

Maria Alice dos Santos Silva Gomes Martins

O eritrócito
como indicador de *stress in vivo*,
no exercício físico e
nas doenças cardiovasculares

UNIVERSIDADE DO PORTO

1995

Maria Alice dos Santos Silva Gomes Martins

O eritrócito
como indicador de *stress in vivo*,
no exercício físico e
nas doenças cardiovasculares

UNIVERSIDADE DO PORTO

1995

Maria Alice dos Santos Silva Gomes Martins

Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

O eritrócito
como indicador de *stress in vivo*,
no exercício físico e
nas doenças cardiovasculares

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

1995

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor
apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade do Porto

Orientador: Professor Doutor Alexandre Tietke Quintanilha

Co-orientador: Professor Doutor Francisco Carvalho Guerra

Ao Tó Zé

Aos meus filhos Rodrigo e Miguel

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Francisco Carvalho Guerra agradeço a orientação pedagógica e científica ao longo da minha carreira como docente do departamento de Bioquímica da Faculdade de Farmácia, o apoio amigo e a manifesta confiança no meu trabalho. Quero ainda agradecer-lhe a possibilidade que me facultou de trabalhar com o Prof. Doutor Alexandre Quintanilha.

Ao Prof. Doutor Alexandre Quintanilha quero expressar um especial agradecimento, pela orientação e apoio científico, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho, e ainda a sua disponibilidade, a sua crítica e o constante incentivo e apoio amigo.

À Prof. Doutora Elisabeth Castro agradeço os ensinamentos e o gosto pelo estudo de temas na área das doenças cardiovasculares, sem esquecer a sua amizade e apoio desde o início da minha carreira.

À Prof. Doutora Natércia Teixeira, pela sua experiência e saber no estudo de proteínas, agradeço os ensinamentos que nessa área me soube transmitir. Quero também agradecer a sua amizade e apoio.

Ao Prof. Doutor Sena Esteves agradeço o apoio científico e pedagógico ao longo da minha carreira docente.

À Dra. Elsa Bronze da Rocha agradeço o seu apoio como amiga; como colega de Laboratório agradeço-lhe a sua constante disponibilidade para discussão dos trabalhos de docência e de investigação.

À Dra. Irene Rebelo, minha amiga e colega de Laboratório, e também minha colega no estudo de temas relacionados com *stress* oxidativo, agradeço a ajuda ao longo da preparação deste trabalho.

A todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica quero expressar o meu agradecimento por todo o tipo de ajuda e apoio. O meu agradecimento também para todos os meus colegas e amigos dos diversos Laboratórios da Faculdade de Farmácia. Aqui, um particular agradecimento aos colegas do Laboratório de Bacteriologia.

Quero ainda agradecer à D. Amélia Sousa, à D. Emília Madureira e ao senhor Alípio Almeida, funcionários do Laboratório de Bioquímica, o apoio na preparação de material e reagentes para execução deste trabalho.

Ao Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, em especial à Dra. Laura Pereira e à Dra. Teresa Carvalho, a colaboração na colheita de amostras de sangue.

Ao Eng^o Rui Pinto do Serviço de Iconografia da Faculdade de Farmácia agradeço a

realização do trabalho fotográfico a apresentar.

À D. Margarida Oliveira quero agradecer além do seu trabalho de secretariado em apoio aos Projectos de Investigação nos quais este trabalho se insere, a sua disponibilidade e apoio, sempre que solicitados.

À Fundação Gomes Teixeira, à Universidade do Porto e à Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, agradeço o apoio financeiro concedido a este estudo.

Ao Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, ao Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto e ao Centro de Medicina Desportiva do Porto agradeço a disponibilidade de aparelhagem e de instalações.

Por último, um especial agradecimento ao meu marido e aos meus filhos Rodrigo e Miguel pelo seu amor, compreensão e apoio.

Este trabalho

foi realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, no Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto e no Centro de Medicina Desportiva do Porto.

teve o apoio financeiro da Fundação Gomes Teixeira, da Reitoria da Universidade do Porto e da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT), inserido na linha de investigação

Resumo

O eritrócito é uma célula particularmente sensível a agressões oxidativas e proteolíticas, por ter uma capacidade biossintética limitada que o impede de reparar ou substituir proteínas lesadas. Esta sensibilidade torna-o um modelo precioso de estudo em situações de agressão eritrocitária, nomeadamente de *stress* oxidativo e, quiçá, capaz de fornecer marcadores mais sensíveis que os tradicionais, em determinadas patologias e situações ditas fisiológicas, associadas com o desenvolvimento de *stress* oxidativo, como é o caso das doenças cardiovasculares (DCV) e do exercício físico, respectivamente.

Afigurou-se importante a associação do estudo hematológico básico com o estudo da membrana eritrocitária, em condições de *stress* fisiológico, como o exercício físico, e de *stress* patológico, como as DCV. No estudo da membrana eritrocitária a proteína banda 3 mereceu especial atenção pela sua importância como tradutora de modificações intracelulares ou membranares de natureza senescente ou de lesão oxidativa. O exercício físico e as DCV, em particular o enfarte de miocárdio, associam o desenvolvimento de uma leucocitose neutrofilica. A procura e identificação de novos marcadores de *stress in vivo*, e a avaliação de uma provável relação entre modificações eritrocitárias e bioactivação de neutrófilos, constituíram o principal objectivo do presente estudo. Tendo em vista apoiar e esclarecer os resultados obtidos *in vivo*, foram elaborados alguns testes *in vitro*, nomeadamente o estudo da acção de serinoproteases como a quimiotripsina e a elastase do neutrófilo sobre o eritrócito; o estudo da acção de neutrófilos activados *in vitro* sobre o eritrócito; procedeu-se ainda ao estudo de modificações eritrocitárias em eritrócitos de diferentes densidades.

O estudo das modificações leucocitárias e eritrocitárias observadas no exercício físico e no doente em risco, revelou uma correlação negativa do número de neutrófilos com o número de eritrócitos e com a actividade da glucose-6-fosfato desidrogenase eritrocitária, e uma correlação positiva com o volume globular médio (VGM). De referir ainda que estas modificações se acentuam, nas amostras de doentes cardiovasculares, com o risco, definido pela avaliação dos factores de risco tradicionais. Estas correlações indiciam o envolvimento dos neutrófilos num processo de envelhecimento eritrocitário acelerado, que provavelmente compromete a sobrevivência de eritrócitos mais velhos, que são particularmente sensíveis a um *stress* oxidativo e proteolítico.

O estudo do neoantigénio de senescência, a proteína banda 3 da membrana eritrocitária, mostrou nos doentes em risco um perfil perfeitamente distinto daquele

apresentado por uma população controlo. O exercício físico intenso de curta duração apresenta modificações mais ténues no perfil da banda 3. Todavia, o perfil da banda 3 antes do exercício físico numa amostragem de indivíduos constituída predominantemente por indivíduos que exercitam de uma forma regular e intensa, é muito próximo daquele apresentado pelos pacientes em risco.

Também a hemoglobina ligada à membrana (HbLM) aumenta significativamente nos grupos de risco e nos indivíduos que fazem exercício físico regular e intenso, relativamente ao controlo.

Do estudo do *stress* imposto por um exercício físico intenso de curta duração e de um *stress* contínuo (como o que ocorre nos doentes em risco e nos indivíduos que exercitam regularmente), parece-nos razoável afirmar que o *stress* imposto por um exercício físico intenso de curta duração determina lesões oxidativas ténues que, todavia, se acumulam e são evidentes no perfil da banda 3 dos indivíduos que exercitam regularmente. Da mesma forma, os doentes em risco sofrem um *stress* oxidativo contínuo, também evidente no perfil da banda 3.

Embora conhecendo o risco de extrapolar os resultados obtidos *in vitro* para o que ocorre *in vivo*, poderá dizer-se que os neutrófilos estão envolvidos na resposta e no desenvolvimento de *stress* oxidativo e proteolítico, determinante de lesões oxidativas e proteolíticas cumulativas nos eritrócitos. A extensão destas lesões será provavelmente modulada pela actividade dos mecanismos de defesa antioxidante e pela acção de antiproteases e outros produtos de bioactivação de células inflamatórias.

Um estudo mais amplo destes potenciais marcadores clínicos de risco, quiçá mais sensíveis e mais precoces que os tradicionais, é sobremaneira importante se considerarmos que as DCV representam a primeira causa de morte em Portugal e que os factores de risco tradicionais permitem prever apenas um terço dos eventos cardiovasculares. Acresce que no controlo analítico dos doentes é importante atentar em modificações no valor de leucócitos e em particular de neutrófilos, paralelas a uma redução no valor de eritrócitos e a um aumento do VGM.

Em conformidade com os resultados, o eritrócito constitui um bom modelo de estudo de *stress in vivo* e possui marcadores sensíveis a esse *stress*, como a proteína banda 3 e a HbLM, capazes de fornecer informação cumulativa sobre as lesões sofridas pela célula ao longo da sua vida.

Abstract

The erythrocyte presents a particular sensitivity to oxidative and proteolytic *stress*. Its limited biosynthetic capacity precludes the repair or replacement of damaged proteins. This sensitivity makes the erythrocyte a precious model for the study of oxidative *stress*; this cell may provide markers of this type of *stress*, which may be useful and more sensitive than the traditional markers used for some pathologies and physiologic conditions, such as cardiovascular diseases (CVD) and physical exercise, respectively.

Therefore, it seemed to carry out a basic hematologic study together with an erythrocyte membrane study in conditions associated with the development of oxidative *stress*, like CVD and physical exercise. In the erythrocyte membrane study special attention was given to protein band 3, on account of its importance as an index of intracellular or membrane modifications of senescence or of oxidative *stress*. Both CVD and physical exercise were associated with a rise in leukocytes, namely neutrophils. The aim of this study was to identify erythrocyte markers of *stress in vivo* and to draw a possible correlation between erythrocyte modification and neutrophil activation. We also present some *in vitro* studies designed to support and clarify the *in vivo* studies, including (1) the action of serine proteases, like chymotrypsin and neutrophil elastase, upon erythrocytes; (2) the action of activated neutrophils upon erythrocytes; (3) the study of erythrocyte modifications as a function of cell density.

In both CVD and physical exercise a negative correlation was found between total neutrophils and both total erythrocytes and erythrocyte G6PD activity, while a positive correlation was found with mean cell volume (MCV). These erythrocyte and leukocyte modifications are more pronounced when the risk of CVD increases, according to traditional risk factors. These correlations suggest the involvement of neutrophils with erythrocyte damage and premature senescence, compromising the erythrocyte survival, namely the senescent cells, which are particularly sensitive to oxidative and proteolytic *stress*.

The study of the senescence neoantigen, the erythrocyte membrane protein band 3, showed in patients at risk of CVD a perfectly different profile as compared to a control group. A short bout of intense physical exercise imposed only a slight modification in the band 3 profile. However, in a group of individuals on strenuous and regular physical exercise this profile was similar to that presented by patients at risk of CVD.

Both patients at risk of CVD and individuals on strenuous and regular physical

exercise presented a significant rise in membrane bound hemoglobin (MBH) as compared to controls.

According to the modifications observed as a result of the *stress* imposed by strenuous brief periods of physical exercise and to the modifications imposed by continuous *stress* (as in patients at risk of CVD and in individuals on strenuous and regular physical exercise), it seems reasonable to assume that although the oxidative modifications imposed by a strenuous brief physical exercise are slight, they are nevertheless cumulative as evidenced by the band 3 profile presented by individuals on strenuous and regular physical exercise. In the same way, patients at risk of CVD, suffering continuous *stress* present a similar band 3 profile.

Although aware of the risk of extrapolating *in vitro* studies to *in vivo* events, we may assume that neutrophils are involved in the development and response to oxidative and proteolytic *stress*, causing cumulative oxidative and proteolytic lesions upon erythrocytes. The extension of those lesions is probably modulated by the activity of the antioxidant defense mechanisms and by the action of proteases and other products of inflammatory cells activation.

A wider study of these new potential clinical markers of risk, more sensitive and premature than the traditional ones, becomes specially important, considering that CVD events are the main cause of death in Portugal, and only about one third of those events are predicted by the traditional risk factors. Also, in the analytical control of patients at risk more attention must be given to leukocyte rises, namely due to neutrophils, along with a reduction in erythrocyte concentration and a rise in MCV.

As suggested by the results, the erythrocyte represents a good model for the study of *stress in vivo*, providing sensitive markers, like band 3 protein and MBH, which are able to give cumulative knowledge of the *stress* imposed to the cell along its life span.

Résumé

Les globules rouges (GR) sont des cellules particulièrement sensibles aux agressions oxydatives et protéolitiques. Ils sont incapables de biosynthétiser des protéines pour substituer ou réparer les protéines lésées. À cause de cette sensibilité, le GR devient un précieux modèle pour l'étude des situations d'agression érythrocytaire, comme dans le cadre du stress oxydatif. Probablement, il sera capable de fournir des indicateurs plus sensibles que les traditionnelles, dans le cas de certaines pathologies et de quelques situations physiologiques, comme les maladies cardiovasculaires (MCV) et l'exercice physique, respectivement.

Alors, il nous semble important de faire une association entre l'étude hématologique basique et l'étude de la membrane érythrocytaire, sous différentes conditions de stress physiologique et pathologique - l'exercice physique et les MCV. Dans l'étude de la membrane érythrocytaire, on a consacré à la protéine bande 3 une attention spéciale, vu sa importance comme traducteur des modifications intracellulaires ou membranaires. Ces modifications peuvent être d'origine sénescence ou oxydatif. Les MCV et l'exercice physique conduisent à la polynucléose neutrophile. L'objectif de cet étude c'est d'identifier indicateurs de *stress in vivo* dans le GR et d'étudier la probable liaison entre les modifications érythrocytaires et la bioactivation des neutrophiles. Pour comprendre et clarifier les résultats obtenus *in vivo*, nous avons inclu dans ce travail des tests *in vitro*, notamment (1) l'étude de l'action de serine protéases, comme chymotrypsine et élastase du neutrophile, sur le GR; (2) l'étude de l'action de neutrophiles activés *in vitro*, sur le GR et (3) l'étude des modifications érythrocytaires en GR de différentes densités.

L'étude des modifications leucocytaires et érythrocytaires dans l'exercice physique et dans les MCV, a montré une corrélation négative entre la concentration de neutrophiles soit avec la concentration de GR, soit avec l'activité de la glucose-6-phosphate désidrogenase érythrocytaire; et une corrélation positive avec le volume globulaire moyen (VGM). Ces modifications augmentent avec le risque cardiovasculaire, défini par l'évaluation des facteurs de risque traditionnels. Ces corrélations peuvent être indicatives du rôle des neutrophiles dans un processus de vieillissement érythrocytaire accéléré, lequel peut déclencher l'enlèvement des GR plus âgés, qui sont particulièrement sensibles au stress oxydatif et protéolitique.

L'observation du profil du neoantigène de sénescence, la protéine bande 3 de la membrane érythrocytaire, démontre que les malades en risque ont un profil tout à fait

différent de celui présenté par un contrôle. L'exercice physique intense et de courte durée présente des modifications plus faibles dans le profil de la bande 3. Dans les échantillons provenant d'individus qui font l'exercice physique intense et régulièrement, on a trouvé déjà un profil de bande 3 qui ressemble celui des malades en risque.

L'hémoglobine liée à la membrane (HLM) augmente significativement dans les groupes de risque et dans les individus qui font l'exercice physique intense et régulièrement, quand on compare avec un contrôle.

Par rapport à l'étude du stress développé en résultat de l'exercice physique intense et de courte durée et de l'étude du stress continu (ceux des malades en risque et de les individus qui font l'exercice physique intense et régulièrement), on peut dire que, malgré les faibles modifications développées en résultat de l'exercice physique intense et de courte durée, ces modifications vont s'accumuler et sont bien évidentes dans le profil de la protéine bande 3, dans les individus qui font l'exercice physique intense et régulièrement. De la même façon les malades en risque souffrent un stress oxydatif continu, aussi bien évident dans le respectif profil de la protéine bande 3.

Même connaissant le risque d'extrapoler les résultats obtenus *in vitro* pour ce que se vérifie *in vivo*, on pourra dire que les neutrophiles jouent un rôle dans la réponse et dans le développement du stress oxydatif et protéolytique, déterminant des lésions oxydatives et protéolytiques cumulatives dans les GR. L'extension de ces lésions sera probablement modulée par l'activité des mécanismes de défense antioxydant et par l'action de antiprotéases et à des autres produits de la bioactivation des cellules inflammatoires.

Un ample étude de ces potentiels indicateurs cliniques de risque, probablement plus sensibles et plus précoces que les indicateurs traditionnelles, devient plus important si on considère que les MCD représentent la première cause de mort au Portugal et que les facteurs traditionnelles de risque ne permet que prévoir seulement un tiers de les complications cardiovasculaires. On doit rajouter que dans le contrôle analytique des malades cardiovasculaires, il est important de remarquer les modifications dans la concentration des leucocytes et en particulier des neutrophiles, à côté d'une réduction dans la concentration des GR et à une augmentation du VGM.

Le GR constitue, donc un bon modèle pour l'étude du stress *in vivo*, vu qu'il a des indicateurs sensible à ce stress, comme la protéine bande 3 et la HLM, que sont capables de donner des informations cumulatives sur le stress imposé au GR le long de sa vie.

Declaração

Ao abrigo do Artigo 8º, nº 2, do Decreto-Lei nº 388/70, se declara que nesta dissertação se apresentam resultados usados nas publicações que a seguir se referem. Mais se declara que a autora desta dissertação colaborou na elaboração dos projectos de trabalho e sua execução laboratorial, na interpretação dos resultados e redacção das referidas publicações, sob o nome de **Alice Santos Silva**.

Comunicações:

- Poster "Rastreo e diagnóstico da deficiência em G6PD. Estudo da actividade eritrocitária e estabelecimento de valores de referência, estudo do comportamento electroforético e estudo citoquímico" - **Santos Silva, A.**, Guerra, F. C., Ribeiro, M. M., Teixeira, N. - apresentado no "Simpósio sobre Talasso-drepanocitose - Patologia da Membrana Eritrocitária - Deficiência em G6PD", que se realizou no Algarve, em Fevereiro de 1991.

- Comunicação "Perfil Lipídico, alfa-Tocoferol e Neutrofilia" - Castro, E. M. B., **Santos Silva, A.**, Quintanilha, A. - proferida no "I Congresso da Sociedade Portuguesa de Aterosclerose" realizado em Lisboa, em Novembro de 1993.

- Poster "A Neutrofilia na Lesão Tecidual e Alterações Eritrocitárias Associadas" - **Santos Silva, A.**, Castro, E. M. B., Quintanilha, A. - apresentado no "9º Congresso Nacional de Bioquímica" que decorreu no Algarve, em Dezembro de 1993.

- Comunicação "Blood markers of oxidative stress during exercise in humans"- **Santos Silva, A.**, Rebelo, I., Cunha e Silva, P., Quintanilha, A. - proferida no "VIII Meeting European Association for Red Cell Research" que decorreu em Outubro de 1994, na Curia.

- Poster "Perfil da Proteína Banda 3 da Membrana Eritrocitária como Potencial Marcador de Risco de Doenças Cardiovasculares" - **Santos Silva, A.**, Castro, E. M. B., Teixeira, N. A., Guerra, F. C., Quintanilha, A. - apresentado no "V Congresso da

Sociedade Portuguesa de Aterosclerose", que decorreu no Funchal, em Fevereiro de 1995.

Publicações:

- "Deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Estabelecimento de valores de referência da sua actividade no eritrócito. Estudo de dois hemizigotos." - **Santos Silva, A.**, Guerra, F. C., Ribeiro, M. M., Teixeira, N. - Revista Portuguesa de Farmácia 39 : 84, (1989)

- "Altered erythrocyte membrane band 3 profile provides a useful marker in patients known to be at risk of Cardiovascular Diseases" - **Santos Silva A.**, Castro, E. M. B., Teixeira, N. A., Guerra, F. C., Quintanilha, A.; Atherosclerosis 116 : 199, 1995.

- "Blood markers of oxidative stress during exercise in humans"- **Santos Silva A.**, Rebelo, I., Cunha e Silva, P., Quintanilha, A. - submetido para publicação na revista International Journal of Sports Medecine.

Abreviaturas

A	em repouso, antes do exercício físico
AgEPM	agregados de elevado peso molecular
Apo A1	apolipoproteína A1
Apo B	apolipoproteína B
ATP	adenosina trifosfato
CHGM	concentração de hemoglobina globular média
Col	colesterol
D	após exercício físico
DCV	doenças cardiovasculares
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
DTT	ditioteitrol
EDTA	ácido etilenodiaminatetracético
EMA	enfarte de miocárdio antigo, com mais de três meses
GB	glóbulo branco
GLG	grande linfócito granular
G6PD	glucose-6-fosfato desidrogenase
GSH/GSSG	glutação reduzido/oxidado
GV	glóbulo vermelho
1h	uma hora após o termo do exercício físico
Hb	hemoglobina
HbLM	hemoglobina ligada à membrana
HBSS	"Hanks balanced salt solution"
HDL	lipoproteínas de alta densidade
HDLc	colesterol das lipoproteínas de alta densidade
HGM	hemoglobina globular média
HMF	via das hexoses monofosfato
Ht	hematócrito
HT	com hipertensão
IgG	imunoglobulina do tipo G
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
LDLc	colesterol das lipoproteínas de baixa densidade

Linf.	linfócito
MDA	malonildialdeído
Monoc.	monócito
NAD/NADH	nicotinamida adenina dinucleotido oxidado/reduzido
NADP/NADPH	nicotinamida adenina dinucleotido fosfato oxidado/reduzido
Neut.	neutrófilo
NK	linfócitos tipo "natural killer"
NT	grupo de indivíduos não treinados
PAF	factor activador das plaquetas
PBS	solução tampão de fosfatos
pEMR	pós enfarte de miocárdio recente, com menos de 48 h
PMA	forbol miristato acetato
PMN	polimorfonucleares
PSA	persulfato de amónio
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida e SDS
T	grupo de indivíduos treinados
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
TG	triglicerídeos
TNF	factor de necrose tumoral
VGM	volume globular médio

Índice Geral

Preâmbulo

O eritrócito como indicador de <i>stress in vivo</i> , no exercício físico e nas doenças cardiovasculares	1
---	---

Capítulo I

O Eritrócito Maduro Circulante 5

1. Fisiologia do eritrócito 7

1.1. O eritrócito maduro 7

1.2. Forma do eritrócito 8

1.3. Função e metabolismo energético 9

1.4. Resposta ao *stress* oxidativo fisiológico 13

1.5. Transferências transmembranares 17

1.6. Estrutura e função da membrana 19

2. Senescência do eritrócito 33

2.1. Longevidade e senescência do eritrócito 33

2.2. Modificações na célula senescente 37

2.2.1. Disfunção metabólica do eritrócito senescente 37

2.2.1.1. Variações na glicólise pela via de Embden-Meyerhof (EM) 37

2.2.1.2. Variações na glicólise pela via das Hexoses Monofosfato (HMF) 39

2.2.2. Modificações na membrana eritrocitária 41

2.2.2.1. Por depleção metabólica do eritrócito senescente 42

2.2.2.2. Por lesão oxidativa 43

2.2.2.2.1. Por lesão oxidativa da banda 3 48

2.2.2.3. Por proteólise 49

2.2.3. Variações nas propriedades físicas 51

2.2.4. Por ligação de auto-anticorpos	54
2.2.4.1. A relação do neoantigénio de senescência com a banda 3	55
2.2.4.2. Identificação dos determinantes antigénicos da proteína banda 3	55
2.2.4.3. Exposição do neoantigénio e ligação dos auto-anticorpos	56
2.2.4.4. A agregação de banda 3 expõe o neoantigénio de senescência	57
2.2.4.4. 1. Desnaturação da hemoglobina causa agregação da banda 3	57
2.2.4.4. 2. Agregados de banda 3 ligam anticorpos autólogos do tipo IgG	58
2.2.4.5. A ligação de IgG autóloga promove a deposição de complemento	59
3. Remoção do eritrócito senescente	60
3.1. O auto-anticorpo natural anti-banda 3	61
3.1.1. Concentração e afinidade do auto-anticorpo anti-banda 3	62
3.1.2. A ligação bivalente do auto-anticorpo fortalece a ligação ao antígeno	62
3.1.3. Anticorpos anti-banda 3 estimulam a deposição de complemento (C3b) pela via alternativa	63

Capítulo II

O <i>Stress</i> Oxidativo	67
1. A importância do oxigénio	68
1.1. Origem e reactividade dos radicais livres de oxigénio	68
1.2. Antioxidantes fisiológicos	70
2. A importância dos mediadores de activação leucocitária	72
3. O <i>stress</i> oxidativo “não fisiológico” no eritrócito	75
3.1. <i>Stress</i> oxidativo de origem intracorpúscular	75
3.2. <i>Stress</i> oxidativo de origem extracorpúscular	75
4. O <i>stress</i> oxidativo no exercício físico	79
5. O <i>stress</i> oxidativo nas doenças cardiovasculares	84

Capítulo III

Objectivos e Plano de Trabalho	89
Objectivos e plano de trabalho	90

Capítulo IV

O <i>stress</i> oxidativo fisiológico imposto pelo exercício físico	93
--	----

1. Material e métodos aplicados ao estudo do <i>stress</i> oxidativo fisiológico, imposto pelo exercício físico	95
1.1. População estudada	95
1.2. Actividade física desenvolvida	95
1.3. Análises sanguíneas executadas	95
1.3.1. Hemograma	96
1.3.2. Fraccionamento eritrocitário em gradiente de densidade descontínuo	96
1.3.2.1. Isolamento dos eritrócitos	96
1.3.2.2. Preparação do gradiente de densidade descontínuo e obtenção das fracções eritrocitárias	97
1.3.3. Determinação da actividade enzimática da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) eritrocitária	97
1.3.4. Análise electroforética da G6PD eritrocitária por focagem isoeléctrica	99
1.3.5. Avaliação da percentagem de hemoglobina ligada à membrana eritrocitária (% HbLM)	100
1.3.5.1. Isolamento de eritrócitos	100
1.3.5.2. Preparação das membranas eritrocitárias	101
1.3.5.3. Determinação da concentração proteica da suspensão de membranas eritrocitárias	101

1.3.5.4. Determinação da % HbLM	102
1.3.6. Estudo electroforético do perfil proteico da membrana eritrocitária	102
1.3.6.1. Preparação da amostra	102
1.3.6.2. Electroforese em gel descontínuo de poli-acrilamida (sistema de Laemmli), na presença de SDS (SDS-PAGE)	103
1.3.6.3. Revelação do gel	106
1.3.6.3.1. Coloração pelo azul de Coomassie	106
1.3.6.3.2. Coloração pela prata	107
1.3.6.4. Secagem do gel	107
1.3.7. Estudo do perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária por "Western Blotting"	108
1.3.7.1. Electroforese em SDS-PAGE	108
1.3.7.2. Transferência de proteínas	108
1.3.7.3. Incubação com os anticorpos	109
1.3.7.4. Revelação	110
1.3.7.5. Quantificação por densitometria	111
1.3.8. "Western blotting" para estudo da lactoferrina no lisado de polimorfonucleares (PMN)	111
1.3.8.1. Isolamento e preparação dos PMN	111
1.3.8.2. Preparação das amostras para electroforese do tipo SDS-PAGE	112
1.3.8.3. Electroforese por SDS-PAGE e transferência de proteínas	112
1.3.8.4. Detecção imunológica e revelação da lactoferrina	113
2. Resultados	114
2.1. Hemograma	114
2.1.1. Modificações impostas pelo exercício físico na amostra total	114
2.1.2. Modificações impostas pelo exercício físico no subgrupo não treinado	115
2.1.3. Modificações impostas pelo exercício físico no subgrupo treinado	118
2.1.4. Estudo comparativo entre treinados e não treinados antes e depois do exercício físico	118
2.1.5. Modificações impostas pelo exercício físico e sua recuperação 1 hora após o seu termo	122
2.2. Estudo da actividade enzimática da G6PD eritrocitária no hemolisado total e em fracções eritrocitárias de diferente densidade	124

2.3. Análise electroforética da G6PD eritrocitária por focagem isoeléctrica	126
2.4. Avaliação da percentagem de hemoglobina ligada à membrana eritrocitária	126
2.5. Estudo electroforético do perfil proteico da membrana eritrocitária	126
2.6. Estudo do perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária	128
2.7. Estudo da lactoferrina no lisado de PMN	131
3. Discussão dos resultados	133
3.1. Nota final de discussão	140

Capítulo V

O *stress* oxidativo patológico nas doenças cardiovasculares

1. Material e métodos aplicados ao estudo do <i>stress</i> oxidativo patológico em pacientes em risco de DCV	143
1.1. População estudada	143
1.2. Análises sanguíneas executadas	143
1.2.1. Análises hematológicas	143
1.2.1.1. “Western blotting” para avaliação de IgG’s ligadas à membrana eritrocitária	144
1.2.1.1.1. Incubação com o anticorpo	144
1.2.2. Análises bioquímicas para definição do perfil lipídico	146
2. Resultados	148
2.1. Hemograma	148
2.2. Estudo da actividade enzimática da G6PD eritrocitária	150
2.3. Avaliação da %HbLM	150
2.4. Estudo do perfil proteico da membrana eritrocitária	153
2.5. Estudo do perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária	154
2.6. “Western blotting” para avaliação de IgG’s ligadas à membrana eritrocitária	156
2.7. Avaliação do perfil lipídico	158

3. Discussão dos resultados	159
3.1. Nota final de discussão	162

Capítulo VI

Estudos <i>in vitro</i>	164
1. Material e métodos	166
1.1. Estudo <i>in vitro</i> do perfil da banda 3 em fracções eritrocitárias de densidade crescente	166
1.2. Estudo <i>in vitro</i> da interacção de PMN activados com eritrócitos, e seu impacto sobre a proteína banda 3 da membrana eritrocitária	167
1.3. Estudo <i>in vitro</i> da interacção das serinoproteases quimiotripsina e elastase neutrofílica com os eritrócitos e com a proteína banda 3 da membrana eritrocitária	168
2. Resultados e discussão	170
2.1. Perfil da banda 3 em fracções eritrocitárias de densidade crescente	170
2.2. Interacção de PMN activados com eritrócitos	173
2.3. Interacção das serinoproteases quimiotripsina e elastase neutrofílica, com os eritrócitos e com a proteína banda 3 da membrana eritrocitária	176
3. Nota final de discussão	177

Capítulo VII

Considerações finais	183
Considerações finais	184

Capítulo VIII

Bibliografía	190
Bibliografía	191

Preâmbulo

Preâmbulo

O eritrócito como indicador de stress, in vivo no exercício físico e nas doenças cardiovasculares

Em condições fisiológicas normais o eritrócito maduro é uma célula com um período de vida de aproximadamente 120 dias. É, todavia, uma célula com uma capacidade biossintética limitada, que sofre e acumula agressões físicas e químicas, as quais sendo intensas e prolongadas determinam uma aceleração do processo de envelhecimento e, por consequência, a remoção prematura da célula.

Da revisão do processo de senescência e remoção eritrocitária, bem como de patologias eritrocitárias acompanhadas de envelhecimento acelerado, torna-se evidente a importância da redução da capacidade de defesa anti-oxidante e das modificações oxidativas nos constituintes citoplasmáticos e da membrana eritrocitária na determinação da longevidade da célula. Na membrana eritrocitária, a proteína banda 3 ganha uma importância relevante como tradutora de modificações intracelulares ou membranares de natureza senescente ou de lesão oxidativa. A lipoperoxidação da membrana eritrocitária, tão estudada na lesão oxidativa, revelou-se um marcador menos sensível e também de desenvolvimento mais tardio que a oxidação de proteínas.

O eritrócito, pelas suas características únicas e a sua sensibilidade ao stress oxidativo, é um modelo precioso de estudo em situações de agressão eritrocitária, nomeadamente de stress oxidativo e, quiçá, capaz de fornecer marcadores mais sensíveis que os tradicionais, em determinadas patologias associadas com o desenvolvimento de stress oxidativo, como é o caso das doenças cardiovasculares.

Afigura-se-nos pois importante a associação do estudo hematológico básico com o estudo da membrana eritrocitária, em particular o estudo da proteína banda 3, em condições fisiológicas e em condições de stress oxidativo fisiológico e patológico. Escolhemos o exercício físico e a aterosclerose como modelos de stress oxidativo fisiológico e patológico, respectivamente.

As doenças cardiovasculares constituem um tema de extraordinária actualidade e importância, não só por representarem a primeira causa de morte em Portugal, mas também porque os marcadores de risco tradicionais permitem prever apenas um terço dos eventos cardiovasculares.

O exercício físico e as doenças cardiovasculares, em particular o enfarte de

miocárdio, apresentam ainda em comum o desenvolvimento de uma leucocitose neutrofílica, pelo que, para além da procura de novos marcadores de stress fisiológico e de risco de doença cardiovascular, considerámos a provável relação entre modificações eritrocitárias e bioactivação de neutrófilos.

Uma vez que o tema deste trabalho focará primordialmente modificações eritrocitárias, iniciaremos a exposição do trabalho com uma revisão da fisiopatologia do eritrócito, do processo de senescência e de remoção eritrocitária, seguindo-se uma breve revisão sobre o desenvolvimento e a importância do stress oxidativo nos diferentes modelos propostos.

Capítulo I

Capítulo I

O Eritrócito Maduro Circulante	5
1. Fisiologia do eritrócito	7
1.1. O eritrócito maduro	7
1.2. Forma do eritrócito	8
1.3. Função e metabolismo energético	9
1.4. Resposta ao <i>stress</i> oxidativo fisiológico	13
1.5. Transferências transmembranares	17
1.6. Estrutura e função da membrana	19
2. Senescência do eritrócito	33
2.1. Longevidade e senescência do eritrócito	33
2.2. Modificações na célula senescente	37
2.2.1. Disfunção metabólica do eritrócito senescente	37
2.2.1.1. Variações na glicólise pela via de Embden-Meyerhof (EM)	37
2.2.1.2. Variações na glicólise pela via das Hexoses Monofosfato (HMF)	39
2.2.2. Modificações na membrana eritrocitária	41
2.2.2.1. Por depleção metabólica do eritrócito senescente	42
2.2.2.2. Por lesão oxidativa	43
2.2.2.2.1. Por lesão oxidativa da banda 3	48
2.2.2.3. Por proteólise	49
2.2.3. Variações nas propriedades físicas	51
2.2.4. Por ligação de auto-anticorpos	54
2.2.4.1. A relação do neoantigénio de senescência com a banda 3	55
2.2.4.2. Identificação dos determinantes antigénicos da proteína banda 3	55
2.2.4.3. Exposição do neoantigénio e ligação dos auto-anticorpos	56
2.2.4.4. A agregação de banda 3 expõe o neoantigénio de senescência	57
2.2.4.4. 1. Desnaturação da hemoglobina causa agregação da banda 3	57
2.2.4.4. 2. Agregados de banda 3 ligam anticorpos autólogos do tipo IgG	58
2.2.4.5. A ligação de IgG autóloga promove a deposição de complemento	59

3. Remoção do eritrócito senescente	60
3.1. O auto-anticorpo natural anti-banda 3	61
3.1.1. Concentração e afinidade do auto-anticorpo anti-banda 3	62
3.1.2. A ligação bivalente do auto-anticorpo fortalece a ligação ao antigénio	62
3.1.3. Anticorpos anti-banda 3 estimulam a deposição de complemento (C3b) pela via alternativa	63

I - O eritrócito maduro circulante.

1. - Fisiologia do eritrócito.

1.1. - O eritrócito maduro.

O eritrócito normal em repouso apresenta a forma de disco bicôncavo com um diâmetro de 7,5 a 8,7 μm , que se reduz ligeiramente por senescência, um volume médio de 90 fentolitros e uma área de superfície de 136 μm^2 . A relação superfície/volume permite ao eritrócito quer transformar-se num esferócito de 150 fl sem sofrer hemólise, quer atravessar capilares com um diâmetro até 2,8 μm , de valor muito inferior ao seu próprio diâmetro.

O eritrócito maduro é uma célula estruturalmente diferente das outras células do organismo. É uma célula anucleada, com um citoplasma sem organelas e, portanto, de capacidade biossintética limitada. O citoplasma apresenta uma composição perfeitamente distinta da do plasma, no qual circula. É uma solução aquosa de electrólitos e proteínas, das quais a hemoglobina representa cerca de 95%. A relação entre as concentrações catiónicas do plasma e do eritrócito é inversa, sendo a concentração do ião K^+ superior no eritrócito e a dos iões Ca^{++} e Na^+ inferior no eritrócito. A hemoglobina a pH fisiológico comporta-se como um anião e a sua presença explica o teor em Cl^- e em iões HCO_3^- mais baixos no eritrócito que no plasma. A elevada concentração de hemoglobina determina uma pressão oncótica tal, que permite manter a concentração dos catiões baixa, relativamente ao plasma, e evitar a entrada de água e a lise osmótica do eritrócito.

O estado metabólico do eritrócito, a sua composição, a sua idade, e os diversos factores que condicionam o ambiente exterior em que a célula circula, são alguns dos múltiplos factores que determinam a forma do eritrócito na circulação sanguínea.

O eritrócito circula através de vasos sanguíneos de diferentes diâmetros e em diferentes condições de fluxo, passando grande parte da sua vida nos vasos capilares da microcirculação. Durante 100 a 120 dias o eritrócito percorre aproximadamente 250 Km para depois ser removido pelas células do sistema fagocitário. Nos capilares, a capacidade de deformabilidade do eritrócito constitui um factor reológico importante para a viscosidade e fluxo sanguíneo. Em zonas de fluxo sanguíneo lento os eritrócitos tomam formas irregulares, circulando em agregados de duas ou mais células; por vezes formam "rouleaux" nas zonas de fluxo ainda mais lento. A nível dos grandes vasos a agregação

rompe-se devido ao aumento do fluxo sanguíneo e das forças de atrito.

A viabilidade e capacidade de deformabilidade do eritrócito são, em conjunto com o meio ambiente em que a célula circula, importantes para a longevidade do eritrócito.

1.2. - *Forma do eritrócito.*

O eritrócito humano normal tem a forma de disco bicôncavo. Determinadas eritropatias são, todavia, acompanhadas de alteração de forma da célula. As múltiplas formas que o eritrócito pode tomar estão descritas e definidas segundo uma nomenclatura internacional (Bull *et al.*, 1991; Wintrobe *et al.*, 1993). Algumas destas formas podem criar-se experimentalmente por modificação da força iónica do meio, depleção metabólica e por acção de químicos ou fármacos, sendo todavia controversos os parâmetros físicos ou químicos envolvidos. A forma da célula é determinada pela membrana e esta depende do metabolismo eritrocitário e do meio ambiente extracelular. O citosqueleto proteico parece ter um papel primordial na forma da célula como o evidencia a obtenção de "ghosts" com a forma nativa da célula, após isolamento e extracção de lípidos e proteínas transmembranares. Também no caso de anomalias hereditárias das proteínas do citosqueleto se observam formas eritrocitárias anormais estáveis. É o caso de alterações na espectrina, anquirina, banda 4.1, banda 3, associadas a esferocitose, eliptocitose e piropoiquilocitose.

Todavia, tendo em consideração a existência de interacções moleculares entre as proteínas do citosqueleto e destas com as proteínas transmembranares e com a bicamada lipídica, a alteração em qualquer um dos constituintes da membrana terá provavelmente repercussão nos outros constituintes e, finalmente, na forma da célula (Boivin, 1994).

Há alterações na forma do eritrócito que podem ter origem em modificações da bicamada lipídica. Estas são frequentemente reversíveis e resultam em equinócitos, acantócitos e estomatócitos. Os folhetos lipídicos, habitualmente adaptados um ao outro, podem todavia sofrer uma alteração de área de superfície. Quando o aumento absoluto ou relativo ocorre no folheto externo, formam-se espículos, dando origem a equinócitos ou acantócitos. Se tem lugar no folheto interno o eritrócito tomará a forma de estomatócito.

A reversibilidade das modificações na forma da célula confere ao eritrócito uma característica muito particular, a capacidade de deformabilidade, que é a propriedade de o eritrócito modificar reversivelmente a sua forma sob a influência de factores físicos internos ou externos. Esta propriedade deve-se ao excesso de superfície da membrana

para o volume da célula, à viscoelasticidade da membrana e à viscosidade interna, isto é, ao conteúdo aquoso da solução hemoglobínica.

A viscosidade interna depende da concentração e da estabilidade da hemoglobina. Quando a viscosidade interna é modificada, por formação de pseudo-cristais (Hb S) ou derivados de oxidação (corpos de Heinz), o aumento da viscosidade dependerá da relação área de superfície/volume e do bom funcionamento dos sistemas de transferência transmembranares da água e iões, os quais dependem dos constituintes da membrana neles envolvidos e ainda do metabolismo energético do eritrócito.

A relação área de superfície/volume raramente aumenta. O aumento da superfície com volume constante acontece quando há uma acumulação de colesterol, com múltiplas consequências bioquímicas sobre a estrutura e função da membrana. A diminuição do volume com área de superfície constante é acompanhada de retracção da membrana e formação de acantócitos. Traduz uma desidratação celular que pode ser consequência de perda de água e de catiões por disfunção dos sistemas de transporte transmembranares, primário ou secundário a uma alteração metabólica intraeritrocitária determinada pelo ambiente plasmático. A desidratação acompanha-se de um aumento na concentração da hemoglobina e por consequência da viscosidade interna.

O aumento de volume com superfície constante é acompanhado de intumescimento celular e, portanto, de uma esferocitose pré-hemolítica. A hiper-hidratação celular é frequentemente devida a um ambiente plasmático anormal, não compensado pelos mecanismos reguladores das transferências transmembranares.

A diminuição de superfície com volume constante deve-se à perda de fragmentos de membrana, que pode traduzir uma lesão molecular primitiva congénita da membrana, ou a acção de complexos anticorpos-complemento, de origem extracorpúscular. Também esta modificação será acompanhada de um aumento na viscosidade interna.

A forma e a capacidade de deformabilidade do eritrócito são fenómenos complexos e dependentes de múltiplos factores em interacção obrigatória um com os outros. Só esta complexidade explica as dificuldades encontradas na clínica para esclarecer as alterações de forma e deformabilidade eritrocitária e nelas intervir terapêuticamente.

1.3. - *Função e metabolismo energético.*

A principal função do eritrócito é o transporte de oxigénio dos pulmões para os tecidos, a qual é assegurada pela hemoglobina que constitui aproximadamente 95% da

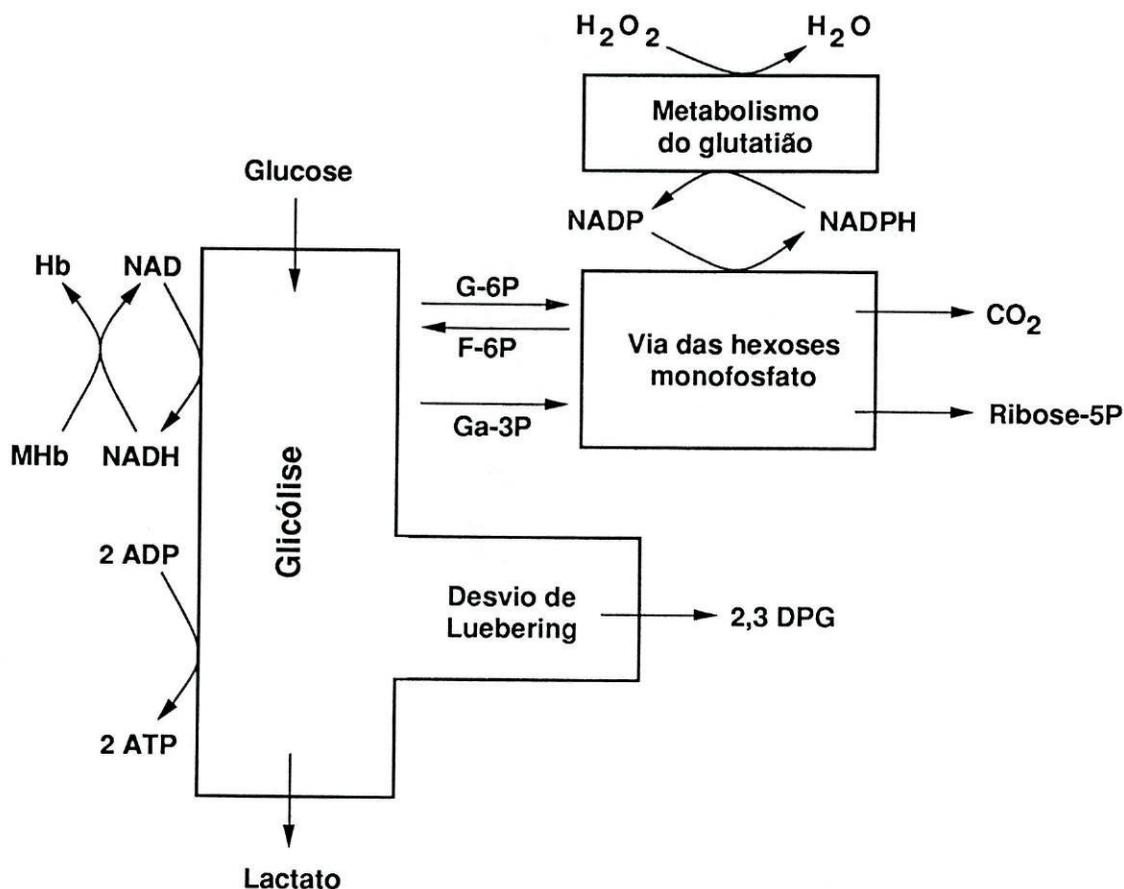


Fig. 1 - Metabolismo energético do eritrócito. Apresentam-se as diferentes vias metabólicas do eritrócito e os respectivos substratos e produtos de reação mais importantes.

Hb, hemoglobina; MhB, meta-hemoglobina; NAD, NADH, nicotinamida adenina dinucleótido; ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato; NADP, NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; G-6-P, glucose-6-fosfato; F-6-P, frutose-6-fosfato; Ga-3-P, gliceraldeído-3-fosfato; 2,3-DPG, 2,3-difosfoglicerato.

Adaptado de "The mature erythrocyte", Telen, M. J. em "Wintrobe's Clinical Hematology", Ed. Lee, G. R. *et al.*, Lea & Febiger (1993).

composição citoplasmática; facilita ainda o retorno de dióxido de carbono dos tecidos, para eliminação nos pulmões.

O metabolismo eritrocitário é dirigido essencialmente no sentido da manutenção da hemoglobina no seu estado funcional reduzido. Para produção de energia utiliza iões fosfato e glucose de origem plasmática (Beutler, 1984a). Embora a célula tenha capacidade para utilizar substratos análogos à glucose como a adenosina, inosina, frutose, manose, galactose, di-hidroxiacetona e lactato, só os utiliza em casos de depleção em glucose, como acontece por exemplo no caso de sangue armazenado. Os iões fosfato do plasma entram na célula por difusão simples através da membrana, enquanto a glucose utiliza um transportador de membrana, entrando por um mecanismo de transporte facilitado, independente da insulina.

São duas as vias metabólicas no eritrócito, a via anaeróbica, designada por via de Embden-Meyerhof, em que a glucose é catabolizada até à formação de piruvato ou ácido láctico, com fosforilação da adenosina-difosfato (ADP) a adenosina-trifosfato (ATP) e redução de nicotinamida-adenina-dinucleotido (NAD) a NADH (forma reduzida), e a via aeróbica, também designada por via das hexoses monofosfato (HMF). A glicólise anaeróbica é também designada por via metabólica principal, por representar cerca de 90% do metabolismo eritrocitário, enquanto que o shunt das hexoses se designa por via acessória, por representar apenas 10% daquele.

