve ser adotada apenas em crianças com mais de 10 anos de idade, quando os eventuais riscos de responder inadequadamente a eventuais infecções são menores.

Em geral, logo após o ato cirúrgico, os valores sanguíneos do número de hemácias e a taxa de hemoglobina elevam-se e o número de reticulócitos cai para valores próximos ao dos normais. Apenas a forma das hemácias continua a ser predominantemente esférica. Além disso, mesmo durante os futuros períodos de crise o quadro clínico será atenuado.

Questões

- 1 Pesquisadores que descreveram o “citoesqueleto de membrana” das hemácias descobriram na década de 1980 que camundongos apresentavam um tipo de esferocitose hereditária semelhante à forma humana. Nas formas suaves, não havia uma parte da molécula de espectrina e essa não existia completamente nas formas mais graves da doença. O desenvolvimento desse modelo animal de esferocitose hereditária foi muito importante para a pesquisa científica. No que ele pode ajudar nosso entendimento da doença?
- 2 As causas da esferocitose hereditária são heterogêneas. Explique como certas mutações nas proteínas espectrina α e β , anquirina, banda 3 e banda 4.2 podem determinar o aparecimento da doença. O que elas têm em comum?
- 3 Quais os sinais clínicos fundamentais para o diagnóstico da esferocitose hereditária?
- 4 Que tipos de crise poderão ocorrer em um caso de esferocitose hereditária?
- 5 A fragilidade osmótica das hemácias que apresentam esferocitose hereditária é consequência da diminuição do cociente entre a superfície/volume da célula. Explique por que os esferócitos são mais frágeis neste teste.
- 6 Explique a fisiopatologia da hemólise das hemácias no baço. Por que os esferócitos são mais sensíveis?

Bibliografia

Abdullah F, Zhang Y, Sciortino C, Camp M, Gabre-Kidam A, Price MR, Chang DC. Splenectomy in hereditary spherocytosis. Review of 1657 patients and application of the pediatric indicators. *Pediatr Blood Cancer* 2009;52(7):834-837.

Agre P, Orringer EP, Bennett V. Deficient red-cell spectrin in severe recessively inherited spherocytosis. *N Engl J Med* 1982;306:1155-1161.

Agre P. Aquaporins water channels. Nobel Lecture; 2003.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M et al. Fundamentos da biologia celular. 3ª ed. Artmed; 2006. p. 380-381.

Bennett V, Healy J. Organizing the fluid membrane bilayer: diseases linked to spectrin and ankyrin. *Trends Mol Med* 2008;14(1):28-36.

Emerson CP Jr, Shen SC, Ham TH, Fleming EM, Castle WB. Studies on the destruction of red blood cells. IX. Quantitative method for determining the osmotic and mechanical fragility of red cells in the peripheral blood and splenic pulp; the mechanism of increased hemolysis in hereditary spherocytosis (congenital hemolytic jaundice) as related to the function of the spleen. *Arch Intern Med* 1956;97:1

Ideguchi H. Hereditary spherocytosis. In Glew RH, Rosenthal MD (eds). *Clinical studies in*

medical biochemistry. 3rd ed. Oxford: University Press; 2007. p. 66-74.

MedlinePlus. Congenital spherocytic anemia. Disponível em <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000530.htm>

Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present and future (ASH 50th anniversary review). *Blood*, 2008;112(10):3939-3948.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th ed. New York: WH Freeman and Co.; 2008. p. 404-406.

Perrota S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet* 2008;372(9647):1411-1426.

Tse WT, Lux SE. Hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. In Scriver CR, Beaudet A, Sly W, Valle D (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 2001. p. 4665-4727.

Vanlair CF, Masius JB. De la microcythémie. *Bull Acad R Med Belg*, 3rd series: 1871;515-613.