O ATP tem diversas e importantes funções no eritrócito. É necessário à fosforilação da glucose e da frutose-6-fosfato; é o substrato das ATPases reguladoras da transferência de catiões; intervém nas trocas de lípidos membranares; é inibidor da piruvato cínase e da fosfofruto cínase, intervindo, portanto, na regulação do ritmo da glicólise anaeróbica. É ainda importante para manter a forma da célula e para a síntese de compostos vitais para a célula, como o FAD, AMP (adenosina monofosfato) e GSH (glutatião reduzido). A capacidade de síntese destes compostos e ainda dos coenzimas NAD e NADH, é única no eritrócito, o qual é incapaz de síntese proteica e lipídica.

O NADH é necessário como coenzima da meta-hemoglobina redutase principal para a redução da hemoglobina oxidada (meta-hemoglobina) a hemoglobina reduzida, sendo neste caso o piruvato o produto final da glicólise e não o lactato.

A via de Embden-Meyerhof pode apresentar um desvio metabólico, designado por desvio de Rapoport-Luebering, com produção de 2,3-difosfoglicerato que, em conjunto com o ATP, regula a afinidade da hemoglobina para o oxigénio.

A via das hexoses monofosfato apesar de representar apenas 10% do metabolismo

eritrocitário constitui, todavia, uma importante via metabólica por ser a única fonte de NADP/NADPH na célula.

O NADPH tem um papel fundamental na economia e sobrevivência celular. Funciona como coenzima da meta-hemoglobina redutase acessória, que actua apenas em estados não fisiológicos, isto é, quando o teor de meta-hemoglobina sobe além do nível fisiológico e o funcionamento do sistema principal é insuficiente para o manter. Participa também como fonte energética na redução dos dissulfuretos mistos formados pela hemoglobina e glutatião reduzido, protegendo a hemoglobina de uma desnaturação progressiva (Srivastava *et al.*, 1970). Outra função é a de actuar como coenzima da glutatião redutase na redução do glutatião oxidado a glutatião reduzido, assim se efectivando a ligação da via das HMF ao metabolismo do glutatião.

O metabolismo do glutatião dependente do bom funcionamento da via das hexoses monofosfato, assegura a manutenção dos grupos sulfidril da célula na forma reduzida e promove a desintoxicação da célula em peróxido de hidrogénio ou outras formas activas de oxigénio e lipoperóxidos da membrana, na presença da glutatião peroxidase e do coenzima NADPH.

No eritrócito a maior parte do glutatião encontra-se na forma reduzida e desempenha um importante papel contra a acção oxidante de metabolitos de oxigénio e peróxidos, participando nos processos de desintoxicação da célula, daqueles produtos e, ainda, promovendo a produção de formas reduzidas de outros antioxidantes como o ácido ascórbico e o alfa-tocoferol (Meister, 1992). O ácido ascórbico parece também interagir com o peróxido de hidrogénio e outros radicais de oxigénio, todavia, a actividade peroxidásica do ácido ascórbico é ainda controversa (Meister, 1992).

O glutatião é um dos poucos compostos sintetizados pelo eritrócito. A sua síntese faz-se na presença de ATP e Mg^{++} e nela estão envolvidas duas enzimas, a glutamil cisteína sintetase e a glutatião sintetase. A sua forma oxidada (GSSG) é passível de reconversão à forma reduzida (GSH) ou ainda, caso haja acumulação da forma oxidada, de ser transportada para o exterior da célula. O transporte do GSSG para o exterior da célula faz-se por dois mecanismos, ambos dependentes do ATP, e que diferem essencialmente pelo seu valor de K_m e pelo facto de o mecanismo de transporte de K_m mais elevado funcionar apenas quando a produção de GSSG se elevar acima dos níveis fisiológicos (Akerboom *et al.*, 1992). O GSH é capaz de ligar-se a diversas drogas e xenobióticos, formando conjugados, na presença da glutatião S-transferase, que serão eliminados da célula por um mecanismo também dependente do ATP e que inibe por

competição o transporte de GSSG (Kondo *et al.*, 1982). Dada a semelhança dos mecanismos de transporte, cedo se pensou que o transporte de GSSG e dos respectivos conjugados pudesse ser efectuado pelo mesmo mecanismo (LaBelle *et al.*, 1986). Todavia, posteriormente verificou-se que existe um mecanismo de emergência para eliminação de GSSG, que funciona quando se forma GSSG em elevadas concentrações em situações de *stress* oxidativo, e um mecanismo de transporte, independente, para eliminação de conjugados de glutatião de origem exógena ou endógena, que podem formar-se por exposição tóxica a compostos electrofílicos (Sharma *et al.*, 1990).

Os processos metabólicos de extracção de energia a partir de um substrato, como a glucose, ou de substratos análogos e os processos de utilização dessa energia, são realizados por um extenso número de enzimas. Uma vez que a célula eritróide extrusa o seu núcleo antes de entrar na circulação sanguínea sob a forma de reticulócito, e perde o seu RNA nas primeiras 24 a 48 horas de circulação, passando então ao estado de eritrócito maduro, não tem capacidade para sintetizar novas moléculas de enzimas a fim de substituir aquelas que se alteram ao longo da vida da célula. As enzimas presentes no eritrócito maduro, são produzidas pelos precursores eritróides nucleados, na medula óssea, e uma pequena parte pelos reticulócitos.

O ritmo a que a glucose é catabolizada a piruvato ou ácido láctico, a que o potássio é bombeado para o interior da célula, a que a metahemoglobina e o glutatião oxidado são reduzidos, aliás, o ritmo de todos os processos metabólicos que têm lugar no eritrócito, dependem das propriedades das enzimas que catalizam cada uma das reacções, do número de moléculas de enzima presentes, da temperatura e ainda da concentração de substratos, cofactores, activadores, inibidores e iões hidrogénio presentes na célula.

1.4. - *Resposta ao stress oxidativo fisiológico.*

A via das Hexoses Monofosfato (HMF) desempenha um papel único no combate à oxidação de inúmeros componentes da célula e em particular da hemoglobina. O NADPH é essencial na desintoxicação de compostos oxidantes, nomeadamente produtos resultantes da redução de oxigénio molecular. A produção do NADPH é determinada pelos níveis de NADP na célula e regulada pela actividade da primeira enzima da via das HMF, a glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Em situações normais a produção é lenta e está relacionada com o ritmo de oxidação do glutatião. A estabilidade do NADPH e do GSH na presença de oxigénio molecular é de importância vital para o eritrócito, uma

vez que a sua função primordial é o transporte de oxigénio.

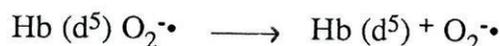
A presença de oxigénio molecular na célula constitui uma ameaça constante para a célula. O NADPH é um dos compostos mais vulneráveis à oxidação e a sua regeneração é fundamental para assegurar a protecção da hemoglobina e outros componentes celulares. Alterações ou deficiências na via das HMF, como acontece no caso de deficiência em G6PD ou ainda no caso de deficiência em glutatíon sintetase, comprometem a resposta antioxidante essencial à viabilidade do eritrócito.

A maioria das situações de *stress* oxidativo no eritrócito resultam da redução de oxigénio molecular e têm origem intrínseca (Fig. 2), isto é, resultam da acção de compostos com origem na própria célula e não em compostos estranhos à célula e que nela se introduziram.

Da ligação da desoxi-hemoglobina ao oxigénio resulta a formação de um anião superóxido. O ferro do grupo heme da desoxi-hemoglobina encontra-se no estado ferroso e apresenta 6 electrões na camada exterior (d), estando 4 deles desemparelhados. Quando o oxigénio se liga ao grupo heme, a molécula de oxigénio adquire ou partilha um desses electrões desemparelhados. Esta ligação converte momentaneamente o oxigénio num anião superóxido de ligação fraca. Na dissociação imediata observa-se habitualmente que aquele electrão retoma a posição original no átomo de ferro do grupo heme da hemoglobina e que o oxigénio se liberta na forma molecular (Jandl, 1987):



Todavia, por vezes esse electrão permanece associado ao oxigénio, resultando então meta-hemoglobina e superóxido, da dissociação:



A dissociação da hemoglobina do oxigénio, com produção de meta-hemoglobina representa apenas 0,1 a 0,5% do total. É a chamada meta-hemoglobina fisiológica.

A molécula de superóxido sofre dismutação espontânea, mediada e activada pela enzima superóxido dismutase (Lynch *et al.*, 1978; Fridovich 1983), convertendo-se em peróxido de hidrogénio, o qual, além de uma maior estabilidade, tem um poder oxidante bastante inferior ao do anião superóxido:

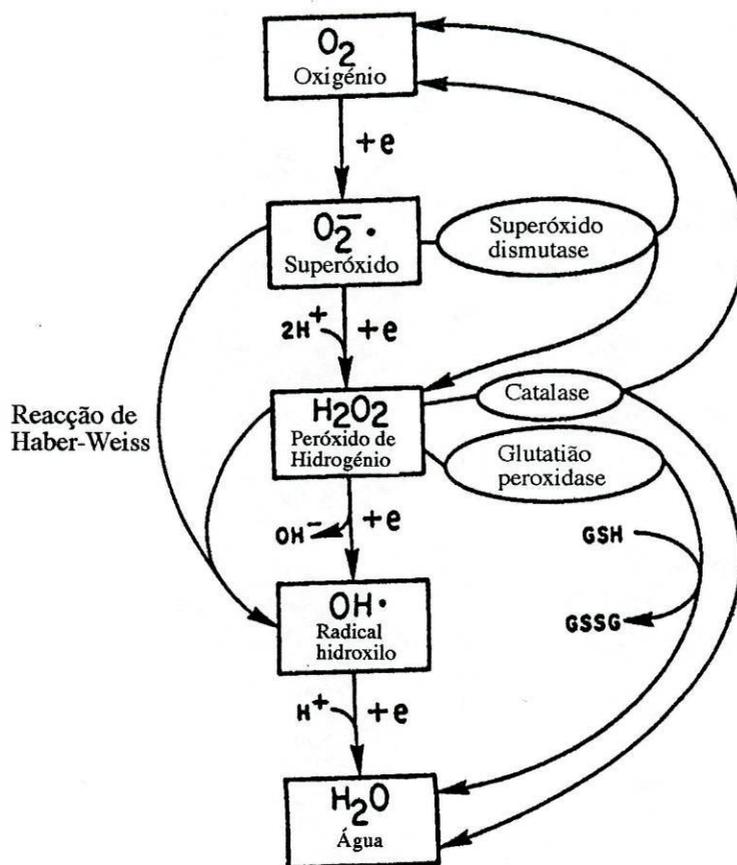
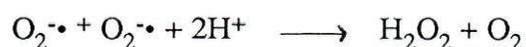


Fig. 2 - Representação da produção dos diferentes metabólitos de oxigênio, que podem ter origem no eritrócito, e as respectivas vias enzimáticas envolvidas na sua remoção (à direita). A reacção de Haber Weiss, à esquerda, refere-se à produção do radical hidroxilo, um poderoso oxidante, na presença de catalisadores metálicos.

Adaptado de "The mature erythrocyte", Telen, M. J. em "Wintrobe's Clinical Hematology", Ed. Lee, G. R. *et al.*, Lea & Febiger (1993).



O peróxido de hidrogénio será eliminado pelo glutatião na presença de glutatião peroxidase, sob a forma de água. A glutatião peroxidase é também importante na redução de hidroperóxidos lipídicos (Rohn *et al.*, 1993).

Em determinadas situações de *stress* oxidativo os níveis de peróxido de hidrogénio podem elevar-se entrando, então, nesta linha de defesa antioxidante a enzima catalase.

Em suma, as enzimas superóxido dismutase e glutatião peroxidase asseguram a remoção de baixos níveis de superóxidos e peróxidos, prevenindo a formação de radicais de oxigénio de poder oxidante superior.

Na presença de catalizadores metálicos, o peróxido de hidrogénio e o superóxido podem dar origem à formação de radicais de oxigénio de poder oxidante superior - radical hidroxilo e oxigénio singlete:



A extrema reactividade dos radicais hidroxilo e singlete limitam a protecção pelos sistemas enzimáticos de defesa antioxidante; o impacto do *stress* oxidativo no eritrócito manifesta-se pela acumulação de constituintes oxidados, que não poderão ser substituídos, por incapacidade biosintética da célula (Winterbourn *et al.*, 1976). A acção oxidativa destes radicais tem um impacto superior a nível de estruturas mais densas, donde, o ataque destes radicais é mais extenso a nível da membrana, que a nível citosólico (Nagy, 1987).

Para além destes mecanismos de desintoxicação, o eritrócito possui ainda outros mecanismos anti-oxidantes que asseguram a regeneração da meta-hemoglobina e do glutatião oxidado à forma reduzida. A conversão da hemoglobina ao estado funcional está dependente do NADH, o qual constitui o coenzima da meta-hemoglobina redutase principal, também designada por NADH desidrogenase I. O eritrócito possui uma via alternativa de redução enzimática da meta-hemoglobina, em que o NADPH é o cofactor e a enzima responsável a meta-hemoglobina redutase acessória, também designada por NADPH meta-hemoglobina redutase. Também o ácido ascórbico e o glutatião estão envolvidos nesta resposta anti-oxidante de regeneração da meta-hemoglobina (Meister,

1992). Todavia, das quatro diferentes alternativas para regeneração hemoglobina funcional, o mecanismo representado pela NADH meta-hemoglobina reductase prevalece entre eles, representando cerca de 95% do processo de redução.

Nos mecanismos de defesa antioxidante do eritrócito incluem-se ainda a vitamina E e o selênio. A importância destes advém do facto de o selênio ser necessário à actividade da glutatíon peroxidase, e da vitamina E ser capaz de bloquear a reacção em cadeia da lipoperoxidação dos ácidos gordos insaturados da membrana eritrocitária (Símonarson, 1988).

1.5. - *Transferências transmembranares.*

O transporte de catiões através da membrana eritrocitária faz-se na sua grande maioria por um mecanismo de transporte activo, sendo a energia necessária para este processo fornecida essencialmente sob a forma de ATP.

O sistema de transporte de Na^+ transmembranar inclui três mecanismos diferentes (Boivin, 1994). O mais importante é designado por bomba de sódio (80% do transporte é feito por este processo), e é mediado pela enzima de membrana $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, na presença de Mg^{++} e de ATP. Este sistema é activado pelo Na^+ e pelo K^+ e inibido por cardiotónicos. A $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ actua por modificação conformacional, expondo alternativamente os locais de afinidade para o Na^+ e para o K^+ em cada uma das faces da membrana. Esta modificação é acompanhada de uma alteração na afinidade dos locais, de tal forma que 3Na^+ saem da célula e 2K^+ são bombeados para o seu interior. Esta sequência é acompanhada de hidrólise do ATP e depende da presença de K^+ extracelular e de Na^+ intracelular, mas não de Na^+ extracelular.

Um segundo sistema faz o cotransporte Na^+K^+ por um processo bidireccional, transportando em simultâneo os iões Na^+K^+ para o exterior ou para o interior da célula. A passagem de um ião através da membrana está obrigatoriamente dependente da presença do segundo ião do mesmo lado da membrana. Este sistema de transporte é já insensível à acção dos cardiotónicos.

O terceiro e último sistema de transporte é feito contra-transporte, trocando um ião Na^+ contra outro ião Na^+ e representa apenas cerca de 5% das transferências de Na^+ .

O transporte do Ca^{++} é mediado pela $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$ na presença de Mg^{++} , é activado pelo Ca^{++} e inibido por glicósidos cardiotónicos. A enzima $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$ existe sob duas formas, uma de baixa e outra de alta afinidade para o Ca^{++} , sendo essa afinidade regulada

pela ligação de calmodulina à enzima. Se a concentração de Ca^{++} eritrocitária atingir valores fisiologicamente elevados, a calmodulina citoplasmática fixa-se à membrana, ligando-se à $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$, que tomará então a forma de elevada afinidade para o Ca^{++} e activará o sistema de rejeição de Ca^{++} para o exterior.

As trocas catiónicas estão estreitamente ligadas à glicólise anaeróbica. A via de Embden-Meyerhof fornece às ATPases o seu substrato. Cerca de 12% do ATP produzido pela glicólise é utilizado pelas ATPases. Só uma depleção grave do metabolismo poderá, pois, limitar gravemente as transferências catiónicas. Pelo contrário, a glicólise é fortemente influenciada pela intensidade das transferências. Um acréscimo destas e, portanto, da actividade das ATPases é também acompanhado de uma intensificação na glicólise. A ligação faz-se a nível da fosfoglicerato cínase, cuja actividade é aumentada por acção do ADP resultante da acção da ATPase. Uma diminuição das trocas “trava” a glicólise por inibição da fosfofruto cínase, devido ao aumento da relação ATP/ADP.

As enzimas de membrana estão também em relação estreita com os lípidos circundantes, cuja presença é necessária para a obtenção de actividades enzimáticas óptimas.

A troca de aniões faz-se através da principal proteína transmembranar, a banda 3. Os iões Cl^- são transferidos em troca de HCO_3^- intracelular.

O equilíbrio entre a glucose extra e intracelular é atingido rapidamente, o que indica um mecanismo de transferência rápida, mas que, sendo independente da diferença de concentrações intra e extracelulares, exclui um mecanismo de difusão simples. A transferência é variável com a temperatura e faz-se por competição entre diversas oses, o que poderá explicar-se pela existência de transportadores específicos. A proteína de transferência da glucose é a proteína 4.5, que é fosforilável pela proteína cínase dependente do AMP cíclico e que parece estreitamente ligada à banda 3 (Tanner, 1993).

A proteína de transporte da glucose no eritrócito - GLUT1 - faz parte de uma família de cinco transportadores de glucose homólogos, determinados por diferentes genes e expressos em diferentes tecidos (Boivin, 1994). Esta família de proteínas apresenta uma estrutura semelhante. São transmembranares, atravessam a membrana 12 vezes e apresentam ambos os terminais amina e carboxi na face citoplasmática. O transporte passivo de glucose através da membrana é feito por estes transportadores no sentido do gradiente de concentração da glucose. À semelhança da banda 3, a proteína 4.5 é portadora dos antigénios ABH e Ii na face plasmática. A sua forma nativa na membrana é tetramérica, embora a forma dimérica seja também isolada na membrana e pareça resultar

de uma redução das ligações dissulfureto intracelulares por acção dos agentes usados para isolar as proteínas. Os dímeros e tetrâmeros da proteína apresentam cinéticas de transporte da glucose perfeitamente distintas, que são função do número de receptores para a glucose apresentados pelas duas formas. Alterações da estrutura oligomérica da proteína podem pois ser responsáveis ou ainda regular o transporte da glucose.

1.6. - *Estrutura e função da membrana.*

A membrana do eritrócito determina a forma da célula, a sua elasticidade e deformabilidade. É aceite que tanto a forma do eritrócito como a capacidade de alteração e recuperação da forma inicial da membrana sejam determinadas por modificações inerentes à própria membrana (Elgsaeter *et al.*, 1991). A composição da membrana e a interacção das proteínas do citoesqueleto com as outras proteínas de membrana e com a bicamada lipídica determinam a forma da célula e as propriedades viscoelásticas da membrana, conferindo à célula uma elasticidade e capacidade de deformação única. O facto de eritrócitos fantasma, constituídos por membranas isoladas que voltam a selar em meio fisiológico, retomarem a forma inicial da célula e manterem ainda a capacidade para alterar a sua forma da mesma maneira que o eritrócito intacto, denuncia o envolvimento da composição e estrutura da própria membrana, como factores determinantes da forma e capacidade de deformação da célula.

A capacidade apresentada pela membrana eritrocitária de, após rotura, voltar a fechar-se retomando a forma inicial, deve-se à cooperação das estruturas hidrofóbicas que tendem a reunir-se e a fundir-se em presença da água plasmática e, ainda, porque uma abertura, mesmo muito pequena, na bicamada lipídica é energeticamente desfavorável. A molécula fosfolipídica pode mover-se lateralmente a um ritmo de 2 $\mu\text{m/s}$, permitindo um rápido encerramento da membrana. As interacções hidrofóbicas constituem forças estabilizadoras da membrana e permitem ao eritrócito, que por lesão mecânica foi dividido em dois ou mais fragmentos, readquirir estabilidade suficiente para sobreviver em circulação por várias horas ou mesmo dias. Neste caso, os fragmentos selando tomarão uma forma esférica ou irregular de menor superfície.

A elasticidade e capacidade de deformabilidade do eritrócito é limitada quando ocorre desnaturação de hemoglobina. A ligação de hemoglobina à membrana leva à formação de agregados densos e indeformáveis, nomeadamente corpos de Heinz e agregados globínicos. No baço, estes eritrócitos portadores de inclusões patológicas são

estrangulados pela zona da inclusão, ao atravessarem os sinusóides, podendo aí ficar retidos e aí morrerem ou romper pela zona de estrangulação, ficando de um lado a inclusão e uma pequena porção da membrana ligada à inclusão, e do outro a célula cuja membrana se fechará e retomará a circulação. É já, todavia, uma célula com propriedades reológicas distintas. A repetida remoção de pequenos fragmentos é acompanhada de redução da área da membrana, sem perda de hemoglobina, e da formação de células esféricas ou mesmo da hemólise da célula.

A membrana serve como barreira, na manutenção da concentração de iões e metabolitos, cujo valor no interior do eritrócito difere da do meio exterior - o plasma sanguíneo. Aproximadamente 40% dos seus constituintes são lípidos o que permite a sua circulação no meio plasmático aquoso. Apesar de funcionar como barreira, a membrana apresenta canais e "bombas" para movimentar o sódio, potássio, cálcio e glutatião oxidado e, ainda, facilitar o transporte de glucose e outras moléculas de baixo peso molecular. A água difunde livremente através da membrana. Os aniões Cl^- e HCO_3^- atravessam a membrana por um mecanismo de transporte facilitado semelhante ao da glucose. Por cada anião Cl^- que se movimenta num determinado sentido através da membrana, observa-se um movimento simultâneo de um anião HCO_3^- no sentido oposto. Esta troca é feita através de um canal da membrana, designado por canal aniónico. O transportador deste canal é a proteína banda 3, a proteína integral mais abundante na membrana do eritrócito. O seu desempenho é vital na regulação dos níveis de HCO_3^- no interior do eritrócito e na mediação da excreção de dióxido de carbono dos tecidos.

A nível dos capilares sanguíneos, o CO_2 proveniente do metabolismo celular e que é pouco solúvel em meios aquosos como o plasma, difunde-se livremente através da membrana eritrocitária (Fig. 3). No eritrócito, por acção da anidrase carbónica, converte-se em HCO_3^- , que é já hidrossolúvel. A troca de HCO_3^- intracelular, mediada pela banda 3, por Cl^- extracelular, tende a acidificar o interior da célula, facilitando desta forma a cedência de oxigénio, pela hemoglobina aos tecidos (efeito de Bohr). Na ausência de uma troca aniónica eficaz o HCO_3^- pode acumular-se e atingir valores tóxicos por alcalinização do citoplasma, em períodos de grande produção de CO_2 . A nível pulmonar ocorre uma inversão do processo, com entrada do HCO_3^- no eritrócito, em troca de Cl^- intracelular, e a sua regeneração à forma de CO_2 para ser eliminado na respiração. A deslocação do H^+ da desoxi-hemoglobina, para regeneração do CO_2 , é seguida da ligação de oxigénio à molécula de hemoglobina.

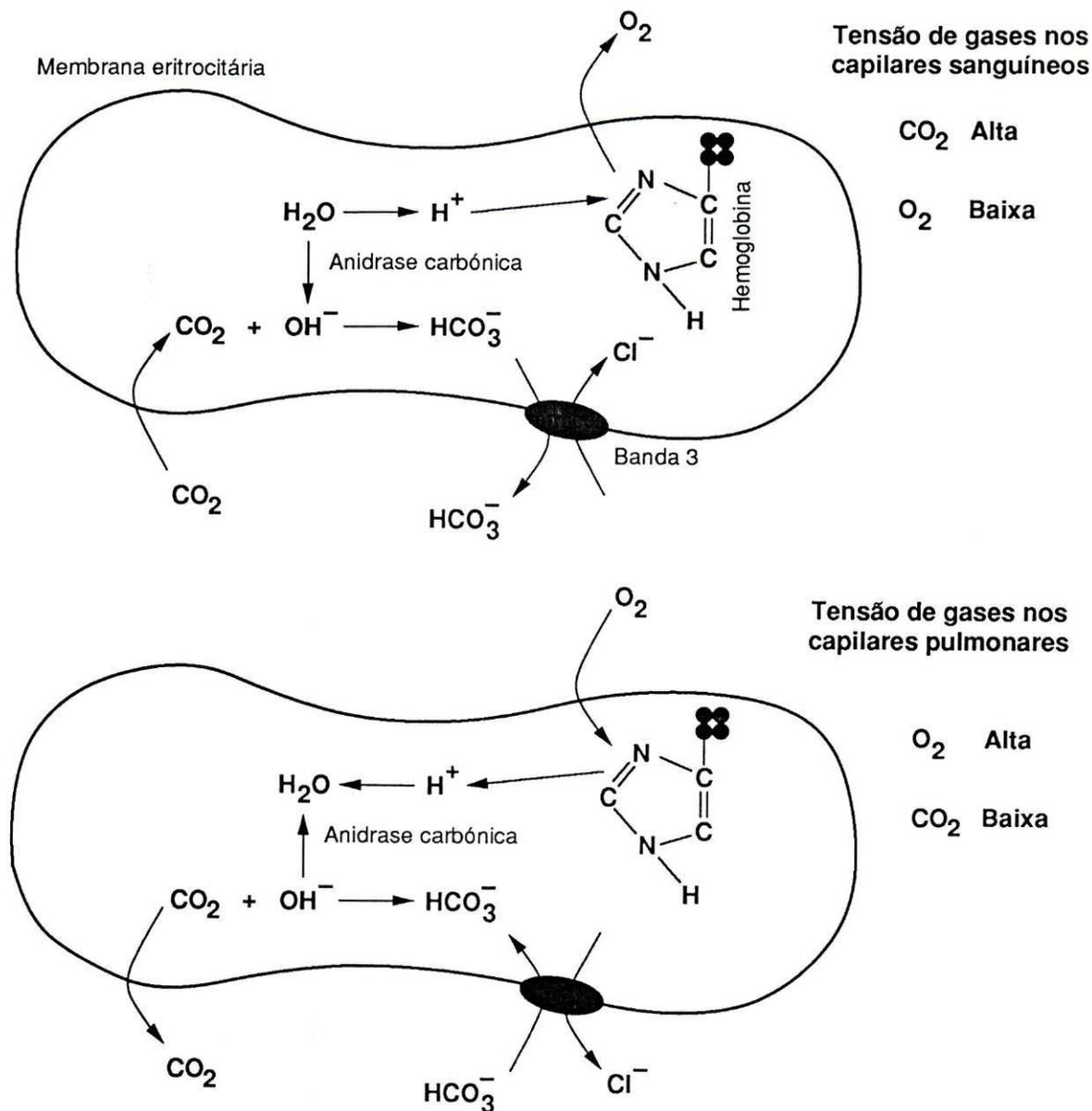


Fig. 3: A nível dos capilares sanguíneos, o CO₂ proveniente do metabolismo celular e que é pouco solúvel em meios aquosos como o plasma, difunde-se livremente através da membrana eritrocitária. No eritrócito, por acção da anidrase carbónica, converte-se em HCO₃⁻, que é já hidrossolúvel. A troca de HCO₃⁻ intracelular, mediada pela banda 3, por Cl⁻ extracelular, tende a acidificar o interior da célula, facilitando desta forma a cedência de oxigénio, pela hemoglobina aos tecidos (efeito de Bohr). Na ausência de uma troca aniónica eficaz o HCO₃⁻ pode acumular-se e atingir valores tóxicos por alcalinização do citoplasma, em períodos de grande produção de CO₂. A nível pulmonar ocorre uma inversão do processo, com entrada do HCO₃⁻ no eritrócito, em troca de Cl⁻ intracelular, e a sua regeneração à forma de CO₂ para ser eliminado na respiração. A deslocação do H⁺ da desoxi-hemoglobina, para regeneração do CO₂, é seguida da ligação de oxigénio à molécula de hemoglobina.

Adaptado de "Transport across Cell Membranes" em "Molecular Cell Biology", cap. 15, Ed. Lodish, H. et al., Scientific American Books (1995).

No eritrócito maduro só a membrana apresenta componentes de natureza lipídica. Os fosfolípidos e o colesterol são os principais constituintes lipídicos, representando cerca de 60 e 40%, respectivamente. Os restantes 10% incluem essencialmente glicolípidos, glicéridos e ácidos gordos livres. A maioria dos lípidos está organizada na forma de camada bimolecular. Nesta disposição a extremidade polar dos lípidos confronta com o meio exterior, o plasma, e com o meio interno citoplasmático, ambos hidrófilos. As extremidades apolares dispõem-se face a face, no âmago da membrana.

Muitas das proteínas e glicoproteínas da membrana confinam com um dos folhetos lipídicos enquanto outras, especialmente aquelas envolvidas em processos de transporte e de regulação da forma da célula, atravessam toda a membrana.

Tanto as proteínas como os lípidos podem movimentar-se lateralmente, segundo o plano da membrana. Pelo contrário, os movimentos verticais, isto é, de uma camada para outra, são restritos aos lípidos e a sua origem e função controversa.

A distribuição dos fosfolípidos nas duas camadas é assimétrica. Enquanto a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilserina (fosfolípidos ácidos) predominam no folheto citoplasmático da membrana, a maioria da fosfatidilcolina e da esfingomiéline (fosfolípidos neutros) encontra-se no folheto exterior da membrana, confrontando com o plasma.

O significado fisiológico da assimetria dos fosfolípidos de membrana é obscura. A activação de algumas enzimas, como a Na^+ e K^+ ATPase e a Ca^{++} e Mg^{++} ATPase estão dependentes dos fosfolípidos do folheto interior da membrana. Há casos em que a assimetria fosfolipídica se altera, com exteriorização dos fosfolípidos ácidos, e se observa alteração do processo hemostático (Zwall 1977 *et al.*; Luppú *et al.*, 1993). A presença de fosfolípidos pró-coagulantes no folheto interior da membrana pode constituir um importante mecanismo de regulação da hemóstase e de prevenção de trombozes.

A manutenção da assimetria da repartição fosfolipídica entre os dois folhetos é um fenómeno fisiológico importante (Connor *et al.*, 1988; Herrmann *et al.*, 1990). A perda de assimetria, observável em múltiplas condições patológicas, parece acompanhar-se de um aumento da adesividade dos eritrócitos ao endotélio vascular (Dhermy *et al.*, 1987; Luppú *et al.*, 1993). Modificações nas interacções moleculares entre os lípidos da camada interna e as proteínas do citosqueleto determinam também alterações na assimetria fosfolipídica. Algumas destas interacções fazem-se por intermédio de fosfatidil-inositóis mono e difosfatos.

A membrana eritrocitária contém todos os elementos do ciclo do fosfatidil-inositol

fosfato, nomeadamente a fosfolipase C que permite a clivagem do fosfatidil-inositol difosfato em inositol mono e difosfato e em diacilglicerol, o activador da proteína cínase C. Possui ainda fosfatidil-inositol cínases que permitem a regeneração dos fosfatidil-inositol-fosfatos. A estes está ligado o sistema de fosfatidil-inositol glicanos que expõe na face externa do eritrócito uma estrutura glicânica à qual se podem ligar numerosas moléculas, tais como elementos do complemento, enzimas e moléculas de adesão susceptíveis de interagir com outros eritrócitos, com outras células circulantes e com os endotélios vasculares.

O eritrócito perde a capacidade de síntese lipídica ao transformar-se de reticulócito em eritrócito maduro. Dependerá a partir de então de mecanismos de troca entre a respectiva membrana e as lipoproteínas plasmáticas. O colesterol da membrana mantém-se em equilíbrio com o colesterol não esterificado das lipoproteínas. O turnover dos fosfolípidos é muito baixo e o dos glicolípidos praticamente nulo.

Modificações na composição ou estrutura dos lípidos da membrana podem determinar modificações quer na função como na fluidez e permeabilidade celular.

Uma perturbação na composição lipídica da membrana está relacionada com alterações na composição lipídica do plasma, o que aliás é razoável, uma vez que os lípidos da membrana estão presentes no plasma sanguíneo.

A estrutura e composição lipídica da membrana determina os fluxos catiónicos transmembranares, dado que o sistema de transporte destes se localiza naquelas estruturas. Se uma alteração na composição lipídica da membrana pode determinar alterações estruturais e funcionais da membrana, então, uma alteração do fluxo catiónico pode constituir um marcador de alterações da composição, estrutura e função dos lípidos da membrana. Um aumento destes é acompanhado de uma redução no fluxo catiónico e, logicamente, da actividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ (Lijnen *et al.*, 1992). Uma das modificações referidas quer em indivíduos hipertensos, quer em atletas é, aliás, uma alteração na permeabilidade da membrana aos catiões (Rinaldi *et al.*, 1988).

Uma perturbação na esterificação do colesterol e, portanto, na sua excreção, acompanhar-se-á de um aumento do colesterol não esterificado, quer a nível das lipoproteínas, quer, por consequência, a nível das membranas celulares. É o caso das abetalipoproteinemias e determinadas hepatopatias, como a deficiência em LCAT (Lecitina colesterol acil transferase) em que ocorre um desequilíbrio entre o colesterol da bicamada lipídica e o colesterol livre plasmático, do qual resulta acumulação de colesterol na membrana e um rearranjo dos fosfolípidos, com exteriorização dos aminofosfolípidos

(Sánchez-Yague *et al.*, 1987). Este enriquecimento das membranas em colesterol, promove ainda alterações de forma da célula, alterações metabólicas e eventualmente hemólise e/ou remoção prematura da célula, mas raramente associam anemia. Pelo contrário, uma depleção em colesterol pode causar uma redução na afinidade do local de ligação para o Na^+ , sem afectar todavia os locais externos de ligação para o K^+ . De facto, uma redução na relação colesterol/fosfolípidos pode determinar a desestabilização da membrana de que resultará um aumento da permeabilidade celular por alteração da bomba de sódio, permitindo um aumento no influxo de sódio (Ronquist *et al.*, 1992).

A rede de proteínas subjacente à camada lipídica constitui o citosqueleto da membrana. As proteínas membranares subdividem-se em duas categorias, as proteínas intrínsecas transmembranares, que atravessam a membrana de um lado ao outro através da camada bilipídica e as extrínsecas ou periféricas, localizadas na face interna ou externa da membrana. As proteínas do citosqueleto, que confinam com a bicamada lipídica interna e com o citoplasma, são também designadas por proteínas estruturais, pelo facto de constituírem como que um esqueleto da membrana. O principal componente é a espectrina que forma uma rede de malhas irregulares, cujos nós são constituídos pela ligação a outras proteínas e, ainda, a proteínas transmembranares ou intrínsecas, através das quais se estabelecem interacções com a camada lipídica e uma ligação estreita com o exterior da célula.

A espectrina constitui a proteína mais importante do citosqueleto; apresenta-se sob a forma de um longo e fibroso heterodímero constituído por uma cadeia alfa e uma cadeia beta, dispostas em hélices antiparalelas e enroladas uma sobre a outra; a maioria destes dímeros ligam-se formando tetrâmeros, os quais formam uma estrutura longa e flexível que, dada a sua abundância na membrana (cerca de 75%), contribui certamente para a notável deformabilidade da membrana do eritrócito. A ligação dos dímeros é feita por interacções com a banda 4.1 e com banda 5 ou actina, nas extremidades opostas às extremidades básicas da molécula do dímero (Boivin, 1994).

Os nós da rede que as moléculas de espectrina formam são constituídos por actina e banda 4.1, estabelecendo-se a ligação destas proteínas do citosqueleto à membrana, através de uma proteína integral, a glicoforina C (Anderson *et al.*, 1984; Pinder *et al.*, 1993). Neste complexo de junção estão ainda envolvidas outras proteínas de actividades diversas e equilibradas, mas ainda pouco clarificadas. A proteína 4.9 ou dematina, em conjunto com a proteína 4.1 modula a ligação da actina à espectrina; a aducina, tem uma acção oposta à da 4.1, diminuindo a afinidade da actina para a espectrina; a tropomiosina,

inibe a ligação da espectrina aos filamentos de actina, estabilizando-os; a tropomodulina, modula a interacção da tropomiosina com a actina. Toda a rede de espectrina se liga ainda à membrana através de outra proteína do citosqueleto, a anquirina ou banda 2.1 que tem a particularidade de apresentar dois sites de ligação, com afinidade para a espectrina e para a proteína integral banda 3 (Bennet *et al.*, 1980; Hall *et al.*, 1987).

Destas interacções resulta uma unidade de membrana forte, flexível, em estreita interacção com a bicamada lipídica com a qual confina estreitamente, conferindo-lhe uma integridade física notável (Fig. 4).

Convencionou-se que a classificação destas proteínas e de outras proteínas, também representativas da membrana eritrocitária, é feita com base no comportamento electroforético das proteínas desnaturadas, em gel de poliacrilamida e SDS. Na Tabela 1 referem-se as proteínas mais representativas, o seu peso molecular, a sua principal função e a sua localização na membrana.

designação electroforética	Peso Molecular	% Proteína	Nome	Localização	Função
1	240.000	30	Espectrina	Interna	Citosqueleto
2	220.000				
2.1	200.000	7	Anquirina	Interna	Citosqueleto
3	93.000	24	Canal aniónico	Transmembranar	Transporte
4.1	82.000	4	Banda 4.1	Interna	Citosqueleto
4.2	76.000	5	Proteína Cínase	Interna	Citosqueleto
5	43.000	5	Actina	Interna	Citosqueleto
6	35.000	6	G3PD	Interna	Enzimática
7	29.000	3	Banda 7	?	?
PAS-1	55.000	7	Glicoforina A	Transmembranar	Receptor
PAS-2					

Tab. 1 - Proteínas mais representativas da membrana do eritrócito. Convencionou-se que a classificação das proteínas da membrana eritrocitária é feita com base no comportamento electroforético das proteínas desnaturadas, em gel de poliacrilamida e SDS. Referem-se as designações electroforéticas e comuns, o peso molecular, a principal função e a localização na membrana, de cada uma delas.

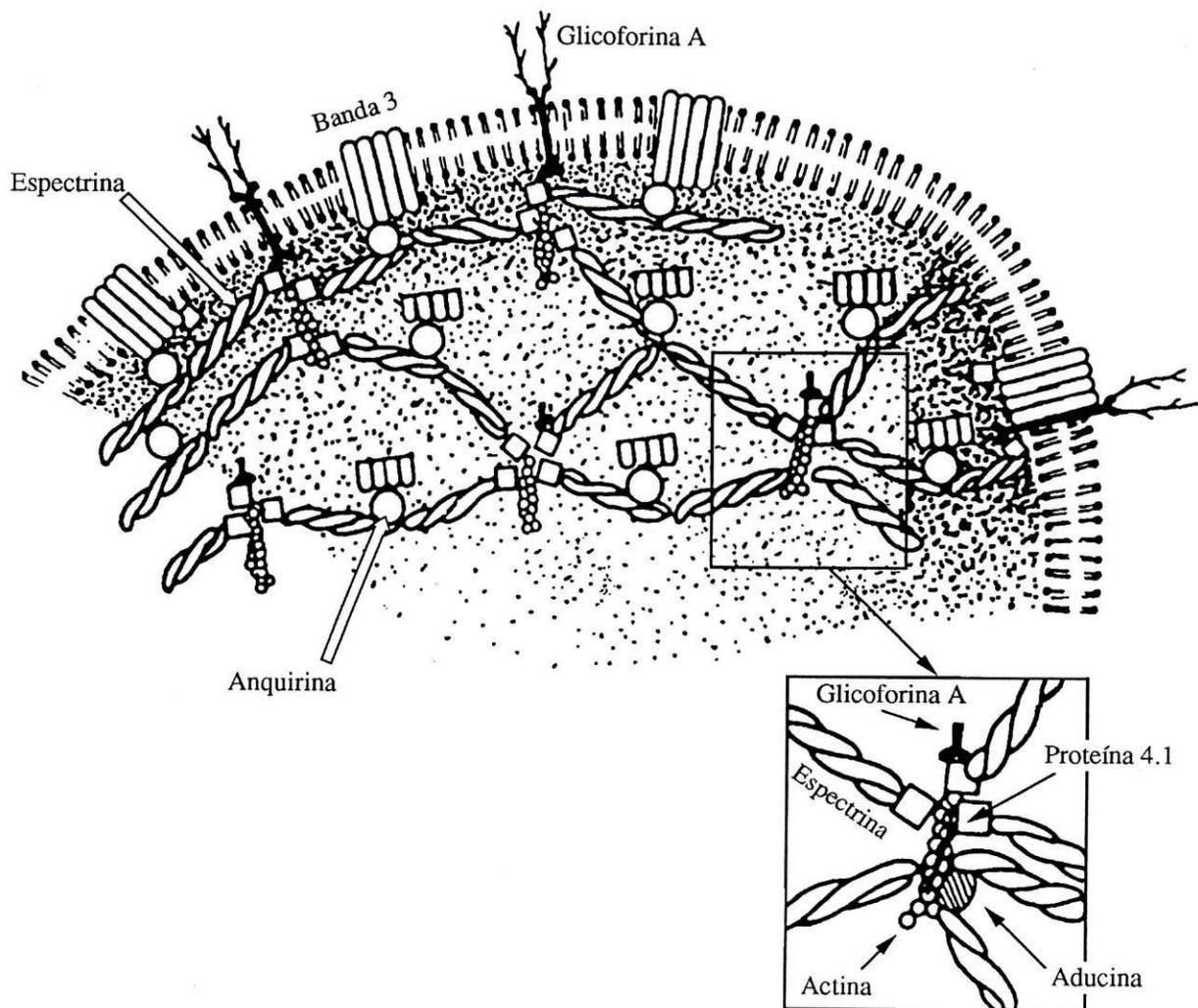


Fig. 4 - Modelo esquemático da interação das proteínas do citosqueleto com as proteínas integrais da membrana do eritrócito. Os domínios citoplasmáticos das proteínas integrais interagem com diferentes proteínas do citosqueleto, numa relação estreita com a bicamada lipídica. Adaptado de Gardner, K., Bennett, G.V., "Recently identified erythrocyte membrane-skeletal proteins and interactions" em "Red Blood Cell Membranes - Structure, Function, Clinical Implications" Ed. Marcel Dekker, 1989.

Para além das proteínas já referidas e que são as mais representativas, são já conhecidas aproximadamente 200 outras proteínas.

As proteínas não estruturais incluem integrais, também designadas por intrínsecas ou transmembranares, e as proteínas periféricas, podendo desempenhar funções de transportadores, de receptores ou ainda terem uma função enzimática. No grupo das proteínas transmembranares incluem-se como mais representativas as glicoforinas e a banda 3, todas glicoproteínas. O grupo das proteínas periféricas que não fazem parte das proteínas estruturais ou do citosqueleto, inclui glicoproteínas que se localizam na parte exterior e na parte interior da membrana, introduzindo-se parcialmente na camada lipídica, sem todavia a atravessarem. É o caso do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e da aldolase, que se localizam na parte interna da membrana. Os componentes superficiais das glicoproteínas funcionam na sua grande maioria como portadores dos antigénios que definem os diferentes grupos sanguíneos e como receptores de membrana.

As glicoforinas constituem um grupo de sialoglicoproteínas que, como as outras proteínas integrais, apresentam três domínios. O exterior, que corresponde à região aminoterminal e contém as unidades hidrocarbonadas, o domínio transmembranar hidrofóbico, que atravessa a bicamada lipídica, e o domínio interior, citoplasmático, com a região carboxiterminal rica em grupos polares e ionizados (Tanner, 1993). O grupo de açúcares polares do domínio exterior, nomeadamente o grupo do ácido siálico, confere à superfície celular uma carga negativa.

São quatro as sialoglicoproteínas conhecidas pela designação de glicoforinas - A, B, C, e D - e representam grupos de reconhecimento ou de contacto. A glicoforina A é portadora dos hidratos de carbono determinantes dos grupos sanguíneos M e N e dos receptores para o vírus influenza e para fito-hemaglutininas. A glicoforina B é também portadora dos determinantes do sistema N e ainda do sistema S. Andersen e Lovrien (1984) mostraram que o domínio citoplasmático de glicoforinas se liga à banda 4.1. Estudos com En(a-), eritrócitos deficientes em glicoforina A, revelaram que as células mantinham uma capacidade de deformabilidade e estabilidade normal e, segundo Chasis *et al.* (1988) é a glicoforina C que se liga à proteína 4.1 e não a glicoforina A. De facto, a função de cada uma das glicoforinas não está ainda perfeitamente esclarecida. O modelo proposto por Chasis *et al.* baseia-se no facto de a ligação das glicoproteínas com os respectivos anticorpos terem impactos diferentes nas propriedades da membrana. No caso da glicoforina C não se observa alteração na deformabilidade e estabilidade da membrana, mas da ligação da glicoforina A com o respectivo anticorpo resulta em rigidez da

membrana. Assim, propõem que a glicoforina A não está ligada, em condições fisiológicas, à proteína 4.1, mas que ocorrendo uma ligação com o respectivo anticorpo ao domínio extracelular da glicoforina, se induz uma alteração na conformação da molécula, a qual determinará, então, a aproximação do domínio citoplasmático da glicoforina com as proteínas do citosqueleto, efectivando-se a ligação com estas. Estes resultados sugerem que o aumento de ligações proteicas causa uma rigidez acrescida da membrana e ainda que a glicoforina A pode estar envolvida numa nova forma de transdução de sinais exteriores, para o interior do eritrócito.

A proteína banda 3 com 90-100 Kd apresenta três domínios e é a proteína transmembranar mais representativa da membrana do eritrócito. A molécula completa da banda 3 é extremamente hidrofóbica, associa-se em homodímeros ou tetrâmeros e apresenta uma forte tendência para a agregação sob *stress* oxidativo (Lutz, 1990). O domínio exterior, de 35-45 Kd, é portador de radicais glicosídicos e de dois radicais sulfidril, e representa a extremidade carboxiterminal. O domínio mediano, de 17 Kd, está incluso na bicamada lipídica e, em conjunto com o domínio exterior, é responsável pelo transporte de aniões. Ao conjunto formado por estes dois domínios dá-se a designação de domínio transmembranar, já que o domínio exterior parece atravessar a membrana cerca de 12 a 14 vezes. O domínio interior ou citoplasmático com 43 Kd, representa a extremidade aminoterminal da glicoproteína. Este segmento citosólico é portador dos locais de fixação da proteína 4.2, 4.1 e anquirina (Hargreaves *et al.*, 1980), as quais estabelecem ligações com o citosqueleto. É ainda portador de locais de ligação de alta afinidade para várias enzimas da glicólise (G3PD, aldolase, PK, etc.) (Harris *et al.*, 1990) e para a hemoglobina (Walder *et al.*, 1984; Schuck *et al.*, 1991).

A ligação do domínio citoplasmático da banda 3 com múltiplos substratos só é possível devido à sua estrutura longa e assimétrica. Enquanto os locais de ligação para a hemoglobina e enzimas glicolíticas se situam próximo do terminal amina, a interacção com as proteínas do citosqueleto parece fazer-se em zonas mais distais. De facto, esta proteína tem uma estrutura muito dinâmica, que poderá dever-se à existência de uma zona mais flexível, localizada na zona média do domínio citoplasmático e muito sensível aos valores de pH (Low *et al.*, 1984; Thevenin *et al.*, 1994). Assim, toma configurações diferentes em função do valor de pH, as quais, determinarão a afinidade do domínio citoplasmático para a anquirina e, portanto, para o citosqueleto e para a bicamada lipídica (Tsuji *et al.*, 1986). Também na zona de inserção do domínio citoplasmático com o domínio transmembranar parece existir uma zona flexível, reguladora da forma e deformabilidade

eritrocitária. É, aliás, esta zona que está ausente no caso da ovalocitose hereditária, caracterizada por alterações de forma e rigidez da membrana (Schofield *et al.*, 1992; Tilley *et al.*, 1993).

É aceite que o domínio transmembranar e o domínio citoplasmático são estrutural e funcionalmente independentes, uma vez que a remoção proteolítica do domínio citoplasmático não altera a capacidade de transporte aniónico do domínio transmembranar (Casey *et al.*, 1992); também as modificações na capacidade rotacional e translacional de cada um dos domínios, no caso de agregação promovida pela ligação de hemicromos, são independentes (McPherson *et al.*, 1992).

A banda 3 pode sofrer uma extensa agregação, induzida por associação de hemicromos, produtos de oxidação de hemoglobina desnaturada, ao seu N-terminal (Low, 1991). O domínio exterior e mediano, que em conjunto constituem o canal aniónico, têm uma função distinta do domínio interior e são de grande importância fisiológica no transporte de CO_2 dos tecidos para os pulmões (Lindenthal *et al.*, 1991). No eritrócito o CO_2 acumulado é hidratado a HCO_3^- por acção da anidrase carbónica. O efluxo do HCO_3^- faz-se por troca com Cl^- através do canal aniónico, o qual, pela sua abundância na membrana eritrocitária, constitui um sistema extraordinariamente eficiente e rápido (90% das trocas são realizadas em 0,4 a 0,5 segundos). Este processo de troca $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$, que existe na maioria dos tecidos, regula também o pH intracelular e o volume da célula.

A banda 3 é um dos membros da família AE (Anion Exchanger). Estudos genéticos e moleculares mostraram que apesar das grandes semelhanças na sequência de aminoácidos das proteínas envolvidas no processo de troca de aniões em diferentes tecidos, são produzidos por genes diferentes. O gene para a banda 3 da membrana eritrocitária é descrito como o gene AE1, enquanto outros de diferentes tecidos são designados por AE2, AE3, etc.

A estrutura e topologia da banda 3 é ainda controversa. Segundo alguns, ambos os terminais amina e carboxi da molécula estão localizados na face citoplasmática da membrana e a cadeia polipeptídica atravessa a membrana mais de 14 vezes (Tanner, 1993). A falta de informação a nível da estrutura da banda 3 não permite, apesar da extensa informação sobre a cinética da troca iónica estabelecida através dela, esclarecer o mecanismo de transporte em termos moleculares.

Estão já descritas variantes polimórficas da banda 3, entre as quais a banda 3 Memphis, resultante da substituição do aminoácido Lys-56 por Glu (Mueller *et al.*,

1977). Esta variante caracteriza-se por uma reduzida mobilidade electroforética, em SDS-PAGE, dos fragmentos contendo o terminal amina. Também a ovalocitose hereditária do sudoeste asiático, que se caracteriza por apresentar uma maior rigidez da membrana eritrocitária e também alteração da mobilidade electroforética, constitui uma mutante da banda 3, a qual, para além da mutação Memphis, apresenta uma deleção em nove aminoácidos (Schofield *et al.*, 1992; Tilley *et al.*, 1993). Uma outra variante é designada por banda 3 alongada, por possuir um fragmento citoplasmático adicional (Retelewska *et al.*, 1991). Outras mutações da banda 3 estão associadas a formas de esferocitose hereditária. Alterações no domínio citoplasmático da banda 3 foram já associadas a deficiência em proteína 4.2 e a esferocitose (Jarolim *et al.*, 1992). Algumas mutantes são acompanhadas de deficiência da banda 3 na membrana, que poderá eventualmente resultar de degradação da banda 3 por instabilidade da proteína. Outras mutantes associam anemias devidas a um processo de envelhecimento acelerado e a um transporte aniónico reduzido (Kay *et al.*, 1989).

Ao longo da vida da célula a banda 3 sofre modificações que estão relacionadas com o processo de envelhecimento e remoção da célula. Desde há muito o estudo das alterações que o eritrócito sofre ao longo da sua vida e o estudo da sua importância no mecanismo de remoção das células, tem merecido especial atenção. Um dos mecanismos de remoção propostos é desencadeado pela ligação de auto-anticorpos à membrana eritrocitária e subsequente fagocitose pelas células mononucleares do sistema fagocítico. Estes auto-anticorpos reagem com a banda 3 modificada, que sofreu modificações por degradação ou por agregação (Kay, 1984; Low *et al.*, 1985). Estes anticorpos naturais anti-banda 3 reagem também com o componente C3 do complemento, o que contribui para uma destruição mais eficiente dos eritrócitos senescentes, por fagocitose (Lutz, 1990).

É de notar que, aparentemente, nem toda a banda 3 se encontra ligada ao citosqueleto. De facto, o número de moléculas de anquirina é bastante inferior ao das moléculas de banda 3, numa relação molar de 0,10 a 0,15 (Pinder *et al.*, 1992). Ou seja, apenas 20 a 30% ou 40 a 60% da banda 3, consoante se encontre sob a forma de dímeros ou tetrâmeros, está ligada à anquirina e, portanto, ao citosqueleto. Segundo Tsuji *et al.*, (1986), a banda 3 ligada ao citosqueleto via anquirina apresenta uma mobilidade lateral reduzida, enquanto que a não ligada apresenta uma mobilidade lateral superior, dependendo o seu valor da estabilidade do citosqueleto e do estado associativo da espectrina. A forma tetramérica, favorecida em meios de força iónica elevada ou

depletados em ATP, promove uma redução na mobilidade lateral da banda 3 não ligada, enquanto a forma dimérica a favorece. O movimento rotacional não é afectado pelo estado associativo da espectrina.

A relação funcional das proteínas da membrana, entre si e com a bicamada lipídica foi estabelecida a partir de um modelo que considera a existência de dois tipos de união proteica - ligações horizontais e ligações verticais. As uniões horizontais são as que se estabelecem entre as proteínas periféricas e as que constituem o citosqueleto. É o caso das ligações entre as moléculas de espectrina para formar dímeros e tetrâmeros, da ligação da proteína 4.1 e aducina para estabilização da ligação da espectrina com a actina. As interações verticais são as que se estabelecem entre as proteínas do citosqueleto e as proteínas integrais e incluem a ligação da espectrina à banda 3 (cadeia β da espectrina com o domínio citoplasmático da banda 3), na qual estão também envolvidas a anquirina e a banda 4.2, e a ligação da proteína 4.1 com o domínio citoplasmático de glicoforinas. Supõe-se que as interações horizontais contribuem para a estabilidade do citosqueleto e as verticais para fixar este à bicamada lipídica. Estas últimas são imprescindíveis para a manutenção da forma eritrocitária e algumas delas, como é o caso da banda 3, estão também envolvidas no transporte iónico através da célula. Além da banda 3, as ATPases são também de extraordinária importância funcional. Alterações na actividade destas proteínas transportadoras de iões determinam modificações no conteúdo catiónico e hídrico do citoplasma eritrocitário e, com estas, alterações na regulação do volume do eritrócito que, em conjunto podem condicionar a hemólise ou remoção da célula.

A espectrina, pela sua interacção com as proteínas não estruturais, influencia a mobilidade lateral no plano da membrana, podendo inibir ou promover a movimentação lateral dos domínios funcionais dos diversos grupos de superfície.

A interacção espectrina-anquirina-banda 3 é essencial a diversas propriedades do citosqueleto, mas não explica por si só a sua integridade estrutural, uma vez que o citosqueleto mantém uma integridade, embora limitada, em casos de deficiência numa delas, como acontece na esferocitose e na ovalocitose (Delaunay, 1993). A actina é também uma proteína importante para a integridade estrutural da membrana; é uma proteína não filamentosa no estado purificado, mas que em presença de espectrina e da banda 4.1 forma um pequeno complexo oligomérico que funciona como núcleo de polimerização da actina em pequenos filamentos constituídos por 8 a 30 monómeros.

A integridade da membrana resulta de diferentes interacções equilibradas entre as proteínas, entre as proteínas e os lípidos e entre proteínas de membrana e proteínas

citoplasmáticas. A alteração da ligação das proteínas transmembranares ao citosqueleto, que se estabelece em vários pontos, pode limitar a mobilidade lateral e rotacional das proteínas. A esferocitose, eliptocitose e piropoiquilocitose hereditárias evidenciam bem a importância de uma composição e interação equilibrada entre as proteínas da membrana eritrocitária. A deficiência em espectrina determina um defeito horizontal, com redução na densidade do citosqueleto, o que facilita a vesiculação da membrana, isto é, a separação de pequenas vesículas contendo lípidos e outras proteínas de membrana, mas não do citosqueleto. A deficiência em anquirina é acompanhada por uma redução em espectrina, uma vez que a anquirina constitui a proteína principal de ligação da espectrina. No caso de deficiência em banda 3, observa-se também vesiculação da membrana, resultante do enfraquecimento da ligação da banda 3 com as proteínas do citosqueleto (Reinhart *et al.*, 1994). Estas vesículas, para além de banda 3 contêm também lípidos aos quais está estreitamente ligada. Em qualquer dos casos o desequilíbrio horizontal ou vertical determina instabilidade da membrana, com perda de material e, portanto, redução da área de superfície, alteração da forma e diminuição do volume da célula.

Considerando que as proteínas do citosqueleto da membrana eritrocitária, nomeadamente a espectrina, apresentam domínios hidrófobos, é altamente provável a interação directa desses domínios com o folheto lipídico interno. As proteínas transmembranares interagem com os lípidos envolventes da bicamada lipídica e essa interação tem importância funcional para a membrana, podendo modular a sua viscosidade. Quer a mobilidade lateral da banda 3, quer a actividade de certas enzimas membranares são influenciadas pelo ambiente lipídico envolvente e podem alterar a viscosidade da membrana.

Das interações de proteínas da membrana com proteínas citoplasmáticas salientam-se as interações da banda 3 com diversas enzimas glicolíticas e com a hemoglobina (Walder *et al.*, 1984; Harris *et al.*, 1990; Schuck *et al.*, 1991).

2. - Senescência do eritrócito.

2.1. - Longevidade e Senescência do Eritrócito.

O tempo médio de vida do eritrócito, isto é, a sua potencial longevidade é de cerca de 120 dias. Ao longo deste período a célula vai sofrendo modificações resultantes de um processo natural de envelhecimento.

O eritrócito sendo uma célula de capacidade biossintética limitada, é também, por consequência, uma célula com uma limitada capacidade de manutenção das suas propriedades e recuperação de alterações físicas e químicas. O eritrócito circulante sofre e acumula modificações físicas e químicas, que constituem marcadores de envelhecimento celular (Tab. 2). À medida que a célula se aproxima dos 100 dias de vida como eritrócito maduro, começa a observar-se uma redução na actividade enzimática das diversas enzimas operantes, o que se reflecte na deterioração dos processos metabólicos delas dependentes.

A redução de actividade da via de Embden-Meyerhof conduz a uma diminuição do ATP disponível e, por consequência, a um desequilíbrio dos processos energético-dependentes, entre os quais a bomba de sódio e potássio, e à perda de capacidade de deformabilidade da membrana.

A falência da via das HMF constitui também um factor importante no processo de envelhecimento da célula, pois torna-a incapaz de superar favoravelmente uma situação não fisiológica de *stress* oxidativo. Quando o ambiente oxidante é extremo ou há uma insuficiência metabólica efectiva por senescência, observar-se-ão alterações estruturais e funcionais reversíveis da hemoglobina ou a sua desnaturação irreversível, com precipitação sob a forma de corpos de Heinz. À formação destas inclusões segue-se habitualmente a sequestração da célula, a nível esplénico, para remoção da inclusão ou para remoção da própria célula.

As lesões bioquímicas decorrentes do processo de envelhecimento determinam alterações físicas e químicas na célula. Observam-se alterações no volume da célula, na sua densidade e nos componentes citoplasmáticos e da membrana. O volume celular reduz-se por envelhecimento e parece resultar da perda de K^+ e de microvesiculação da membrana. O processo de envelhecimento associa ainda um aumento de densidade da célula, uma redução na capacidade de deformabilidade e também uma redução da mobilidade eléctrica, devida a uma redução das cargas negativas de superfície (Seaman *et al.*, 1977; Clark, 1988).

-
- 1 - **Variações na glicólise**
 - a - Actividades enzimáticas que diminuem:
 - hexocínase
 - fosfogluose isomerase
 - fosfofrutocínase
 - aldolase
 - gliceraldeído-3-fosfato-desidrogénase
 - cínase do fosfoglicerato
 - cínase do piruvato
 - b - Redução do metabolismo glicolítico
 - c - Intermediários fosforilados que diminuem:
 - ATP
 - 2,3-DPG
 - 2 - **Variações na via das PMF**
 - a - Redução da G6PD
 - b - Redução da 6-fosfogluconato-desidrogénase
 - 3 - **Variações na membrana**
 - a - Diminuição do conteúdo lipídico
 - b - Diminuição da área de superfície
 - c - Diminuição das cargas negativas
 - d - Redução das glicoproteínas de membrana e outras proteínas
 - e - Alteração do conteúdo catiónico celular:
 - K⁺ diminui
 - Na⁺ aumenta
 - 4 - **Diminuição na actividade enzimática de outras enzimas**
 - a - Transaminase glutâmica-oxaloacética
 - b - Colinesterase
 - c - Catalase
 - d - Glioxilase
 - e - Isocitrato desidrogénase
 - f - Transcetolase
 - g - Purina nucleosído fosforilase
 - h - Cínase adeníllica
 - i - Fosfátase alcalina
 - j - ATPase
 - 5 - **Variações na hemoglobina**
 - a - Aumento da metahemoglobina
 - b - Diminuição da hemoglobina A
 - c - Diminuição da afinidade do oxigénio
 - 6 - **Variações nas propriedades físicas**
 - a - Aumento da densidade
 - b - Diminuição da deformabilidade
 - c - Aumento da fragilidade osmótica e mecânica
 - 7 - **Diminuição do volume celular**
-

Tab. 2: Modificações físicas e químicas, que constituem marcadores de envelhecimento celular.

Na composição da membrana não se observam grandes modificações. As alterações conhecidas são subtis e referem-se mais à organização que à composição da membrana. É o caso da modificação na organização de fosfolípidos, resíduos de hidratos de carbono, proteínas e enzimas. A susceptibilidade dos fosfolípidos da membrana à fosfolipase A2 aumenta nos eritrócitos mais velhos, o que poderá explicar a organização fosfolipídica alterada e a assimetria reduzida, observada nos eritrócitos senescentes (Shukla *et al.*, 1982; Herrmann *et al.*, 1990). A peroxidação lipídica é também frequente nos eritrócitos mais velhos, sobretudo naqueles que sofreram *stress* oxidativo (Jain, 1988). As modificações em proteínas da membrana incluem alterações por oxidação, glicosilação não enzimática, carboximetilação, fosforilação, agregação covalente devida à activação do sistema Ca^{++} transglutaminase e degradação (Lorand *et al.*, 1976; Barber *et al.*, 1983; Williamson *et al.*, 1985; Brovelli *et al.*, 1991). É ainda frequente a ligação de proteínas citoplasmáticas e do citosqueleto à membrana (Clark, 1988).

Atribui-se ainda à célula senescente uma redução nos lípidos, nas proteínas e enzimas da membrana, como resultado da perda de pequenas porções da membrana, com eventual perda de conteúdo citoplasmático, ao longo da vida da célula. Provavelmente estarão na origem desta fragmentação lesões mecânicas sofridas pela célula circulante, nomeadamente a nível esplénico e da microcirculação.

Nenhuma das alterações decorrentes do processo fisiológico de envelhecimento atinge valores determinantes de incapacidade metabólica, condenando a célula à morte. A importância relativa de cada um deles no processo de remoção eritrocitária é controverso. Parece, no entanto, obrigatório que o mecanismo determinante de remoção da célula envolva modificações no eritrócito maduro circulante, dada a sua incapacidade biossintética, as quais mediarão alterações no exterior do eritrócito, a nível da membrana, de forma a poderem ser reconhecidas como células senescentes pelos macrófagos.

O tempo médio de vida do eritrócito pode ser abreviado, caso ocorram defeitos intrínsecos, como no caso de hemoglobinopatias, enzimopatias, defeitos na estrutura ou composição da membrana ou ainda quando se desenvolvem mecanismos ou factores extrínsecos que determinem senescência ou lesão precoce do eritrócito.

O maior problema no estudo do processo de senescência advém da dificuldade em separar células de diferentes idades numa população eritrocitária circulante normal. A maioria das metodologias desenvolvidas nesse sentido fundamentam-se no facto de o envelhecimento celular se acompanhar de um aumento de densidade e de redução nos valores de hemoglobina globular média (HGM) e volume globular médio (VGM).

Todavia, o valor de concentração de hemoglobina globular média (CHGM) é o principal determinante nos métodos de separação por centrifugação, pelo que, no caso de uma modificação desproporcionada de um daqueles índices, associar-se-á uma redução ou um aumento no valor da CHGM que determinará o posicionamento da célula numa fracção que não corresponderá à sua idade. São, aliás, diversos os trabalhos em que se refere a observação em populações eritrocitárias menos densas, de alterações características das células senescentes (Clark *et al.*, 1991; Ferroni *et al.*, 1991).

Uma diversidade de técnicas foram desenvolvidas para o isolamento e estudo do processo de envelhecimento eritrocitário. A maioria das metodologias envolvem um processo de separação por centrifugação com base na diferença de densidade das células. Uma extensa variedade de meios de gradiente de densidade foram usados, tais como albumina bovina sérica, stractan II, dextranos, ficoll e percoll. Este último, constituído por partículas de sílica coloidal revestidas com polivinilpirrolidona, apresenta diversas vantagens sobre os restantes. A sua baixa viscosidade, pressão osmótica e atoxicidade permitem um fácil ajustamento às condições fisiológicas. Pode usar-se na preparação de gradientes de densidade contínua ou linear, descontínuo e contínuo ("self-generated") (Salvo *et al.*, 1982; Mackie *et al.*, 1987). Em animais são também usadas técnicas de supressão eritrocitária por policitemia induzida por hipertransfusão.

O envelhecimento de eritrócitos *in vitro* é considerado por alguns autores como um bom modelo de estudo do processo de envelhecimento eritrocitário *in vivo*, considerando que a capacidade de sobrevivência de eritrócitos armazenados decresce ao longo do tempo de armazenamento e que as modificações adquiridas ao longo desse período e que comprometem a viabilidade da célula, podem identificar-se com as modificações adquiridas por senescência *in vivo*. De facto, do estudo comparativo de células envelhecidas *in vitro*, com células de elevada densidade, diversas semelhanças têm sido observadas, nomeadamente a diminuição da relação área de superfície/volume, semelhança do perfil proteico da membrana obtido por SDS-PAGE, aumento da ligação de auto-anticorpos à membrana (Kay, 1975). De forma análoga, foram também observadas semelhanças entre eritrócitos mais densos e eritrócitos com patologia associada a envelhecimento acelerado, tais como talassemias, drepanocitoses, esferocitoses, eliptocitoses, xerocitoses (Hebbel *et al.*, 1984; Green *et al.*, 1985; Clark, 1988).

2.2. - Modificações na Célula Senescente.

2.2.1. - Disfunção Metabólica do Eritrócito Senescente.

2.2.1.1.- Variações na Glicólise pela Via de Embden-Meyerhof.

Na célula senescente a glicólise faz-se pela via de Embden-Meyerhof a um ritmo muito mais lento, provavelmente em consequência de uma redução na actividade das diversas enzimas que nele actuam. Esta redução na actividade enzimática não é valorizada por alguns autores, que atribuem a redução de actividade observada em diversos trabalhos, mais ao processo de maturação reticulocitária que ao processo de envelhecimento celular, dada a dificuldade em obter células senescentes, mais densas, sem contaminação reticulocitária. Independentemente desta controvérsia, as células senescentes em condições de *stress* metabólico (como acontece na circulação esplénica) são mais susceptíveis de depleção metabólica. Num ambiente pobre em glucose, as células mais densas são rapidamente depletadas em ATP e, portanto, incapazes de resposta à estimulação metabólica imposta nessas condições.

Todos os processos energético dependentes do eritrócito, ficam comprometidos em caso de redução nos níveis de ATP disponível e, paralelamente, nos níveis de NADH e de 2,3-DPG.

A importância do ATP e do 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) para a viabilidade e preservação da principal função da célula, a oxigenação dos tecidos, é largamente evidenciada nas amostras de sangue colhidas para transfusão, em que se usa ACD (ácido citrato dextrose) ou CPD (citrato fosfato dextrose) como anticoagulante. A redução de ATP e de 2,3-DPG observada nestas amostras, por armazenamento, está relacionada com a concentração hidrogeniónica e com a osmolaridade da solução anticoagulante. Ambos os anticoagulantes determinam um valor de pH inferior ao valor fisiológico (6.9-7.0 para o ACD e 7.1 para o CPD), donde decorrerá uma menor produção de ATP na célula e também de 2,3-DPG. Acresce que sendo o ACD uma solução hipotónica, favorece a lise do eritrócito (Contreras *et al.*, 1990). A depleção de ATP na célula limita a acção das enzimas dele dependentes - ATPases - determinando a falência da bomba de sódio e potássio, do transporte de Ca^{++} , do transporte de GSSG, de dissulfuretos mistos e conjugados de glutatião. Segundo alguns o *stress* metabólico por depleção em ATP é também acompanhado de um aumento na capacidade de ligação de IgG's à membrana eritrocitária. Este ponto é todavia controverso e pode estar associado a outras modificações que, por si só ou em conjunto, determinam a ligação dos anticorpos à

membrana (Muller *et al.*, 1983).

O 2,3-DPG é, como se referiu, importante para a função da hemoglobina, regulando a sua afinidade para o oxigénio. Uma redução do 2,3-DPG significa um aumento da afinidade da hemoglobina para o oxigénio, comprometendo desta forma a função da hemoglobina, por dificultar a libertação de oxigénio para os tecidos.

A depleção do ATP é progressiva durante o armazenamento e conduz a alterações na forma da célula, de discócito para esferócito, a perda de lípidos de membrana e a uma rigidez acrescida da membrana. Há, pois, uma perda progressiva da viabilidade celular, que é bem evidenciada pela remoção de células lesadas, após a reinfusão do sangue (Contreras *et al.*, 1990). Estas alterações são reversíveis parcialmente, por adição de "rejuvenescedores" (adenina, inosina) ao anticoagulante. São vários os trabalhos feitos no sentido de preservar a viabilidade das células armazenadas, mantendo os níveis de ATP e de 2,3-DPG (Bensinger *et al.*, 1977; Chillar *et al.*, 1977; Hogman *et al.*, 1983).

De forma semelhante, em determinadas eritropatias, observa-se remoção precoce das células, provavelmente decorrente de um processo de envelhecimento celular acelerado devido a um *stress* metabólico crónico. É o caso das alterações primárias da membrana eritrocitária, que são acompanhadas de um aumento da permeabilidade passiva ao Na⁺ e ao K⁺, habitualmente de valor irrelevante. Este aumento de permeabilidade, cuja origem se desconhece, determina uma actividade acrescida das ATPases envolvidas no transporte activo do Na⁺ e do K⁺, um aumento da glicólise e produção de ATP. O *stress* metabólico crónico nestas condições, determinará uma depleção precoce dos sistemas enzimáticos, e, por consequência, em ATP e glucose, com falência das bombas catiónicas, hidratação e aumento de volume da célula. Paralelamente ao aumento da porosidade aos catiões, a célula, devido a uma composição proteica alterada da membrana, sofre fragmentação, com diminuição da relação área de superfície/volume e perda de elasticidade e estabilidade da membrana.

À medida que a célula envelhece a capacidade de síntese de GSH, via glutatião sintetase e gama glutamil cisteína sintetase, dependente de ATP, decresce e o GSSG acumula-se. Este aumento de GSSG, segundo alguns autores, pode inibir a actividade da hexocinase, limitando a glicólise e o fornecimento de energia (Imanishi *et al.*, 1985).

A capacidade de defesa da célula senescente contra o ataque oxidativo de peróxidos ou outros oxidantes, bem como contra a acção tóxica de compostos electrofílicos de origem endógena ou exógena, está limitada e permite o desenvolvimento de um *stress* oxidativo, que poderá afectar os diversos componentes do eritrócito, nomeadamente a

hemoglobina (Kondo *et al.*, 1982; DeFlora *et al.*, 1985; LaBelle *et al.*, 1986; Sharma *et al.*, 1990).

A produção de NADH na célula senescente será também mais reduzida, limitando a acção da enzima meta-hemoglobina redutase principal e, por consequência, a manutenção da hemoglobina no estado funcional.

Como se referiu, a célula senescente é habitualmente mais densa e de menor volume. A densidade é predominantemente determinada pela concentração hemoglobínica do eritrócito. O conteúdo em hemoglobina mantém-se ao longo da vida embora, segundo alguns autores, possa ocorrer perda de hemoglobina no decurso de fragmentação celular. A concentração de hemoglobina será, portanto, determinada pelo conteúdo hídrico da célula, que é regulado pela concentração intracelular de Na^+ e K^+ . As células senescentes contêm menos K^+ e Na^+ que as células mais jovens, o que parece resultar de uma maior porosidade da membrana aos catiões (Clark, 1988) e, à semelhança das eritropatias de membrana, desenvolve-se um *stress* metabólico que pode originar ou contribuir para a depleção energética e metabólica da célula.

2.2.1.2.- Variações na Glicólise pela Via das Hexoses Monofosfato.

A via das hexoses monofosfato, apesar de representar apenas 10% do metabolismo eritrocitário, é de extraordinária importância como defesa anti-oxidante, por constituir a única fonte de NADPH na célula.

A enzima chave deste metabolismo é a G6PD, cuja actividade no eritrócito maduro e em condições fisiológicas, é regulável pelo nível de NADPH disponível na célula. Nestas condições, no eritrócito maduro normal, a G6PD apresenta uma actividade que é cerca de 1% da sua capacidade máxima (Rosemeyer, 1987) e, portanto, não constitui um factor limitante da via das HMF na medida em que possui capacidade para operar a um ritmo superior em situações de *stress* oxidativo (Gaetani *et al.*, 1974). Ou seja, gerando-se uma situação de *stress* oxidativo no eritrócito, a G6PD aumenta a sua actividade enzimática, no sentido de repôr os níveis de NADPH e proteger a célula contra o ataque oxidante. A estimulação da via das HMF far-se-á em prejuízo da via de Embden Meyerhof. O aumento da glicólise conduzirá a uma redução de glucose-6-fosfato, cujos níveis regulam em conjunto com a hexocinase a utilização da glucose. Este mecanismo regulador da utilização de glucose é muito importante se pensarmos que em casos de hiperglicemia a ausência de um factor inibidor levaria à hidrólise descontrolada do ATP. A intensidade da estimulação é função do agente oxidante e da sua concentração (Davidson

et al., 1972).

Nas células senescentes, a G6PD apresenta uma actividade reduzida e, mais importante, uma capacidade de resposta ao *stress* oxidativo bastante inferior ao das células mais jovens (Ouwkerk *et al.*, 1989).

A importância da G6PD na resposta a uma situação de *stress* oxidativo é bem evidenciada pelo quadro hemolítico desenvolvido pelos indivíduos portadores de uma deficiência em G6PD.

Os factores que afectam a via das HMF em geral e a actividade da sua enzima chave, a G6PD, em particular, são ainda hoje objecto de estudo, que se afigura, aliás, de grande importância para o esclarecimento do metabolismo nos eritrócitos normais e naqueles portadores de enzimopatias hereditárias. A importância da G6PD prende-se com o facto de a sua deficiência comprometer todo o metabolismo pela via das HMF e de representar a eritroenzimopatia de maior prevalência mundial, afectando cerca de 100 milhões de pessoas. A grande maioria dos indivíduos portadores deste traço genético são assintomáticos e frequentemente desconhecem a sua existência até ao momento em que se desencadeia uma crise hemolítica. Este facto demonstra que na maioria dos casos a enzima deficiente operando com uma actividade muito próxima da sua capacidade máxima, consegue manter níveis compatíveis com a viabilidade celular. Todavia, “falham” quando sujeitos a um *stress* oxidativo, dada a incapacidade de aumentar a actividade da G6PD.

As crises hemolíticas, têm origem em modificações eritrocitárias, determinadas por agentes oxidantes extra-corporais. A crise hemolítica aguda pode ser desencadeada por medicamentos ou agentes químicos, ingestão de favas, acidose diabética ou ainda por infecções ou viroses (Luzzatto, 1975; Luzzatto *et al.*, 1985). O ponto comum a estes diversos agentes desencadeadores da crise hemolítica é o *stress* oxidativo criado no interior do eritrócito, o qual se deve à formação ou difusão de formas activas de oxigénio, que se acumulam na célula, aí exercendo a sua acção oxidante sobre diferentes constituintes eritrocitários.

Nos deficientes em G6PD a acção oxidante de medicamentos e agentes químicos no despoletamento de crises hemolíticas significativas, é atribuída aos respectivos metabolitos, em face da dificuldade de demonstrar *in vitro* as modificações eritrocitárias observadas *in vivo* (Beutler, 1984b). De forma semelhante, os responsáveis pela crise hemolítica no favismo são metabolitos de alguns constituintes da fava, apesar da controvérsia relativamente à natureza desses princípios activos (Arese, 1982).

Alterações do pH sanguíneo e dos níveis de glucose e piruvato são provavelmente

as responsáveis pela crise hemolítica em caso de acidose diabética, por estimularem a via das HMF em prejuízo da via de EM (Saeed *et al.*, 1982).

As crises hemolíticas desencadeadas por infecções e viroses envolvem frequentemente Salmonelas, Escherichia coli, Estreptococos β -hemolíticos, Riquetsias, vírus influenza A e vírus da hepatite. Nos processos infecciosos e nas viroses desenvolve-se no eritrócito um *stress* oxidativo, que se deve à difusão de peróxido de hidrogénio através da membrana do eritrócito, o qual tem origem na activação dos neutrófilos, decorrente do processo infeccioso. De facto, eritrócitos deficientes em G6PD, quando incubados *in vitro* na presença de granulócitos e partículas de látex, sofrem uma redução nos níveis de GSH e do tempo de vida. Esta alteração não se verifica por incubação dos eritrócitos com granulócitos em “repouso”, isto é, sem activação, ou ainda por incubação de eritrócitos normais com granulócitos e partículas de látex. Estas observações evidenciam a acção do peróxido de hidrogénio, produzido pelos neutrófilos durante o processo de activação para fagocitose das partículas de látex, sobre o eritrócito (Luzzatto, 1975).

Considerando o que ocorre em caso de *stress* oxidativo na deficiência em G6PD e ainda nas células senescentes, com uma actividade enzimática inferior e uma capacidade limitada de resposta ao *stress* oxidativo, é razoável pensarmos que as células senescentes são passíveis de remoção precoce em caso de *stress* oxidativo e, ainda, que a restante população eritrocitária, embora capaz de ultrapassar a “crise”, sofrerá e acumulará modificações que poderão abreviar a sua longevidade. Da mesma forma, situações que associem activação de neutrófilos determinarão um envelhecimento precoce da população eritrocitária.

Apesar da reconhecida capacidade de síntese de GSH pelo eritrócito, o metabolismo do glutatião é também sensível a qualquer modificação do metabolismo pela via das HMF. Uma prolongada exposição do eritrócito a reduzidos níveis de GSH foi já associada a lesões de natureza oxidativa da membrana eritrocitária, com redução da sua estabilidade (Johnson *et al.*, 1994).

2.2.2.- Modificações na Membrana Eritrocitária.

As modificações a nível da membrana decorrentes do processo de senescência surgem na sequência da deterioração dos processos metabólicos e ainda por lesão mecânica, que será exacerbada logo que a capacidade de deformabilidade do eritrócito seja também limitada. O *stress* oxidativo opera alterações na membrana, cuja natureza e

extensão constituem um tema actual e extremamente controverso.

Vários trabalhos evidenciam modificações a nível da membrana no que se refere ao conteúdo em lípidos, glicoproteínas e outras proteínas e ao número de cargas negativas (Winterbourn *et al.*, 1970; Clark, 1988; Herrmann *et al.*, 1990).

A membrana apresenta uma redução em fosfolípidos e colesterol e ainda uma redução em ácido siálico, responsável pela carga negativa da célula (Schlepper-Schafer *et al.*, 1983). Estas modificações parecem resultar da perda de área de superfície que se observa nas células senescentes, já que as proporções dos diversos componentes apresentam valores praticamente constantes (Clark, 1988). No que respeita aos fosfolípidos, embora as proporções se mantenham há, todavia, uma alteração na assimetria lipídica, com exteriorização dos aminofosfolípidos fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, provavelmente decorrente de uma alteração no processo de interiorização dos mesmos (Herrmann *et al.*, 1990; Connor *et al.*, 1994).

O mecanismo subjacente à perda de pequenas porções de membrana não está ainda perfeitamente esclarecido, embora o baço pareça ter um papel crucial. De facto, indivíduos esplenectomizados apresentam, relativamente aos não esplenectomizados, eritrócitos de volume superior e um aumento no conteúdo lipídico da membrana, em paralelo com o aparecimento de pequenos "pits", com aspecto de vacúolos ou inclusões, que aumentam em número à medida que a célula envelhece em circulação. Este facto indicia, portanto, o envolvimento do baço na remoção dos "pits", a qual é provavelmente acompanhada de perdas de membrana ou de sequestração e remoção eritrocitária.

2.2.2.1. - Por Depleção Metabólica do Eritrócito Senescente.

A redução dos níveis de ATP e GSH, decorrentes do processo natural de senescência, ou de desequilíbrio metabólico em caso de *stress* oxidativo, é acompanhado por um decréscimo da actividade dos sistemas de defesa anti-oxidante e da actividade das enzimas de membrana dependentes do ATP - ATPases. Gera-se um desequilíbrio electrolítico na célula, com diminuição de K^+ e Na^+ intracelular, que determinarão um menor conteúdo hídrico na célula, que se torna mais densa, com uma viscosidade interna acrescida e, por consequência, com uma capacidade de deformabilidade reduzida. A CHGM do eritrócito é já tão elevada que um pequeno aumento, por redução da água intracelular, determina um aumento substancial da viscosidade interna.

A lesão oxidativa de constituintes da membrana de eritrócitos depletados em ATP ou em GSH, ou ainda em ambos, é função do tipo de agente oxidante, da sua concentração e

dos seus alvos preferenciais ou ocasionais. O *stress* oxidativo criado por deterioração metabólica ou por acção de agentes exógenos determinam modificações oxidativas da membrana de natureza diversa. Coetzer *et al.* (1980) mostrou que eritrócitos depletados em GSH (amostras de indivíduos deficientes em G6PD), com níveis normais de ATP, apresentam agregação de proteínas da membrana, resultante da formação de pontes dissulfureto entre diferentes proteínas da membrana, como a espectrina, globina, banda 3 e outras proteínas, provavelmente citoplasmáticas. A depleção concomitante em GSH e ATP conduz também à formação destes agregados, mas, segundo o autor, a depleção nos níveis de ATP não é obrigatória para que ocorra a referida agregação. Coetzer mostrou ainda que sob a acção de um agente oxidante exógeno, a acetilfenil hidrazina, as células depletadas em GSH, mas não em ATP, apresentavam também agregação proteica, mas a natureza destes agregados era distinta daqueles obtidos por acção de oxidantes de origem intracorpúscular. Estes tinham como principal constituinte a globina, apresentando ainda pequenas quantidades de espectrina e banda 3. Segundo este autor o tamanho e frequência da agregação é função do número de colisões entre os grupos tiol das proteínas e a concentração do oxidante e do GSH. O ATP poderá desempenhar o papel de regulador da mobilidade das proteínas da membrana e não de preservação da interacção estável das proteínas da membrana.

A concentração de cálcio intracelular não apresenta variações significativas, apesar de a actividade da enzima $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$ apresentar valores progressivamente mais baixos, por senescência. Todavia, por acção de um agente oxidante exógeno observa-se já em paralelo com um decréscimo de actividade da enzima, um aumento do Ca^{++} intracelular (DeFlora *et al.*, 1985).

O *stress* metabólico por depleção em ATP é acompanhado de um aumento na capacidade de ligação de IgG's à membrana eritrocitária. Este ponto é todavia controverso e pode estar associado a modificações que ocorrem a nível da membrana e que, traduzindo a depleção metabólica, determinam a ligação dos anticorpos à membrana (Muller *et al.*, 1983).

2.2.2.2.- Por Lesão Oxidativa.

A natureza e origem das lesões oxidativas da membrana do eritrócito circulante, pela sua diversidade e inconsistência são controversas e pouco esclarecidas. Um dos motivos prováveis para o desenvolvimento e acumulação de lesões oxidativas é a redução na actividade dos sistemas de defesa anti-oxidante e/ou da capacidade de resposta perante

uma situação de *stress* oxidativo. A diversidade e inconsistência das observações nesta área está relacionada com o agente oxidante - concentração, tempo de actuação, poder oxidante, localização - e com o estado metabólico do eritrócito ou, mais precisamente, com a actividade e capacidade de resposta dos seus sistemas de defesa anti-oxidante. Um eritrócito senescente ou com um sistema anti-oxidante limitado é sempre uma célula mais vulnerável que um eritrócito normal. E, mesmo no caso de eritrócitos normais é razoável pensar que, sendo as enzimas envolvidas naqueles sistemas, de localização citoplasmática, podem não impedir cabalmente lesões oxidativas a nível da membrana, quando o oxidante é libertado nas proximidades desta.

Embora o eritrócito dependa predominantemente dos seus sistemas de defesa anti-oxidante na prevenção de lesões oxidativas da membrana, existem também nesta proteases que podem reconhecer e degradar proteínas oxidadas, incluindo a hemoglobina. (Fagan *et al.*, 1986). Os reticulócitos possuem um sistema de proteólise para degradação de proteínas de estrutura alterada, dependente do ATP. Este sistema, também responsável pela eliminação programada de várias proteínas, no decurso do processo de maturação reticulocitária, está ausente no eritrócito (Fagan *et al.*, 1986). Nos reticulócitos e eritrócitos maduros actua um outro sistema proteolítico independente do ATP e que está envolvido na degradação de proteínas alteradas por oxidação (Davies, 1987a). O desenvolvimento de polímeros de elevado peso molecular de natureza oxidativa na membrana, pode resultar de uma capacidade limitada deste sistema, para a sua remoção proteolítica, ou de um ritmo oxidativo tal que aquele sistema proteolítico seja incapaz de o acompanhar.

O eritrócito maduro pela sua especialização no transporte de oxigénio é uma célula equipada de um mecanismo de defesa anti-oxidante, o qual, em determinadas circunstâncias, pode tornar-se vulnerável à acção oxidativa do oxigénio molecular. O estudo de células senescentes tem, de facto, evidenciado a existência de lesões cumulativas de natureza oxidativa (Clark, 1988; Jain, 1988; Lutz, 1990; Kannan *et al.*, 1991). A meta-hemoglobina aumenta progressivamente com a idade celular e, paralelamente, verifica-se uma redução de GSH e um aumento em glutatião oxidado (Imanishi, 1985). A desnaturação de hemoglobina é, aliás, frequente em determinadas patologias associadas com *stress* oxidativo, por incapacidade dos mecanismos redutores (deficiência em G6PD e glutatião peroxidase), com envelhecimento celular acelerado e com hemoglobinopatias caracterizadas por instabilidade da hemoglobina (Flynn *et al.*, 1983). Nestes casos, a hemoglobina desnaturada é visível sob a forma de inclusões eritrocitárias, designadas por corpos de Heinz, de localização membranar. A hemoglobina

oxidada a meta-hemoglobina, sofre pequenos rearranjos estruturais que podem levar à formação de hemicromos reversíveis ou, prosseguindo a desnaturação, a hemicromos irreversíveis que irão constituir o núcleo para a formação de corpos de Heinz. Os hemicromos, ao contrário dos seus precursores apresentam uma elevada afinidade para o domínio citoplasmático da banda 3, formando um copolímero reversível, mas insolúvel, que se amplifica rapidamente, atingindo dimensões macromoleculares (Waugh *et al.*, 1985; Waugh *et al.*, 1987; Kannan *et al.*, 1988). A formação de um precipitado, que se observa por adição de hemicromos à banda 3, em tubo, traduz-se, nos eritrócitos, por acumulação de hemicromos, os quais promovem a agregação de banda 3 na membrana. A maior frequência de corpos de Heinz em indivíduos esplenectomizados mostra que a sua formação está relacionada com o processo de envelhecimento e remoção eritrocitária.

A desnaturação da hemoglobina, como já foi referido, pode surgir na sequência da formação de radicais activos de oxigénio que, não sendo convertidos e eliminados sob a forma de água, por acção do metabolismo do glutatião que nas células senescentes e em determinadas eritropatias está comprometido, conduzem à formação de outros radicais de poder oxidante superior. A lesão oxidativa é observada não só a nível da hemoglobina, como também a nível dos lípidos e proteínas da membrana (Kannan *et al.*, 1991).

O aumento do sulfóxido de metionina na membrana de eritrócitos densos é outro sinal de lesão oxidativa da membrana e constitui um precoce marcador de senescência (Brovelli *et al.*, 1991; Castellana *et al.*, 1992). De facto, a concentração de sulfóxido de metionina da membrana de eritrócitos jovens é significativamente diferente da apresentada pelos eritrócitos de meia-idade; entre estes e os eritrócitos mais densos não há, todavia, diferença significativa. A oxidação da metionina inicia-se, portanto, muito cedo na vida do eritrócito circulante, mantendo um valor mais ou menos constante a partir de um determinado período da vida da célula. Uma explicação possível para este facto pode ser a degradação das proteínas altamente oxidadas ou, ainda, a sua remoção no decurso do processo de fragmentação da membrana, que sabemos ocorrer ao longo da vida da célula. A considerar-se esta última hipótese, a oxidação da metionina pode constituir também um marcador de fragmentação eritrocitária (Brovelli *et al.*, 1991).

O metabolismo do glutatião permite ao eritrócito manter os grupos tiol no estado reduzido. Todavia, a disfunção metabólica que acompanha o processo de senescência, torna os grupos tiol das proteínas da membrana susceptíveis à oxidação. De facto, as células senescentes apresentam uma redução dos grupos tiol em diferentes proteínas da membrana - banda 3, banda 4.1 e banda 4.2 - e, em paralelo com a lesão oxidativa,

apresentam alterações conformacionais e o aparecimento de novas bandas, de elevado peso molecular, nos electroforetogramas (Brovelli *et al.*, 1991).

São muitos os trabalhos feitos *in vitro*, com o objectivo de estudar a acção de diferentes oxidantes, em diferentes condições, sobre eritrócitos normais, senescentes ou com determinadas patologias, por forma a explicar ou clarificar o processo de senescência e de lesão oxidativa da membrana eritrocitária. Os agentes oxidantes podem actuar directamente sobre as proteínas da membrana, alterando a sua estrutura e tornando-as susceptíveis à degradação ou agregação, ou, alternativamente, a oxidação lipídica determinada pelos agentes oxidantes pode conduzir à formação de radicais lipídicos, como dienos conjugados, hidroperóxidos ou malonildialdeído, capazes de promover também modificações oxidativas nas proteínas da membrana eritrocitária (Davies, 1987a; Davies, 1987b; Beppu *et al.*, 1990).

Os sistemas produtores de formas activas de oxigénio no eritrócito, têm merecido especial atenção, dada a produção contínua de formas activas de oxigénio no eritrócito, nomeadamente por autooxidação da hemoglobina. Genericamente, podem salientar-se como modificações mais consistentes, impostas por estes sistemas, a redução dos sistemas de defesa anti-oxidante do eritrócito (GSH e NADPH), a oxidação da hemoglobina, proteólise, formação de agregados de elevado peso molecular, inibição das enzimas envolvidas no transporte transmembranar ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPases}$, $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$), lipoperoxidação, redução da capacidade de deformabilidade da membrana e da sua estabilidade e hemólise (Dubbelman *et al.*, 1977; Corry *et al.*, 1980; Pfafferott *et al.*, 1982; Bates *et al.*, 1984; Clark, 1988; Jain, 1988; Lutz, 1990; Chen *et al.*, 1991; Kannan *et al.*, 1991; Rohn *et al.*, 1993).

Compostos quimicamente semelhantes podem ter efeitos distintos sobre o eritrócito. O peróxido de hidrogénio, um peróxido hidrossolúvel, em concentrações pré-hemolíticas, determina modificações na permeabilidade ao K^+ , redução na capacidade de deformabilidade da membrana, oxidação da hemoglobina e sua ligação à membrana e lipoperoxidação (Chen *et al.*, 1991). O t-butil hidroperóxido, um peróxido hidrófobo, tem já um efeito diferente sobre o eritrócito. A sua acção sobre a permeabilidade catiónica é mínima, assim como na deformabilidade da membrana, verificando-se, todavia, uma redução na estabilidade da membrana. Efeitos tão díspares, de compostos quimicamente semelhantes, sobre o eritrócito, podem resultar de mecanismos e locais de acção também díspares. De forma semelhante, são atribuídas aos radicais activos de oxigénio algumas modificações menos consistentes e, por isso, controversas. Enquanto a exposição dos

eritrócitos ao hidroperóxido promove o “cross-linking” de proteínas, sem alteração de volume (Corry *et al.*, 1980), a sua exposição ao superóxido resulta em proteólise acentuada e aumento do volume celular que, todavia, não se verificam em membranas isoladas, evidenciando também a importância da hemoglobina neste processo (Uyesaka *et al.*, 1992b). O aumento no volume celular pode resultar de um aumento da permeabilidade da membrana, por alterações estruturais ou de degradação da banda 3; observam-se também modificações na forma dos eritrócitos, evoluindo de discócitos para estomatócitos e, finalmente, esferócitos.

Outro efeito da produção de formas activas de oxigénio no interior do eritrócito é a lipoperoxidação. Os ácidos gordos poli-insaturados são decompostos por um processo de peroxidação directa ou indirecta de que resulta, como produto final, o malonildialdeído (MDA) (Jain *et al.*, 1980; Flynn *et al.*, 1983; Sushil *et al.*, 1983; Duijn *et al.*, 1984; Hebbel *et al.*, 1984; Clark, 1988). O MDA reage com o meio lipídico circundante mais próximo, que no caso serão os aminofosfolípidos do folheto interno da bicamada lipídica, para formar um aducto lipídico, resultante do “cross-linking” de fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina com os grupos aldeído do MDA (Sushil *et al.*, 1983; Jain, 1988), em antecipação às bases de Schiff, que resultam da interacção do MDA com os grupos amina das proteínas da membrana eritrocitária. O MDA pode, para além destes produtos, promover o “cross-linking” de proteínas por pontes dissulfureto, com eventual formação de agregados irreversíveis de elevado peso molecular (Jain *et al.*, 1980). Estas modificações têm também sido referidas, embora de uma forma inconsistente, na membrana de eritrócitos senescentes, com enzimopatias, com esferocitose ou com hemoglobinas instáveis (Flynn *et al.*, 1983; Giuliani *et al.*, 1993). Estas alterações intensificam-se nos indivíduos esplenectomizados, o que evidencia o seu envolvimento no processo de remoção eritrocitária. O aumento observado na peroxidação lipídica da membrana, sugere que alguns dos constituintes anti-oxidantes da membrana eritrocitária possa estar depletado. A vitamina E é um destes anti-oxidantes e o seu valor está reduzido nas células senescentes, mais densas.

A peroxidação de ácidos gordos insaturados altera as propriedades físico-químicas da membrana eritrocitária, em consequência das modificações lipídicas e proteicas que a acompanham, determinando rigidificação da bicamada lipídica, estimulação dos movimentos verticais dos fosfolípidos, com exteriorização dos aminofosfolípidos (Herrmann *et al.*, 1990; Connor *et al.*, 1994) e, eventualmente, modificações funcionais das estruturas envolvidas na lesão oxidativa.

Se existe controvérsia quanto à natureza e origem das lesões oxidativas da membrana do eritrócito senescente, também ela existe no que se refere ao impacto destas modificações na morfologia, deformabilidade, viabilidade e longevidade da célula. Segundo alguns, as lesões oxidativas são acompanhadas de desestabilização da membrana, a qual se traduz numa redução da sua capacidade de deformabilidade, aumento da fragilidade osmótica, predisposição para a fragmentação, para a remoção e eventualmente para uma longevidade abreviada (Johnson *et al.*, 1994).

O impacto da acção de um oxidante sobre o eritrócito dependerá não só dos múltiplos mecanismos de defesa anti-oxidante existentes na célula e que poderão proteger diferentes componentes da mesma, mas também de outros factores, nomeadamente o tipo de oxidante, a sua concentração, as concentrações dos diferentes componentes celulares, etc.

2.2.2.2.1.- Por Lesão Oxidativa da Banda 3.

O tratamento de eritrócitos jovens com agentes oxidantes, como a fenilhidrazina e o “acridine orange”, promovem a agregação da banda 3 (Low *et al.*, 1985; Low, 1991). O processo de oxidação pela fenilhidrazina inicia-se com a desnaturação da hemoglobina e formação de hemicromos que têm uma grande afinidade para o domínio citoplasmático da banda 3 (Waugh *et al.*, 1985). A associação dos hemicromos com o domínio citoplasmático da banda 3 desencadeia a propagação da reacção, com formação de copolímeros de elevado peso molecular, os quais são reconhecidos por auto-anticorpos anti-banda 3. O “acridine orange”, sendo um oxidante lipofílico, não actua sobre a hemoglobina, mas somente sobre os constituintes da membrana eritrocitária. Todavia, promove igualmente a agregação irreversível da banda 3, a que se segue também o reconhecimento e ligação por auto-anticorpos; demonstra-se desta forma o envolvimento da banda 3 modificada, independentemente da desnaturação da hemoglobina, na ligação de auto-anticorpos à membrana eritrocitária. Estudos microscópicos por imunofluorescência e estudos por “immunoblotting” dos eritrócitos tratados com oxidantes corroborou este envolvimento, mostrando uma localização sobreponível dos anticorpos, dos agregados de banda 3 e dos corpos de Heinz (Low *et al.*, 1985; Schluter *et al.*, 1986; McPherson *et al.*, 1992). Os agregados de hemoglobina desnaturada ou de hemicromos com banda 3 são característicos de eritrócitos senescentes, eritrócitos deficientes em G6PD, eritrócitos com um sistema de defesa anti-oxidante reduzido ou ainda em eritrócitos com hemoglobinas instáveis (Jain *et al.*, 1980; Flynn *et al.*, 1983;

Bates *et al.*, 1984; Kannan *et al.*, 1991; Giulliani *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1994).

Para além deste aspecto imunológico, a agregação de banda 3, por desnaturação da hemoglobina, tem ainda outras consequências adversas. A presença de corpos de Heinz no eritrócito determina a remoção esplénica da inclusão, acompanhada de fragmentação eritrocitária, redução de volume, alteração da forma do eritrócito, das suas propriedades físicas e eventualmente da remoção da própria célula. Por outro lado, sendo a banda 3 o principal ponto de ligação do citosqueleto com a bicamada lipídica, qualquer modificação na distribuição da banda 3 pode causar um desequilíbrio da estrutura da membrana. A mobilização lateral da banda 3, decorrente da agregação, poderá até criar áreas estritamente lipídicas na membrana, favorecendo a vesiculação da membrana (Tsuji *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1991).

2.2.2.3.- Por Proteólise.

A membrana eritrocitária da célula senescente apresenta lesões de natureza proteolítica. Ao contrário dos processos de lipoperoxidação e hemólise, a proteólise inicia-se rapidamente, após exposição a radicais livres; à semelhança da liperoxidação, processa-se numa forma linear em função do tempo e da concentração do agente oxidante, o que sugere que o processo de proteólise e de peroxidação lipídica pelos radicais livres, apesar de se processarem por mecanismos diferentes, possam ter uma interligação. É mesmo possível que a produção dos radicais livres no metabolismo normal eritrocitário tenha uma função fisiológica no despoletamento da degradação de proteínas modificadas ou de enzimas nocivas para a célula (Davies 1987a; Davies *et al.*, 1987b).

O mecanismo e a natureza das proteases envolvidas na degradação de proteínas da membrana eritrocitária é ainda obscuro. Todavia, as alterações proteolíticas da membrana são de especial importância por se relacionarem com o desenvolvimento do neoantigénio de senescência (Kay, 1984; Low *et al.*, 1985; Lutz, 1990), responsável pela ligação de anticorpos, presentes no plasma. Essa ligação será reconhecida pelos macrófagos que, em conjunto com o complemento, procedem à remoção da célula por fagocitose. Os macrófagos são células do sistema fagocítico, responsáveis pela remoção de eritrócitos senescentes, e também uma importante fonte de formas activas de oxigénio e proteases. É pois razoável que um eritrócito, que sofreu repetidamente nos sinusóides, a nível esplénico, hepático e da medula óssea, a acção de proteases, acumule e apresente modificações proteolíticas que se acentuarão ao longo da sua vida. De facto, em eritrócitos ainda jovens, mas com eritropatia de membrana, acompanhada de reduzida capacidade de

deformabilidade, cuja passagem nos sinusóides se faz mais lentamente, apresentam já essas modificações (Gaczinska *et al.*, 1987; Gaczinska *et al.*, 1991).

Os anticorpos isolados nos eritrócitos mais densos foram relacionados imunologicamente com a banda 3 e com polipeptidos de menor peso molecular (Czerwinski *et al.*, 1988). Todavia, o tratamento de eritrócitos normais com diferentes enzimas proteolíticas, por si só, não induz a ligação de anticorpos isolados de células densas, o que evidencia a associação das modificações proteolíticas da banda 3 a outro(s) evento(s) eritrocitários, a nível da composição e estrutura da membrana e/ou do citoplasma (Clark, 1988). Estudos feitos por Gaczynska *et al.* (1987, 1991) mostram que a susceptibilidade das proteínas da membrana eritrocitária à proteólise, é função da composição e estrutura das proteínas constituintes da membrana, da actividade das proteases de membrana e da idade da célula. A acção proteolítica de proteases extracelulares parece ser diferente daquela apresentada pelas endoproteases, o que estará provavelmente relacionado com uma maior ou menor acessibilidade das proteínas às proteases (Gaczynska, 1989).

Czerwinski *et al.*, (1988) prepararam no rato um anticorpo monoclonal designado por BIII.136, dirigido para um epítopo de aproximadamente 20 Kd, localizado no terminal amina do domínio citoplasmático da banda 3. Este anticorpo detecta com grande sensibilidade os polipeptidos que contêm esse epítopo, permitindo o estudo proteolítico da banda 3 *in vivo* e *in vitro*. Reconhece a banda 3, três grupos de polipeptidos de 55-60 Kd, 38-42 Kd e 21-26 Kd, habitualmente designados, para simplificação da linguagem, por 60 Kd, 40 Kd e 20 Kd, respectivamente, e, ainda, agregados de banda 3 ou dos respectivos polipeptidos de menor peso molecular. Os fragmentos 40 Kd e 20 Kd resultam da proteólise da banda 3 pelo lado citoplasmático da membrana, enquanto que o de 60 Kd resulta de proteólise da banda 3 a nível da superfície celular plasmática (Steck *et al.*, 1976; Morrison *et al.*, 1985; Jennings *et al.*, 1986). A heterogeneidade da banda 3, bem evidenciada nas bandas difusas obtidas por SDS-PAGE, é atribuída à diferença de tamanho das cadeias de hidratos de carbono, embora outros sugiram também diferenças estruturais na cadeia polipeptídica (Low, 1986). A diversidade no tamanho dos fragmentos proteolíticos evidencia, pois, a heterogeneidade na estrutura primária da proteína banda 3.

Os fragmentos polipeptídicos da banda 3 foram já detectados em membranas eritrocitárias como produtos de proteólise *in vivo*, como produtos de autólise da membrana por acção de endoproteases (Golovtchenko *et al.*, 1982) e como produtos da

acção proteolítica de diferentes proteases como a tripsina, quimotripsina, pronase, elastase do neutrófilo etc. (Morrison *et al.*, 1985; Claster *et al.*, 1986; Czerwinski *et al.*, 1988). A proteólise da banda 3 *in vivo* poderá determinar a exposição do local antigénico designado por neoantigénio de senescência (Kay *et al.*, 1983; Kay, 1984). A degradação da banda 3, por permitir uma melhor movimentação lateral da proteína na membrana, facilita a polimerização da banda 3 (Tsuji *et al.*, 1986) e a agregação da proteína permitirá, por sua vez, uma ligação bivalente dos anticorpos, a qual não era possível anteriormente (Lutz *et al.*, 1987; Lutz *et al.*, 1991; Lutz 1992a). De facto, o processo de senescência eritrocitária é acompanhado de agregação da banda 3, a qual parece iniciar os processos imunológicos conducentes à remoção por fagocitose (Schluchter *et al.*, 1986; Lutz, 1990; Kay, 1991; Low, 1991; Lutz, 1992a).

2.2.3. - Variações nas Propriedades Físicas.

As diversas lesões bioquímicas que o eritrócito circulante sofre e acumula ao longo da sua vida, determinam alterações físicas na célula, nomeadamente, aumento da densidade e da fragilidade osmótica e mecânica e redução da capacidade de deformabilidade.

A viscosidade intracelular acrescida e a redução da área de superfície do eritrócito senescente, limitam a capacidade de deformabilidade e de alongação da célula (Nash *et al.*, 1993; Bosch *et al.*, 1994). Inicialmente pensava-se que a perda de deformabilidade se devia a uma maior rigidez da membrana, todavia, estudos posteriores mostraram que esta se deve predominantemente ao aumento da viscosidade interna (Nash *et al.*, 1993). A perda de deformabilidade determina uma circulação mais lenta da célula através de vasos sanguíneos de pequeno diâmetro, como por exemplo no baço, ou mesmo a sua sequestração se não conseguir deformar-se por forma a conseguir atravessá-los (Uyesaka *et al.*, 1992a). Esta perda de capacidade de deformabilidade, torna, portanto, o eritrócito susceptível de sequestração no baço e outros órgãos. Em determinadas doenças hemolíticas, tais como, esferocitose, eliptocitose, doença das células falsiformes e anemias imuno-hemolíticas, a rigidez da membrana eritrocitária dificulta ou impede a passagem da célula através dos sinusóides esplénicos. A estase eritrocitária a nível esplénico, num ambiente deficiente em glucose e de pH baixo, compromete a actividade metabólica do eritrócito e provoca a diminuição dos níveis de ATP e a falência das bombas catiónicas, de que resulta a perda de K⁺ e a instabilidade da membrana. Acresce que nestas patologias a célula está já sob stress metabólico, devido a um aumento da

permeabilidade passiva ao Na^+ e K^+ ou a alterações na composição ou estrutura da membrana, que torna essas células particularmente sensíveis à estase a nível esplénico. Também o contacto prolongado com os macrófagos activados, de elevado poder oxidante e proteolítico, acentuará o stress metabólico da célula e, por consequência, a depleção de K^+ , podendo ainda promover modificações oxidativas e proteolíticas nas proteínas da membrana e nas proteínas citoplasmáticas. Passagens consecutivas destas células na circulação esplénica poderão determinar modificações cumulativas no eritrócito, até ao momento em que a célula, atravessando a circulação esplénica, é reconhecida como senescente, sendo então sequestrada e destruída.

As propriedades da membrana, no que se refere à sua composição e estrutura, são também importantes para a definição da elasticidade ou de deformabilidade do eritrócito. A elasticidade da membrana assegura a deformação do eritrócito, quando sob a acção de uma força, e a recuperação da forma inicial, logo que cesse a mesma. A estabilidade da membrana refere-se à capacidade de deformabilidade sem rotura estrutural da membrana, isto é, sem fragmentação. Tanto a elasticidade da membrana como a sua estabilidade dependem das proteínas estruturais subjacentes à bicamada lipídica. Todavia, parecem ser determinadas por diferentes aspectos da estrutura proteica (Chasis et al., 1986). A estabilidade da membrana depende essencialmente da integridade do citosqueleto, enquanto a elasticidade se relaciona primordialmente com perturbações estruturais e na interacção da espectrina com outras proteínas da membrana eritrocitária. Estudos feitos sobre a relação entre alterações hereditárias na estrutura e composição das proteínas do citosqueleto, com elasticidade e estabilidade da membrana mostraram que, por si só, não esclareciam e não eram coerentes com as observações referidas sobre o comportamento das respectivas membranas. A forte correlação entre a densidade da espectrina, relativamente à banda 3, com a elasticidade da membrana e ainda o facto de uma redução rotacional e translacional da banda 3 na membrana, observada na variante desta proteína, determinar uma redução na elasticidade e estabilidade da membrana, gerou controvérsia quanto ao papel das proteínas integrais nestas propriedades da membrana. A mobilidade reduzida da banda 3, possivelmente do seu N-terminal citoplasmático, inibe o movimento da molécula de espectrina, determinando a rigidez observada na membrana (Schofield et al., 1992). Contudo, a deficiência em glicoforina C outra proteína integral associada ao citosqueleto não determina rigidez na membrana.

Várias modificações físicas e químicas foram induzidas na membrana eritrocitária, no sentido de avaliar o seu efeito na elasticidade e estabilidade da membrana. Induziu-se o

“cross-linking” de proteínas, quer especificamente sobre as moléculas de espectrina, quer sobre proteínas em geral e as modificações oxidativas mostraram algum impacto sobre a elasticidade da membrana, nomeadamente a formação de pontes dissulfureto por acção da diamida ou com t-butil hidroperóxido (Corry et al., 1980) ou com radicais superóxido. Em todos os casos se observou uma maior rigidez na membrana. A desnaturação e agregação da espectrina por aquecimento ou acidez revelou um efeito semelhante sobre a membrana.

A rigidificação da membrana por “cross-linking” das suas proteínas é lógica para qualquer modelo cuja elasticidade dependa do movimento relativo entre as suas moléculas. Todavia, o facto de a dissociação dos tetrâmeros de espectrina determinar uma maior rigidez da membrana veio lançar controvérsia nesta área e mostrou que a interacção das moléculas de espectrina e o seu impacto na elasticidade da membrana é mais complexa. Posteriormente, foi também referido que a ligação de anticorpos à membrana determinava um aumento da rigidez da membrana (Chasis et al., 1988). No caso da glicoforina A, a sua ligação com o respectivo anticorpo anti-glicoforina A, induzia uma redução da elasticidade da membrana devido a uma nova interacção entre o domínio citoplasmático desta proteína, com o citosqueleto. Este trabalho constituiu mais uma evidência de que a interacção de proteínas do citosqueleto com proteínas integrais podem modular a elasticidade e estabilidade da membrana.

A depleção metabólica observada nas células senescentes tem também reflexo na deformabilidade da célula. A depleção em ATP pode modificar a viscosidade interna, por limitar a acção das ATPases, reguladoras da concentração iónica intracelular; por limitar a troca de fosfolípidos da membrana com o plasma e ainda o movimento de “flip-flop” fosfolipídico; por limitar os processos de fosforilação como dador de fósforo; por limitar a regulação de transglutaminases, etc. A depleção em GSH limitará os processos de desintoxicação da célula em produtos nocivos, nomeadamente em formas activas de oxigénio.

As propriedades físicas e químicas da membrana, apesar de determinadas de uma forma relevante pelas proteínas do citosqueleto, são também reflexo dos outros componentes da membrana, de uma equilibrada interacção molecular entre os diferentes constituintes da membrana e destes com o meio interno e externo e dos múltiplos mecanismos metabólicos do eritrócito.

2.2.4. - Por Ligação de Auto-anticorpos.

Kay (1975) foi a primeira investigadora a mostrar que eritrócitos mais densos e eritrócito envelhecidos *in vitro*, apresentam auto-anticorpos ligados à sua membrana, os quais são imunoglobulinas do tipo IgG. Mostrou ainda que a sua presença promove, *in vitro*, a fagocitose de eritrócitos senescentes, sugerindo o envolvimento destes anticorpos no processo de remoção eritrocitária. Singer *et al.*, (1986) mostrou, algum tempo depois, que eritrócitos envelhecido *in vivo*, usando como modelo experimental o rato hipertransfundido, apresentavam também auto-anticorpos ligados à sua membrana. Referiu ainda a sua quase ausência nas células jovens e corroborou o envolvimento destes auto-anticorpos no processo de desencadeamento da eritrofagocitose pelos macrófagos.

O auto-anticorpo de senescência não é um anticorpo inespecífico ou citofílico, mas sim uma IgG que se liga especificamente pela região Fab à célula senescente e de uma forma cumulativa (Khansari *et al.*, 1983). Um estudo *in vitro*, com macrófagos esplênicos do rato e eritrócitos autólogos novos e velhos, mostrou que a fagocitose das células jovens era praticamente nula (5%) e que a dos eritrócitos de meia-idade (23%) se situa entre a destes e a dos eritrócitos senescentes (50%), o que sugere o desenvolvimento do antigénio de senescência de uma forma cumulativa e que, só quando atingido um determinado limiar, se desencadeia a fagocitose (Kay *et al.*, 1991c).

Se a especificidade do auto-anticorpo foi rapidamente definida, o mesmo não se pode afirmar relativamente à modificação que tem lugar a nível da membrana eritrocitária da célula e que determinará a ligação do auto-anticorpo. Esta modificação, por se observar com maior predominância nas células senescentes e promover a ligação de auto-anticorpos que marcam a célula para a morte, para remoção fagocítica, tomou a designação de neoantigénio de senescência.

A presença e o papel do neoantigénio de senescência parece não se circunscrever à remoção fisiológica de eritrócitos senescentes. Em algumas anemias hemolíticas com patologia associada a envelhecimento acelerado observa-se uma ligação exacerbada desses auto-anticorpos (Hebbel *et al.*, 1984; Green *et al.*, 1985; Yuan *et al.*, 1992). Também no decorrer do armazenamento sanguíneo e ainda em caso de lesão oxidativa eritrocitária se observa uma maior interacção com os mesmos auto-anticorpos. Esta mesma interacção é observada nas outras células sanguíneas, leucócitos e plaquetas, e ainda em células senescentes de outros tecidos (Kay, 1991a; Kay *et al.*, 1991b).

A etiologia da modificação celular determinante da ligação de auto-anticorpos suscitou grande interesse e também controvérsia. Segundo alguns, a ligação de auto-

anticorpos e a fagocitose requeria o desaparecimento dos resíduos terminais de ácido siálico das glicoproteínas da membrana eritrocitária e subsequente exposição dos penúltimos resíduos, de galactose (Galili *et al.*, 1986; Beppu *et al.*, 1992). A natureza do neoantigénio de senescência ficou definitivamente esclarecida em 1981 por Kay, que isola o auto-anticorpo ligado à membrana de eritrócitos senescentes, por cromatografia de afinidade. Da eluição da coluna obteve, para além da IgG, um polipeptido com um peso molecular aproximado de 62 Kd, migrando na região da proteína 4.5 ou, mais precisamente, um sialoglicopeptido, uma vez que corava pela dansil-hidrazina. Kay mostrou ainda neste trabalho, que o mesmo polipeptido estava presente em plaquetas, linfócitos e neutrófilos envelhecidos por armazenamento, bem como em células hepáticas e renais em cultura, sugerindo que este mecanismo imunológico de remoção de eritrócitos senescentes ou lesados, possa constituir um processo fisiológico de remoção de células somáticas senescentes.

2.2.4.1. - A Relação do Neoantigénio de Senescência com a Banda 3.

Estabelecida a natureza glicoproteica do neoantigénio e considerando que o eritrócito é incapaz de sintetizar proteínas, o neoantigénio resultará de modificações numa proteína da membrana eritrocitária de peso molecular superior ao do glicopeptido identificado como neoantigénio de senescência. Em conformidade, Kay *et al.* elaboraram um estudo em 1983, o qual permitiu estabelecer que o neoantigénio está imunologicamente relacionado com a proteína banda 3 da membrana. Tanto a banda 3 como o neoantigénio de senescência isolado de eritrócitos senescentes, após incubação com o anticorpo, anulam a capacidade indutora de fagocitose das IgG's. O mesmo não se verificou com nenhuma das outras proteínas da membrana eritrocitária. Além disso, anticorpos dirigidos para a banda 3 e para o antigénio de senescência, produzidos em ratos, e IgG's eluídas de células senescentes, reagem quer com a banda 3 quer com os respectivos produtos de degradação, que incluem peptidos de 60, 40 e 20 Kd de peso molecular aproximado. Ficou assim estabelecido que estas moléculas possuem determinantes antigénicos comuns, ausentes em qualquer outra proteína de membrana.

2.2.4.2. - Identificação dos Determinantes Antigénicos da Proteína Banda 3.

A identificação dos locais antigénicos da proteína banda 3 foi feita através de peptidos sintéticos (Kay *et al.*, 1990), cuja síntese foi executada de acordo com a sequência elaborada por Tanner (referido em Kay *et al.*, 1990).

Os determinantes antigénicos do neoantigénio de senescência localizam-se nos resíduos 538-554 e 788-827, ambos de localização extracelular. Este último, pertence ao terminal COOH e está implicado, bem como o primeiro, no transporte aniónico. Ambos apresentam também aminoácidos que se ligam por covalência com o inibidor de transporte aniónico DIDS (diisotiociano di-hidrotilbeno). Os hidratados de carbono que entram na composição da proteína, não estão envolvidos na antigenicidade da proteína banda 3, uma vez que a remoção dos determinantes antigénicos identificados na molécula, anulam completamente a capacidade de ligação de IgG's. De resto, a disfunção do transporte aniónico nos eritrócitos senescentes, fazia já supôr que os determinantes antigénicos se localizariam a nível de peptidos envolvidos no transporte aniónico. Da mesma forma presunha-se a localização extracelular destes peptidos, dado que a molécula de IgG com um peso molecular de 150 Kd só poderia interagir com um determinante antigénico localizado à superfície da membrana eritrocitária.

2.2.4.3. - Exposição do Neoantigénio e Ligação dos Auto-anticorpos.

Os auto-anticorpos ligam-se a eritrócitos senescentes, eritrócitos envelhecidos *in vitro* e a eritrócitos lesados por oxidantes.

Considerando o peso molecular do neoantigénio de senescência, seria de esperar que a simples exposição do neoantigénio por proteólise determinasse a sua ligação ao auto-anticorpo. Todavia, a exposição de eritrócitos à acção proteolítica da quimiotripsina, com produção de dois fragmentos peptídicos de aproximadamente 60 Kd e 40 Kd, não determina a ligação de IgG (Steck *et al.*, 1976; Steck *et al.*, 1978). Portanto, a ligação dos anticorpos não se deve a uma simples exposição do antigénio por proteólise, requerendo provavelmente outras modificações na membrana eritrocitária.

A proteína banda 3 nativa não reage com o auto-anticorpo, ao contrário do peptido de 62 Kd, identificado como neoantigénio de senescência. Todavia, quando desnaturada pelo SDS os auto-anticorpos anti-banda 3 reagem não só com a proteína como com os seus produtos de degradação. A presença de fragmentos peptídicos de banda 3 na membrana dos eritrócitos circulantes, sugere que a proteólise desta proteína possa constituir uma modificação fisiológica associada ao processo de senescência e ser também iniciadora, ou não, da ligação de auto-anticorpos (Kay *et al.*, 1991c).

O eritrócito, ao longo da sua vida em circulação, desenvolve lesões bioquímicas à medida que envelhece e que determinam directa ou indirectamente a ligação de auto-anticorpos anti-banda 3 à membrana. É de notar que essas modificações podem surgir por

depleção metabólica da célula, por lesão celular determinante de envelhecimento acelerado, por envelhecimento de eritrócitos *in vitro*, ou, ainda, por lesão oxidativa da célula. Em todos os casos pode observar-se proteólise e agregação da banda 3.

Alguns autores defendem que o neoantigénio de senescência resulta da agregação da banda 3 seguida de proteólise (Kay *et al.*, 1991c), enquanto outros, defendem que a agregação da banda 3 resultante de lesão oxidativa é a responsável pela exposição do neoantigénio de senescência (Low *et al.*, 1985; Lutz 1987; Low, 1991; Lutz *et al.*, 1992a; Lutz *et al.*, 1992b) e subsequente opsonização.

2.2.4.4. - A Agregação de Banda 3 Expõe o Neoantigénio de Senescência.

A agregação de banda 3, que surge na sequência de diversas lesões bioquímicas incluídas no perfil bioquímico de senescência eritrocitária (Corbett *et al.*, 1993), induz posteriormente a sua opsonização por IgG's. Nas lesões bioquímicas do perfil de senescência eritrocitária indutoras de agregação de banda 3 incluem-se, entre outras, a depleção em ATP, formação de MDA, acumulação de Ca^{++} , lesões oxidativas, enfraquecimento do citosqueleto e, ainda, a ligação de hemicromos à porção amino terminal da banda 3 (Muller *et al.*, 1983; Low, 1991).

Se a proteína banda 3 é modificada por lesões bioquímicas tão diversas, pode constituir o "tradutor" dos sinais de *stress* intracelular para o exterior da célula. De facto, se as IgG's reconhecem microscópicos agregados de banda 3, opsonizando-os, então, várias lesões bioquímicas podem ser detectadas e traduzidas para o sistema imune, por um simples marcador celular - a banda 3.

Segundo Low (1991), o processo inicia-se com a desnaturação da hemoglobina, a qual pode ter origem em diversas lesões bioquímicas, sendo o eritrócito removido quando se apresente "modificado", independentemente da sua idade cronológica.

2.2.4.4.1. - Desnaturação da Hemoglobina Causa Agregação da Banda 3.

Embora a desnaturação da hemoglobina não seja a única alteração eritrocitária capaz de induzir a agregação de banda 3, parece todavia constituir o indutor principal, em condições fisiológicas.

Segundo Low (1991), o processo inicia-se com a desnaturação de hemoglobina, isto é, com a formação de hemicromos que ligando-se à porção aminoterminal da banda 3 (Waugh *et al.*, 1985), promovem a agregação da banda 3. A formação de agregados de banda 3 pode ser induzida *in vitro*, por acção de desnaturantes da hemoglobina (Low *et*

al., 1985). Podem também ser observados em eritrócitos com patologia associada à formação de corpos de Heinz, como as células falsiformes (Schluter *et al.*, 1986). Estes agregados ocorrem ainda em células talassémicas, em células com um poder redutor inadequado, em células das fracções mais densas (Kannan *et al.*, 1988; Kannan *et al.*, 1991). Em todos os casos, estes agregados apresentam como principal componente a banda 3.

A agregação de banda 3 induzida por um agente oxidante, como a fenil hidrazina, ou por um agregante directo da banda 3 (que não afecta a estabilidade da hemoglobina), promove sempre a ligação de IgG a esses agregados (Low *et al.*, 1985). De facto, vários agentes agregantes de proteínas integrais do eritrócito foram estudados (Lelkes *et al.*, 1983) e com todos eles se observou agregação de banda 3, seguida de ligação de IgG, fixação de complemento e fagocitose por macrófagos humanos. A inibição de qualquer um dos agentes agregantes, inibia também o desenrolar de todo este processo, ficando assim bem definido o papel crucial da agregação da banda 3 na "clearance" eritrocitária.

2.2.4.4.2. - Agregados de Banda 3 Ligam Anticorpos Autólogos do Tipo IgG.

Vários trabalhos evidenciaram a presença de imunocomplexos constituídos por agregados de banda 3 e IgG na membrana de células falsiformes, células talassémicas e de células das fracções mais densas (Kannan *et al.*, 1988; Kannan *et al.*, 1991). Mostraram ainda que os agregados de banda 3 são reconhecidos como antigénios pelo sistema imune.

A reduzida antigenicidade da banda 3 nativa, relativamente aos respectivos agregados, constitui um tema de grande controvérsia. A agregação de banda 3 poderá ocorrer com deformação da proteína, que passará a expôr epítomos antigénicos, que não expunha no estado nativo e que serão reconhecidos como estranhos pelo sistema imune. Outra hipótese será considerar que no processo de agregação se escondam epítomos, habitualmente expostos no eritrócito saudável, e se exponham outros, que serão reconhecidos como estranhos pelo sistema imune. Finalmente, deve ainda considerar-se que os anticorpos anti-banda 3 poderão apresentar uma baixa afinidade para a banda 3 e a ligação entre eles ser do tipo monovalente. A agregação da banda 3 pode modificar essa afinidade por aproximação de vários locais de ligação com o anticorpo, favorecendo-se assim a interacção antigénio-anticorpo e permitindo o estabelecimento de ligações bivalentes (Low, 1991).

Os anticorpos anti-banda 3 estão normalmente presentes no soro humano, sendo, portanto, anticorpos naturais auto-ímmunes (Muller *et al.*, 1983; Kay, 1984).

2.2.4.5. - A Ligação de IgG Autóloga Promove a Deposição de Complemento.

A opsonização de um antigénio pelo respectivo anticorpo promove a fixação de complemento (Lutz, 1992a). A reacção de fixação de complemento favorece a remoção eritrocitária, todavia, o papel desempenhado pela deposição de complemento no processo de eritrofagocitose só ficou definitivamente estabelecida por Lutz *et al.* (1987), demonstrando que a inactivação do complemento presente no soro autólogo inibia largamente a fagocitose de células tratadas com diamida e opsonizadas com IgG's anti-banda 3.

3. - Remoção do Eritrócito Senescente.

Dado o facto de o eritrócito normal humano ser removido em função da idade ou de lesões físicas ou químicas sofridas, os estudos do processo de envelhecimento têm focado obviamente os mecanismos promotores de remoção e destruição da célula senescente. Muitas questões se colocam e permanecem sem resposta. Qual o impacto de cada uma das modificações decorrentes do processo de envelhecimento no despoletamento do processo de remoção? A célula “morre” devido a incapacidade metabólica ou é reconhecida especificamente e é removida antes de atingir um estado crítico de incapacidade funcional? Existem marcadores de senescência à superfície da célula que permitem o seu reconhecimento. Como se desenvolvem? Com que rapidez aparecem? Há alguma interacção entre o processo de envelhecimento eritrocitário e a idade ou estado de saúde de cada indivíduo? A senescência é pré-determinada ou é simplesmente uma manifestação de lesões cumulativas irreparáveis? Estas são algumas das perguntas que se deparam a quem estuda o processo de remoção eritrocitária, e para as quais não existem ainda respostas definitivas.

É reconhecido que o destino último do eritrócito é ser fagocitado por uma célula do sistema mononuclear fagocítico algures no fígado, baço ou medula óssea. Desconhece-se, todavia, se a sua remoção ocorre depois da “morte funcional” da célula ou se a fagocitose é despoletada por um sinal de senescência desenvolvido à superfície da célula.

São duas as hipóteses mais consideradas e estudadas. A primeira assume que a célula senescente é removida devido a uma disfunção intrínseca e a segunda considera que ocorrem alterações exofaciais no eritrócito senescente, que constituirão o “sinal” de reconhecimento pelas células mononucleares do sistema fagocítico, ou seja, este sinal traduzirá a deterioração da função metabólica eritrocitária, e marcará a célula para a remoção, antes que se atinja uma deterioração metabólica efectiva. Esta última é a hipótese que tem merecido mais consideração e atenção por parte dos investigadores nesta área de estudo.

Segundo esta hipótese a marcação da célula para a remoção é feita por exposição do neoantigénio de senescência, que traduz modificações senescentes da célula, e ao qual se ligará o auto-anticorpo anti-banda 3, que estimulará a deposição de complemento. Em conjunto, IgG's e complemento, fornecerão os receptores necessários para que o macrófago possa distinguir entre um “eritrócito maduro” e um “eritrócito senescente” e proceda à sua remoção por fagocitose (Lutz, 1990; Turrini *et al.*, 1991; Lutz, 1992a).

3.1. - O Auto-Anticorpo Natural Anti-Banda 3.

A auto-imunidade tem sido estudada e avaliada como um estado de doença e não como um processo imunológico normal. Os auto-anticorpos têm, aliás, sido utilizados no diagnóstico e estudo das diversas patologias auto-imunes.

A observação de auto-anticorpos anti-banda 3, em condições normais e em indivíduos saudáveis, veio revolucionar aquele princípio e criar novos interesses de investigação nesta área, a fim de esclarecer o papel biológico daqueles anticorpos. Segundo alguns autores, estão envolvidos no reconhecimento da alteração de antigénios "self" em células senescentes ou lesadas, constituindo um mecanismo homeostático específico (Kay, 1975; Lutz, 1990). Nesta perspectiva, é razoável a existência de anticorpos naturais para um ou vários constituintes da membrana eritrocitária.

Os auto-anticorpos naturais têm características particulares e distintas dos anticorpos associados a doenças auto-imunes. Entre estas, referem-se concentrações séricas baixas, reduzida afinidade para os locais antigénicos, interagindo com estes através de ligações monovalentes fracas e, frequentemente, com uma acção bi ou poli-específica.

É reconhecida a existência de anticorpos naturais para a espectrina, para a banda 3, para os fosfolípidos e para o colesterol. Os dois primeiros foram já estudados quanto ao seu envolvimento na remoção eritrocitária, enquanto os últimos nunca foram estudados nesse âmbito.

O envolvimento do anticorpo anti-banda 3 na opsonização, fagocitose e eventual remoção de eritrócitos senescentes *in vivo*, foi já reconhecido em diversos trabalhos (Lutz *et al.*, 1987; Lutz, 1990). Este anticorpo anti-banda 3 existe no soro em reduzidas concentrações (50-100 ng/ml), apresenta uma afinidade baixa para o antigénio e liga-se preferencialmente aos eritrócitos mais densos ou lesados. Estudos *in vitro* mostram que agressões do tipo oxidativo estimulam a ligação de auto-anticorpos, a deposição de complemento (C3b) e, finalmente, a fagocitose (Lutz *et al.*, 1987).

A natureza ubiquitária da proteína banda 3 e do seu anticorpo natural, sugere um mecanismo homeostático imunológico para remoção de eritrócitos e células senescentes. De facto, a proteína banda 3 existe em diferentes células e tecidos, incluindo hepatócitos, células epiteliais, células alveolares dos pulmões, linfócitos, plaquetas, células do parênquima renal, neurónios, fibroblastos (Kay, 1991a; Kay *et al.*, 1991b; Goodman *et al.*, 1994). É também um constituinte habitual das membranas - membrana dos núcleos, dos aparelhos de Golgi, das mitocôndrias e membranas celulares.

Nas células nucleadas a proteína banda 3 exerce funções semelhantes às referidas para a banda 3 eritrocitária. O estudo destas células revelou também o desenvolvimento do neoantigénio de senescência nas células senescentes (Kay, 1981). Além disso, os anticorpos do tipo IgG do soro humano mostraram interagir não só com os eritrócitos humanos, como também com os eritrócitos de rato, de murganho, de vaca, de coelho e de galinha (Kay, 1991c). Portanto, o mecanismo imunológico para remoção de eritrócitos senescentes ou lesados, parece constituir um processo fisiológico para remoção de células programadas para a morte, nos mamíferos e, possivelmente, em outros vertebrados.

3.1.1. - Concentração e Afinidade do Auto-Anticorpo Anti-Banda 3.

Os anticorpos naturais anti-banda 3 existem em reduzida concentração no soro (50 a 100 ng/ml) e têm uma baixa afinidade para o respectivo antigénio. *In vitro*, a ligação óptima antigénio-anticorpo ocorre a concentrações elevadas e é acompanhada de deposição de complemento e exacerbação de fagocitose. A concentração de anticorpo necessário para a indução do processo de fagocitose é 10 a 100 vezes superior ao valor sérico fisiológico do anticorpo anti-banda 3 (Lutz *et al.*, 1987).

Inesperadamente, verificou-se que a concentração de anticorpo anti-banda 3 necessária para promover o mesmo processo era consideravelmente mais baixa, após tratamento oxidativo de eritrócitos jovens, de que resultava, entre outras lesões oxidativas, a oligomerização de banda 3 (Lutz *et al.*, 1991; Low *et al.*, 1985). Mostrava-se, assim, que os eritrócitos apesar de jovens, por agressão oxidativa, adquiriam capacidade de interagir com os auto-anticorpos naturais anti-banda 3. Além disso, sugere que a exposição dos locais antigénicos nas células senescentes, depende mais de uma alteração topológica que de uma modificação química (Lutz, 1992a).

3.1.2. - A Ligação Bivalente do Auto-Anticorpo Fortalece a Ligação ao Antigénio.

A preferência dos auto-anticorpos naturais anti-banda 3 para os oligómeros de banda 3, a presença de oligómeros de banda 3 nos imunoprecipitados de eritrócitos senescentes, a correlação entre a ligação de IgG's e o cross-linking de banda 3, e a ocorrência de agregados de banda 3 de elevado peso molecular em eritrócitos "oxidados", em conjunto, sugerem que os anticorpos anti-banda 3 adquirem funcionalidade por ligação bivalente ao antigénio que sofreu oligomerização (Lutz *et al.*, 1987; Clark, 1988; Lutz, 1992a). A capacidade de ligação do auto-anticorpo natural anti-banda 3 pode aumentar para valores cerca de 1000 vezes superiores àqueles apresentados pela proteína

nativa (Low *et al.*, 1985; Lutz, 1990). A ligação bivalente é estabelecida entre o anticorpo e a banda 3 oligomerizada, em concentrações tão baixas que se a ligação fosse do tipo monovalente ocorreria facilmente a dissociação.

A ligação do anticorpo pela região Fab fornece receptores para os macrófagos - a região Fc (Khansari *et al.*, 1983). Todavia, o número de receptores oferecidos pelas IgG's anti-banda 3 não são em número suficiente para promover o reconhecimento pelo macrófago. A opsonização da banda 3 constitui, pois, a primeira etapa na aquisição de funcionalidade do anticorpo, mas não a suficiente para promover a fagocitose do eritrócito senescente ou lesado.

3.1.3. - Anticorpos Anti-Banda 3 Estimulam a Deposição de Complemento (C3b) pela Via Alternativa.

A etapa seguinte, que permitirá adquirir e fornecer receptores em número suficiente para o reconhecimento da célula lesada, pelo macrófago, será a deposição de complemento (Fries *et al.*, 1987; Lutz, 1992a).

Vários anticorpos estimulam a deposição de complemento, todavia, o anticorpo anti-banda 3 pertence a um pequeno grupo que estimula a deposição de complemento pela via alternativa (Lutz, 1990).

A importância do C3b como opsonina na remoção de eritrócitos senescentes ou lesados foi durante algum tempo questionada. Todavia, diferentes laboratórios evidenciaram o envolvimento da deposição de C3b no processo de fagocitose e remoção de eritrócitos *in vitro* ou *in vivo* (Szymanski *et al.*, 1985; Lutz *et al.*, 1991; Lutz, 1992a). O mecanismo de interação, embora controverso, parece envolver a deposição preferencial de C3b ao imunocomplexo constituído pelas IgG's e oligómeros de banda 3, através de uma ligação covalente com a IgG (Fig. 5) (Ehlenberger *et al.*, 1977).

A maioria das proteínas e das IgG's podem ligar-se covalentemente ao C3, quando activado. O C3b, resultante desta activação pode interagir com aquelas, estabelecendo ligações amida com os grupos amina, ligações éster com os resíduos de tirosina e de serina. O tipo de ligação estabelecida entre o C3b e o imunocomplexo (anti-banda 3 / oligómero de banda 3) é controversa. É reconhecida, todavia, a sua interação preferencial com um local perto da região de ligação do anticorpo ao antígeno e que a ligação parece fazer-se com a porção (Fab)₂ da imunoglobulina e não com a porção Fc. A preferência do C3b pelos anticorpos anti-banda 3 é de extrema importância funcional, pois permite a intensificação selectiva do sinal de senescência ou de lesão eritrocitária.

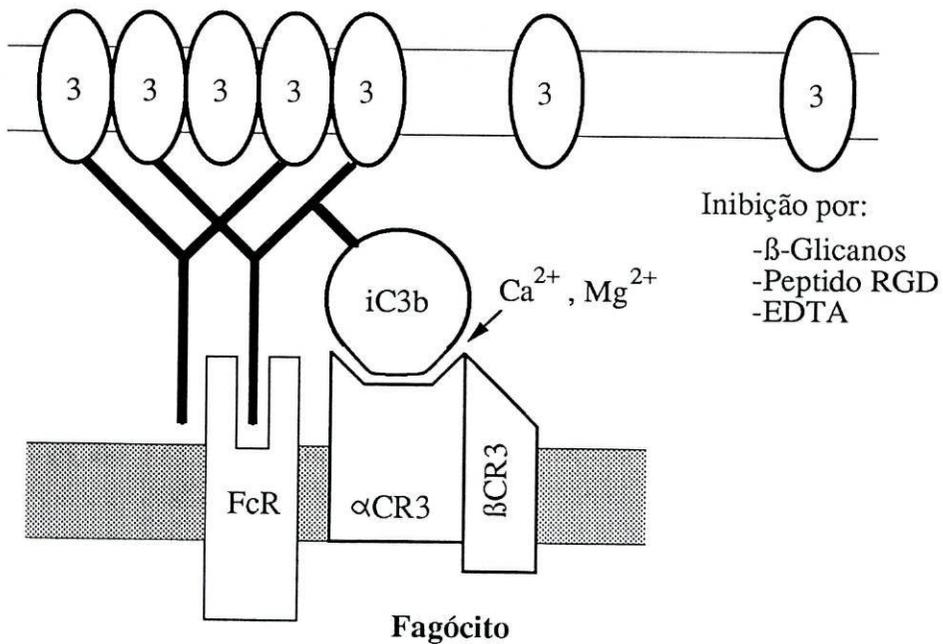
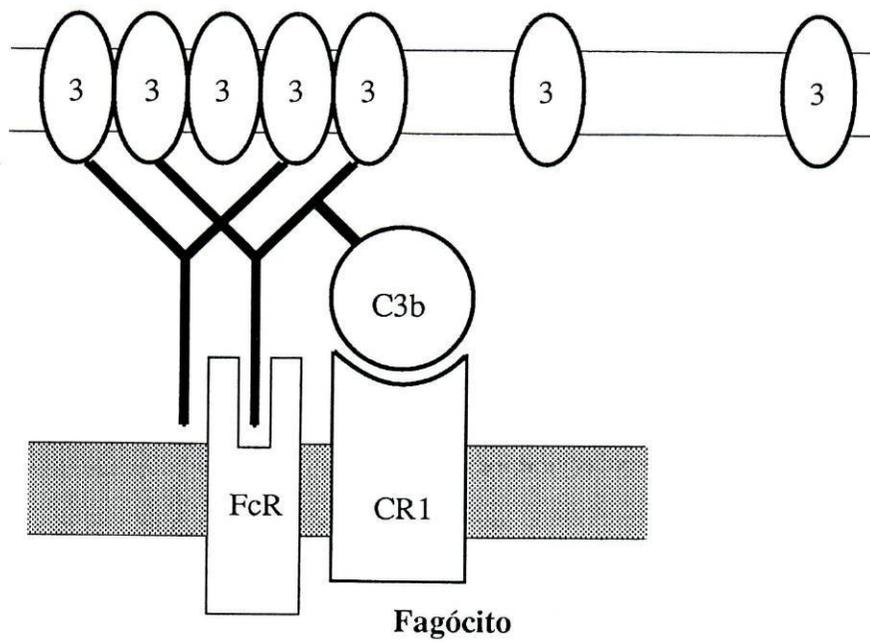


Fig. 5: Interações possíveis entre eritrócitos opsonizados com anticorpos anti-banda 3 e C3b/iC3b, com fagócitos. A figura ilustra as duas possibilidades de reconhecimento de eritrócitos senescentes opsonizados, portadores de imunocomplexos C3b/anti-banda 3, pelos fagócitos. Não estando o C3b inativado, o reconhecimento ocorre via FcR e CR1 (A). Uma vez inativado o C3b a iC3b, os fagócitos interagem com estes imunocomplexos via CR3 e FcR (B). Esta última interação requer a presença de catiões divalentes e é inibida pelas substâncias que se referem. Adaptado de Lutz, H. U. (1992a)

A opsonização pelo complexo C3b - anti-banda 3, que se liga de forma bivalente a oligómeros de banda 3, medeia e pode desencadear o processo de reconhecimento e remoção da célula senescente, por activação dos receptores FcR e CR1 dos fagócitos (Fries *et al.*, 1987). No decorrer do processo pode ocorrer inactivação do C3b (iC3b). Neste caso, a fagocitose envolverá para além do receptor FcR, um receptor diferente para o iC3b, o receptor CR3 e decorre na presença de catiões bivalentes, como o ião cálcio e magnésio. O CR3 é um receptor heterodimérico, com uma sub-unidade alfa, que constitui o receptor para o iC3b, e uma sub-unidade beta, que é o receptor para os β -glicanos.

A forma como os anticorpos anti-banda 3 adquirem funcionalidade permite compreender não só a remoção de eritrócitos senescentes, como também a remoção prematura de eritrócitos portadores de determinadas patologias e que associam frequentemente anemia. É o caso da doença das células falsiformes, das hemoglobinopatias, das crises hemolíticas por deficiência em G6PD. Efectivamente, em todos os casos referidos é reconhecida uma maior opsonização dos eritrócitos por anticorpos anti-banda 3 (Schluter *et al.*, 1986; Kannan *et al.*, 1988) e em alguns casos foi possível detectar um aumento no complexo C3b - anti-banda 3 (Schluter *et al.*, 1986).

Em suma, os anticorpos anti-banda 3 são auto-anticorpos naturais, com propriedades distintas dos anticorpos induzidos. A reduzida afinidade para a proteína banda 3 permite-lhes fazer a distinção entre eritrócito maduro e eritrócito senescente ou lesado. A oligomerização da banda 3 determina um aumento dessa afinidade e inicia a ligação do auto-anticorpo. A interacção do auto-anticorpo anti-banda 3 com o respectivo antigénio é, portanto, controlada por modificações intracelulares, que são traduzidas para a superfície celular por oligomerização da banda 3.

Capítulo II

Capítulo II

O <i>Stress</i> Oxidativo	67
1. A importância do oxigênio	68
1.1. Origem e reactividade dos radicais livres de oxigênio	68
1.2. Antioxidantes fisiológicos	70
2. A importância dos mediadores de activação leucocitária	72
3. O <i>stress</i> oxidativo “não fisiológico” no eritrócito	75
3.1. <i>Stress</i> oxidativo de origem intracorpúscular	75
3.2. <i>Stress</i> oxidativo de origem extracorpúscular	75
4. O <i>stress</i> oxidativo no exercício físico	79
5. O <i>stress</i> oxidativo nas doenças cardiovasculares	84

II - O *Stress* Oxidativo.

1. - A Importância do Oxigénio.

Joseph Priestley ao descrever o oxigénio especulou desde logo que o oxigénio podia ser simultâneamente útil e nefasto para o organismo. A coexistência na célula de sistemas bioquímicos dependentes do oxigénio e de metais como o ferro, sem o desenvolvimento de um estado de auto-destruição impunha a resolução deste “paradoxo” bioquímico. De facto, o oxigénio que é um composto relativamente pouco reactivo, dada a sua configuração electrónica, pode, todavia, ser metabolizado *in vivo*, com formação de produtos oxidantes de elevada reactividade (Bast *et al.*, 1991).

A presença de metabolitos de oxigénio na microcirculação, bem como a sua importância na génese e desenvolvimento de diferentes patologias, nomeadamente naquelas relacionadas com isquémia, com processos infecciosos ou inflamatórios que envolvem a acção das células fagocíticas, e ainda a sua importância no processo de envelhecimento, torna-se cada vez mais evidente. Aliás, a correlação positiva entre a longevidade das diferentes espécies animais e os respectivos níveis de anti-oxidantes naturais, é bem sugestiva da importância dos mecanismos de defesa anti-oxidante na génese de patologias associadas a *stress* oxidativo e consequente redução da longevidade das espécies animais (Kay *et al.*, 1991c).

A produção exacerbada de oxidantes pode ser desencadeada quer por processos “fisiológicos”, como o exercício físico e a gravidez, quer por processos patológicos, de natureza infecciosa ou inflamatória, tais como as doenças cardiovasculares, doenças associadas a envelhecimento, neoplasias, artrite, cataratas e viroses ou ainda em resposta a agentes farmacológicos ou tóxicos.

Sempre que se verifique uma produção de oxidantes numa quantidade superior à capacidade de resposta dos mecanismos antioxidantes, desenvolver-se-á uma situação de *stress* oxidativo (Bast *et al.*, 1991), que poderá determinar a morte da célula (Butke *et al.*, 1994; Fossel *et al.*, 1994).

1.1. - *Origem e Reactividade dos Radicais Livres de Oxigénio.*

Os oxidantes endógenos incluem aqueles resultantes da respiração mitocondrial, enzimas como a lipoxigenase e xantina-oxidase (Parks, 1986), o sistema NADPH

oxidase/ mieloperoxidase dos fagócitos (Klebanoff, 1988) e da oxidação da hemoglobina (Jandl, 1987). São exemplos de oxidantes de origem exógena os constituintes naturais da dieta, as radiações UV, gases radioactivos naturais, poluentes ambientais como os gases de combustão e o fumo do tabaco (Halliwell *et al.*, 1984; Cerutti, 1985).

Dois dos sistemas enzimáticos envolvidos na redução de oxigénio, pela sua localização a nível das células endoteliais - xantina oxidase - e das células fagocíticas - NADPH oxidase (Phan *et al.*, 1989; Halliwell, 1991) - desempenham um papel importante na produção de metabolitos de oxigénio que ganhando facilmente a circulação sanguínea, aí exercerão uma acção oxidativa importante, ou, podendo ser veiculados a longas distâncias do local de produção, poderão determinar modificações oxidativas de uma forma generalizada.

Os radicais livres caracterizam-se pela sua reactividade, actuando a nível das diferentes estruturas celulares e também a nível da membrana celular (Cochrane, 1991). A este nível é bem conhecido o seu efeito sobre as proteínas e ainda a lipoperoxidação. A lipoperoxidação reveste-se de uma importância relevante por constituir um processo em cadeia, isto é, em que a formação de um radical lipídico desencadeia a propagação do processo lipoperoxidativo, que tem como um dos muitos produtos finais o MDA. Estes, para além dos efeitos locais directos sobre outros compostos da membrana celular, podem difundir-se e exercer a sua acção em locais distantes do sítio de produção, generalizando e amplificando o processo oxidativo (Jenkins *et al.*, 1993). Dos efeitos locais directos da lipoperoxidação, sobre a membrana celular, salientam-se a redução na fluidez da membrana, incapacidade da membrana para manter os gradientes iónicos e, portanto, para manter o equilíbrio electrolítico da célula, o que se reflectirá num aumento do volume celular (Alessio, 1992).

Os metabolitos de oxigénio apresentam uma reactividade distinta e característica (Halliwell, 1991). A reactividade do superóxido é determinada pelo valor de pK da dismutação espontânea para o valor de pH fisiológico, isto é, do pH do meio circundante. Assim, só reagirá com substratos que apresentem valores de pK competitivos. O superóxido pode reduzir substratos como o ferricitocromo c, quinonas, complexos de metais de transição ou, pelo contrário, pode oxidar substratos como o ácido ascórbico, alfa-tocoferol, catecóis, catecolaminas, tetrapirróis, hemoproteínas e tióis (Fridovich, 1983; Halliwell *et al.*, 1984; Weiss, 1986). A restrita reactividade do superóxido permite a sua difusão a longa distância nos sistemas biológicos (Weiss, 1986). O peróxido de hidrogénio é uma forma activa de oxigénio mas não um radical livre de oxigénio, embora

seja muitas vezes referido e incluído incorrectamente neste grupo. É um poderoso oxidante, mas reage lentamente com os diferentes substratos orgânicos e inorgânicos. No entanto, reage com iões de metais de transição e com os seus complexos orgânicos e inorgânicos, para produzir poderosos oxidantes como o radical hidroxilo. O radical hidroxilo, ao contrário dos metabolitos anteriores, é um oxidante extremamente poderoso e nocivo para os sistemas biológicos, pois reage quase indiscriminadamente com os diferentes substratos biológicos (Halliwell *et al.*, 1984). Ainda em oposição aos outros metabolitos, a sua reactividade implica um mecanismo de acção directa no local de produção e não a longas distâncias.

Uma situação de *stress* oxidativo envolve, portanto, a formação de radicais livres, que, além de poderem actuar directamente sobre os substratos vizinhos, podem difundir-se, ganhar a circulação sanguínea, exercendo a sua acção oxidativa sobre os constituintes sanguíneos ou sobre outros substratos biológicos, distantes do local de produção.

A dificuldade de detecção e doseamento da actividade de radicais livres nos sistemas biológicos tem sido rodeada através do estudo de biomarcadores de *stress* oxidativo, nomeadamente o estudo da actividade das enzimas envolvidas nos sistemas de defesa anti-oxidante; o doseamento de produtos finais ou intermediários da peroxidação lipídica (MDA, dienos conjugados, pentano, etc.) (Lovlin *et al.*, 1987; Pryor, 1991; Alessio, 1993); a depleção em anti-oxidantes fisiológicos como a vitamina C, vitamina E e glutatião; o doseamento de produtos de oxidação de bases do ADN (Pryor *et al.*, 1991; Alessio, 1993).

De facto, e apesar do reconhecido envolvimento de *stress* oxidativo na génese de diferentes patologias, a avaliação do estado oxidativo não é ainda usado na clínica para o diagnóstico ou prevenção dessas patologias. A ausência de padronização dos métodos conhecidos, bem como dos respectivos valores de referência em condições saudáveis e, quiçá, a ausência de métodos ou marcadores mais sensíveis, justificam a não aplicação à clínica de diagnóstico.

1.2. - Antioxidantes Fisiológicos.

As defesas fisiológicas contra o *stress* oxidativo incluem, para além dos anti-oxidantes vitamínicos da dieta (Sakamoto *et al.*, 1993), os anti-oxidantes sintetizados no organismo (Bast *et al.*, 1991) e ainda pequenas moléculas resultantes de processos metabólicos, como a bilirrubina e o ácido úrico (Olson *et al.*, 1992; Krinsky, 1992).

Obviamente, apenas os anti-oxidantes de origem exógena podem ser manipulados através da dieta ou de suplementos terapêuticos (ácido ascórbico, alfa-tocoferol, β -caroteno). O ácido ascórbico tão necessário à síntese de colagénio é hoje também reconhecido como um importante anti-oxidante em todas as células do organismo, nomeadamente no eritrócito, e ainda no meio plasmático, em estreita correlação com o glutatião (Frei *et al.*, 1989; Meister, 1992). À vitamina E é atribuída, para além da sua importância como anti-oxidante e como “scavenger” de radicais livres, um papel importante na aterogénese e nos processos inflamatórios e infecciosos em geral, por inibir a produção de radicais livres e a síntese de prostaglandina E_2 pelo macrófago activado (Libby *et al.*, 1993). O ácido ascórbico pode, contudo, tornar-se nocivo para o organismo como pró-oxidante, quando em concentrações muito superiores às fisiológicas, particularmente em determinadas situações patológicas em que ocorre libertação de grupos heme ou de iões metálicos de proteínas ligantes (hemoglobina, ferritina) (Bast *et al.*, 1991).

No plasma, o ácido ascórbico tem um papel de importância relativa superior a outros anti-oxidantes. Da exposição de plasma à acção de radicais peroxi verificou-se que, enquanto a presença de ascorbato inibia a lipoperoxidação por períodos mais ou menos longos, consoante a concentração de ascorbato, embora de forma não linear, os outros anti-oxidantes normalmente presentes no plasma (bilirrubina, urato, alfa-tocoferol), apenas tornavam o processo mais lento, não o impedindo todavia. O ascorbato, para além de inibir a lipoperoxidação, protege ainda os outros anti-oxidantes plasmáticos (Frei *et al.*, 1989).

A acção dos anti-oxidantes plasmáticos está limitada à lipoperoxidação, pois, nenhum deles, nem mesmo o ascorbato, tem nestas circunstâncias, qualquer efeito inibidor ou protector sobre a oxidação proteica (Frei *et al.*, 1989). Esta incapacidade é sobremaneira grave no eritrócito, por não possuir capacidade de resíntetizar proteínas para substituir as proteínas oxidadas e, ainda, porque a oxidação de determinadas proteínas, como a hemoglobina, pode exacerbar o *stress* oxidativo intra-eritrocitário.

2. - A Importância dos Mediadores de Activação Leucocitária.

Os processos inflamatórios de origem fisiológica, como o exercício físico, ou patológica, como as doenças cardiovasculares, envolvem interacções de diferentes células, com produção de sinais pró-inflamatórios, que determinarão a activação de células inflamatórias e mobilização de proteínas periféricas (células musculares lisas e colagénio) para síntese hepática de proteínas de fase aguda (Schmid- Schonbein *et al.*, 1991). No grupo das células inflamatórias incluem-se para além dos monócitos/macrófagos e dos neutrófilos, que têm um papel sobremaneira importante, as células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas, linfócitos e plaquetas. A activação dos macrófagos e dos neutrófilos torna-as importantes fontes de oxidantes, proteases, factores quimiotácticos e citoquinas, os quais, para além das propriedades quimiotácticas para outras células inflamatórias têm, ainda, capacidade para activar células da mesma linhagem ou de outro tipo (Edwards, 1994a).

Os neutrófilos que integram o "pool" marginal interagem, em condições fisiológicas, com as células do endotélio vascular, sem a ele aderirem, rolando ao longo das paredes dos vasos. A adesão firme pode decorrer na sequência de lesão endotelial ou mesmo na ausência de modificações morfológicas do endotélio vascular (Harlan, 1985; Ginis *et al.*, 1990; Harris *et al.*, 1993). Neste caso, a interacção entre os dois tipos de células resultará de uma alteração funcional da célula vascular ou de uma resposta do neutrófilo a um gradiente quimiotáctico, desenvolvido a nível extravascular, e em que a célula endotelial funciona apenas como uma barreira passiva, sem sofrer modificações na sua morfologia. A adesão firme do neutrófilo ao endotélio vascular antecede a sua migração para o espaço extravascular em direcção ao local de inflamação, e é sobremaneira importante no desenvolvimento de lesões vasculares, por ser acompanhada de desgranulação do neutrófilo no espaço vascular ou próximo deste, sobre as células sanguíneas (Ward, 1991). O efeito citotóxico sobre as células endoteliais, dos radicais activos de oxigénio, produzidos pelo neutrófilo activado, é potenciado pela libertação simultânea de proteases presentes nos seus grânulos (Borregaard *et al.*, 1993). O mecanismo subjacente a este efeito sinérgico não está ainda definido, todavia, supõe-se que o aumento da permeabilidade celular, por exposição das células endoteliais aos radicais activos de oxigénio, tornará também a membrana celular permissiva à entrada e acção de proteases (Ward, 1991).

Tal como os neutrófilos, os monócitos aderem ao endotélio vascular antes de

emigrarem para o local inflamatório, seguindo os gradientes quimiotáticos, e transformando-se na respectiva forma activada, o macrófago.

Os monócitos/macrófago e os neutrófilos activados, são capazes de sintetizar, para além de substâncias potencialmente citotóxicas, outros factores, que poderão interactuar com as outras células sanguíneas e com as células do endotélio vascular, ou, ainda, interactuar com outros tipos de células, como os fibroblastos e as células musculares lisas (Harlan, 1985), activando-as para a síntese de compostos pró-inflamatórios (Libby *et al.*, 1993). São exemplos de mediadores inflamatórios diversas citoquinas, o complemento e metabolitos do ácido araquidónico.

As prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos são metabolitos do ácido araquidónico, resultante da acção da fosfolipase A₂ sobre os fosfolípidos da membrana celular (Samuelson, 1983; Hutton, 1990). A acção de uma lipoxigenase sobre o ácido araquidónico, conduzirá à formação de leucotrienos. Estes, podem ser produzidos por neutrófilos, basófilos, monócitos / macrófagos e plaquetas (Aviram, 1992), apresentam propriedades quimiotáticas para os neutrófilos, promovem a sua adesão às células endoteliais, a sua agregação e uma extensa desgranulação e activação metabólica. As prostaglandinas e os tromboxanos são produzidas a partir do ácido araquidónico, via cicloxigenase e têm uma importância relevante na activação plaquetária.

Os factores do complemento, resultantes da acivação do complemento pela via clássica ou pela via alternativa, têm acção quimiotáctica para os neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos e induzem a sua activação.

Também o “factor activador das plaquetas”, assim chamado por identificar o primeiro substrato reconhecidamente envolvido na acção deste factor, é rapidamente sintetizado após activação de células como os neutrófilos, plaquetas, basófilos, linfócitos do tipo NK (natural killer), monócitos/macrófagos, eosinófilos, mastócitos e células do endotélio vascular, no decorrer de processos inflamatórios ou infecciosos. Para além de induzir activação plaquetária, estimula a produção de ácido araquidónico e tem capacidade quimiotáctica e activadora de neutrófilos (Lehr *et al.*, 1993; Vandongen, 1991).

Diversas citoquinas são também produzidas em resposta a um processo inflamatório, as quais, podem influenciar a função das células inflamatórias maduras ou ainda, estimular a sua produção pela medula óssea (Steinbeck *et al.*, 1989).

A interleuquina -1 pode ser sintetizada pelos monócitos/macrófagos, pelas células endoteliais, pelas células musculares lisas e pelo próprio neutrófilo activado. A sua acção biológica inclui a estimulação da síntese e libertação de proteínas de fase aguda pelo

fígado e a estimulação de linfócitos; promove a libertação de histamina pelos basófilos, de prostaglandinas pelos fibroblastos e pelas células sinoviais; a libertação de neutrófilos pela medula óssea, e de tromboxano A_2 pelos neutrófilos; a activação do macrófago, aumentando a sua citotoxicidade, e do neutrófilo, exacerbando a sua desgranulação.

O interferon é uma linfoquina produzida por linfócitos do tipo "helper", linfócitos T citotóxicos e do tipo NK, em resposta à interleuquina-2 e ao H_2O_2 . Supõe-se que a produção desta linfoquina possa desempenhar um papel regulador e estimulador da fagocitose, por activação do neutrófilo e monócito/macrófago, antes que a resposta imune pelos linfócitos T possa acontecer.

O GM-CSF (granulocyte, monocyte-colony stimulating factor), G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) e M-CSF (monocyte-colony stimulating factor) incluem o grupo dos factores de crescimento, por estimularem a produção, pela medula óssea, de granulócitos e monócitos, granulócitos, ou monócitos, respectivamente. Para além desta função e da capacidade quimiotáctica para as células inflamatórias, actuam sobre as respectivas células maduras circulantes, activando-as (Steinbeck *et al.*, 1989; Libby *et al.*, 1993).

O TNF (tumor necrosis factor) é uma citoquina produzida predominantemente pelos macrófagos activados, embora outras células como os neutrófilos (Ferro *et al.*, 1993), linfócitos, nomeadamente do tipo NK, células endoteliais, fibroblastos e células tumorais também possam produzi-lo. Tem propriedades quimiotácticas para o monócito/macrófago e capacidade para activar estas e também os neutrófilos (Klebanoff *et al.*, 1986).

A interleuquina-8 é também uma citoquina sintetizada essencialmente pelo monócito e macrófago (DeForge *et al.*, 1993; Libby *et al.*, 1993). É um poderoso quimiotáctico dos linfócitos e neutrófilos e também um potente activador dos mesmos (Terkeltaub *et al.*, 1994). A interleuquina-1 e o TNF podem induzir a produção desta citoquina por outro tipo de células, nomeadamente por células endoteliais, fibroblastos e linfócitos.

Uma resposta inflamatória envolve, portanto, alterações hemodinâmicas importantes, com activação, acumulação e interacção dos produtos de bioactivação de células sanguíneas, com células endoteliais, células do tecido conjuntivo ou mesmo do tecido muscular. A resposta pró-inflamatórias terminará logo que se extinga o agente determinante do processo. Um processo crónico ou de desenvolvimento regular, gerará, todavia, um *stress* de natureza crónica, com repercussão a diferentes níveis celulares.

3. - O *Stress Oxidativo* “Não Fisiológico” no Eritrócito.

3.1. - *Stress Oxidativo de Origem Intracorpúscular.*

Como se referiu anteriormente, o processo de oxigenação/desoxigenação da hemoglobina decorre com formação de aproximadamente 0,5 a 3,0% de meta-hemoglobina por dia e de radicais activos de oxigénio. No eritrócito maduro estes radicais serão eliminados pelos mecanismos de defesa anti-oxidante e a meta-hemoglobina reconvertida a hemoglobina pelo sistema meta-hemoglobina redútase principal/NADH ou, ainda, pela meta-hemoglobina redútase acessória/NADPH.

A aceleração do ritmo do processo de oxigenação/desoxigenação, como acontece por exemplo durante o exercício físico ou em qualquer situação que associe um aumento no ritmo cardíaco e respiratório, determinará também uma produção aumentada de meta-hemoglobina e radicais activos de oxigénio. Para que estes não se acumulem, será necessária a aceleração dos mecanismos de regeneração da hemoglobina e de eliminação dos radicais activos de oxigénio. Por incapacidade destes mecanismos em superar o *stress oxidativo*, desenvolver-se-ão lesões oxidativas nos diferentes constituintes eritrocitários, que poderão mesmo determinar a remoção da célula. Recorde-se que ao longo da vida o eritrócito vai adquirindo uma maior sensibilidade ao *stress oxidativo*, por incapacidade de resposta dos mecanismos de defesa anti-oxidante. Esta particularidade torna-o mais vulnerável ao *stress oxidativo* e a uma remoção prematura quando se desenvolve um ambiente de *stress oxidativo*.

3.2. - *Stress Oxidativo de Origem Extracorpúscular.*

Nos processos infecciosos e inflamatórios em que ocorre activação de células inflamatórias, como o monócito, o macrófago e o neutrófilo, são produzidos e libertados radicais activos de oxigénio e proteases, no espaço intra e extracelular (Klebanoff, 1988). Também situações de hiperoxia, hipoxia, reperfusão pós-isquémica, intoxicação por xenobióticos pró-oxidantes, deficiência nos sistemas de defesa anti-oxidante, exposição a radiações ionizantes, são acompanhadas de uma produção acrescida, de radicais activos de oxigénio (Repine, 1991).

O eritrócito, nas diversas situações fisiológicas e patológicas reconhecidamente envolvidas com o desenvolvimento de radicais livres e peróxidos, para além de constituir

um alvo da acção oxidativa dos radicais activos de oxigénio que chegam à circulação sanguínea ou nela são produzidos, é uma célula que, pelas suas características, é um potencial marcador e indicador do *stress* oxidativo sofrido.

É de salientar que os produtos de bioactivação das células inflamatórias incluem, entre outras, substâncias com propriedades quimiotácticas, que promovem o recrutamento de mais células inflamatórias para o local de inflamação; substâncias com propriedades mitogénicas, determinantes da estimulação mielopoiética e ainda substâncias com capacidade de mediar a activação de outras células inflamatórias.

A maioria, se não todas, as situações relacionadas com *stress* oxidativo associam uma leucocitose do tipo neutrofílico a uma anemia ligeira a moderada, com redução no tempo de vida do eritrócito (Weiss *et al.*, 1988; Weiss *et al.*, 1990). Esta associação sugere o envolvimento dos produtos de bioactivação do neutrófilo nas modificações eritrocitárias conducentes a um envelhecimento acelerado e remoção eritrocitária precoce.

É reconhecido que o neutrófilo tem uma capacidade metabólica e uma bateria enzimática e proteásica, a nível das suas granulações neutrófilas e azurófilas, que o tornam capaz de destruir microrganismos. Todavia, para além deste papel de defesa contra o desenvolvimento de processos infecciosos, é também reconhecido que as mesmas substâncias libertadas pelo neutrófilo activado e necessárias à acção bactericida, são também libertadas no meio circundante, contribuindo para lesões oxidativas e proteolíticas (Harlan, 1985; Henson *et al.*, 1987; Lehrer *et al.*, 1990; Amesterdam *et al.*, 1993).

A activação do neutrófilo é acompanhada de uma “explosão” respiratória, com produção de radicais activos de oxigénio, e da libertação de constituintes das granulações, que, em conjunto, são potenciais mediadores de lesão celular e tecidual (Lehrer *et al.*, 1990; Reimer *et al.*, 1990; Amesterdam *et al.*, 1993).

Vários estudos *in vitro* evidenciaram lesões oxidativas a nível das células do epitélio pulmonar e também a nível eritrocitário, produzidas por exposição das células a neutrófilos activados ou por exposição a um ou vários produtos de bioactivação do neutrófilo (Claster *et al.*, 1984; Claster *et al.*, 1987; Claster *et al.*, 1989; Claster *et al.*, 1991). O envolvimento da elastase, um dos constituintes das granulações azurófilas do neutrófilo, na patogénese do enfizema, na modulação da função plaquetária e activação de factores de coagulação e ainda na lesão do endotélio vascular, foi já descrito (Smedly *et al.*, 1986; Claster *et al.*, 1988). Às proteínas catiónicas das granulações foi atribuído *in vitro* capacidade de lise de células tumorais e de eritrócitos (Claster *et al.*, 1988).

No neutrófilo activado é ainda produzido um outro oxidante extremamente

poderoso, o HOCl, por oxidação do cloro pelo H_2O_2 , catalizada pela mieloperoxidase presente na granulação azurófila. Segundo Vercellotti *et al.* (1985) este sistema, actuando na presença de lactoferrina, uma proteína dos grânulos azurófilos, tem uma acção extremamente tóxica para os eritrócitos.

O eritrócito tem constituído o modelo de estudo mais frequentemente utilizado para estudo *in vitro* do processo de activação do neutrófilo e mecanismo de acção dos diferentes produtos libertados. Um dos primeiros estudos nesta área, mostrou que eritrócitos portadores de deficiência em G6PD, na presença de neutrófilos activados, sofriam uma redução no glutatião reduzido e remoção acelerada, após reinfusão autóloga indiciando uma importância relevante para os mecanismos de defesa anti-oxidante e confirmando a capacidade de interacção dos produtos de bioactivação do neutrófilo, com o eritrócito. Outro estudo, feito em eritrócitos normais e eritrócitos portadores de hemoglobinopatias, mostrou que os neutrófilos activados são capazes de oxidar a hemoglobina em solução ou nas células intactas; nas hemoglobinopatias não se observou, todavia, exacerbação do efeito oxidante, o que corrobora a importância dos mecanismos de defesa anti-oxidante.

Estudos posteriores mostraram que a lesão oxidativa da hemoglobina, decorrente da exposição a neutrófilos activados, se deve à acção do H_2O_2 e do superóxido, que atravessam a membrana eritrocitária, via canal aniónico (Weiss, 1980; Weiss, 1982). De facto, o bloqueio da banda 3, a adição de superóxido dismutase, de catalase, ou ainda, a ligação de CO à hemoglobina, inibem a acção oxidativa descrita.

Como já referimos, a oxidação da hemoglobina determina alterações a nível da membrana e em particular a nível da proteína banda 3, que, por sua vez, determinam a ligação de auto-anticorpos anti-banda 3 que, em conjunto com o complemento C3b medeiam a remoção do eritrócito, pelo fagócito. Assim, e como se previa, os neutrófilos activados determinam um aumento na ligação de IgG à membrana eritrocitária, bem como degradação de proteínas de membrana (Weiss *et al.*, 1990). Aliás, o mesmo investigador, mostrou mais tarde que o aumento de IgG's ligadas à membrana, resulta não só da acção dos compostos de activação do neutrófilo de natureza oxidante, como também da acção de proteases do tipo serino-proteases (Weiss *et al.*, 1992). Ou seja, resulta de uma acção combinada de proteases e oxidantes resultantes da activação do neutrófilo.

É importante observar que as modificações determinadas por produtos de activação dos neutrófilos sobre o eritrócito, são sobreponíveis às referidas para o processo de

senescência eritrocitária. Note-se ainda que um processo infeccioso desencadeia com frequência uma crise hemolítica nos indivíduos com anemias hemolíticas congênitas por deficiência nos sistemas de defesa anti-oxidante, e que situações de *stress* fisiológico ou patológico desenvolvem também frequentemente uma anemia ligeira.

Parece pois razoável considerar que a anemia, mais ou menos grave, que se associa a situações de *stress* oxidativo e a leucocitose neutrofílica, possa resultar de uma redução do tempo de vida do eritrócito, por um processo de senescência acelerado, imposto pelo *stress* oxidativo e proteolítico, de origem neutrofílica, que culminará com a remoção precoce do eritrócito.

Com o propósito de estudarmos esta questão tomámos para estudo dois modelos, um modelo fisiológico - o exercício físico - e um modelo patológico - as doenças cardiovasculares - que associam frequentemente uma leucocitose neutrofílica.

4. - O *Stress* Oxidativo no Exercício Físico.

É hoje reconhecido que o exercício físico inicia um processo de *stress* oxidativo (Zerba *et al.*, 1990; Sen *et al.*, 1992; Jenkins *et al.*, 1993), cujo valor se correlaciona com a intensidade e tempo de duração da actividade física (Powers *et al.*, 1994), e que resulta do elevadíssimo acréscimo no consumo de oxigénio e subsequente produção de radicais livres, nomeadamente radicais de oxigénio (Lew *et al.*, 1985; Pyke *et al.*, 1986; Quintanilha, 1988; Zerba *et al.*, 1990; Sen *et al.*, 1992; Jenkins *et al.*, 1993).

A origem dos radicais livres é controversa, bem como o respectivo mecanismo e local de acção. Os radicais livres podem resultar de diversas modificações impostas pelo exercício físico, nomeadamente, do aumento do metabolismo celular, do aumento do "turnover" da hemoglobina ou ainda da activação de leucócitos (Duarte *et al.*, 1994).

A oxidação mitocondrial normal envolve quatro reacções simples de transferência electrónica, em que a maioria do oxigénio se combina com o hidrogénio para formar água. Todavia, 4 a 5% do oxigénio consumido forma superóxidos com electrões que escapam à cadeia respiratória (Jenkins *et al.*, 1993), iniciando o processo de *stress* oxidativo. O superóxido formado pode de seguida sofrer uma dismutação espontânea ou enzimática, por acção da superóxido dismutase, transformando-se em H_2O_2 . A nível celular o H_2O_2 pode ser removido pela glutatião peroxidase ou pela catalase. A nível tecidual a glutatião peroxidase representa a defesa anti-oxidante mais importante, o que parece relacionar-se com a existência a este nível, de uma glutatião peroxidase dependente do selénio e outra via independente do selénio, cuja actividade pode resultar de uma glutatião peroxidase distinta da anterior ou ainda da actividade de seis enzimas glutatião redutase. Ambas, a glutatião peroxidase e a glutatião redutase, funcionam em sintonia com o glutatião intracelular, na remoção de H_2O_2 . Para além desta bateria enzimática é também importante a presença de "scavengers" como o ascorbato, vitamina E e A e β -caroteno, na defesa anti-oxidante (Meister, 1992). As enzimas envolvidas na desintoxicação celular de produtos oxidantes apresentam uma redução de actividade, durante o exercício físico prolongado. Contudo, há uma diferença significativa entre a actividade enzimática em repouso, nos indivíduos treinados e não treinados, o que é sugestivo da existência de um mecanismo de adaptação do organismo ao *stress* oxidativo regular, imposto nos indivíduos que exercitam regularmente, já que estes apresentam valores superiores (Alessio, 1993).

Em resposta ao exercício físico observa-se um aumento dos leucócitos circulantes

(Shephard *et al.*, 1987; Cannon *et al.*, 1990; Field *et al.*, 1991). O valor desse aumento está directamente relacionado com a intensidade e duração do exercício físico e, numa forma inversa, com o nível de treino do indivíduo (Gabriel *et al.*, 1992; McCarthy *et al.*, 1992; Fairbairn *et al.*, 1993). Em repouso, apenas cerca de metade dos leucócitos incluem o "pool" circulante. Os restantes integram o "pool" marginal, a nível da microvasculatura, dos pulmões, fígado e baço. Os mecanismos responsáveis pela desmarginalização parecem envolver factores mecânicos e modificações hormonais decorrentes do exercício físico (Mackinnon, 1992). Os factores mecânicos incluem o aumento do ritmo e débito cardíaco, o aumento do fluxo sanguíneo a nível dos pequenos vasos e a interacção entre os leucócitos e as células endoteliais (Harlan *et al.*, 1985; Ward *et al.*, 1991). As catecolaminas e o cortisol, frequentemente designadas por hormonas de *stress*, apresentam uma elevação nas suas concentrações plasmáticas, na sequência do exercício físico (Gabriel *et al.*, 1992). As catecolaminas aumentam imediatamente após o início do exercício físico e retomam os valores de repouso em cerca de 30 minutos, após o seu termo; o aumento de cortisol verifica-se algum tempo depois do início do exercício físico e pode continuar a aumentar ou manter valores elevados durante longo tempo após a realização do exercício físico (McCarthy *et al.*, 1992). Ou seja, as catecolaminas parecem estar relacionadas com o aumento do número total de leucócitos circulantes, observado imediatamente após o início do exercício físico, enquanto que o cortisol actuará com um atraso de aproximadamente 1 a 2 horas relativamente às catecolaminas e determinará um aumento dos leucócitos no compartimento vascular, por promover a libertação de neutrófilos da medula óssea.

A leucocitose imposta pelo exercício físico deve-se predominantemente a um aumento nos neutrófilos e linfócitos (Shephard *et al.*, 1987; Field *et al.*, 1991). À acção das catecolaminas é atribuído predominantemente o aumento inicial dos leucócitos, por mobilização imediata de linfócitos, e o aumento de plaquetas (Nieman *et al.*, 1992), enquanto que ao cortisol se atribui primordialmente o aumento dos neutrófilos (Gabriel *et al.*, 1992; McCarthy *et al.*, 1992). O aumento dos linfócitos é acompanhado de modificações nas proporções relativas das respectivas subpopulações T, B e NK (Shephard *et al.*, 1987) e deve-se à mobilização destes a partir dos órgãos linfóides periféricos, especialmente do baço (Nieman *et al.*, 1992). A linfocitose é particularmente acentuada quando se usa o ciclismo como modelo de estudo (Shephard *et al.*, 1987). O número de monócitos sofre também um aumento durante o exercício físico ou no período imediatamente a seguir ao seu termo (Shephard *et al.*, 1987).

Após o exercício físico o número total de leucócitos e de granulócitos, podem manter-se elevados por várias horas, enquanto que os linfócitos, habitualmente, tomam valores inferiores aos de repouso, antes de recuperarem o valor apresentado antes do exercício físico (Field *et al.*, 1991; Mackinnon, 1992).

Segundo Nieman *et al.* (1992) o valor da linfocitose é determinado mais pela intensidade, que pela duração do exercício físico. A linfocitose resulta sobretudo da mobilização de linfócitos do tipo NK e de linfócitos T, citotóxicos (Field *et al.*, 1991). Para exercícios intensos tem sido referido uma duplicação dos valores de linfócitos T e um aumento de cerca de 300% para os linfócitos tipo NK (Field *et al.*, 1991; Nieman *et al.*, 1991). A actividade citotóxica total destas células apresenta uma redução após o exercício físico, em paralelo com a redução no número total de células. A actividade citotóxica por célula apresenta, todavia, um valor superior, após o exercício físico (Field *et al.*, 1991; Nieman *et al.*, 1993). Com o fim de explicar estas variações da actividade citotóxica com o exercício físico, vários mecanismos têm sido propostos. Segundo alguns, esta actividade está relacionada com o aumento no número de linfócitos tipo NK, e a sua saída para os tecidos, explicará a redução observada. Outros defendem que a produção de compostos que interferem por inibição ou estimulação da actividade citotóxica destas células, explicam as variações descritas. O interferon, o factor de necrose tecidular, as interleuquinas 1, 2 e 8, o GM-CSF, G-CSF, M-CSF têm uma acção estimuladora, enquanto as prostaglandinas, por exemplo, têm um efeito inibidor.

O exercício físico parece desencadear uma resposta imune não específica, como sugere o aumento de linfócitos do tipo NK e T citotóxicos. Segundo Field *et al.* (1991), a supressão das células mediadoras da resposta imune, previne a sua exposição aos metabolitos provenientes da lesão muscular, que habitualmente não são expostos ao sistema imune, e, por consequência, o desenvolvimento de reacções de hipersensibilidade ou de auto-imunidade contra esses produtos. A ocorrência de processos infecciosos em atletas praticantes de modalidades associadas a exercício físico intenso ou prolongado, como por exemplo os maratonistas, sugere e fortalece a hipótese anterior de imunodepressão. Por outro lado, após exercício físico moderado verifica-se uma disfunção linfocitária por redução da sua capacidade mitogénica. Esta disfunção e o acréscimo de linfócitos citotóxicos mediadores de resposta não imune, poderá esclarecer a maior resistência ao crescimento de tumores, observada em ratos exercitados moderada e regularmente, em comparação com um grupo controlo sedentário (Sharp *et al.*, 1992).

De uma forma sumária poderá dizer-se que o exercício físico determina uma

leucocitose, cuja composição nos diferentes tipos de leucócitos é função da intensidade, duração e tipo de actividade física e que o tipo de modificações leucocitárias são acompanhadas de modificações no sistema imune do indivíduo. Enquanto um exercício moderado parece conferir resistência à doença, por estimulação do sistema imune não específico - aumento da actividade fagocítica do sistema fagocítico mononuclear, aumento de imunoglobulinas e de citocinas (Cannon *et al.*, 1989; Sprenger *et al.*, 1992) - um exercício muito intenso ou prolongado frequentemente associa um efeito oposto, de imunodepressão (Shephard *et al.*, 1987; Nehlsen-Cannarella *et al.*, 1991; Rodriguez *et al.*, 1991; Sharp *et al.*, 1992).

A depressão do sistema imune está frequentemente associada ao “síndrome de treino excessivo”, caracterizado por infecções recorrentes nos períodos de treino máximo e maior *stress*, por altura das competições (Sharp *et al.*, 1992; Weidner *et al.*, 1994).

Indivíduos envolvidos em actividades físicas regulares ou intensas, desenvolvem frequentemente uma anemia ligeira conhecida, aliás, por anemia do desporto ou anemia do atleta (Erslev, 1991). Esta anemia apresenta habitualmente um valor de eritrócitos próximo dos valores mais baixos do intervalo de referência e uma ligeira macrocitose e reticulocitose. O ferro sérico e os níveis de ferritina estão geralmente baixos, assim como a haptoglobina. Outros sinais de hemólise aumentada, que se intensificam frequentemente após actividade física intensa nos indivíduos treinados, são a hemoglobinemia, hemossiderinúria e hemoglobinúria.

Alguns autores consideram que os atletas apresentam uma expansão do volume plasmático, que não é acompanhada por um aumento semelhante da massa eritrocitária, e que se trata, portanto, de uma pseudo-anemia. Outros propõem que a oxigenação muscular acrescida, imposta pelo exercício físico regular, determine um aumento dos níveis de 2,3-DPG e, por consequência, um desvio para a direita na curva de dissociação da hemoglobina. A oxigenação muscular será, então, facilitada e acompanhar-se-á de uma redução na produção de eritropoietina que, por sua vez, determinará uma redução na produção de células eritrocitárias.

Se considerarmos que durante o exercício físico intenso se observa uma hemoconcentração, cujo valor varia habitualmente entre 5 a 10%, o eritrócito veiculará, então, o oxigénio até aos tecidos, a uma velocidade superior, num fluido mais viscoso. Se a viscosidade do plasma favorece a lesão mecânica dos eritrócitos, o “turnover” elevado da hemoglobina favorece a produção de radicais de oxigénio que, em conjunto com outros de origem extra-eritrocitária, produzidos a nível tecidual ou pelos leucócitos activados,

podem criar um ambiente de *stress* oxidativo no eritrócito, que determinará lesões oxidativas na célula.

Como já foi referido, o *stress* oxidativo na célula eritrocitária, e em particular no eritrócito senescente pela sua sensibilidade acrescida ao *stress* oxidativo, pode determinar lesões oxidativas cumulativas, quer a nível dos constituintes citoplasmáticos, quer a nível da membrana eritrocitária, que marcam a célula para a morte (Imanishi *et al.*, 1985; Suzuki *et al.*, 1989; Lutz, 1990; Brovelli *et al.*, 1991; Kosover, 1993). Dos efeitos da lipoperoxidação sobre a membrana eritrocitária, salienta-se a redução na fluidez da membrana, a sua incapacidade para manter os gradientes iónicos e, portanto, o equilíbrio electrolítico da célula, que se reflectirá num aumento de volume do eritrócito e uma maior propensão para a hemólise.

É razoável que as modificações oxidativas no eritrócito, criadas pelo exercício físico, determinem um processo de senescência eritrocitária acelerada, com remoção precoce de eritrócitos.

O eritrócito sofrendo lesões oxidativas cumulativas, em função do *stress* oxidativo criado, poderá fornecer marcadores de *stress* oxidativo que permitam compreender ou estabelecer limites razoáveis ou até benéficos de actividade física, ou ainda, compreender a marcada variação biológica e individual para a mesma ou para diferentes intensidades, tipos de actividade física e tempos de execução da mesma.

5. - O Stress Oxidativo nas Doenças Cardiovasculares.

A aterogénese é um processo lento, mas progressivo, que se inicia habitualmente no adulto jovem e se manifesta clinicamente no adulto de meia idade, geralmente depois dos 40 anos). A incidência das doenças cardiovasculares (DCV) aumenta exponencialmente com a idade e é mais elevada no homem que na mulher pré-menopausica, o que, segundo alguns está relacionado com os valores superiores de hematócrito observados no homem e segundo outros, com os valores das reservas de ferro, também mais elevadas no homem (Magnusson *et al.*, 1994).

Vários estudos epidemiológicos e laboratoriais têm evidenciado como factores de risco de eventos cardiovasculares (enfarte de miocárdio, trombozes) a hipercolestoremia, hipertrigliceridemia, concentrações elevadas do colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDLc -low density lipoprotein cholesterol) e da apopliproteína B (Apo B), baixas concentrações do colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDLc - high density lipoprotein cholesterol) e da apolipoproteína A1 (Apo A1), hipertensão, tabagismo e hiperfibrinogenemia (Duchois *et al.*, 1987; Clozel *et al.*, 1991; Schmitz *et al.*, 1991; Giral, 1992; Benowitz *et al.*, 1993; Bonithon *et al.*, 1993; Loscalzo *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1993; Heinrich *et al.*, 1994; Kawachi *et al.*, 1994; Menotti *et al.*, 1994). Estes factores de risco tradicionais, que podem ocorrer isoladamente ou em associação, prevêm apenas aproximadamente um terço dos eventos cardiovasculares.

A importância dos lípidos e lipoproteínas na patogénese da aterosclerose é inquestionável, apesar de algumas lesões ateroscleróticas conterem pequenas proporções de colesterol (Smith, 1987; Wall *et al.*, 1994). De facto, diversos tipos de células e processos metabólicos parecem estar também envolvidos na aterogénese, a qual pode ter início, ou não, numa lesão do endotélio vascular (Ross, 1986; Charo, 1992). As modificações mais evidentes das lesões ateroscleróticas são a acumulação lipídica e a infiltração e proliferação de diversos tipos de células, nomeadamente, monócitos/macrófagos, linfócitos, células musculares lisas, fibroblastos e plaquetas (Ross, 1986; Steinberg, 1987).

São duas as hipóteses aterogénicas que têm merecido especial atenção e estudo. Segundo a hipótese aterogénica por lesão do endotélio vascular, é a lesão deste que inicia o processo aterogénico, promovendo de imediato a adesão e activação de plaquetas e o recrutamento de células inflamatórias para a zona lesionada. A outra hipótese, mais

recente, é designada por hipótese de modificação oxidativa, por atribuir aos radicais activos de oxigénio as modificações conducentes à inserção e progressão da lesão aterosclerótica (Fig. 6) (Steinberg, 1987). Segundo esta, o processo inicia-se pela adesão de monócitos/macrófagos à célula endotelial morfológicamente ileza (Charo, 1992), na sequência de infiltração de LDL no espaço subendotelial (Friedman *et al.*, 1993). Neste espaço, a LDL é modificada oxidativamente, sendo esta modificação determinada por radicais activos de oxigénio que podem ter origem nos monócitos/macrófagos, nas células musculares lisas ou nas células do endotélio vascular. A LDL oxidada constitui um factor quimiotáctico para os monócitos circulantes, tem capacidade para inibir a motilidade dos macrófagos e tem ainda a particularidade de ser fagocitada mais avidamente pelos macrófagos, que a LDL nativa. Da modificação oxidativa das LDL no espaço subendotelial, resultará, então, um recrutamento de monócitos da circulação sanguínea, a acumulação de macrófagos (macrófagos residentes) e uma fagocitose exacerbada de LDL oxidada pelo macrófago, com formação de células “foam” e do ateroma (Steinberg, 1987). A proliferação e acumulação de células favorecerá a lesão do endotélio vascular, por estiramento das células endoteliais.

O processo aterogénico com início na modificação oxidativa das LDL no espaço subendotelial, adquire uma progressão “auto-catalítica” em que interactuam células activadas do espaço extravascular (macrófagos, linfócitos, células musculares lisas), da parede vascular e do espaço intravascular (plaquetas, monócitos, neutrófilos, linfócitos) (Aviram, 1992; Lehr *et al.*, 1993; Buja *et al.*, 1994; Lam *et al.*, 1994; Sawshuk *et al.*, 1994). No centro desta interacção celular está o macrófago (Libby *et al.*, 1993) que, para além de constituir uma fonte importante de radicais de oxigénio e proteases, é capaz de secretar citocinas que induzem a activação e proliferação de células musculares lisas, fibroblastos e células endoteliais, também elas capazes de produzir e secretar mediadores inflamatórios como o interferon, TNF, PAF. Algumas das citocinas secretadas pelas células inflamatórias têm capacidade para activar células da circulação sanguínea, nomeadamente o linfócito, o neutrófilo (Weiss, 1982; Uyesaka 1992a) e as plaquetas (Mehri *et al.*, 1993).

É pois razoável que a activação celular no ateroma, acompanhada por libertação de mediadores de activação leucocitária, proteases e de radicais activos de oxigénio capazes de difusão através das membranas celulares, crie um ambiente de *stress* oxidativo e proteolítico que possa mediar a activação de células sanguíneas como os neutrófilos, ou ainda mediar modificações oxidativas e proteolíticas no eritrócito, particularmente sensível

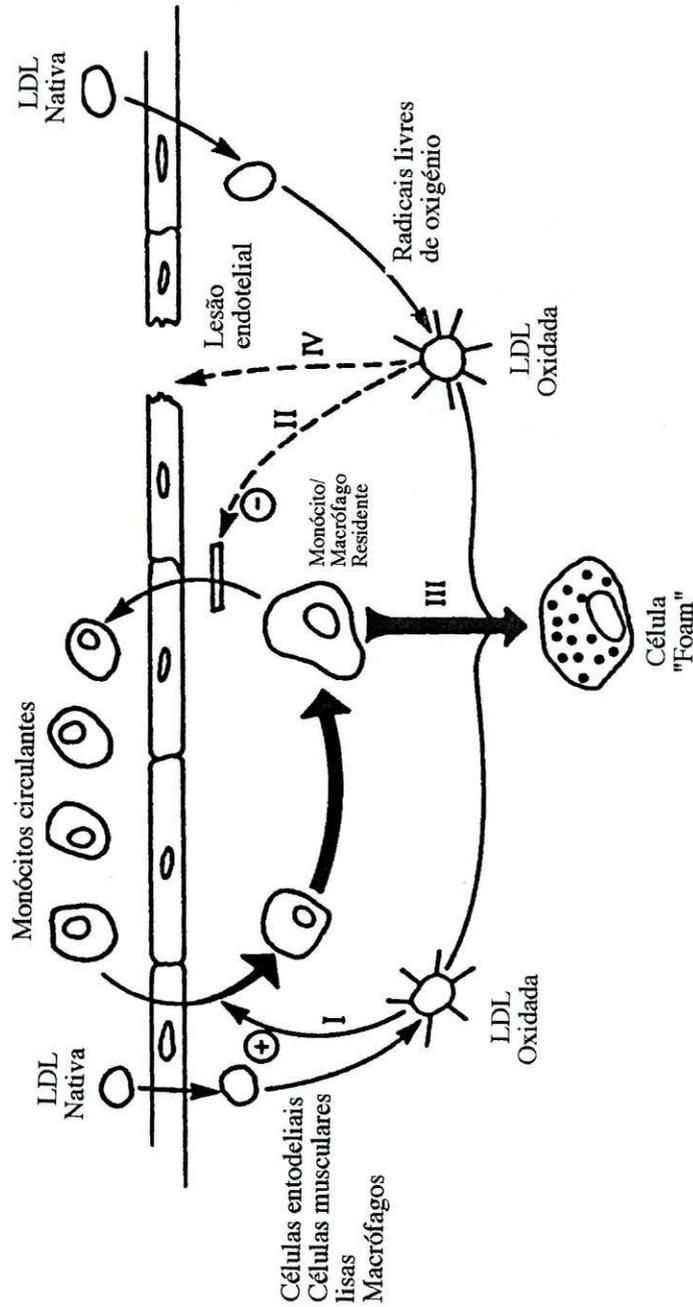


Fig. 6: Representação esquemática da hipótese de modificação oxidativa das LDL. Segundo esta, o processo aterogênico inicia-se pela adesão de monócitos/macrófagos à célula endotelial morfológicamente ílesa, na sequência de infiltração de LDL no espaço subendotelial. Neste espaço, a LDL é modificada oxidativamente, sendo esta modificação determinada por radicais activos de oxigénio que podem ter origem nos monócitos/macrófagos, nas células musculares lisas ou nas células do endotélio vascular. A LDL oxidada constitui um factor quimiotáctico para os monócitos circulantes (I), tem capacidade para inibir a motilidade dos macrófagos (II) e tem ainda a particularidade de ser fagocitada mais avidamente pelos macrófagos, que a LDL nativa. Da modificação oxidativa das LDL no espaço subendotelial, resultará, então, um recrutamento de monócitos da circulação sanguínea, a acumulação de macrófagos (macrófagos residentes) e uma fagocitose exacerbada de LDL oxidada pelo macrófago, com formação de células "foam" (III) e do ateroma. A proliferação e acumulação de células favorecerá a lesão do endotélio vascular (IV). Adaptado de Steinberg, 1987.

a situações de *stress* oxidativo e proteolítico. É de salientar que os doentes cardiovasculares apresentam frequentemente uma leucocitose do tipo neutrofílico, sugestiva do envolvimento do neutrófilo na fisiopatologia da aterogénese (Ernst *et al.*, 1987; Mugge *et al.*, 1991; Lowe, 1993) e que foi atribuída a algumas citocinas secretadas pelo macrófago e também por outras células inflamatórias, como a interleuquina-1, interleuquina-8 e TNF, capacidade para despoletar a activação do neutrófilo (Klebanoff *et al.*, 1986; Bast *et al.*, 1991).

Com a formação e progressão do ateroma, o lúmen vascular trona-se mais estreito, criando zonas de turbulência que permitem uma interacção mais próxima e demorada das células sanguíneas com o microambiente oxidativo e proteolítico dessa zona. Aliás, a localização típica das placas ateroscleróticas em zonas de turbulência e também de maior estase, é bem sugestiva da importância duma interacção próxima das células, no processo aterogénico, por favorecer a interacção entre as células e seus produtos de activação e, ainda, por contribuir para o desnudamento do endotélio vascular (Sawshuk *et al.*, 1994). O impacto do *stress* oxidativo sobre as células circulantes, nestas regiões de turbulência e estase, será, obviamente, favorecido pela viscosidade sanguínea. Esta, é determinada por condições físicas como a temperatura, forças de atrito entre as células, capazes de romper a agregação eritrocitária e induzir a deformação celular (Sang *et al.*, 1993a; Sang *et al.*, 1993b), pela composição do sangue, isto é, pelo valor de hematócrito, capacidade de deformabilidade dos eritrocitos, número de leucócitos, concentração de lípidos plasmáticos, concentração de fibrinogénio (Heinrich *et al.*, 1994), e pela tensão arterial (Bonithon *et al.*, 1993; Sang *et al.*, 1993a; ; Sang *et al.*, 1993b). A viscosidade sanguínea e plasmática, o hematócrito, o número de leucócitos e o fibrinogénio, estão habitualmente aumentados no doente cardiovascular (Lowe, 1993; Heinrich *et al.*, 1994). As perturbações reológicas determinadas por uma viscosidade sanguínea acrescida, favorecerão a ocorrência de eventos cardiovasculares, particularmente se associada a estenose e oclusão arterial.

Capítulo III

Capítulo III

Objectivos e Plano de Trabalho 89

Objectivos e plano de trabalho 90

III - Objectivos e Plano de Trabalho.

Um aumento no número de leucócitos, em particular de neutrófilos, é comum a diversas situações patológicas, como processos inflamatórios e infecciosas e doenças cardiovasculares (Grimm *et al.*, 1985; Ernst *et al.*, 1987; Mugge *et al.*, 1991; Schmid-Schonbein 1991; Lowe, 1993; Garcia *et al.*, 1994). É ainda frequente em situações ditas fisiológicas, como o exercício físico e a gravidez (Field *et al.*, 1991; Shephard *et al.*, 1991). É interessante observar que paralelamente à leucocitose neutrofílica se desenvolve frequentemente uma anemia ligeira a moderada, de etiologia pouco esclarecida, que, por associar uma redução no tempo de vida do eritrócito, pressupõe o desenvolvimento de condições favorecedoras do envelhecimento eritrocitário.

O exercício físico e as doenças vasculares, como foi referido, desencadeiam ou são acompanhados de um processo que envolve a activação e proliferação de células inflamatórias, à semelhança do que acontece nos processos inflamatórios e infecciosos. A activação das células inflamatórias constitui uma importante fonte de radicais de oxigénio e proteases que, sendo libertados na rede vascular, poderão exercer a sua acção oxidativa e proteolítica sobre as células endoteliais, sobre as células sanguíneas e sobre constituintes plasmáticos. Os radicais activos de oxigénio têm uma reactividade característica e alguns deles são capazes de se difundir através de membranas celulares e actuar em locais distantes daquele onde foram produzidos.

Vários trabalhos, referidos anteriormente, evidenciaram já *in vitro* a acção do neutrófilo activado sobre o eritrócito. Entre as modificações eritrocitárias impostas pelos produtos de activação do neutrófilo são de salientar a desnaturação e ligação de hemoglobina à membrana, a degradação e oxidação com agregação da proteína banda 3 e a ligação de IgG's à membrana, por constituírem alterações que conduzem à remoção do eritrócito e que traduzem modificações intracelulares decorrentes do processo de senescência ou impostas por *stress* oxidativo intra-eritrocitário, com disfunção dos mecanismos de defesa anti-oxidante. Sendo o eritrócito um dos alvos dos produtos de bioactivação dos neutrófilos, pelas suas características, constitui um bom modelo de estudo e um potencial marcador de *stress* oxidativo fisiológico ou patológico. De facto, sendo o eritrócito uma célula de capacidade biossintética limitada e, portanto, incapaz de reparar lesões oxidativas e proteolíticas, sofre e acumula ao longo da sua vida as lesões sofridas, e a avaliação dessas lesões poderá indicar a intensidade do *stress* sofrido. É, aliás, reconhecido que eritrócitos que desenvolvam precocemente lesões celulares, são também removidos prematuramente, em termos cronológicos. É o caso de células

falsiformes, talassémicas, com enzimopatias comprometedoras dos mecanismos de defesa anti-oxidante e, ainda, de eritrócitos tratados com oxidantes.

É, portanto, razoável que situações fisiológicas e patológicas, como aquelas que se pretendem estudar, sejam acompanhadas de *stress* oxidativo intra-eritrocitário, com disfunção metabólica dos sistemas de defesa antioxidante e desenvolvimento de lesões de natureza oxidativa e proteolítica que poderão determinar a remoção precoce dos eritrócitos. O estudo destas lesões, pela sua natureza cumulativa, podem revelar-se importantes marcadores clínicos de risco fisiológico e patológico.

Pretende-se estudar alterações quantitativas referentes a eritrócitos e leucócitos, alterações enzimáticas eritrocitárias e modificações a nível da membrana eritrocitária. Nesta, dar-se-á especial atenção às alterações nas proteínas de membrana e em particular à proteína banda 3, a proteína imunologicamente relacionada com o neoantigénio de senescência, que é produzido por envelhecimento celular ou decorrente de agressões celulares acumuladas. Pretende-se ainda relacionar a leucocitose neutrofílica com bioativação de neutrófilos, através do estudo das modificações eritrocitárias associadas, em modelos vivos de *stress* oxidativo fisiológico e patológico.

Numa primeira fase utilizou-se apenas o exercício físico como modelo de *stress* oxidativo, por se considerar conveniente estudar as alterações hematológicas impostas por uma situação de *stress* oxidativo sem patologia associada e que é referida como benéfica no doente cardiovascular. Nesta fase procurou-se ainda estabelecer diferenças entre indivíduos que exercitam regularmente e indivíduos com hábitos sedentários.

Numa segunda fase alargou-se o estudo aos modelos patológicos, de indivíduos em risco de DCV, que incluam indivíduos com história de enfarte de miocárdio (superior a três meses), com enfarte de miocárdio nas últimas 48 horas e indivíduos com hipertensão ou outros factores considerados de risco, mas sem história de eventos cardiovasculares. Estas populações foram também estudadas sob o ponto de vista bioquímico, a fim de avaliar eventuais relações entre alterações hematológicas e alterações de lípidos, lipoproteínas ou apoproteínas, que constituem factores de risco, e, quiçá definir marcadores de risco mais sensíveis que os tradicionais. Um grupo controlo incluiu indivíduos aparentemente saudáveis, com parâmetros hematológicos e bioquímicos normais e de hábitos sedentários, isto é, sem hábitos de exercício físico regular.

Na fase final procedeu-se a alguns testes *in vitro*, no sentido de esclarecer alguns resultados obtidos e relacioná-los com envelhecimento eritrocitário acelerado e bioativação de neutrófilos.

Capítulo IV

Capítulo IV

O *stress* oxidativo fisiológico imposto pelo exercício físico 93

1. Material e métodos aplicados ao estudo	
do <i>stress</i> oxidativo fisiológico, imposto pelo exercício físico	95
1.1. População estudada	95
1.2. Actividade física desenvolvida	95
1.3. Análises sanguíneas executadas	95
1.3.1. Hemograma	96
1.3.2. Fraccionamento eritrocitário em gradiente de densidade descontínuo	96
1.3.2.1. Isolamento dos eritrócitos	96
1.3.2.2. Preparação do gradiente de densidade descontínuo e obtenção das fracções eritrocitárias	97
1.3.3. Determinação da actividade enzimática da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) eritrocitária	97
1.3.4. Análise electroforética da G6PD eritrocitária por focagem isoelectrica	99
1.3.5. Avaliação da percentagem de hemoglobina ligada à membrana eritrocitária (% HbLM)	100
1.3.5.1. Isolamento de eritrócitos	100
1.3.5.2. Preparação das membranas eritrocitárias	101
1.3.5.3. Determinação da concentração proteica da suspensão de membranas eritrocitárias	101
1.3.5.4. Determinação da % HbLM	102
1.3.6. Estudo electroforético do perfil proteico da membrana eritrocitária	102
1.3.6.1. Preparação da amostra	102
1.3.6.2. Electroforese em gel descontínuo de poli-acrilamida (sistema de Laemmli), na presença de SDS (SDS-PAGE)	103
1.3.6.3. Revelação do gel	106
1.3.6.3.1. Coloração pelo azul de Coomassie	106
1.3.6.3.2. Coloração pela prata	107

1.3.6.4. Secagem do gel	107
1.3.7. Estudo do perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária por "Western Blotting"	108
1.3.7.1. Electroforese em SDS-PAGE	108
1.3.7.2. Transferência de proteínas	108
1.3.7.3. Incubação com os anticorpos	109
1.3.7.4. Revelação	110
1.3.7.5. Quantificação por densitometria	111
1.3.8. "Western blotting" para estudo da lactoferrina no lisado de polimorfonucleares (PMN)	111
1.3.8.1. Isolamento e preparação dos PMN	111
1.3.8.2. Preparação das amostras para electroforese do tipo SDS-PAGE	112
1.3.8.3. Electroforese por SDS-PAGE e transferência de proteínas	112
1.3.8.4. Detecção imunológica e revelação da lactoferrina	113
2. Resultados	114
2.1. Hemograma	114
2.1.1. Modificações impostas pelo exercício físico na amostra total	114
2.1.2. Modificações impostas pelo exercício físico no subgrupo não treinado	115
2.1.3. Modificações impostas pelo exercício físico no subgrupo treinado	118
2.1.4. Estudo comparativo entre treinados e não treinados antes e depois do exercício físico	118
2.1.5. Modificações impostas pelo exercício físico e sua recuperação 1 hora após o seu termo	122
2.2. Estudo da actividade enzimática da G6PD eritrocitária no hemolisado total e em fracções eritrocitárias de diferente densidade	124
2.3. Análise electroforética da G6PD eritrocitária por focagem isoeléctrica	126
2.4. Avaliação da percentagem de hemoglobina ligada à membrana eritrocitária	126
2.5. Estudo eléctrico do perfil proteico da membrana eritrocitária	126
2.6. Estudo do perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária	128
2.7. Estudo da lactoferrina no lisado de PMN	131
3. Discussão dos resultados	133
3.1. Nota final de discussão	140

IV. O *stress* oxidativo fisiológico imposto pelo exercício físico.

Na primeira fase deste estudo tomámos o exercício físico como modelo experimental, para o estudo de alterações eritrocitárias e leucocitárias, decorrentes de uma situação de *stress* oxidativo sem patologia associada.

O protocolo do exercício físico e sua aplicação só foi possível graças à colaboração com a Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física e do Centro de Medicina Desportiva, na pessoa do Dr. Paulo Cunha e Silva.

1. - Material e métodos aplicados ao estudo do *stress* oxidativo fisiológico imposto pelo exercício físico.

1.1. - População Estudada.

Selecionou-se uma população jovem de 24 indivíduos, aparentemente saudáveis, com parâmetros hematológicos normais, de idades compreendidas entre os 20 e os 25 anos. Esta população integrava dois grupos, um constituído por 12 indivíduos da população estudantil da Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física e que, portanto, praticavam exercício físico regularmente, e outro com igual número de estudantes universitários com hábitos sedentários. Ao primeiro grupo demos a designação de Treinados (T) e ao segundo de Não Treinados (NT).

1.2. - Actividade Física Desenvolvida.

Utilizou-se o ciclismo como modelo de actividade física. A todos os indivíduos foi aplicado um protocolo de exercício em cicloergómetro, que consistiu em introduzir incrementos de carga de 20 W cada minuto, partindo de uma carga inicial de 20 W, mantendo uma frequência pedalar de 60 rpm, e tomando o critério de desistência na exaustão, como ponto de finalização do exercício.

1.3. - Análises Sanguíneas Executadas.

A fim de estudar e quantificar as alterações hematológicas a nível eritrocitário e

leucocitário, recolheram-se amostras de sangue, utilizando como anticoagulante o sal potássico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 1 mg/ml de sangue. As amostras foram recolhidas em todos os indivíduos em jejum e em repouso e imediatamente após o exercício físico. Em nove dos indivíduos estudados foi ainda feita outra colheita de sangue, 1 hora após o termo do exercício físico, sem ingestão de líquidos durante esse período.

Os estudos feitos incluíram:

1.3.1. - Hemograma.

As determinações quantitativas do hemograma foram executadas num contador de glóbulos automático do tipo Microcell Counter CC 120 Sismex e incluem a avaliação do número de glóbulos vermelhos por litro de sangue (GV/l), a concentração de hemoglobina (Hb g/dl), o valor de hematócrito (Ht l/l), de hemoglobina globular média (HGM pg), de concentração de hemoglobina globular média (CHGM g/dl), de volume globular médio (VGM fl) e do número de glóbulos brancos por litro de sangue (GB/l). Recolheu-se para esta determinação um volume de 2,5 ml de sangue venoso com EDTA, na proporção adequada.

O estudo da morfologia das células sanguíneas e a contagem diferencial de leucócitos, foram executados em esfregaços sanguíneos corados pela técnica de Wright (Dacie *et al.*, 1991a).

1.3.2.- Fracionamento Eritrocitário em Gradiente Descontínuo de Densidade.

1.3.2.1.- Isolamento dos Eritrócitos.

Para o isolamento dos eritrócitos partiu-se da amostra de sangue venoso com EDTA (10 ml) e utilizou-se uma técnica que recorre a uma filtração através de alfa-celulose e celulose microcristalina. Este método permite a remoção da maioria dos leucócitos (99,75%) e das plaquetas, e a recuperação de mais de 90% dos eritrócitos, incluindo reticulócitos (Beutler *et al.*, 1976; Beutler *et al.*, 1977).

O meio de separação é preparado por mistura em partes iguais dos dois tipos de celulose, que se suspendem em soro fisiológico a 4° C. Toma-se uma seringa de 5 ml, à qual se retira o êmbolo, e adapta-se-lhe um disco de papel de filtro no fundo. Coloca-se num suporte, verticalmente, e decanta-se, então, a suspensão de celulose, bem homogeneizada, até à marca 3 ml; depois de equilibrada a coluna de celulose com 5 ml de soro fisiológico a 4° C, coloca-se a amostra (5 ml de sangue em cada uma de duas

seringas) no topo da coluna e mantém-se um fluxo contínuo de soro fisiológico a 4° C, até à separação completa dos eritrócitos. Depois de lavado os eritrócitos em soro fisiológico a 4° C e de retirar uma alíquota para determinação da actividade da G6PD eritrocitária (Beutler *et al.*, 1977), ressuspendem-se num hematócrito de cerca de 0,30 l/l, a fim de preparar a suspensão que se colocará no topo do gradiente de densidade.

1.3.2.2. - Preparação do Gradiente de Densidade Descontínuo e Obtenção das Fracções Eritrocitárias.

Para a preparação do gradiente de densidade utilizaram-se quatro soluções isotónicas de arabinogalactano ("Larex-LO", Larex International Corp.), a pH 7,4, de densidades 1,100; 1,105; 1,110 e 1,200, gentilmente cedidas pela Dra. Maria Strech do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto. O gradiente foi preparado colocando no tubo de ultracentrífuga 2,5 ml de cada uma das soluções, por ordem decrescente de densidade.

A suspensão globular a 0,30 l/l é colocada no topo do gradiente e centrifugada a 20.000 rpm durante 30' à temperatura de 4° C, numa ultracentrífuga I.E.C.-M60. Terminada a centrifugação, separam-se as fracções eritrocitárias e, depois de lavadas com soro fisiológico a 4° C, são quantificadas e preparadas para o estudo da actividade enzimática da G6PD e do seu comportamento electroforético, por focagem isoeléctrica, segundo a metodologia que a seguir se descreve.

1.3.3.- Determinação da Actividade Enzimática da G6PD Eritrocitária.

O valor da actividade da G6PD no eritrócito é reconhecido como um bom índice de idade eritrocitária (Ouwkerk *et al.*, 1989). Todavia, este valor pode elevar-se de forma significativa, no caso de contaminação por leucócitos ou por plaquetas, uma vez que ambos apresentam uma actividade de G6PD bastante superior à do eritrócito (Morellini *et al.*, 1985). Donde, a importância da remoção destes elementos celulares (Beutler *et al.*, 1976).

O processamento deste estudo, desde a colheita até ao doseamento da actividade enzimática, deve ser conduzido à temperatura de 4° C. Assim, no período de lavagem dos eritrócitos usou-se uma centrífuga refrigerada (3K10 -Sigma).

Após o isolamento e a lavagem dos eritrócitos, com soro fisiológico, prepara-se uma diluição dos GV a aproximadamente 1:5, numa solução estabilizadora da enzima (EDTA 2,7 mM a pH 7,0, NADP 10 µM e β-mercaptoetanol 7 mM) e de seguida

procede-se à hemólise por choque térmico, que consiste numa congelação rápida em metanol a -20°C e descongelação, também rápida, em banho de água a 25°C . De salientar que a descongelação da amostra só deverá processar-se por altura do doseamento enzimático (Beutler *et al.*, 1977).

Para o doseamento partiu-se de um “kit” da Boehringer Mannheim (Test Combination G6P-DH, Test UV), introduzindo-lhe algumas modificações (Betke *et al.*, 1967; Santos Silva *et al.*, 1989). Entre outras modificações refer-se que, para além de substituir os hemolisados totais por hemolisados eritrocitários, suprimiu-se a hemólise pela digitonina, a qual além de ser muito insolúvel é frequentemente acompanhada de impurezas (Beutler *et al.*, 1977); à mistura reagente foi adicionada, na altura do ensaio, uma solução catalisadora, de cloreto de magnésio em solução concentrada ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 M), por forma a introduzir alterações mínimas nas concentrações dos reagentes e obter uma concentração final de 0,01 M; adoptaram-se as unidades de expressão para a actividade enzimática da G6PD eritrocitária recomendadas pelo Comité Internacional para Padronização em Hematologia, ou seja, em Unidades Internacionais por grama de hemoglobina (UI/ g Hb), e não por número de eritrócitos por ml de sangue.

A mistura reagente é constituída por NADP 0,37 mM em tampão de trietanolamina 37,7 mM (pH 7,6) e EDTA 3,8 mM. No momento do ensaio adiciona-se a esta solução reagente a solução catalisadora (3 μl) e o hemolisado teste (25 μl) e incubam-se em banho de água a 25°C , durante 5'. Após esta incubação, junta-se o substrato (25 μl), uma solução de G6P (0,58 mM), homogeneiza-se e decanta-se a amostra para uma célula do espectrofotómetro, previamente termostaticada a 25°C . A actividade da G6PD eritrocitária revelar-se-á através da produção de NADPH, que absorve a 340 nm. A absorvência é lida e registada, bem como o $\Delta A/\text{minuto}$, durante um período de 6 minutos. Para a execução deste teste utilizou-se um banho de água termostatisado (Thermed 5001), para a incubação dos reagentes e para fazer a circulação da água através das células do espectrofotómetro (Shimadzu UV-265).

Para além da determinação do $\Delta A/\text{minuto}$, é necessário conhecer o valor da concentração hemoglobínica do hemolisado teste, a fim de calcular a actividade enzimática em UI/g Hb. Com esse fim, utilizou-se um “Kit” da Boehringer Mannheim (Test Combination Hemoglobin) que aplica o método da cianometa-hemoglobina (Dacie *et al.*, 1991b) e que consiste, fundamentalmente, em converter todas as formas de hemoglobina a cianometa-hemoglobina, com excepção da sulfo-hemoglobina, por adição do hemolisado à solução de Drabkin, constituída por cianeto de potássio e ferricianeto de

potássio. A leitura é feita a 540 nm, após um período de repouso de 3'.

Finalmente, conhecendo a concentração de hemoglobina do hemolisado teste, o volume de hemolisado por mililitro de solução reagente, o valor do $\Delta A/\text{minuto}$, e sabendo que 1 μmol de NADPH tem um poder absorvente de 6,22 num trajecto óptico de 1 cm, poderá calcular-se o valor de actividade enzimática da G6PD eritrocitária em UI/g Hb.

A actividade enzimática da G6PD eritrocitária foi avaliada nas diferentes fracções eritrocitárias, obtidas por ultracentrifugação em gradiente de densidade descontínuo, e ainda, nos hemolisados eritrocitários totais, obtidos da população eritrocitária total, de cada uma das amostras de sangue colhidas antes, depois e 1 hora depois do exercício físico.

1.3.4.- Análise Electroforética da G6PD Eritrocitária por Focagem Isoeléctrica.

Com o objectivo de avaliar modificações na enzima que parecem relacionar-se com a idade da célula (Khan *et al.*, 1974), procedeu-se ao seu estudo por focagem isoelectrica. A G6PD eritrocitária pode sofrer alterações cuja extensão e natureza podem determinar modificações na sua actividade enzimática ou no seu ponto isoelectrico.

A focagem isoelectrica foi executada no Phast System (Pharmacia), aplicando a amostra num mini gel de poliacrilamida (Phastgel IEF 5-8 - Pharmacia), que contém anfolitos capazes de criar um gradiente de pH linear, entre 5 e 8, e estável durante a electroforese, que será conduzida à temperatura constante de 15° C.

A pré-focagem, para desenvolvimento do gradiente de pH, é feita a 2000 V/2,0 mA durante aproximadamente 10 minutos, procedendo-se de seguida à aplicação da amostra. Neste período de aplicação da amostra a voltagem baixa para 200 V. A fase seguinte de focagem isoelectrica é também feita a 2000 V/2 mA, durante 30'.

Terminada a focagem isoelectrica, o gel é retirado e submetido a uma coloração específica para a G6PD, que associa a redução de NADP, na presença de G6PD, à de um sal de tetrazólio, o azul de tiazolilo (MTT), na presença de um transportador de electrões, o metassulfato de fenazina (PMS), com formação de formazano, insolúvel e de cor púrpura violácea. A coloração deve processar-se imediatamente a seguir à focagem isoelectrica e é feita pela técnica de "blotting", isto é, pela sobreposição do gel com uma tira de acetato de celulose previamente embebida em 10 ml da solução corante e passada por papel de filtro, para remover o excesso de corante. Esta solução corante é constituída por 4 mg de NADP, 10 mg de G6P(Na), 2 mg de MTT em 9,4 ml de tampão Tris HCl 0,1 M a pH 8,0, que se adicionam a 0,6 ml de PMS a 1 mg/ml, apenas na altura da

coloração. Esta, é feita à temperatura ambiente, no escuro, em câmara húmida, durante cerca de 15'. A G6PD revela-se pelo aparecimento de uma cor púrpura violácea, cuja intensidade é proporcional à sua actividade enzimática.

Este estudo foi executado em hemolisados das fracções eritrocitárias obtidas por ultracentrifugação em gradiente de densidade descontínuo e nos hemolisados do total de eritrócitos provenientes das amostras de sangue obtidas antes e depois do exercício físico.

1.3.5.- Determinação da Percentagem de Hemoglobina Ligada à Membrana Eritrocitária (% HbLM).

Para este estudo torna-se necessário isolar os eritrócitos do plasma e das outras células sanguíneas e, de seguida, isolar as membranas dos constituintes citoplasmáticos da célula. Para determinar a percentagem de hemoglobina ligada à membrana (% HbLM) é obrigatório conhecer a concentração proteica da suspensão de membranas obtida, por forma a calcular a quantidade de proteínas totais presentes no ensaio e a respectiva percentagem de hemoglobina. Assim, passar-se-á a referir as técnicas usadas para isolamento de eritrócitos, para preparação das membranas eritrocitárias e para conhecer a concentração proteica de cada uma das amostras.

1.3.5.1.- Isolamento de Eritrócitos.

Para a preparação de membranas eritrocitárias optou-se por um método diferente daquele já referido para o isolamento dos eritrócitos (1.3.2.1.), não só por se tornar difícil o manuseamento de diversas amostras em simultâneo, mas também porque não permite a recuperação total dos eritrócitos. De facto, se se pretende avaliar a ligação de hemoglobina à membrana eritrocitária, cujo aumento foi já relacionado com o processo de senescência, não faz sentido excluir à partida células que poderão ser importantes ou mesmo determinantes no resultado final do estudo. É de referir ainda que este método permite também a separação de granulócitos, sem qualquer passo adicional à técnica, e que, por esse motivo, foi também o método escolhido e usado no isolamento de granulócitos para os testes *in vitro* (cap. VI).

Para o isolamento dos eritrócitos usaram-se dois meios de separação de densidade diferente (Histopaque 1,119 e Histopaque 1,077 - Sigma), constituídos por ficoll e um meio radiopaco. O método consiste em sobrepôr ao meio de densidade superior, igual volume do meio de menor densidade (3 ml), e, no topo deste gradiente descontínuo de densidade dupla, colocar cuidadosamente a amostra de sangue venoso com EDTA (5 ml).

Segue-se uma centrifugação a 700G durante 30', à temperatura de 12 ° C (centrífuga 3K10 - Sigma). Obtêm-se todos os eritrócitos numa só camada no fundo do tubo, perfeitamente separados das plaquetas e dos leucócitos, formando estes últimos duas bandas bem distintas, uma de granulócitos e outra de mononucleares. Os eritrócitos serão então isolados e transferidos para tubos de ultracentrífuga, com cerca de 50 ml de capacidade, e lavados numa solução tampão de fosfato isotónico (PBS) a pH 7,4 (Dacie *et al.* 1991c) e à temperatura de 4° C, por centrifugações sucessivas a 2.500 rpm durante 10' (centrífuga 3K10 - Sigma, com refrigeração).

1.3.5.2.- Preparação das Membranas Eritrocitárias.

Todo o processo de lavagem dos eritrócitos e preparação das respectivas membranas deve ser executado à temperatura de 4° C.

Os eritrócitos lavados são submetidos a uma hemólise hipotónica, segundo o método de Dodge *et al.*, (1963), por adição de tampão fosfato 5 mM a pH 8,0, adicionado de um inibidor de proteases, o PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto), na concentração final de 0,1 mM, a fim de prevenir a acção de endoproteases. Este tampão, como aliás foi evidenciado por Dodge, permite obter uma remoção máxima da hemoglobina que se liga à membrana na ocasião da hemólise.

Para a hemólise deve encher-se o tubo de centrífuga que contém os eritrócitos, com tampão Dodge e colocá-lo em repouso e imerso em gelo picado durante 10', a fim de se processar a hemólise e inibir as proteases. As membranas serão de seguida separadas por centrifugação a 15.000 rpm durante 10' (Sorvall SS-3 Automatic). A primeira lavagem das membranas deve ainda usar tampão Dodge com o inibidor de proteases e a centrifugação ser precedida de um período de repouso de 10' em gelo, para actuação do inibidor de proteases. Seguir-se-ão 4 lavagens com tampão Dodge, usando as mesmas condições de centrifugação. Após a última centrifugação deve regeitar-se o mais possível o tampão sobrenadante, homogeneizar convenientemente num agitador mecânico (Vortex) a suspensão de membranas obtida e dividir em alíquotas para congelar a -20° C.

1.3.5.3.- Determinação da Concentração Proteica da Suspensão de Membranas Eritrocitárias.

Esta determinação foi executada segundo o método de Bradford (1976). Basicamente, o método consiste em traçar uma curva padrão, com soluções de albumina bovina de concentração conhecida, a qual permitirá conhecer o valor da concentração

proteica da amostra. A todas as amostras (soluções de albumina bovina e suspensões de membranas eritrocitárias) é adicionado, no momento que precede a leitura espectrofotométrica, o reagente de Bradford. Este, obtém-se por dissolução de 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma) em 50 ml de etanol (Merck) a 95%, seguida da adição de 100 ml de ácido fosfórico (Merck) a 85% e de água destilada, por forma a perfazer os 1000 ml de solução. Esta solução deve deixar-se em repouso durante a noite e filtrar-se sempre antes da sua utilização. Da adição do reagente às amostras resultará um composto corado, cuja absorvência é lida no espectrofotómetro (Shimadzu UV-265), no comprimento de onda de 595 nm, e é função da concentração proteica da amostra.

1.3.5.4.- Determinação da %HbLM.

Para esta determinação dilui-se a amostra (100 μ l em 800 μ l), de concentração proteica já conhecida, na própria tina para leitura espectrofotométrica. O solvente é um detergente aniónico, o Triton X-100 (Merck) a 5% em tampão Dodge, que determinará a dissociação das proteínas da membrana. Depois de acertar o zero de Absorvência a 700 nm com dois brancos, constituídos apenas pelo solvente, homogeneiza-se a amostra e procede-se à leitura espectrofotométrica (Shimadzu UV-265) contra um branco. A Absorvência é lida a 415 nm e a 700 nm, sendo o primeiro o comprimento de onda de absorção máxima da hemoglobina e que, portanto, dará o valor de Absorvência da hemoglobina, e o segundo dará o valor correspondente ao "background" das outras proteínas. O valor de Absorvência lido a 415 nm será subtraído do valor lido a 700 nm, para com esse valor, com o valor da concentração proteica da amostra e da diluição feita com o detergente, calcular a percentagem de hemoglobina ligada à membrana.

1.3.6. - Estudo Electroforético do Perfil Proteico da Membrana Eritrocitária.

1.3.6.1. - Preparação da Amostra.

Para a sua execução é também necessário proceder ao isolamento dos eritrócitos, à preparação das membranas e à determinação da concentração proteica das suspensões membranares. De facto, pretendendo-se estudar e comparar o perfil proteico das diferentes suspensões membranares, é obrigatório conhecer a concentração proteica de cada uma delas por forma a que possamos trabalhar com iguais quantidades de proteínas por amostra. A técnica de isolamento dos eritrócitos, usada para este estudo, é também a centrifugação em gradiente descontínuo de dupla densidade (Histopaque- Sigma) (1.3.5.1.), o qual permitirá recuperar e isolar toda a população eritrocitária. É importante

trabalhar com uma amostra representativa de toda a população eritrocitária, já que se pretende avaliar modificações eventualmente relacionadas com o processo de senescência.

Uma vez que as técnicas que precedem o estudo electroforético são comuns à determinação anterior (%HbLM), deve partir-se de um volume de sangue (5ml) que permita a obtenção de uma quantidade de suspensão de membranas eritrocitárias suficiente para estas execuções. Assim, como se referiu anteriormente, logo que se obtém a suspensão membranar, deve dividir-se em alíquotas e congelar. É uma destas alíquotas que será descongelada e utilizada para o estudo electroforético.

1.3.6.2.- Electroforese em Gel Descontínuo de Poli-Acrilamida (segundo o sistema de Laemmli), na Presença de SDS (SDS-PAGE).

Para o estudo electroforético do perfil proteico da membrana eritrocitária procedeu-se a uma electroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) (Harlow *et al.*, 1988; Samdook *et al.*, 1989). A acrilamida, que constitui o meio de suporte electroforético, apresenta-se sob a forma de monómeros capazes de polimerizar e formar longas cadeias, ligadas covalentemente, na presença de N,N'-metilenobisacrilamida, habitualmente referida por bisacrilamida. Uma das vantagens deste meio de suporte é o facto de a extensão da polimerização poder controlar-se pela percentagem total de acrilamida (acrilamida e bisacrilamida) ou pela quantidade de bisacrilamida adicionada à acrilamida. Por consequência, poder-se-á pré-determinar o poro do meio de suporte, através do qual migrarão as proteínas. Ainda relativamente à polimerização da poli-acrilamida é de notar a sua inibição pelo oxigénio, que obriga à utilização de uma solução saturada de butanol em água, no momento em que se proceda à polimerização do gel, por forma a isolar o gel do contacto directo com o ar e ainda impedir a formação de um menisco convexo à superfície do gel, o qual determinaria a distorção das bandas durante a corrida electroforética. A polimerização da poli-acrilamida pode desencadear-se pela adição de persulfato de amónio (PSA) e ser catalisada pela amina quaternária N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina, mais conhecida por TEMED. O PSA deve ser de preparação recente e, em conjunto com o TEMED, deve adicionar-se apenas no final, isto é, imediatamente antes de colocar a solução polimerizante entre duas placas de vidro, onde deverá ter lugar a polimerização.

A adição de SDS, um detergente aniónico, ao meio de suporte e ao tampão solubilizante da suspensão de membranas, determinará a desnaturação da proteína, "desenrolando-a" no seu esqueleto polipeptídico. Desta forma, o SDS confere uma carga

negativa ao polipeptido, proporcional ao seu tamanho (Mascher *et al.*, 1986). Se ao SDS juntarmos um agente redutor como o β -mercaptoetanol poderemos separar os polipeptidos de carga negativa, em função do seu peso molecular. Este sistema SDS-PAGE pode usar-se em sistemas contínuos, em que todo o gel tem a mesma composição e, portanto, a mesma porosidade, ou em sistemas descontínuos. Este sistema electroforético descontínuo, que é talvez o mais usado actualmente, é uma modificação feita por Laemmli em 1970 a métodos anteriores, e que por isso tomou a designação de sistema de Laemmli. Este sistema é constituído por dois tipos de gel, com porosidade diferente. O gel do topo, no qual se colocam as amostras, é designado por “stacking gel”, é um gel de cerca de 2 cm de comprimento e deve ter uma porosidade superior ao outro gel designado por “running gel”, que constituirá a grande parte do meio de suporte. Este sistema é excelente, pois permite uma primeira separação das proteínas segundo o seu peso molecular no “stacking gel”. A entrada das proteínas no “running gel”, de acordo com o seu peso molecular, contribui necessariamente para a boa resolução apresentada pelo sistema de Laemmli.

Após descongelação da alíquota de suspensão de membranas eritrocitárias, a 4° C, e já na posse da respectiva concentração proteica (habitualmente entre 2,5 a 4,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), prepara-se uma suspensão (100 μl) com uma concentração final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Para isso, pipeta-se da alíquota perfeitamente homogeneizada um volume que contenha 100 μg de proteínas e junta-se igual volume de um tampão solubilizante, constituído por Tris HCl 0,125 M a pH 6,8, 4% SDS, 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol e 0,1% de azul de bromofenol, que tendo um peso molecular muito baixo, funcionará como marcador da corrida electroforética. De seguida, se necessário, perfaz-se o volume final de 100 μl com tampão Dodge. A desnaturação das proteínas completar-se-á por aquecimento em banho fervente. Em paralelo, prepara-se um padrão de pesos moleculares (SDS-6H - Sigma), para ser aplicado ao lado das amostras. Este padrão, constituído por uma mistura de seis proteínas com pesos moleculares de 205.000 a 29.000, é preparado de acordo com as instruções do fornecedor, dividido em alíquotas e congelado até ao momento de utilização.

Entretanto, prepara-se o gel descontínuo, segundo o sistema de Laemmli. Para o “running gel” preparou-se uma solução de poli-acrilamida a 9% e para o “stacking gel” uma solução de poli-acrilamida a 4,5%. Na preparação destas soluções, para além do TEMED (Merck) usaram-se as seguintes soluções de trabalho: tampão Tris 1,5 M (Merck) a pH 8,8, tampão Tris 0,5 M (Merck) a pH 6,8, solução de SDS (Sigma) a 10%, solução de poli-acrilamida (Sigma) a 30% T 2,7% Bis, solução de PSA (Merck) a 10%.

Dadas as dimensões do suporte vertical para o gel (11 cm de comprimento por 8 cm de largura) na tina de electroforese usada (SE 280 Hoeffer Scientific Instruments) e a espessura pretendida para o gel (1,5 mm), preparou-se um volume de 15 ml para o "running gel", constituído por 6,5 ml de água destilada, 3,75 ml do tampão Tris 1,5 M a pH 8,8, 150 µl da solução de SDS, 54,5 ml da solução de poli-acrilamida e finalmente 100 µl da solução de PSA e 10 µl de TEMED. Depois de homogeneizada, coloca-se de imediato a solução (cerca de 12,5 ml) entre as duas placas de vidro do suporte vertical da tina de electroforese, perfeitamente limpas, desengorduradas com álcool e estanques na parte inferior e lateral. Para laquear a parte inferior recorreu-se a uma calha na qual se coloca um pequeno volume de uma solução de agarose (Difco) a 2%, liquefeita por aquecimento, e sobre a qual colocamos as placas de vidro poucos minutos antes de decantar a solução do "running gel" para o seu interior. As partes laterais são vedadas pelos espaçadores bem siliconizados, os quais determinam também a espessura do gel. As placas de vidro mantêm-se unidas e imóveis por acção de molas adequadas ao efeito pretendido. Logo que colocada a solução entre as duas placas de vidro, devem retirar-se alguns mililitros da camada superior da solução saturada de butanol em água, e adicioná-los de forma a cobrir toda a superfície do topo da solução do "running gel". A polimerização deverá processar-se por um período de aproximadamente 40', decorridos os quais deverá regeitar-se a solução saturada de butanol e lavar cuidadosamente o topo do gel, com água destilada. Sobre este gel deve de seguida pipetar-se a solução do "stacking gel". Para esta preparam-se 5 ml de uma solução constituída por 3,14 ml de água destilada, 1,25 ml do tampão Tris 0,5 M a pH 6,8, 50 µl da solução de SDS, 0,5 ml da solução de poli-acrilamida e por fim 50 µl da solução de PSA e 10 µl de TEMED. De imediato, introduz-se nesta mesma solução, já entre as placas de vidro, um pente de espessura igual à dos espaçadores e que determinará a formação de 10 cavidades, onde serão posteriormente colocadas as amostras. Este gel polimerizará em aproximadamente 15'.

Preparadas as amostras e o gel, adapta-se o suporte vertical com o gel à respectiva tina de electroforese e retira-se o pente. O gel é, então, imerso no tampão de electroforese, que conduzirá a corrente eléctrica entre os dois eléctrodos da tina, e que é constituído por tampão Tris 0,025 M a pH 8,3, glicina 0,192 M e 0,1% de SDS.

As amostras são pipetadas para cada uma das cavidades do gel, aplicando um volume que será determinado pela sensibilidade da técnica a usar na revelação. Sempre que se pretendeu revelar as proteínas pela técnica que usa o azul de Coomassie, aplicou-se

um volume de 20 μ l, enquanto que para a técnica de revelação pela prata se aplicou um volume de 5 μ l, correspondentes a 20 μ g e a 5 μ g de proteína, respectivamente. O volume da solução padrão a aplicar, será também função do tipo de coloração a usar na revelação, tendo-se aplicado um volume de 20 μ l para a primeira técnica e de 2 μ l para a técnica de coloração pela prata.

Aplicadas as amostras e o padrão, liga-se a tina de electroforese a uma fonte de energia (2197 Power supply - LKB) e regula-se a corrente para 12 mA, valor que se manterá até que o marcador da corrida, o azul de bromofenol, tenha penetrado no "running gel". A partir de então será regulada para 22 mA, mantendo-se este valor até ao final da corrida. A fim de eliminar interferências pela temperatura ambiente e sobreaquecimento do meio de suporte, a tina de electroforese e a respectiva fonte são colocadas no interior de uma câmara frigorífica e aí decorrerá a electroforese. A corrida electroforética terá lugar por um período de cerca de 4 horas e termina quando o marcador de corrida estiver a cerca de 1 cm do fundo do gel. Desligado o sistema, retira-se o suporte com o gel e de seguida destaca-se o "stacking gel" com a ajuda de uma espátula. O gel será, então, tratado por forma a revelar as proteínas distribuídas em bandas bem individualizadas, segundo o seu peso molecular.

1.3.6.3. - Revelação do Gel.

Para o estudo do perfil proteico da membrana eritrocitária foram usadas as duas técnicas de revelação já referidas, a coloração pelo azul de Coomassie e a coloração pela prata. Embora sejam ambas de uso generalizado, a sensibilidade das duas é perfeitamente distinta. Enquanto a coloração pela prata é sensível para valores de proteína superiores a 10 ng, a coloração pelo azul de Coomassie só é sensível para valores superiores a 1 μ g de proteína.

1.3.6.3.1. - Coloração pelo Azul de Coomassie.

É uma técnica de execução extremamente fácil, que consiste em imergir o gel na solução corante constituída por 0,125% de Coomassie blue R-250 (Sigma), 50% de metanol (Merck) e 10% de ácido acético (Merck), e incubar durante a noite, à temperatura ambiente, com agitação constante (Thomas rotating apparatus). A descoloração é feita por incubações sucessivas numa solução de metanol a 50% e de ácido acético (Merck) a 10%. A coloração e a descoloração devem ser feitas num volume de solução corante ou descolorante cinco vezes superior ao usado na preparação do gel.

A conservação do gel deve ser feita em água destilada até ao momento da sua análise.

1.3.6.3.2. - Coloração pela Prata.

Esta técnica, de execução um pouco mais complexa que a anterior, inclui uma primeira fase de fixação, em que o gel é imerso em soluções de composição diferente, com volume cinco vezes superior ao usado na preparação do gel. A imersão em cada uma das soluções é seguida de uma incubação por períodos de 20 a 30', com agitação à temperatura ambiente. As duas primeiras soluções fixadoras são soluções de metanol e ácido acético (50% metanol e 10% de ácido acético, a primeira; 5% de metanol e 7,5% de ácido acético, a segunda), enquanto a última é uma solução de glutaraldeído a 10%.

Depois de uma lavagem extensa e cuidadosa, com água destilada, inicia-se a segunda fase que constitui o processo para a revelação. Todo este processo deve ser conduzido sob agitação e à temperatura ambiente. Após uma incubação do gel numa solução de ditioneitol (DTT a 5 µg/ml), durante 30', segue-se outra, por igual período de tempo, em nitrato de prata a 0,1%. Esta incubação deve ser seguida de uma lavagem abundante e cuidadosa para remoção do excesso de prata, que conferiria ao gel um "background" escuro. A adição de uma solução de carbonato de sódio (Merck) a 3%, contendo 50 µl de formaldeído a 40% (Merck), revelará, após alguns minutos de incubação, as bandas de proteínas no gel. Para parar a revelação adicionam-se alguns mililitros de ácido cítrico (Merck) 2,3 M, suficientes para neutralizar o meio. A conservação do gel até à sua análise é feita em água destilada.

1.3.6.4. - Secagem do Gel.

A secagem de um gel permite a sua conservação por longos períodos de tempo.

Um gel apresenta habitualmente propensão para quebrar durante ou após secagem. A obtenção de um gel quebradiço pode ser prevenida imergindo o gel numa solução de 55% de metanol e 2% de glicerol, durante a noite que precede a execução da técnica de secagem do gel.

Para a secagem, utilizou-se um aparelho de secagem de geles (Dry Gel TMSR-SE 1160 da HFI). A técnica consiste em colocar o gel sobre uma folha de papel de filtro 3MM ligeiramente embebida em água destilada, previamente colocada na base do aparelho, e de seguida cobrir o gel com papel celofane, também previamente humedecido. Coloca-se a cobertura própria do aparelho e, depois de conectado o aparelho a um sistema

de vácuo, inicia-se o processo de secagem, que decorrerá durante cerca de 1 hora, regulando a temperatura do aparelho de secagem para 80° C.

1.3.7. - Estudo do Perfil da Proteína Banda 3 da Membrana Eritrocitária por "Western Blotting".

O perfil da proteína banda 3 foi estudado apenas num último grupo de indivíduos treinados (n=8), na sequência dos resultados obtidos para os indivíduos anteriormente estudados e que sugeriam alterações estruturais ou moleculares a nível da membrana eritrocitária, que, todavia, não eram quantificáveis no gel corado, obtido por SDS-PAGE.

1.3.7.1. - Electrofore em SDS-PAGE.

Para a execução deste estudo toma-se uma das alíquotas da suspensão de membranas obtida segundo a metodologia referida (1.3.5.1. e 1.3.5.2.) e procede-se a uma electroforese do tipo SDS-PAGE, de acordo com a metodologia também já referida (1.3.6.1. e 1.3.6.2.). De referir, todavia, que para este estudo se usou um padrão de pesos moleculares diferentes e que, sendo pré-corado, por conjugação das proteínas com um corante azul, permite a visualização das bandas correspondentes às proteínas que o constituem e a observação da sua migração ao longo do processo electroforético (Prestained SDS-7B molecular weight markers - Sigma). Além disso, os marcadores pré-corados são facilmente transferidos do gel proveniente da SDS-PAGE, para suportes sólidos como a nitrocelulose, o que permite confirmar por simples observação visual a eficiência do método de transferência. Este marcador inclui sete proteínas diferentes, com pesos moleculares de 180, 116, 84, 58, 48, 36,5 e 26,6 Kd, respectivamente. Acresce ainda referir que se aplicaram 20 µg de proteína por cavidade.

1.3.7.2. - Transferência de Proteínas.

Corrida a electroforese das amostras e do padrão, procede-se à transferência electroforética das proteínas para um suporte sólido de nitrocelulose (Towbin *et al.*, 1979), através de um sistema de "blotting" ou tina de transferência (TE 22 Hoefer Scientific Instruments) conectado a uma fonte de energia e a um sistema de refrigeração (LKB).

Na tina de transferência, colocada sobre um agitador magnético, deve introduzir-se um magnete, que garantirá a homogeneização da refrigeração do sistema electroforético, a qual é assegurada por conexão do sistema electroforético ao aparelho de refrigeração,

regulado por forma a manter uma temperatura constante de 12° C, durante todo o processo de transferência. A tina deve ser convenientemente cheia com o tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 191 mM a pH 8,3, adicionado de 20% de metanol no momento que precede o enchimento da tina) e proceder à refrigeração do sistema, cerca de 15', antes de introduzir o suporte com a sanduíche para transferência.

Destacado e regeitado o "stacking gel" das placas de vidro do suporte vertical da tina de electroforese, retira-se cuidadosamente o "running gel" e prepara-se a sanduíche para a transferência, num suporte apropriado do sistema de transferência. Sobre a folha de esponja do suporte e de uma folha de papel 3 MM (Whatman), previamente embebidas no tampão de transferência, coloca-se o gel, que deve ser recoberto por uma folha de nitrocelulose com uma porosidade de 0,22 μ m (Schleider & Schüel), perfeitamente embebida no tampão de transferência. Sobre esta coloca-se uma folha de papel 3MM e de seguida a folha esponjosa do suporte, ambas embebidas em tampão. Preparada a sanduíche, fecha-se o suporte e coloca-se verticalmente na calha da tina de transferência, de tal forma que o gel fique do lado do cátodo e a nitrocelulose do lado do ânodo. Depois de fechar o sistema de transferência e de o ligar a uma fonte de alta voltagem, aplicar uma corrente constante de 20 mA durante a noite, seguida de uma corrente constante de 200 mA durante 1 hora.

Uma vez feita a transferência de proteínas, bem evidente pela completa ausência do padrão no gel, procede-se à lavagem da nitrocelulose em PBS pH 7,0. De seguida, a nitrocelulose deve ser submetida a um bloqueio dos locais de reacção que não reagiram, por forma a prevenir posteriores reacções inespecíficas. Este, é feito por imersão da nitrocelulose numa solução a 5% de leite em pó (Molico magro) em PBS pH 7,0, contendo 0,1% de Triton X-100, durante 1 hora, com agitação suave, à temperatura ambiente. Feito o bloqueio, a nitrocelulose é lavada duas vezes, por períodos de 10' em PBS pH 7,0, contendo 0,1% de Triton X-100, com agitação suave, à temperatura ambiente.

1.3.7.3. - Incubação com os Anticorpos.

Para a detecção da banda 3 usou-se um sistema de dois anticorpos, o primeiro dirigido para a banda 3, e um segundo anticorpo que, para além de se ligar ao primeiro, é também conjugado com uma peroxidase, a qual permitirá, no final, revelar a proteína banda 3 presente na nitrocelulose.

A primeira incubação da nitrocelulose, utiliza um anticorpo monoclonal produzido

no rato (IgG) e dirigido para a banda 3 humana (Sigma). Este anticorpo reconhece um epítopo localizado no domínio citoplasmático da molécula de banda 3, localizado a cerca de 20 Kd do terminal NH₂, pelo que reconhecerá não só a molécula de banda 3, de 90 a 100 Kd, mas também outros fragmentos peptídicos, já reconhecidos na membrana de eritrócitos circulantes, por SDS-PAGE. Estes fragmentos peptídicos migram nas regiões de 55-60, 38-42 e 21-26 Kd, atribuindo-se esta micro-heterogeneidade dos fragmentos à heterogeneidade estrutural da porção glúcídica da molécula de banda 3. Por uma questão de simplicidade serão designados por fragmentos 60, 40 e 20, respectivamente. Os dois últimos resultam de clivagem da molécula de banda 3, em pontos pertencentes ao domínio citoplasmático, enquanto que o fragmento 60 resulta da clivagem do domínio transmembranar, cujo ponto de clivagem é acessível na superfície exofacial da membrana. Ou seja, a proteólise da molécula de banda 3, pode revelar-se pela detecção de bandas migrando nas regiões de 60, 40 e 20 Kd, e a agregação de banda 3 pode revelar-se pelo aparecimento de bandas de peso molecular superior ao seu.

Para a incubação da nitrocelulose com o anticorpo anti-banda 3, preparou-se uma diluição do anticorpo a 1/3.000 em PBS pH 7,0, contendo 0,5% de leite em pó e 0,1% de Triton-X 100. A incubação processou-se à temperatura ambiente, com agitação suave, durante 4 horas (2219 Multitemp II thermostatic circulator - LKB). Decorrido este período e após lavagem para remoção do anticorpo que não reagiu (3 lavagens de 10 minutos), procede-se à incubação com o segundo anticorpo, dirigido para as imunoglobulinas de rato e conjugada com uma peroxidase (Anti-mouse Ig, peroxidase linked species-specific whole antibody - Amersham). A incubação é feita numa solução de PBS pH 7,0, contendo 0,5% de leite em pó, 0,1% de Triton-X 100 e o anticorpo numa diluição de 1/300, durante 1 hora, nas mesmas condições de agitação e temperatura que a incubação anterior. A revelação será precedida de uma lavagem cuidadosa da nitrocelulose, utilizando na última lavagem PBS pH 7,0. Todas as outras lavagens referidas, devem utilizar PBS pH 7,0, contendo 0,1% de Triton-X 100.

1.3.7.4. - Revelação.

Para a revelação usa-se uma solução filtrada, de preparação recente, contendo 99 ml de PBS pH 7,0 e 1 ml de uma solução a 5% de 4-cloro-1-naftol em etanol absoluto. No momento da revelação adiciona-se a esta solução, na qual se encontra imersa a nitrocelulose, 30 µl de peróxido de hidrogénio a 30%. Desenvolvem-se bandas bem visíveis de cor azul escura, com um "background" praticamente nulo. O processo termina

adicionando água destilada.

1.3.7.5. - Quantificação por Densitometria.

A quantificação relativa das diferentes bandas, correspondentes aos agregados, à banda 3 e aos seus fragmentos peptídicos, é feita num densitómetro (Cybertech CS1), tendo em vista o estudo de modificações moleculares a nível da banda 3, impostas pelo *stress* associado ao exercício físico.

O perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária, definido na tira de nitrocelulose, é fotografado e a imagem tratada por um computador acoplado ao densitómetro, que fará o traçado do espectro. Este sistema permitirá não só fazer a integração das áreas, por forma a avaliar a relação percentual das diferentes bandas, como também avaliar o peso molecular das proteínas, a partir de uma curva de calibração traçada com base no padrão de pesos moleculares.

1.3.8. - “Western Blotting” para Estudo da Lactoferrina do Lisado de Polimorfonucleares (PMN).

1.3.8.1. - Isolamento e preparação dos PMN.

Como foi referido no ponto 1.3.5.1., a centrifugação em gradiente descontínuo, de dupla densidade (Histopaque) permite a separação das diferentes células sanguíneas em três camadas distintas, a do topo constituída por células mononucleares - linfócitos e monócitos - a intermédia que inclui os polimorfonucleares - neutrófilos, eosinófilos e basófilos - e, finalmente, no fundo do tubo toda a população eritrocitária. Assim, na mesma operação em que se procedeu ao isolamento de eritrócitos, executou-se também a separação de PMN, por forma a realizar este estudo. Acresce que esta técnica de separação de PMN só é viável se praticada no período de 3 horas após a colheita, e que a suspensão globular deve ser tratada com cuidado, sem agitação vigorosa, nem incorporação de bolhas de ar, evitando assim a activação dos PMN. Depois de isolados e convenientemente lavados (3 vezes a 2.500 rpm e à temperatura de 4° C) em Hanks Balanced Salt Solution (HBSS - Sigma), ressuspendem-se num volume conhecido de HBSS (habitualmente usou-se 1 ml) e determina-se a concentração globular da suspensão obtida, por contagem automática, num contador de glóbulos do tipo Microcell Counter CC 120 Sismex.

1.3.8.2. - Preparação das Amostras para a Electroforese do Tipo SDS-PAGE.

A suspensão de PMN, de concentração globular conhecida, é submetida a uma sonicação durante 40'' a 40 unidades, para lise das células, tendo o cuidado de colocar o tubo que contém a amostra, imerso em gelo picado, já que o desenvolvimento de calor que acompanha este procedimento poderia levar a modificações nos constituintes da amostra.

Preparado o lisado de PMN, coloca-se num "eppendorf" um volume de lisado equivalente a $0,5 \times 10^6$ PMN e junta-se acetona gelada num volume 5 vezes superior ao do lisado. A suspensão é colocada a -20°C durante 1 hora e de seguida é centrifugada a 14.000 rpm durante 15'. Regeitado o sobrenadante, faz-se a evaporação da acetona no vácuo. A concentração da amostra por esta técnica permitirá obter no tratamento electroforético bandas com melhor resolução. Ressuspende-se a amostra concentrada, em 20 μl de HBSS e igual volume de tampão solubilizante (Tris HCl 0,125 M a pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol e 0,1% de azul de bromofenol) e leva-se à ebulição em banho de água fervente, durante 2'. Em paralelo prepara-se um padrão de lactoferrina e também um padrão de pesos moleculares (SDS - 6H - Sigma).

1.3.8.3. - Electroforese por SDS-PAGE e Transferência de Proteínas.

O gel para a electroforese é preparado segundo o sistema de Laemmli, de acordo com a metodologia referida no ponto 1.3.6.2.. Refira-se, todavia, que se usou uma solução de poliacrilamida a 30% T 0,8% Bis na preparação do "running gel" a 9%, e de 30% T 1,6% Bis na preparação do "stacking gel" a 4,5%. A electroforese foi executada segundo a metodologia descrita no mesmo ponto. Em cada cavidade do gel são colocados 20 μl de amostra. Do padrão de lactoferrina (Sigma), tratado nas mesmas condições das amostras, será aplicado um volume contendo 10 μg de lactoferrina.

Corrida a electroforese, procede-se à transferência de proteínas para um suporte sólido de nitrocelulose com uma porosidade de 0,45 μm (Schleider & Schüel), segundo a técnica descrita no ponto 1.3.7.2.

A fim de localizar a lactoferrina e as proteínas do padrão de pesos moleculares na tira de nitrocelulose, lava-se esta com PBS pH 7,0 e de seguida procede-se a uma coloração com uma solução a 0,2% de Ponceau S (Merck) em ácido tricloroacético a 3%, durante alguns minutos. Regeita-se o corante e faz-se uma breve lavagem com PBS pH 7,0, marcando-se, então, com a ajuda de uma caneta, as bandas correspondentes aos marcadores de pesos moleculares e ao padrão de lactoferrina, bem como o ponto de início

da corrida no running gel. Depois de descorar a tira por lavagens sucessivas com PBS pH 7,0, far-se-á a detecção imunológica da lactoferrina.

1.3.8.4. - Detecção Imunológica e Revelação da Lactoferrina.

Na detecção imunológica da lactoferrina utilizou-se uma metodologia semelhante à descrita para a detecção da proteína banda 3 da membrana eritrocitária (pontos 1.3.7.3. e 1.3.7.4.), diferindo apenas no sistema de anticorpos utilizado.

A primeira incubação utilizou um soro contendo anticorpos dirigidos para a lactoferrina (Amersham), produzidos no coelho, numa diluição de 1/150. Como segundo anticorpo usou-se um soro contendo uma imunoglobulina anti-Ig de coelho conjugada com uma peroxidase (Amersham), numa diluição de 1/300.

2. - Resultados.

Os resultados obtidos serão apresentados e analisados, por forma a quantificar as modificações impostas pelo exercício físico nos diversos parâmetros estudados e, ainda, analisá-los no sentido de verificar eventuais diferenças nas modificações impostas pelo exercício físico nos indivíduos treinados e não treinados.

Este estudo dividiu-se em duas fases. Na primeira, procedeu-se ao estudo das modificações quantitativas e qualitativas incluídas no hemograma e ao estudo da actividade enzimática da G6PD eritrocitária, cujas determinações se estenderam à segunda fase ($n = 24$); nas fracções eritrocitárias, obtidas por ultracentrifugação em gradiente de densidade descontínuo, fez-se o estudo da actividade enzimática da G6PD eritrocitária e o estudo electroforético da G6PD eritrocitária por focagem isoeléctrica ($n = 10$). Na segunda fase, iniciou-se a aplicação de outras técnicas para estudo da membrana eritrocitária, nomeadamente o estudo do perfil electroforético das proteínas da membrana eritrocitária, a ligação da hemoglobina à membrana e o perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária, e, ainda, de outras técnicas para estudo e avaliação de bioactivação de leucócitos. Para melhor interpretação e clarificação de alterações impostas pelo exercício físico, observadas no hemograma, foi feita também nesta segunda fase, a colheita de sangue 1 hora após o termo do exercício físico ($n = 8$). Também por esta altura se haviam já alargado os trabalhos ao estudo do *stress* nos doentes cardiovasculares e no grupo controlo.

2.1. - Hemograma.

2.1.1. - Modificações Impostas pelo Exercício Físico na Amostra Total.

O estudo do hemograma, feito na amostra total de 24 indivíduos, é apresentado na Tabela 3 e mostra que o exercício físico determina modificações significativas em todos os parâmetros, com excepção da HGM. Nesta tabela podemos observar os valores médios e respectivos valores de desvio padrão (média \pm d.p.) para cada um dos parâmetros constituintes do hemograma, em repouso e após exercício físico; apresentam-se também os valores da variação percentual imposta pelo exercício físico em cada um dos parâmetros e a comparação dos valores em repouso e após exercício físico, por aplicação do teste t de Student.

Relativamente à população eritrocitária, podemos observar que o exercício físico

impôs um aumento significativo no número de glóbulos vermelhos por litro de sangue, no hematócrito, na concentração de hemoglobina, no volume globular médio e na concentração de hemoglobina globular média. Em todos os indivíduos se observou hemoconcentração, bem evidenciada pela modificação no número de GV/l e na concentração de Hb, sendo o seu valor médio de cerca de 10%. Todavia, a modificação observada no Ht tem um valor díspare (12,5%), que se reflecte num aumento de 2,5% para o VGM e numa redução de igual valor para a CHGM.

Em paralelo, observa-se também um aumento significativo na população total de leucócitos, sendo o seu valor médio de 71,1% ($\Delta\%$). Embora se observe um aumento para os diferentes tipos de leucócitos, são os linfócitos, os neutrófilos e os monócitos os principais responsáveis por essa modificação. Os linfócitos apresentam o aumento mais elevado (120,2%), seguindo-se os monócitos (90,4%) e os neutrófilos (34,6%). Na população linfocitária observa-se um aumento extraordinário (286,4%) numa população linfocitária que se caracteriza por apresentar grandes dimensões e granulação azurófila bem evidente, que designámos por grandes linfócitos granulares (GLG) e que parecem corresponder a uma subpopulação linfocitária designada por células NK (natural killer).

As modificações na concentração de eritrócitos e de neutrófilos, impostas pelo exercício físico, determinam uma relação entre o número de GV por neutrófilo (GV/Neut) significativamente mais baixa que a observada em repouso.

2.1.2. - Modificações Impostas pelo Exercício Físico no Subgrupo Não Treinado.

As modificações observadas no subgrupo de indivíduos não treinados estão apresentadas na Tabela 4 e são similares áquelas referidas para o grupo total. De facto, todos os parâmetros, exceptuando a HGM, apresentam modificações significativas com o exercício físico.

Tal como acontecia no grupo total, o aumento percentual do número de GV/l, da concentração de Hb e do Ht não é igual, sendo o aumento do valor de Ht superior ao dos outros dois.

O número de GB/l aumenta significativamente, com um acréscimo percentual médio de 56,9%. Esta modificação deve-se principalmente a um aumento nos linfócitos (103,3%) e em menor extensão a um aumento dos neutrófilos (26,4%) e monócitos (59,3%). Os GLG apresentam também um aumento significativo (263,6%).

Também neste subgrupo as modificações na concentração de eritrócitos e de neutrófilos, impostas pelo exercício físico, determinam uma relação entre o número de

(n = 24)	A	D	Δ	$\Delta\%$	P
GV/l ($\times 10^{12}$)	5,12 \pm 0,46	5,62 \pm 0,47	+ 0,49 \pm 0,22	+ 10,0 \pm 4,4	0,001
Ht (l/l)	0,47 \pm 0,03	0,53 \pm 0,04	+ 0,06 \pm 0,03	+ 12,4 \pm 5,8	< 0,001
VGM (fl)	91,4 \pm 3,6	93,7 \pm 3,8	+ 2,31 \pm 2,47	+ 2,55 \pm 2,68	0,034
Hb (g/dl)	14,9 \pm 1,2	16,3 \pm 0,9	+ 1,40 \pm 0,75	+ 9,60 \pm 5,40	< 0,001
HGM (pg)	29,2 \pm 1,05	29,2 \pm 1,50	0,02 \pm 0,97	0,05 \pm 3,38	s.s.
CHGM (g/dl)	31,9 \pm 1,1	31,1 \pm 1,4	- 0,78 \pm 1,48	- 2,61 \pm 4,49	0,008
GB/l ($\times 10^9$)	6,73 \pm 1,43	11,36 \pm 2,46	+ 4,63 \pm 1,76	+ 71,1 \pm 28,0	< 0,001
Neut./l ($\times 10^9$)	3,40 \pm 0,99	4,43 \pm 1,27	+ 1,06 \pm 0,75	+ 34,6 \pm 32,5	< 0,001
Linf./l ($\times 10^9$)	2,67 \pm 0,78	5,76 \pm 1,86	+ 3,09 \pm 1,48	+ 120,2 \pm 56,1	< 0,001
GLG/l ($\times 10^9$)	0,29 \pm 0,18	1,00 \pm 0,73	+ 0,71 \pm 0,62	+ 286,4 \pm 209,3	< 0,001
Monóc./l ($\times 10^9$)	0,41 \pm 0,16	0,80 \pm 0,31	+ 3,09 \pm 1,48	+ 90,4 \pm 55,9	< 0,001
GV/Neut.	1575 \pm 443	1362 \pm 443	- 214 \pm 377	- 12,6 \pm 17,7	0,011
G6PD (UI/gHb)	4,44 \pm 0,54	4,32 \pm 0,44	- 0,11 \pm 0,47	- 1,79 \pm 10,2	s.s.

Tab. 3: Estudo do hemograma, da relação n^oGV/Neutrófilo e da actividade da G6PD eritrocitária na amostra total (n = 24). Apresenta-se a média \pm d.p. para os diferentes parâmetros em repouso antes do exercício (A) e depois do exercício físico (D). Refere-se ainda a média \pm d.p. das modificações observadas (Δ), o respectivo valor percentual ($\Delta\%$) e os valores de P calculados pelo teste t de Student.

(n = 12 NT)	A	D	Δ	$\Delta\%$	P
GV/l ($\times 10^{12}$)	5,13 \pm 0,44	5,59 \pm 0,54	+ 0,46 \pm 0,23	+ 9,5 \pm 4,7	< 0,001
Ht (l/l)	0,47 \pm 0,03	0,53 \pm 0,04	+ 0,06 \pm 0,03	+ 11,6 \pm 6,1	< 0,001
VGM (fl)	91,8 \pm 4,6	94,2 \pm 4,0	+ 2,40 \pm 2,67	+ 2,3 \pm 2,9	0,014
Hb (g/dl)	15,0 \pm 0,8	16,1 \pm 0,9	+ 1,16 \pm 0,65	+ 7,8 \pm 4,5	< 0,001
HGM (pg)	29,3 \pm 1,3	29,0 \pm 1,9	- 0,29 \pm 0,92	- 0,8 \pm 3,2	s.s.
CHGM (g/dl)	31,8 \pm 1,2	30,7 \pm 1,6	- 1,17 \pm 1,73	- 3,6 \pm 5,4	0,048
GB/l ($\times 10^9$)	6,85 \pm 1,30	10,66 \pm 2,38	+ 3,81 \pm 1,76	+ 56,9 \pm 24,7	< 0,001
Neut./l ($\times 10^9$)	3,67 \pm 0,91	4,60 \pm 1,40	+ 0,99 \pm 0,75	+ 26,4 \pm 17,5	0,004
Linf./l ($\times 10^9$)	2,58 \pm 0,67	5,06 \pm 1,26	+ 2,48 \pm 1,12	+ 103,3 \pm 50,2	< 0,001
GLG/l ($\times 10^9$)	0,29 \pm 0,20	0,84 \pm 0,28	+ 0,54 \pm 0,20	+ 263,6 \pm 140,2	< 0,001
Monóc./l ($\times 10^9$)	0,41 \pm 0,11	0,66 \pm 0,20	+ 0,24 \pm 0,13	+ 59,3 \pm 26,8	< 0,001
GV/Neut.	1480 \pm 404	1318 \pm 412	- 163 \pm 205	- 11,3 \pm 15,3	0,025
G6PD (UI/g Hb)	4,62 \pm 0,54	4,61 \pm 0,42	- 0,06 \pm 0,36	- 1,9 \pm 7,0	s.s.

Tab. 4: Estudo do hemograma, da relação n° GV/Neutr3filo e da actividade da G6PD eritrocit3ria no subgrupo de indiv3duos n3o treinados (NT) (n = 12). Apresenta-se a m3dia \pm d.p. para os diferentes par3metros em repouso antes do exerc3cio (A) e depois do exerc3cio f3sico (D). Refere-se ainda a m3dia \pm d.p. das modifica33es observadas (Δ), o respectivo valor percentual ($\Delta\%$) e os valores de P calculados pelo teste t de Student.

GV/Neutrófilo por neutrófilo significativamente mais baixa que a observada em repouso.

2.1.3. - Modificações Impostas pelo Exercício Físico no Subgrupo Treinado.

As modificações impostas pelo exercício físico nos diversos parâmetros referentes ao hemograma, no subgrupo de 12 indivíduos treinados, podem observar-se na Tabela 5. Todos os parâmetros sofrem modificações significativas, com exceção da HGM e da CHGM.

O aumento ($\Delta\%$) no número de GV/l toma neste subgrupo um valor médio de cerca de 10,5%, próximo do valor apresentado pelo aumento de Hb (11,2%) e mais distante do aumento observado para o Ht (13,1%).

O número de GB/l tem neste subgrupo um aumento percentual médio de 83,1%, devido a um aumento médio de 135,8% nos linfócitos, 118,9% nos monócitos e 41,6% nos neutrófilos. A subpopulação linfocitária de GLG sofre também neste subgrupo um aumento considerável de 311,2%.

Neste subgrupo T, apesar de as modificações na concentração de eritrócitos e de neutrófilos, impostas pelo exercício físico, serem superiores às apresentadas pelo subgrupo NT, não determinam uma relação GV/Neutrófilo significativamente mais baixa que a observada em repouso.

2.1.4. - Estudo Comparativo entre T e NT antes (A) e depois (D) do Exercício Físico.

Neste estudo comparativo, apresentado na Tabela 6, não se encontraram diferenças significativas entre os valores do hemograma apresentados em repouso e os valores do mesmo, impostos pelo exercício físico, nos indivíduos T e NT, com exceção para o valor de monócitos que é significativamente superior depois do exercício físico, no subgrupo T. Note-se, todavia, que apesar de não haver diferenças significativas, os valores no número de GB, de linfócitos totais, da subpopulação linfocitária GLG e de monócitos, apresentados pelo subgrupo T é superior aos observados no subgrupo NT. As modificações relativas aos eritrócitos são já mais notórias no subgrupo NT, em que podemos observar, após o exercício físico, um valor mais baixo no número de GV/l, na concentração de Hb e na CHGM, em paralelo com um valor superior de VGM.

O valor da relação GV/Neutrófilo não apresenta diferenças significativas nos dois subgrupos, quer em repouso, quer após exercício físico.

(n = 12 T)	A	D	Δ	$\Delta\%$	P
GV/l ($\times 10^{12}$)	5,12 \pm 0,50	5,64 \pm 0,42	+ 0,52 \pm 0,20	+ 10,5 \pm 4,3	< 0,001
Ht (l/l)	0,47 \pm 0,04	0,53 \pm 0,04	+ 0,06 \pm 0,03	+ 13,1 \pm 5,7	< 0,001
VGM (fl)	91,1 \pm 2,5	93,3 \pm 3,7	+ 2,23 \pm 2,39	+ 2,4 \pm 2,6	0,006
Hb (g/dl)	14,9 \pm 1,4	16,5 \pm 1,0	+ 1,60 \pm 0,79	+ 11,2 \pm 5,8	< 0,001
HGM (pg)	29,1 \pm 0,9	29,3 \pm 1,1	+ 0,21 \pm 0,99	+ 0,8 \pm 3,5	s.s.
CHGM (g/dl)	32,0 \pm 1,0	31,4 \pm 1,2	- 0,45 \pm 1,20	- 1,8 \pm 3,6	s.s.
GB/l ($\times 10^9$)	6,62 \pm 1,58	11,95 \pm 2,47	+ 5,33 \pm 1,48	+ 83,1 \pm 25,5	< 0,001
Neut./l ($\times 10^9$)	3,17 \pm 1,03	4,29 \pm 1,20	+ 1,12 \pm 0,77	+ 41,6 \pm 40,7	< 0,001
Linf./l ($\times 10^9$)	2,74 \pm 0,88	6,35 \pm 2,13	+ 3,61 \pm 1,59	+ 135,8 \pm 58,6	< 0,001
GLG/l ($\times 10^9$)	0,29 \pm 0,16	1,14 \pm 0,97	+ 0,86 \pm 0,83	+ 311,2 \pm 271,0	0,004
Monóc./l ($\times 10^9$)	0,41 \pm 0,20	0,93 \pm 0,35	+ 0,52 \pm 0,27	+ 118,9 \pm 61,1	< 0,001
GV/Neut.	1655 \pm 475	1399 \pm 481	- 256 \pm 482	- 13,8 \pm 20,1	s.s.
G6PD (UI/g Hb)	4,22 \pm 0,37	4,10 \pm 0,23	- 0,12 \pm 0,18	- 1,7 \pm 12,9	s.s.

Tab. 5: Estudo do hemograma, da relação n° GV/Neutrófilo e da actividade da G6PD eritrocitária no subgrupo de indivíduos treinados (T) (n = 12). Apresenta-se a média \pm d.p. para os diferentes parâmetros em repouso antes do exercício (A) e depois do exercício físico (D). Refere-se ainda a média \pm d.p. das modificações observadas (Δ), o respectivo valor percentual ($\Delta\%$) e os valores de P calculados pelo teste t de Student.

(n = 24)	A/T	A/NT	P	D/T	D/NT	P
GV/l ($\times 10^{12}$)	5,12 \pm 0,50	5,13 \pm 0,44	s.s.	5,64 \pm 0,42	5,59 \pm 0,54	s.s.
Ht (l/l)	0,47 \pm 0,04	0,47 \pm 0,03	s.s.	0,53 \pm 0,04	0,53 \pm 0,04	s.s.
VGM (fl)	91,1 \pm 2,5	91,8 \pm 4,6	s.s.	93,3 \pm 3,7	94,2 \pm 4,0	s.s.
Hb (g/dl)	14,9 \pm 1,4	15,0 \pm 0,8	s.s.	16,5 \pm 1,0	16,1 \pm 0,9	s.s.
HGM (pg)	29,1 \pm 0,9	29,3 \pm 1,3	s.s.	29,3 \pm 1,1	29,0 \pm 1,9	s.s.
CHGM (g/dl)	32,0 \pm 1,0	31,8 \pm 1,2	s.s.	31,4 \pm 1,2	30,7 \pm 1,6	s.s.
GB/l ($\times 10^9$)	6,62 \pm 1,58	6,85 \pm 1,30	s.s.	11,95 \pm 2,47	10,66 \pm 2,38	s.s.
Neut./l ($\times 10^9$)	3,17 \pm 1,03	3,67 \pm 0,91	s.s.	4,29 \pm 1,20	4,60 \pm 1,40	s.s.
Linf./l ($\times 10^9$)	2,74 \pm 0,88	2,58 \pm 0,67	s.s.	6,35 \pm 2,13	5,06 \pm 1,26	s.s.
GLG/l ($\times 10^9$)	0,29 \pm 0,16	0,29 \pm 0,20	s.s.	1,14 \pm 0,97	0,84 \pm 0,28	s.s.
Monóc./l ($\times 10^9$)	0,41 \pm 0,20	0,41 \pm 0,11	s.s.	0,93 \pm 0,35	0,66 \pm 0,20	0,03
GV/Neut.	1655 \pm 475	1480 \pm 404	s.s.	1399 \pm 481	1318 \pm 412	s.s.
G6PD (UI/g Hb)	4,22 \pm 0,37	4,62 \pm 0,64	s.s.	4,10 \pm 0,23	4,61 \pm 0,42	s.s.

Tab. 6: Estudo comparativo dos valores (média \pm d.p.) do hemograma, da relação n^oGV/Neutrófilo e da actividade da G6PD eritrocitária, apresentados pelos indivíduos T e NT, em repouso e depois do exercício físico. Os valores de P foram calculados pelo teste t de Student.

(n = 24)	$\Delta\%$ T	$\Delta\%$ NT	P
GV/l ($\times 10^{12}$)	- 10,5 \pm 4,3	- 9,5 \pm 4,7	s.s.
Ht (l/l)	+ 13,1 \pm 5,7	+ 11,6 \pm 6,1	s.s.
VGM (fl)	+ 2,4 \pm 2,6	+ 2,7 \pm 2,9	s.s.
Hb (g/dl)	+ 11,2 \pm 5,8	+ 7,8 \pm 4,5	s.s.
HGM (pg)	+ 0,8 \pm 3,5	- 0,8 \pm 3,2	s.s.
CHGM (g/dl)	- 1,8 \pm 3,6	- 3,6 \pm 5,4	s.s.
GB/l ($\times 10^9$)	+ 83,1 \pm 25,5	+ 56,9 \pm 24,7	0,031
Neut./l ($\times 10^9$)	+ 41,6 \pm 40,7	+ 26,4 \pm 17,5	s.s.
Linf./l ($\times 10^9$)	+ 135,8 \pm 58,6	+ 103,3 \pm 50,2	s.s.
GLG/l ($\times 10^9$)	+ 311,2 \pm 271,02	+ 263,6 \pm 140,2	s.s.
Monóc./l ($\times 10^9$)	+ 118,9 \pm 61,1	+ 59,3 \pm 26,8	0,005
GV/Neut.	- 13,8 \pm 20,1	- 11,3 \pm 15,3	s.s.
G6PD (UI/g Hb)	- 1,7 \pm 12,9	- 1,9 \pm 7,0	s.s.

Tab. 7: Estudo comparativo das modificações percentuais (média \pm d.p.) impostas pelo exercício físico no hemograma, na relação n^oGV/Neutrófilo e na actividade da G6PD eritrocitária dos indivíduos T e NT. Os valores de P foram calculados pelo teste t de Student.

Na Tabela 7 apresenta-se um estudo comparativo das modificações percentuais impostas pelo exercício físico nos indivíduos T e NT, a fim de verificar se o valor da modificação imposta, é semelhante ou significativamente diferente nos dois subgrupos.

Apesar da ausência de diferenças significativas, pode notar-se no subgrupo T um aumento superior no número de GV/l, na concentração de Hb e no Ht. O subgrupo NT apresenta, contudo, modificações mais acentuadas para o VGM e para a CHGM.

Relativamente às modificações na população leucocitária, pode observar-se um aumento significativamente superior no acréscimo de GB e de monócitos, impostos pelo exercício físico, no subgrupo T. Além disso, este subgrupo apresenta também, relativamente ao subgrupo NT, aumentos superiores de neutrófilos e linfócitos, nomeadamente de GLG, embora sem diferença significativa.

A modificação observada na relação GV/Neutrófilo, apesar de ter um valor superior no subgrupo T, não é, todavia, significativamente diferente da modificação apresentada pelo subgrupo NT.

2.1.5. - Modificações Impostas pelo Exercício Físico e sua Recuperação 1 hora Após o seu Termo.

Nos últimos nove indivíduos da amostra total fez-se o estudo do hemograma em repouso (A), depois do exercício físico (D) e 1 hora depois do seu termo (1h), por forma a clarificar as modificações observadas na população eritrocitária.

Na Tabela 8 podem observar-se os valores (média \pm d.p.) encontrados, bem como as modificações percentuais relativas aos três estados - A, D e 1h - e o respectivo estudo comparativo, calculando o valor de *P* pelo teste *t* de Student.

Para além das modificações significativas impostas pelo exercício físico, referidas anteriormente, observou-se que 1 hora após o termo do exercício físico se verifica uma inversão, também significativa, na maioria dos parâmetros, isto é, os valores que com o exercício sofriam um aumento, apresentavam agora uma redução, e aqueles que haviam sofrido um decréscimo com o exercício, apresentavam agora valores mais elevados.

No seguimento destes resultados, procedeu-se a um estudo comparativo dos valores em repouso, com aqueles observados 1 hora depois do termo do exercício físico, a fim de verificarmos quais os valores de repouso que eram recuperados e quais os que tomavam valores diferentes. Verificou-se uma recuperação nos índices hematimétricos, em paralelo com uma redução significativa no número de GV/l e no valor de Ht. O número de GB/l recupera o valor de repouso, apresentando, todavia, uma população leucocitária distinta,

(n=9)	A	D	1h	$\Delta\%$ A/D	P	$\Delta\%$ D/1h	P	$\Delta\%$ A/1h	P
GV/l ($\times 10^{12}$)	5,33 \pm 0,51	5,70 \pm 0,45	5,24 \pm 0,43	+ 7,3 \pm 3,5	< 0,001	- 8,2 \pm 2,2	< 0,001	- 1,5 \pm 2,1	0,005
Ht (l/l)	0,48 \pm 0,04	0,53 \pm 0,04	0,47 \pm 0,03	+ 9,0 \pm 3,4	< 0,001	- 10,1 \pm 1,9	0,05	- 2,2 \pm 2,7	0,03
VGM (fl)	91,1 \pm 4,8	92,6 \pm 4,1	90,4 \pm 3,9	+ 1,7 \pm 2,4	s.s.	- 0,7 \pm 3,9	< 0,001	- 0,7 \pm 3,6	s.s.
Hb (g/dl)	15,6 \pm 1,2	16,7 \pm 0,9	15,3 \pm 0,7	+ 7,1 \pm 5,0	0,003	- 8,1 \pm 2,0	< 0,001	- 1,8 \pm 4,1	s.s.
HGM (pg)	29,4 \pm 1,0	29,4 \pm 1,3	29,3 \pm 1,5	- 0,1 \pm 1,6	s.s.	- 0,2 \pm 1,2	s.s.	- 0,3 \pm 2,3	s.s.
CHGM (g/dl)	32,3 \pm 1,3	31,7 \pm 1,4	32,4 \pm 1,2	- 1,8 \pm 3,7	s.s.	+ 2,3 \pm 2,8	0,04	+ 0,4 \pm 5,0	s.s.
GB/l ($\times 10^9$)	6,78 \pm 1,85	12,31 \pm 2,90	5,64 \pm 1,93	+ 84,1 \pm 22,9	< 0,001	- 45,1 \pm 8,7	< 0,001	- 0,4 \pm 7,7	s.s.
Neut./l ($\times 10^9$)	3,27 \pm 1,14	4,46 \pm 1,68	4,24 \pm 1,14	+ 37,5 \pm 21,2	0,002	- 0,1 \pm 19,9	s.s.	+ 34,8 \pm 19,0	< 0,001
Linf./l ($\times 10^9$)	2,72 \pm 1,04	6,60 \pm 2,11	1,83 \pm 0,56	+ 146,6 \pm 35,1	< 0,001	- 71,6 \pm 6,7	< 0,001	- 33,9 \pm 22,0	0,007
GLG/l ($\times 10^9$)	0,28 \pm 0,17	1,01 \pm 0,58	0,12 \pm 0,10	+ 292,9 \pm 229,2	0,003	- 86,7 \pm 8,7	0,003	- 59,3 \pm 22,3	0,009
Monóc./l ($\times 10^9$)	0,50 \pm 0,18	0,91 \pm 0,33	0,39 \pm 0,14	+ 90,9 \pm 47,3	< 0,001	- 56,4 \pm 11,6	< 0,001	- 18,2 \pm 28,7	0,025
GV/Neut	1573 \pm 385	1427 \pm 632	1187 \pm 209	- 12,1 \pm 18,7	s.s.	- 8,3 \pm 25,6	s.s.	- 23,3 \pm 8,0	0,001
G6PD (UI/g Hb)	4,36 \pm 0,60	4,11 \pm 0,23	4,23 \pm 0,53	- 4,4 \pm 13,9	s.s.	+ 3,1 \pm 12,8	s.s.	- 2,7 \pm 8,9	s.s.
HbLM ($\% \times 10^{-4}$)	210,7 \pm 47,1	198,9 \pm 66,6	203,2 \pm 73,8	- 64,2 \pm 26,0	s.s.	+ 5,56 \pm 27,8	s.s.	- 5,07 \pm 17,2	s.s.

Tab. 8: Valores (média \pm d.p.) do hemograma, da actividade da G6PD eritrocitária e da %HbLM, num grupo de 9 indivíduos, antes do exercício físico (A), depois (D) e após 1 hora(1 h) do termo do exercício físico. Referem-se, ainda, as modificações percentuais entre A, D e 1h e a sua comparação pelo teste t de Student.

com mais neutrófilos e menos linfócitos e monócitos. De facto, o número de neutrófilos mantém-se significativamente elevado 1 hora depois do termo do exercício físico, relativamente ao valor de repouso, enquanto os linfócitos, GLG e monócitos têm agora valores significativamente mais baixos que aqueles apresentados em repouso.

Neste grupo de 10 indivíduos, ao contrário do que se observou no grupo total de 24 indivíduos, não se observa uma redução significativa na relação GV/Neutrófilo, imposta pelo exercício físico. Todavia, a redução significativa da concentração de eritrócitos e o aumento significativo de neutrófilos 1 hora após o termo do exercício físico, relativamente aos valores de repouso, determinam já uma redução, também significativa, naquela relação.

2.2. - Estudo da Actividade Enzimática da G6PD Eritrocitária no Hemolisado Total e em Fracções Eritrocitárias de Diferente Densidade.

A actividade enzimática da G6PD eritrocitária na amostra total, embora sofra uma redução em 70% dos casos, não apresenta, todavia, uma diferença significativa (Tab. 3). O mesmo se passa nos subgrupos T e NT (Tab. 4 e 5). Os valores apresentados em repouso e após exercício físico nos dois subgrupos não têm também diferença significativa (Tab. 6 e 7). Note-se, todavia, que os valores apresentados pelo subgrupo NT são superiores aos do subgrupo T, tanto antes como depois do exercício físico.

No grupo de nove indivíduos em que foi estudada a actividade da G6PD eritrocitária 1 hora após o termo do exercício físico (Tab. 8), verificou-se que, embora aumentando relativamente ao valor apresentado depois do exercício físico, a sua actividade enzimática mantinha um valor inferior ao de repouso. É de referir ainda que todos os valores obtidos estão dentro do intervalo de valores de referência para a actividade enzimática da G6PD, descritos para a metodologia que se aplicou (4,06 a 4,82 UI/g Hb) (A. Santos Silva *et al.*, 1989).

O fraccionamento dos eritrócitos em gradiente descontínuo de densidade, em 10 amostras, permitiu o estudo da actividade enzimática das diferentes fracções obtidas. Na Tabela 9 apresentam-se os resultados relativos à evolução deste valor, da fracção menos densa ($1,100 < d < 1,105$) (<d) para a mais densa ($1,110 < d < 1,200$) (>d).

O exercício físico impõe uma redução da actividade enzimática da G6PD na fracção de <d, em 7 dos casos estudados, enquanto na fracção de >d se observa um ténue aumento de actividade, também em 7 dos casos estudados.

(n = 10)	A	D	Δ	$\Delta\%$	P
G6PD total (UI/g Hb)	4,44 \pm 0,54	4,32 \pm 0,44	- 0,11 \pm 0,47	- 1,8 \pm 10,2	s.s.
G6PD fr. <d	5,27 \pm 0,71	5,01 \pm 0,65	- 0,26 \pm 0,49	- 4,5 \pm 9,1	s.s.
G6PD fr. >d	3,52 \pm 0,56	3,59 \pm 0,82	+ 0,07 \pm 0,49	+ 1,6 \pm 14,6	s.s.

Tab. 9: Estudo da actividade enzimática da G6PD eritrocitária numa amostra de 10 indivíduos. Apresenta-se a média \pm d.p., em repouso antes do exercício (A) e depois do exercício físico (D), para o hemolisado total e para as fracções de <d e >d, obtidas por fracionamento em gradiente de densidade descontínuo. Refere-se ainda a média \pm d.p. das modificações observadas (Δ), o respectivo valor percentual ($\Delta\%$) e os valores de P calculados pelo teste t de Student.

A modificação imposta pelo exercício físico em fracções de densidade equivalente, não determina valores significativamente diferentes dos apresentados em repouso.

(n = 10)	A	D	P
Red. G6PD fr. <d / >d	1,75 \pm 0,75	1,42 \pm 0,85	s.s.
Red.% G6PD fr. <d / >d	33,1 \pm 12,5	27,9 \pm 15,4	s.s.
% GV 1,100 <d> 1,110	81,5 \pm 4,5	84,0 \pm 4,7	s.s.
% GV fr. d > 1,110	18,5 \pm 4,5	16,0 \pm 4,7	s.s.

Tab. 10: Redução (média \pm d.p.), em valor absoluto e percentual, observada na actividade enzimática da G6PD eritrocitária, da fracção menos densa para a mais densa (Red. G6PD fr. <d / >d e Red.% G6PD fr. <d / >d), antes e depois do exercício físico, quantificada numa amostra de 10 indivíduos. Refere-se ainda o valor percentual da concentração eritrocitária das fracções de densidade superior a 1,100 e inferior a 1,110 (% GV 1,100 <d> 1,110), e da fracção eritrocitária de maior densidade (% GV fr.d>1,110). Em todos os casos se calcula o valor de P pelo teste t de Student.

Se não se verificam modificações horizontais significativas (fracções de densidade equivalente), com o exercício físico (Tab. 10), o mesmo já não se passa com as modificações verticais, isto é, com os valores de actividade enzimática da fracção menos densa para a mais densa (Tab. 9). De facto, calculados os valores de P , verificámos que os valores de actividade da G6PD das fracções menos densas são significativamente diferentes dos valores de actividade das fracções mais densas, quer antes ($P < 0,001$), quer depois do exercício ($P = 0,001$). Note-se ainda que o valor da redução de actividade da G6PD da fracção menos densa para a mais densa é menor após o exercício físico.

Relativamente à distribuição celular no gradiente de densidade, verifica-se que há uma redução no numero de células de maior densidade, com o exercício físico.

2.3 - Análise Electroforética da G6PD por Focagem Isoeléctrica.

Na focagem isoelectrica da G6PD dos hemolisados das fracções obtidas em gradiente de densidade, não observámos qualquer alteração na enzima, observando-se apenas uma banda de cor púrpura violácea, correspondente à G6PD e outra de cor laranja correspondente à hemoglobina.

2.4 - Avaliação da Percentagem de Hemoglobina Ligada à Membrana Eritrocitária.

Na Tab. 8 referem-se os valores encontrados para a %HbLM em repouso, após exercício físico e 1 hora depois do seu termo. As modificações, sem significado estatístico, denotam uma ténue redução da %HbLM com o exercício, e um aumento ligeiro, 1 hora após o termo do exercício físico. Todos os valores são, todavia, significativamente diferentes do valor de %HbLM ($96,2 \pm 32,1$) avaliado numa população controlo, aparentemente saudável, com valores hematológicos e lipídicos normais e com hábitos sedentários, isto é, sem o hábito de exercício físico regular (Tab.12).

2.5 - Estudo Electroforético do Perfil Proteico da Membrana Eritrocitária.

O estudo do perfil proteico da membrana eritrocitária, após electroforese e coloração do gel pelo azul de Coomassie e pela prata, revelou que o exercício físico não associa modificações significativas e consistentes no perfil da membrana eritrocitária, nem o aparecimento de novas bandas (Fig 7). No entanto, para além das proteínas normais,

observam-se em todos os casos - A, D e 1h - diversas bandas ténues, localizadas entre a banda 4.2 e a banda 5 (algumas muito próximas ou mesmo sobreponíveis com esta última banda), cujo número e intensidade aumentava pela coloração com a prata. A reduzida intensidade destas bandas, numerosas e muito próximas entre si, impossibilita a sua detecção e quantificação densitométrica. Curiosamente, no início do “stacking gel”, observava-se também uma zona difusa com maior ou menor intensidade de coloração.

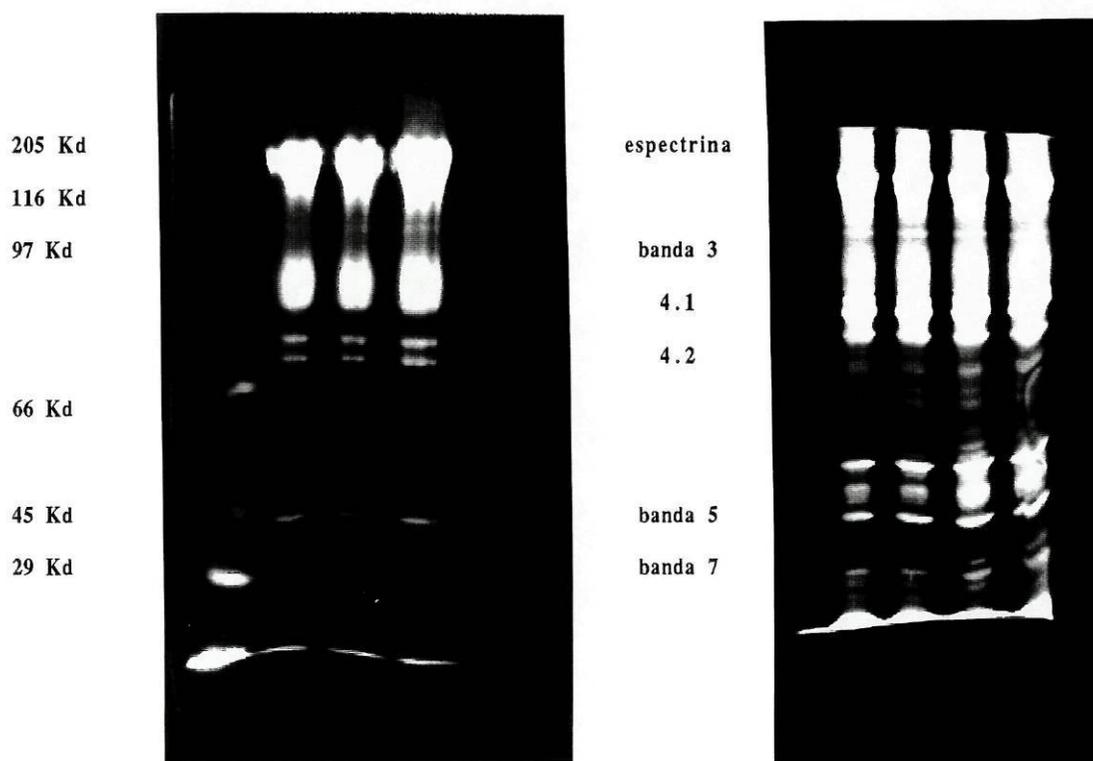


Fig. 7: Perfil proteico das membranas eritrocitárias, após electroforese e coloração pelo azul de Coomassie (à esquerda) e pela prata (à direita). Os perfis observados no gel revelado pelo azul de Coomassie são referentes, da esquerda para a direita, a um padrão de pesos moleculares, a uma amostra obtidas em repouso antes do exercício físico, depois do exercício físico e 1 hora após o termo do exercício físico. O gel revelado pela prata refere-se, também da esquerda para a direita, a uma amostra obtida em repouso antes do exercício físico, 1 hora após o termo do exercício físico, depois do exercício físico e antes do exercício físico. De notar as pequenas bandas que se observam nas zonas de 60 e 40 Kd, cujo número e intensidade aumenta na coloração pela prata.

A fim de avaliar o peso molecular aproximado das bandas referidas e a sua eventual correlação com os produtos de degradação da proteína banda 3, cujos pesos moleculares estão incluídos naquele intervalo de valores, procedeu-se a uma SDS-PAGE, fazendo correr as amostras em paralelo com um padrão de pesos moleculares e revelando pelo azul de Coomassie. A determinação do Rf dessas bandas confirmou que o seu peso molecular aproximado se situava na zona de 60 Kd e de 40 Kd, e que o estudo específico da banda 3 se tornava conveniente e importante, sobretudo considerando outros resultados já obtidos por esta altura do trabalho.

2.6. - *Estudo do Perfil da Proteína Banda 3 da Membrana Eritrocitária.*

Para avaliar a influência do exercício físico no perfil da proteína banda 3, uma proteína reconhecidamente envolvida no processo de envelhecimento eritrocitário e com funções importantes para a sobrevivência do eritrócito, procedeu-se ao seu estudo por "western blotting", de acordo com a metodologia descrita no ponto 1.3.7.

O anticorpo monoclonal anti-banda 3, como já foi referido, reconhece a proteína banda 3 (90-100 Kd), um grupo de peptidos na zona de 60 Kd, outro na zona de 40 e ainda de 20 Kd. Para além destas bandas observou-se ainda uma outra, de elevado peso molecular, localizada na zona inicial do "stacking gel" (Fig. 8). Nesta mesma zona do gel corado pelo Coomassie havíamos observado, como foi referido, uma banda difusa com maior ou menor intensidade de coloração.

Na Tabela 11 referem-se os valores encontrados neste estudo, bem como o valor de um perfil normal estudado numa população controlo, de 29 indivíduos aparentemente saudáveis, com hábitos sedentários e com valores hematológicos e lipídicos normais.

Em todas as amostras, incluindo o controlo, se observa uma banda de elevado peso molecular (AgEPM), a qual é, todavia, significativamente mais baixa no controlo, relativamente às três amostras A, D e 1h. Esta população controlo apresenta ainda um valor significativamente mais elevado do monómero de banda 3 e de todos os fragmentos peptídicos de banda 3, relativamente a qualquer uma das três amostras A, D e 1h. O valor de AgEPM aumenta com o exercício físico e continua a aumentar 1 hora após o seu termo. De forma semelhante, os fragmentos peptídicos totais sofrem uma redução com o exercício físico e decorrida 1 hora após o termo deste, o seu valor continua a baixar e apresenta já um valor significativamente mais baixo que aquele apresentado em repouso. Esta redução deve-se sobretudo aos fragmentos de 60 e 40 Kd, os quais apresentam também uma redução significativa, relativamente aos valores de repouso. O monómero de

banda 3 apresenta apenas ligeiríssimas variações, podendo mesmo dizer-se que o valor de repouso é igual ao apresentado 1 hora após o termo do exercício físico.

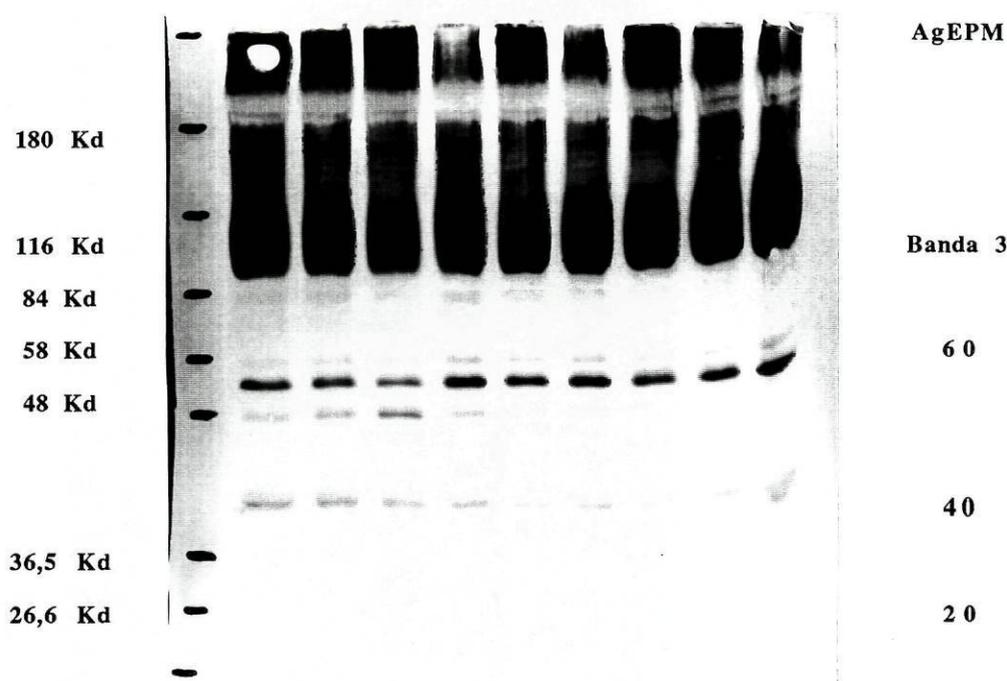


Fig. 8: Perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária nas amostras colhidas antes, depois e 1 hora após o termo do exercício físico. À esquerda referem-se os pesos moleculares do padrão de pesos moleculares e, à direita, as diferentes bandas constituintes do perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária - agregados (AgEPM), banda 3 e seus fragmentos peptídicos de 60, 40 e 20 Kd. Estes perfis referem-se a amostras colhidas a três indivíduos, correspondendo, da esquerda para a direita e para cada um dos três casos, à amostra colhida antes, depois e 1 hora após o termo do exercício físico.

A evolução observada para os AgEPM e para os três fragmentos peptídicos é semelhante à evolução observada para os neutrófilos, isto é, a modificação imposta pelo exercício físico, mantém-se 1 hora após o seu termo. Por este motivo, estabelecemos a correlação entre o valor de neutrófilos e o valor de cada uma das bandas em A, D e 1h (Fig. 9) e verificámos uma correlação positiva entre os AgEPM e o número de neutrófilos, para os valores impostos pelo exercício físico, mas não para os valores de repouso, nem para os de 1 hora após o exercício. Para a banda 3 e para os fragmentos totais não observámos correlação significativa.

(n = 8)	AgEPM	Banda 3	frag. totais	60 Kd	40 Kd	20 Kd
Controlo (n = 29)	9,8 ± 6,0	62,9 ± 4,4	28,3 ± 5,7	10,1 ± 2,3	14,8 ± 3,7	2,9 ± 1,2
A	24,2 ± 2,2	56,4 ± 2,4	19,3 ± 1,6	8,4 ± 1,1	9,6 ± 1,5	1,3 ± 1,0
D	25,3 ± 2,7	57,2 ± 2,4	17,6 ± 2,2	7,9 ± 1,1	8,7 ± 1,3	1,0 ± 0,8
1h	26,6 ± 2,1	56,7 ± 3,0	16,6 ± 3,3	7,2 ± 1,9	5,3 ± 4,1	1,0 ± 0,7
Δ% A/D	+ 4,9 ± 12,2	+ 1,4 ± 3,7	- 8,3 ± 15,2	- 5,3 ± 18,0	- 8,5 ± 15,4	- 10,1 ± 67,1
P	s.s.	s.s.	s.s.	s.s.	s.s.	s.s.
Δ% D/1h	+ 6,0 ± 13,2	- 0,7 ± 3,4	- 3,6 ± 24,0	- 7,0 ± 27,4	- 38,7 ± 45,1	-46,3 ± 122,7
P	s.s.	s.s.	s.s.	s.s.	0,005	s.s.
Δ% A/1h	+ 10,8 ± 15,3	+ 0,6 ± 5,3	- 14,2 ± 13,8	- 8,6 ± 16,7	47,0 ± 38,1	-40,2 ± 187,0
P	s.s.	s.s.	0,02	0,009	- 0,019	s.s.

Tab. 11: Perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária numa população controlo e nas amostras colhidas antes, depois e 1 hora após o termo do exercício físico. Apresentam-se os valores médios percentuais (média ± d.p.) da banda 3, seus agregados (AgEPM) e fragmentos peptídicos de 60, 40 e 20 Kd. Os valores de P foram calculados pelo teste t de Student a fim de estabelecer o estudo comparativo entre as bandas equivalentes das diferentes amostras.

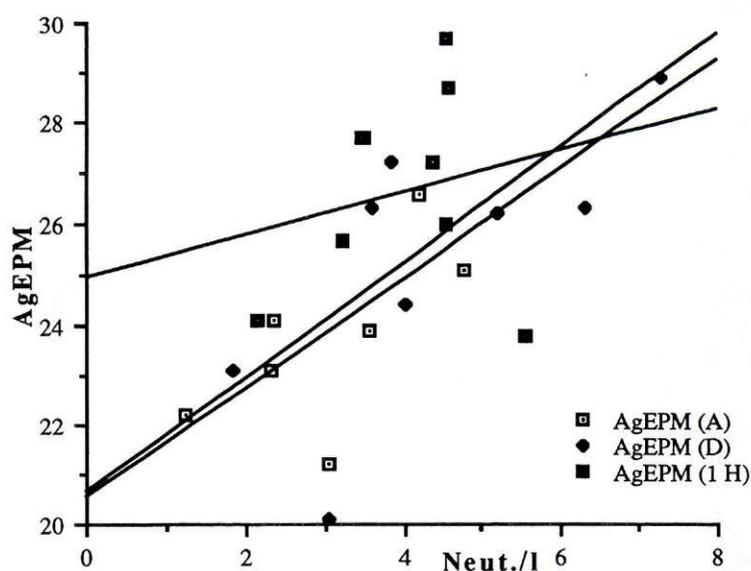


Fig. 9: Estudo das correlações entre o número de neutrófilos/l e o valor de AgEPM, nas amostras colhidas antes (A), depois (D) e 1 hora após o termo do exercício físico (1H). A correlação, positiva em todos os casos, só é significativa ($R > 0,5$) para os valores impostos pelo exercício físico.

2.7. - Estudo da Lactoferrina no Lisado de PMN.

Com o estudo do conteúdo em lactoferrina do lisado de PMN, por “western blotting”, nas amostras A, D e 1h, pretendeu-se avaliar a activação dos neutrófilos. Todavia, os resultados obtidos, pela sua inconsistência, não permitiram chegar a uma conclusão (Fig.10).



Fig. 10: “Western Blotting” para a lactoferrina do lisado de PMN das amostras A, D e 1h. Da direita para a esquerda, apresentam-se as amostras A, D e 1h de três indivíduos diferentes, e de um padrão de lactoferrina.

Em quatro dos oito casos estudados observámos uma redução da lactoferrina, após exercício físico, enquanto nos restantes se observava um valor semelhante ou superior. Uma hora após o termo do exercício físico, observámos valores de lactoferrina inferiores ao valor de repouso em cinco dos casos, um valor semelhante em dois e num dos casos um valor superior.

3. - Discussão dos resultados.

É hoje aceite que o mecanismo de remoção de eritrócitos senescentes ou lesados envolva uma modificação em algum dos componentes já presentes no eritrócito circulante, já que o eritrócito maduro é uma célula incapaz de sintetizar proteínas, e que essa modificação tenha lugar a nível da membrana, já que parece difícil que o macrófago possa detectar lesões bioquímicas intracelulares. É também aceite que deva existir uma interligação ou interdependência desse componente da membrana eritrocitária com o estado funcional dos diferentes componentes citoplasmáticos da célula. De facto, uma célula que desenvolva precocemente lesões intracelulares, é também removida precocemente, tal como acontece com as células talassémicas, falsiformes, com enzimopatias, células tratadas com oxidante (Bates *et al.*, 1984; Lutz, 1990; Kay *et al.*, 1991c) etc.

A banda 3 é uma proteína transmembranar da membrana eritrocitária, frequentemente referida por canal aniónico, por mediar a troca de aniões através da membrana. Outra designação, mais recente, desta proteína é a de neoantigénio de senescência (Apell *et al.*, 1981), por sofrer modificações (Kay, 1984; Low *et al.*, 1985; Czerwinski *et al.*, 1988; Low, 1991) que determinam a ligação de auto-anticorpos, mediadores da remoção do eritrócito senescente ou lesado, pelo macrófago. A proteólise da banda 3 é uma dessas modificações, desconhecendo-se, todavia, as proteases envolvidas (Kay, 1984; Czerwinski *et al.*, 1988). Outro processo modificador da banda 3 inicia-se com a desnaturação e ligação da hemoglobina à membrana eritrocitária, a nível do domínio citoplasmático da banda 3. Desta ligação resulta a formação de agregados de banda 3, que fornecerão os locais antigénicos de ligação de auto-anticorpos anti-banda 3 (Low *et al.*, 1985) (Low, 1991).

No *stress*, imposto pelo exercício físico, as modificações observadas no estudo do hemograma, da actividade da G6PD no hemolisado do total de eritrócitos e nos hemolisados de eritrócitos de diferentes densidades, e o estudo do perfil proteico da membrana eritrocitária, são sugestivas de senescência eritrocitária e de modificações moleculares a nível da membrana eritrocitária. O estudo da proteína banda 3 da membrana eritrocitária e a avaliação da percentagem de hemoglobina ligada à membrana permitiu reforçar aquela hipótese e evidenciar uma provável relação com a leucocitose neutrofilica observada.

O hemograma mostrou que a alteração mais evidente na população eritrocitária,

imposta pelo exercício físico, é a hemoconcentração (Tab. 3, 4, 5 e 8). Em todos os parâmetros do hemograma, relativos à população eritrocitária, se observou um aumento significativo, exceptuando o valor de HGM. Como consequência da hemoconcentração, esperava-se uma modificação percentual similar para o número de GV/l, para a concentração de Hb e para o Ht, sem alteração dos índices hematimétricos. No entanto, só o número de GV/l e a concentração de Hb apresentavam uma modificação similar. O Ht apresentava um aumento superior ao daqueles e, paralelamente, verificava-se um aumento do VGM e uma redução da CHGM.

Em analogia com a população leucocitária, também a eritrocitária não apresenta valores significativamente diferentes, antes e após exercício físico, no subgrupo treinado e não treinado (Tab. 6). O valor das modificações nos diferentes parâmetros eritrocitários nos dois subgrupos, não apresenta diferença significativa. Refira-se, no entanto, que as modificações são mais acentuadas no subgrupo treinado, em que a resposta leucocitária ao *stress* é também mais intensa e que, como se referiu, podem estar relacionadas com o grau de treino dos indivíduos.

Para melhor compreender e esclarecer as modificações impostas pelo exercício na população eritrocitária, sem interferência da hemoconcentração decorrente do exercício, procedeu-se ao estudo dos mesmos parâmetros, 1 hora após o seu termo (Tab. 8). Verificou-se que os índices hematimétricos retomavam o valor de repouso, enquanto o número de GV/l e o Ht tomavam valores significativamente mais baixos.

O aumento discrepante do hematócrito, relativamente ao aumento do número de GV/l e da concentração de Hb, em associação com um aumento no VGM, imposto pelo exercício físico, faz suspeitar de uma modificação a nível da membrana eritrocitária. A redução significativa do número de GV/l e do valor de Ht, observada 1 hora após o termo do exercício físico, veio fortalecer aquela suspeita e sugerir que essa modificação imposta pelo *stress* oxidativo e/ou proteolítico, criado pelo exercício físico, seja determinante de um envelhecimento eritrocitário acelerado, que conduz à remoção de eritrócitos senescentes. Também o fraccionamento eritrocitário por ultracentrifugação em gradiente de densidade descontínuo, mostrou uma redução no número de eritrócitos da camada mais densa, correspondente aos eritrócitos senescentes (Tab. 10). Não é, todavia, de excluir a hipótese de que este resultado seja também em parte determinado pela alteração do VGM dos eritrócitos, o qual poderá determinar um posicionamento diferente das células no gradiente de densidade descontínuo.

▲ G6PD é uma enzima eritrocitária cuja actividade está relacionada com a idade da

célula (Ouwkerk *et al.*, 1989) e, como tal, pode usar-se como um bom índice de idade da população eritrocitária. Os resultados obtidos para a actividade da enzima em fracções eritrocitárias de diferentes densidades, mostraram uma redução de actividade significativa, da fracção menos densa para a mais densa (Tab.9), o que está de acordo com aquele conceito. Neste estudo de fracções eritrocitárias de diferentes densidades, executado nas amostras colhidas antes e depois do exercício físico, verificámos uma redução na actividade da fracção menos densa, com o exercício, em oposição à fracção mais densa, que apresenta até um valor ligeiramente superior ao de repouso. Se considerarmos que os eritrócitos senescentes são particularmente sensíveis ao *stress* oxidativo, é compreensível que a fracção mais densa sofra uma redução no seu número, por remoção das células senescentes, incapazes de superar o *stress* oxidativo criado pelo *stress* oxidativo, e que inclua, depois do exercício físico, eritrócitos cuja actividade média de G6PD seja ligeiramente superior. Esta mesma suposição de que o *stress* imposto pelo exercício físico nos eritrócitos senescentes é determinante da sua remoção, é corroborada pelo estreitamento do intervalo de valores de actividade da G6PD da fracção menos densa para a mais densa (Tab. 10), observada após exercício físico. A actividade da G6PD no hemolisado total, obtido por hemólise de toda a população eritrocitária (G6PD total), sofre uma redução de actividade com o *stress* oxidativo imposto pelo exercício físico. Uma hora após o termo do exercício físico observa-se uma actividade superior, mas ainda com um valor inferior ao valor de repouso (Tab. 8 e 9).

O *stress* oxidativo criado em todos os eritrócitos, senescentes, de média idade ou eritrócitos jovens, determina a redução de actividade enzimática, observada no hemolisado total, e a remoção dos eritrócitos de menor actividade enzimática, incapazes de superar o *stress* oxidativo imposto.

O eritrócito parece sofrer um *stress* oxidativo, evidenciado pela alteração no VGM, no Ht, na actividade da G6PD eritrocitária no hemolisado total e nas fracções de diferentes densidades e na distribuição das células no gradiente de densidade, que parece determinar a remoção das células mais sensíveis a esse *stress*, evidenciado pela redução no número de GV/l. A modificação observada no VGM foi já atribuída à acção dos radicais activos de oxigénio (Uyesaka *et al.*, 1992b). Também Susan Claster (comunicação pessoal) mostrou que da exposição de eritrócitos a neutrófilos activados *in vitro*, resulta um aumento do volume eritrocitário.

É pois razoável assumir que a modificação no VGM possa reflectir alterações moleculares a nível da membrana eritrocitária, resultantes do *stress* oxidativo criado por

radicais activos de oxigénio e proteases, que podem resultar da activação de leucócitos ou do aumento do "turnover" da hemoglobina. É ainda razoável assumir que essa modificação possa comprometer a sobrevivência dos eritrócitos. De facto, para além da redução observada na actividade enzimática da G6PD no hemolisado total e no hemolisado das diferentes fracções, que sugerem um processo de envelhecimento acelerado, imposto pelo *stress* oxidativo criado pelo exercício físico, a redução significativa do número de GV/l e do Ht, 1 hora após o termo do exercício, sugerem que essa modificação é acompanhada pela remoção de eritrócitos senescentes. É, aliás, reconhecido que indivíduos envolvidos em actividades físicas regulares ou intensas, desenvolvem frequentemente uma anemia ligeira, conhecida pela anemia do desporto ou anemia do atleta (Erslev, 1991). Não deve também menosprezar-se o efeito da hemoconcentração, que determinando uma maior viscosidade sanguínea, favorecerá lesões mecânicas nos eritrócitos que, para além de circular num meio mais viscoso, têm de o fazer a uma velocidade acrescida.

O estudo proteína banda 3 da membrana eritrocitária, por ser independente do valor de hemoconcentração e por constituir um "tradutor" reconhecido de modificações eritrocitárias acumuladas ao longo da vida da célula, revelou-se de extraordinário interesse para a clarificação do estudo do *stress in vivo*, no exercício físico.

Numa população controlo traçámos o perfil normal da banda 3 (Tab. 11). A maioria da banda 3 encontra-se sob a forma de monómero (62,9%), enquanto os fragmentos peptídicos totais, resultantes de uma clivagem natural, acumulada ao longo da vida do eritrócito, representam 28,3%. Nestes fragmentos estão incluídos os fragmentos de 60, 40 e 20 Kd. Observa-se ainda uma banda de elevado peso molecular, representando 9,8% da proteína banda 3.

Curiosamente, as três amostras -A, D e 1h - apresentam um perfil perfeitamente distinto do perfil normal, o que atribuímos ao facto de a maioria da população usada neste estudo, integrar o grupo de indivíduos que exercitam regularmente. A diferença mais evidente entre estas três amostras e o controlo, verifica-se no valor de AgEPM, que é significativamente mais baixo no controlo. Os fragmentos e a banda 3 estão reduzidos, relativamente ao controlo. Parece, pois, que o eritrócito sob *stress* oxidativo e proteolítico regular, sofre e acumula lesões, que o tornam diferente do eritrócito que sofre e acumula apenas lesões determinadas por um processo de senescência normal.

Relativamente às modificações decorrentes do exercício físico intenso de curta duração, que se impôs à população seleccionada, é de salientar a redução dos fragmentos

peptídicos, como a modificação mais acentuada (8,3%), e ainda um aumento nos AgEPM (4,9%) e um ténue aumento da percentagem de banda 3 (1,4%).

Uma hora após o termo do exercício físico, acentua-se a redução dos fragmentos peptídicos totais e a elevação dos AgEPM. Os fragmentos totais apresentam agora uma redução significativa relativamente ao seu valor em repouso, com um valor médio de 14,2%. Também os fragmentos de 60 e 40 Kd tomam um valor significativamente mais baixo que o valor de repouso. O aumento dos AgEPM, embora com um aumento médio de 10,8% relativamente aos valores de repouso, não tem todavia significado estatístico, dado o elevado valor do desvio padrão.

As modificações no perfil da banda 3 referidas para o exercício físico e 1 hora após o seu termo, sugerem que a agregação da banda 3 pode resultar da oxidação e “cross-linking” do monómero de banda 3 ou do seus fragmentos peptídicos; pode ainda resultar da proteólise do monómero de banda 3, seguida de oxidação e “cross-linking” dos seus fragmentos proteolíticos. A redução nos fragmentos proteolíticos, de valor superior ao aumento dos AgEPM, dever-se-à, provavelmente, à produção de fragmentos proteolíticos de peso molecular inferior ao “cutoff” da membrana de nitrocelulose, que se perdem na transferência electroforética e que não são, por esse motivo, detectáveis no “immunoblotting”.

Note-se que as modificações impostas pelo exercício físico intenso de curta duração, no perfil da banda 3 são bastante ténues, quando comparadas com as modificações impostas por um exercício físico regular, como é evidenciado pela diferença entre os valores de repouso da população com hábitos de exercício físico regular e os valores apresentados pela população controlo.

De forma semelhante, no valor da %HbLM observam-se modificações sem significado estatístico no exercício físico intenso de curta duração, mas os valores de repouso da população estudada são significativamente superiores aos da população controlo (Tab. 8 e Tab.12).

A correlação observada entre a agregação da banda 3 e o número de neutrófilos, sugere que o *stress* oxidativo criado pelo exercício físico, possa dever-se também à activação leucocitária, nomeadamente dos neutrófilos, que constituem importantes fontes de radicais activos de oxigénio e proteases.

A leucocitose neutrofílica constitui uma resposta frequente a diversas situações de *stress*, nomeadamente no *stress* imposto pelo exercício físico. O valor da leucocitose neste, parece estar directamente relacionado com a intensidade e duração do exercício

físico e inversamente relacionado com o grau de treino de cada indivíduo. A duração da actividade física, segundo alguns autores, parece, todavia, constituir o factor mais importante (McCarthy *et al.*, 1992; Fairbairn *et al.*, 1993).

Em repouso, menos de metade dos leucócitos maduros circulam no sistema vascular e integram o “pool” circulante; os restantes, localizados predominantemente a nível do baço, fígado e pulmões, integram o “pool” marginal e podem ser recrutados para integrarem o “pool” circulante nas situações de *stress*. O mecanismo exacto pelo qual se processa esta chamada dos leucócitos do “pool” marginal para o “pool” circulante durante o exercício físico, embora não esteja perfeitamente esclarecido, é atribuído à acção de factores mecânicos e de modificações hormonais imediatas ou decorrentes do exercício físico (Mackinnon, 1992). Os factores mecânicos incluem o aumento do ritmo e do débito cardíaco, uma maior reperfusão sanguínea a nível microvascular e modificações na interacção normal entre células endoteliais e leucócitos. O *stress* hormonal deve-se essencialmente à elevação nas concentrações de catecolaminas e cortisol (Mackinnon, 1992).

As modificações leucocitárias, decorrentes de um exercício físico intenso de curta duração, observadas neste estudo estão de acordo com a literatura (Field *et al.*, 1991; McCarthy *et al.*, 1992). De facto, o número de leucócitos circulantes eleva-se para um valor que é aproximadamente o dobro do observado em repouso, e esse aumento deve-se predominantemente aos linfócitos e, em menor extensão, aos neutrófilos e monócitos (Tab. 3, 4, 5 e 8). No caso dos linfócitos, o seu aumento é predominantemente atribuído aos linfócitos T e aos linfócitos tipo NK. A esta última subpopulação linfocitária é atribuído um aspecto característico, observável nos esfregaços corados. São linfócitos grandes e de granulação azurófila citoplasmática bem evidente e numerosa. A numeração deste tipo de linfócito nos esfregaços sanguíneos das amostras estudadas (GLG), evidenciou também o seu aumento significativo, com o exercício físico, sendo esse aumento de aproximadamente 286% (Tab. 3). A literatura refere aumentos de cerca de 300% para os linfócitos do tipo NK e de cerca de 100 % para os linfócitos T (Field *et al.*, 1991; Nieman *et al.*, 1991b). O elevado número destas células, em resposta ao exercício físico, sugere que este desencadeie uma resposta imune não específica. O efeito citotóxico destas células poderá impedir a exposição de metabolitos, produzidos durante o exercício físico, aos linfócitos de resposta imune e, desta forma, prevenir futuras reacções de hipersensibilidade ou reacções de natureza auto-imune (Field *et al.*, 1991; Nieman *et al.*, 1991b).

Para o valor de leucócitos, em repouso e após exercício físico, bem como para os valores dos diferentes tipos de leucócitos, não foram evidenciadas diferenças significativas com o grau de treino (Tab. 6), exceptuando o valor de monócitos, que apresentou um valor significativamente mais elevado na população treinada. Contudo, o valor da resposta leucocitária ao exercício físico, é significativamente diferente para cada um dos grupos. De facto, os indivíduos treinados apresentam uma resposta leucocitária ao *stress*, mais intensa que a observada nos não treinados (Tab. 7). Enquanto nestes se verifica um aumento médio de 56,9%, nos treinados o aumento é de 83,1%. Da mesma forma, o aumento dos neutrófilos, dos linfócitos, incluindo os GLG, e dos monócitos é superior nesta população.

As diferenças na resposta ao *stress*, apresentadas pelos indivíduos com hábitos sedentários e indivíduos que exercitam regularmente, sugere uma adaptação do organismo a um *stress* regular, que o torna capaz de uma resposta diferente e, quiçá, mais eficaz, ao *stress*. Nesse processo de adaptação do organismo ao *stress* regular inclui-se a adaptação do sistema cardiovascular e respiratório (Jenkins *et al.*, 1993), com uma elevação da capacidade de consumo de oxigénio e, por consequência, também uma elevação na capacidade de resistência, que lhe permitirá exercitar por períodos mais longos de tempo até atingir a exaustão. Onde, as diferenças observadas neste estudo, entre treinados e não treinados, podem dever-se a um maior consumo de oxigénio e a um período de tempo de exercício mais longo, apresentados pelos indivíduos treinados.

O estudo feito após 1 hora de recuperação do exercício físico mostrou uma inversão significativa no número de leucócitos totais e dos respectivos subtipos (Tab. 8). No entanto, embora o número de GB retome os valores de repouso, não apresenta a mesma composição celular. A população leucocitária inclui agora mais neutrófilos e menos linfócitos e monócitos. Os neutrófilos tomam valores significativamente superiores aos de repouso, enquanto os linfócitos e monócitos têm valores significativamente mais baixos que os de repouso.

As modificações leucocitárias observadas neste tipo de exercício intenso de curta duração, são atribuídas a uma redistribuição das células leucocitárias e não à síntese de novas células (McCarthy *et al.*, 1992), o que não exclui, no caso de indivíduos que exercitam regularmente e que se submetem, portanto, a um *stress* regular, a possibilidade de adaptação, em termos quantitativos e funcionais, da resposta leucocitária.

3.1. - *Nota final de discussão.*

Em face dos resultados e do estado da arte, poderá dizer-se que o eritrócito como célula de capacidade biossintética limitada, incapaz de sintetizar proteínas e, portanto, de substituir aquelas que são lesadas oxidativa ou proteoliticamente, constitui um bom modelo de estudo de *stress* oxidativo.

A proteína banda 3 da membrana eritrocitária e o valor de HbLM revelaram-se bons indicadores de *stress in vivo*, no exercício físico. De acordo com os perfis da banda 3 e com os valores de %HbLM impostos por um exercício físico intenso de curta duração e aqueles observados na população controlo e na população que exercita regularmente, poder-se-á afirmar que a actividade física intensa, de curta duração, impõe um *stress* oxidativo pequeno, mas de carácter cumulativo. Se o *stress* impostosto por uma actividade física se repetir frequentemente, as lesões oxidativas acumulam-se, tomando valores superiores e significativamente diferentes dos de uma população saudável e sem hábitos de exercício físico regular. De notar ainda que a correlação observada entre a agregação da banda 3 e o número de neutrófilos, sugere que o *stress* oxidativo criado pelo exercício físico, possa dever-se também à activação dos neutrófilos, por constituírem importantes fontes de radicais activos de oxigénio e de proteases.

O estudo destes indicadores de *stress in vivo*, no exercício físico, poderá permitir estabelecer o limite entre o exercício físico benéfico e o exercício físico nocivo associado a perturbações do sistema imunológico. O exercício físico regular e moderado pode ser benéfico por representar não só um “treino” para os músculos, pulmões e sistema cardiovascular, mas também para os leucócitos, que serão “treinados” na ausência do clássico estímulo por agentes infecciosos, para uma resposta imune pronta e eficaz. De facto, os indivíduos treinados têm uma resposta leucocitária diferente dos não treinados, que poderá justificar a resposta imune não específica mais intensa nos treinados. Por outro lado, o exercício físico determinando a remoção de células senescentes, de capacidade funcional já comprometida, assegurará uma população eritrocitária, também “treinada”, com uma capacidade funcional mais homogénea e, por esse motivo, mais capaz no desempenho das suas funções.

Capítulo V

Capítulo V

O <i>stress</i> oxidativo patológico nas doenças cardiovasculares	142
1. Material e métodos aplicados ao estudo do <i>stress</i> oxidativo patológico em pacientes em risco de DCV	143
1.1. População estudada	143
1.2. Análises sanguíneas executadas	143
1.2.1. Análises hematológicas	143
1.2.1.1. “Western blotting” para avaliação de IgG’s ligadas à membrana eritrocitária	144
1.2.1.1.1. Incubação com o anticorpo	144
1.2.2. Análises bioquímicas para definição do perfil lipídico	146
2. Resultados	148
2.1. Hemograma	148
2.2. Estudo da actividade enzimática da G6PD eritrocitária	150
2.3. Avaliação da %HbLM	150
2.4. Estudo do perfil proteico da membrana eritrocitária	153
2.5. Estudo do perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária	154
2.6. “Western blotting” para avaliação de IgG’s ligadas à membrana eritrocitária	156
2.7. Avaliação do perfil lipídico	158
3. Discussão dos resultados	159
3.1. Nota final de discussão	162

V. O *Stress* Oxidativo Patológico nas Doenças Cardiovasculares.

1. Material e Métodos Aplicados ao Estudo do *Stress* Oxidativo Patológico em Pacientes em Risco de DCV.

1.1. - *População Estudada.*

A população estudada incluiu 87 indivíduos do sexo masculino com idades compreendidas entre os 20 e os 65 anos. Para o grupo controlo seleccionaram-se 29 indivíduos aparentemente saudáveis, com parâmetros hematológicos e perfil lipídico normais. O grupo patológico, subdivisível em três subgrupos, é constituído por um subgrupo de 22 indivíduos que haviam sofrido um enfarte de miocárdio nas 48 horas anteriores (pós enfarte de miocárdio recente: pEMR), um subgrupo de 24 indivíduos sobreviventes de um enfarte de miocárdio sofrido há mais de três meses (enfarte de miocárdio antigo EMA) e um terceiro subgrupo de 12 indivíduos com hipertensão (HT) e eventualmente outros factores de risco de DCV. Acresce que qualquer indivíduo pertencente a um destes subgrupos apresentava no mínimo um factor de risco de DCV, nomeadamente hipertensão, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, níveis elevados de LDLc ou de Apo B, níveis reduzidos de HDLc ou de Apo A1. Os indivíduos hipertensos apresentavam valores de tensão sanguínea sistólica superior a 140 mm Hg e a diastólica superior a 90 mm Hg. Os dois últimos grupos estavam sob controlo terapêutico, sendo as respectivas amostras recolhidas por altura do controlo analítico laboratorial. Nos indivíduos com enfarte de miocárdio recente as amostras sanguíneas foram recolhidas nas 48 horas após o evento, independentemente da terapêutica administrada.

1.2. - *Análises Sanguíneas Executadas.*

1.2.1. - *Análises Hematológicas.*

O estudo hematológico destes indivíduos incluiu determinações descritas para o estudo anterior referente ao *stress* oxidativo no exercício físico (cap. IV - 1.3.), bem como outras determinações, a referir.

Para todas as amostras se procedeu à execução do hemograma, de acordo com a metodologia referida no cap. IV - 1.3.1.

A determinação da actividade enzimática da G6PD eritrocitária foi avaliada na população eritrocitária total isolada segundo o método referido no cap. IV - 1.3.5.1. Para o doseamento enzimático utilizou-se a técnica referida no ponto 1.3.3. do mesmo capítulo.

Para todas as outras determinações avaliadas, e que a seguir se referem, se partiu da população eritrocitária total de cada amostra, isolada segundo o método referido no cap. IV - 1.3.5.1., para a obtenção das membranas eritrocitárias. Cada uma das amostras de eritrócitos totais foi submetida a hemólise e as membranas eritrocitárias isoladas e preparadas de acordo com a metodologia referida no cap. IV - 1.3.5.2. As suspensões de membranas foram divididas em alíquotas e congeladas até ao momento de execução de cada um dos estudos.

Para a avaliação da %HbLM tomou-se uma das alíquotas das membrana congeladas e, conhecida a concentração proteica da suspensão membranar por aplicação do método de Bradford cap. IV - 1.3.5.3., determinou-se a %HbLM, segundo a metodologia referida no ponto 1.3.5.4. do mesmo capítulo.

Também as metodologias aplicadas para estudo do perfil proteico da membrana eritrocitária e para o estudo do perfil da proteína banda 3 por "western blotting", foram as descritas nos pontos 1.3.6. e 1.3.7 do capítulo IV.

1.2.1.1. - "Western Blotting" para Avaliação de IgG's Ligadas à Membrana Eritrocitária.

Uma vez que os resultados obtidos, quer no *stress* oxidativo imposto pelo exercício físico, quer no *stress* associado às DCV, indicavam um processo de senescência eritrocitária acelerada e subsequente remoção de eritrócitos senescentes, procedeu-se à avaliação de IgG's ligadas à membrana eritrocitária em amostras pertencentes ao grupo controlo e ao grupo pEMR, por ser este o que apresenta modificações eritrocitárias mais evidentes e também uma leucocitose neutrofilica mais acentuada. Assim, para a sua determinação fez-se correr uma electroforese SDS-PAGE (cap. IV - 1.3.7.1.), seguida de uma transferência electroforética das proteínas para nitrocelulose (cap. IV - 1.3.7.2.), utilizando uma corrente constante de 250 mA durante 2 horas.

1.2.1.1.1. - Incubação com o Anticorpo.

A metodologia a usar é semelhante à referida no "western blotting" para o estudo do

perfil da proteína banda 3. Assim, transferidas para a nitrocelulose as proteínas da membrana, previamente separadas por SDS-PAGE, faz-se o bloqueio dos locais de reacção adicionais da nitrocelulose, com uma solução de PBS pH 7,0 contendo 5% de leite em pó e 0,1% de Tween 20 (Sigma). A incubação com a solução de bloqueio é feita durante a noite à temperatura de 4° C, com agitação suave e constante. Após lavagem cuidadosa da nitrocelulose em PBS pH 7,0 contendo 0,1% de Tween 20, faz-se a detecção das IgG's.

Para a detecção da IgG humana ligada à membrana eritrocitária utilizou-se um anticorpo anti-IgG humana conjugado com uma peroxidase (Vector), que se preparou numa diluição de 1/1.000 em PBS pH 7,0 contendo 5% de leite em pó e 0,1% de Tween 20. A incubação teve lugar durante 2 horas, à temperatura ambiente e com agitação suave constante.

Na revelação, o método referido no cap. IV - 1.3.7.4. mostrou-se pouco sensível, pelo que se recorreu a um método de quemiluminescência, de superior sensibilidade (ECL "Western Blotting" detection reagents - Amersham). Este método é sensível a valores inferiores a 1 pg do antigénio ligado à membrana de nitrocelulose, sendo cerca de 10 vezes mais sensível que o método de revelação pelo cloronaftol ou pelos métodos de marcação radioactiva. A quemiluminescência obtém-se por oxidação do luminol pela peroxidase conjugada com o anticorpo anti-IgG, na presença de exacerbadores químicos, como os fenóis, que exacerbam a quemiluminescência. Estes, têm capacidade para aumentar cerca de 1000 vezes a emissão de luz e prolongar o seu tempo de emissão. A emissão é máxima entre os 5 e os 20 minutos de reacção, a um comprimento de onda de 428 nm, a qual pode detectar-se por exposição rápida a uma película azul de autoradiografia (Agfa).

Laboratorialmente a técnica consiste em expôr a superfície da nitrocelulose que contém as proteínas, a um volume de 0,125 ml da mistura reagente / cm² de nitrocelulose, durante 1 minuto, à temperatura ambiente e sem agitação. De seguida, retira-se o excesso de solução reagente da nitrocelulose, coloca-se esta numa placa de vidro, com a superfície reactiva para cima, e reveste-se com uma fina película de plástico transparente, que adira perfeitamente à nitrocelulose, sem formação de bolhas de ar. Esta película permitirá isolar a superfície húmida da nitrocelulose, por forma a não manchar a película de raio-X, que se lhe sobrepôr sem, todavia, interferir na emissão de luz. A placa de vidro com a nitrocelulose isolada pela fina película de plástico transparente será, então, colocada numa cassette de autoradiografia e, depois de desligada a luz, sobrepõe-se uma película de raio-

X e fecha-se a cassete. À exposição de 2', seguir-se-á a revelação que incluirá uma primeira imersão de 2' na solução de revelação, uma segunda numa solução de paragem da reacção de revelação e, finalmente, a fixação de 10' e a lavagem em água corrente. Segue-se a secagem da película em estufa a 50° C.

1.2.2. - Análises Bioquímicas para Definição do Perfil Lipídico.

O perfil lipídico de cada indivíduo foi definido pelos respectivos valores séricos de colesterol (Col), triglicerídeos (TG), colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDLc), colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDLc) e apolipoproteínas A1 e B (Apo A1 e Apo B).

Para o doseamento do Col total utilizou-se um método colorimétrico enzimático (Monotest Cholesterol - CHOD-PAP - Boehringer Mannheim), aplicado a um auto-analisador (Cobas Mira - Roche). Este método envolve a conversão dos ésteres de colesterol em colesterol e ácidos gordos livres, por acção da colesterol esterase, seguida da modificação oxidativa do colesterol livre, por acção da colesterol oxidase, com formação de peróxido de hidrogénio que, na presença de peroxidase, de fenol e de 4-aminofenazona, dá origem à formação de um composto corado, cuja Absorvência a 500 nm é proporcional à concentração de Col presente na amostra.

Também o doseamento dos TG e das Apo A1 e Apo B, foi executado no auto-analisador.

Para os TG usou-se um método colorimétrico enzimático (TG -PAP - Roche) que envolve quatro reacções; a primeira consiste na conversão dos TG em glicerol e ácidos gordos, por acção da lipase; na segunda o glicerol na presença de ATP, sob a acção da glicerol cinase, é convertido em glicerol-3-fosfato; a terceira consiste na oxidação do glicerol-3-fosfato a fosfato de di-hidroxiacetona e peróxido de hidrogénio, por acção da glicerol-fosfato oxidase; finalmente, na quarta, o peróxido de hidrogénio será quantificado da mesma forma que aquela referida para o doseamento do Col, com formação de um composto corado, cuja Absorvência a 500 nm é proporcional à concentração de TG presente na amostra.

Para o doseamento das apolipoproteínas usou-se um método imunoturbidimétrico que, basicamente, consiste na adição de anti-soros específicos, de que resultará um precipitado, seguida de leitura espectrofotométrica a 340 nm (Uni Kit Apolipoproteína A e B; T antiserum - Roche).

Para o doseamento do HDLc faz-se inicialmente uma precipitação selectiva das

fracções LDL e VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade - very low density lipoproteins) pelo ácido fosfotúngstico, na presença de iões magnésio. Após centrifugação, o colesterol das HDL no sobrenadante será doseado pelo método acima referido para o doseamento do colesterol.

De forma similar, para o doseamento do LDLc promoveu-se a precipitação selectiva desta fracção, por adição de polivinilsulfato. O colesterol do sobrenadante obtido será doseado pelo método já referido e o valor do LDLc calculado por diferença entre o valor de colesterol total e o valor de colesterol do sobrenadante obtido após a precipitação selectiva do LDLc.

2. - Resultados.

Os resultados a apresentar serão analisados no sentido de averiguar eventuais diferenças nos diversos parâmetros estudados, entre uma população controlo e três outras que têm em comum o risco de doença cardiovascular.

2.1. - Hemograma.

Na Tabela 12 apresentam-se os valores da média \pm d.p. para os diversos parâmetros constituintes do hemograma, nas populações em risco e na população controlo. Cada um dos valores será comparado com o valor correspondente na população controlo pelo teste t de Student.

Dos três grupos de risco - HT, EMA e pEMR - é o grupo pEMR o que apresenta modificações mais notórias na população eritrocitária, relativamente ao grupo controlo. Apresenta o valor mais baixo de GV/l e significativamente diferente do valor do grupo controlo; o valor mais baixo de Ht, embora sem diferença significativa, relativamente ao controlo; o valor mais elevado de VGM, com diferença significativa em relação ao controlo; apresenta ainda um elevado valor de HGM e um valor semelhante ao dos outros grupos, de CHGM. O grupo EMA apresenta também um valor de VGM significativamente elevado, e os restantes valores estão mais próximos dos do controlo. O grupo HT apresenta os valores mais próximos do controlo. Note-se, aliás, que se assumirmos que o risco de eventos cardiovasculares aumenta do grupo HT para o EMA e deste para o pMER, parece haver uma evolução no sentido de uma redução no número de GV/l, no valor de Ht, no valor da concentração de Hb e, paralelamente, uma elevação nos índices hematimétrico, nomeadamente no VGM.

Nos valores respeitantes ao estudo da população leucocitária (Tab.12) verifica-se que, também neste caso, é o grupo pEMR o que apresenta modificações mais acentuadas relativamente ao grupo controlo. O número de GB/l eleva-se significativamente e essa elevação deve a um aumento significativo dos neutrófilos e também dos monócitos. No grupo EMA observa-se também uma elevação no número de GB/l, mas sem diferença significativa. Todavia, a população leucocitária é já neste grupo significativamente diferente, pois os neutrófilos assumem um valor significativamente mais elevado que o controlo. No grupo HT, embora o número de GB/l e de neutrófilos se elevem, os seus valores ficam próximos dos do grupo controlo.

	Controlo (n = 29)	HT (n = 12)	P	EMA (n = 24)	P	pEMR (n = 22)	P
GV/l (x10¹²)	5,19 ± 0,24	4,94 ± 0,56	s.s.	4,86 ± 0,56	s.s.	4,50 ± 0,76	0,003
Ht (l/l)	0,46 ± 0,06	0,45 ± 0,06	s.s.	0,46 ± 0,06	s.s.	0,44 ± 0,07	s.s.
VGM (fl)	88,53 ± 3,13	90,48 ± 4,87	s.s.	95,41 ± 4,67	< 0,001	98,00 ± 5,73	< 0,001
Hb (g/dl)	14,20 ± 0,56	13,92 ± 1,65	s.s.	14,28 ± 2,16	s.s.	13,60 ± 2,64	s.s.
HGM (pg)	27,2 ± 1,2	28,2 ± 1,46	s.s.	29,5 ± 2,0	< 0,001	30,2 ± 2,2	< 0,001
CHGM (g/dl)	30,99 ± 0,45	31,17 ± 1,08	s.s.	30,78 ± 1,48	s.s.	31,08 ± 2,26	s.s.
GB/l (x10⁹)	6,66 ± 1,75	7,35 ± 1,93	s.s.	7,72 ± 1,84	s.s.	9,83 ± 2,55	< 0,001
Neut./l (x10⁹)	3,63 ± 1,31	4,28 ± 1,47	s.s.	4,95 ± 1,55	0,011	7,10 ± 2,76	< 0,001
Linf./l (x10⁹)	2,52 ± 0,95	2,23 ± 0,54	s.s.	2,14 ± 0,78	s.s.	1,98 ± 0,89	s.s.
Monóc./l (x10⁹)	0,40 ± 0,14	0,55 ± 0,31	s.s.	0,41 ± 0,18	s.s.	0,67 ± 0,30	0,007
GV/Neut.	1712 ± 464	1287 ± 458	s.s.	1065 ± 356	< 0,001	714 ± 217	< 0,001
G6PD (UI/g Hb)	3,91 ± 0,56	3,74 ± 0,66	s.s.	3,78 ± 0,76	s.s.	3,53 ± 0,44	0,024
%HbLM (x10⁻⁴)	96,2 ± 32,1	205,2 ± 27,2	< 0,001	198,0 ± 45,0	< 0,001	214,6 ± 62,6	< 0,001

Tab. 12: Valores (média ± d.p.) do hemograma, da relação n^oGV/Neutrófilo, da actividade da G6PD eritrocitária e da %HbLM numa população de 87 indivíduos, integrados em quatro grupos distintos: Controlo; com hipertensão e outros factores de risco (HT); com enfarte de miocárdio antigo, com mais de três meses (EMA); pós-enfarte recente, com menos de 48 horas (pEMR). Cada um dos valores é comparado com o valor correspondente no grupo controlo, pelo teste t de Student.

Note-se que também neste estudo referente à população leucocitária se verifica um certo paralelismo entre a elevação dos leucócitos totais, devida a um aumento dos neutrófilos, e o risco de eventos cardiovasculares.

Na Tabela 12 apresenta-se também o número de GV por neutrófilo, por forma a evidenciar a alteração nesta relação que, a haver activação de neutrófilos, poderá determinar uma interacção dos produtos de bioactivação dos neutrófilos com os eritrócitos

francamente acentuada.

2.2. - *Estudo da Actividade Enzimática da G6PD Eritrocitária.*

Para a actividade enzimática da G6PD eritrocitária nos grupo HT e EMA, encontraram-se valores sem diferença significativa, relativamente ao grupo controlo, embora ambos apresentem um valor médio inferior ao do controlo (Tab. 12). Pelo contrário, no grupo pEMR esse valor distancia-se, apresentando uma actividade significativamente mais baixa que a do grupo controlo.

Sobressai também da observação dos valores de actividade da G6PD eritrocitária nos diferentes grupos, uma redução dos valores com o risco de DCV e com o número de neutrófilos.

Uma vez que os valores médios hematológicos, nomeadamente o número de GV/l, o VGM e actividade da G6PD eritrocitária, parecem evoluir com o número de neutrófilos apresentado por cada um dos grupos, estudou-se a correlação existente entre aqueles parâmetros e o número de neutrófilos correspondente (Fig. 11). Encontrou-se uma correlação negativa do número de neutrófilos com o número de GV/l e com a actividade da G6PD eritrocitária, e uma correlação positiva do número de neutrófilos com o VGM.

Uma vez que estas modificações são comuns ao *stress* imposto pelo exercício físico, afigurou-se interessante incluir naquelas correlações, os valores encontrados para as amostras colhidas antes do exercício e as obtidas 1 hora após o seu termo (Fig. 12). Os valores das amostras obtidas imediatamente após o exercício físico, foram excluídas por se reportarem a valores sobrepostos de um determinado valor de hemoconcentração. Desse estudo resultou a confirmação da correlação positiva do número de neutrófilos com o VGM e ainda da correlação negativa do número de neutrófilos com o número de GV/l e com a actividade da G6PD eritrocitária.

2.3. - *Avaliação da Percentagem de Hemoglobina Ligada à Membrana.*

O valor de hemoglobina ligada à membrana é significativamente superior nos três grupos patológicos, relativamente ao valor do grupo controlo (Tab. 12). Também para a %HbLM, é o grupo pEMR o que apresenta a diferença mais acentuada.

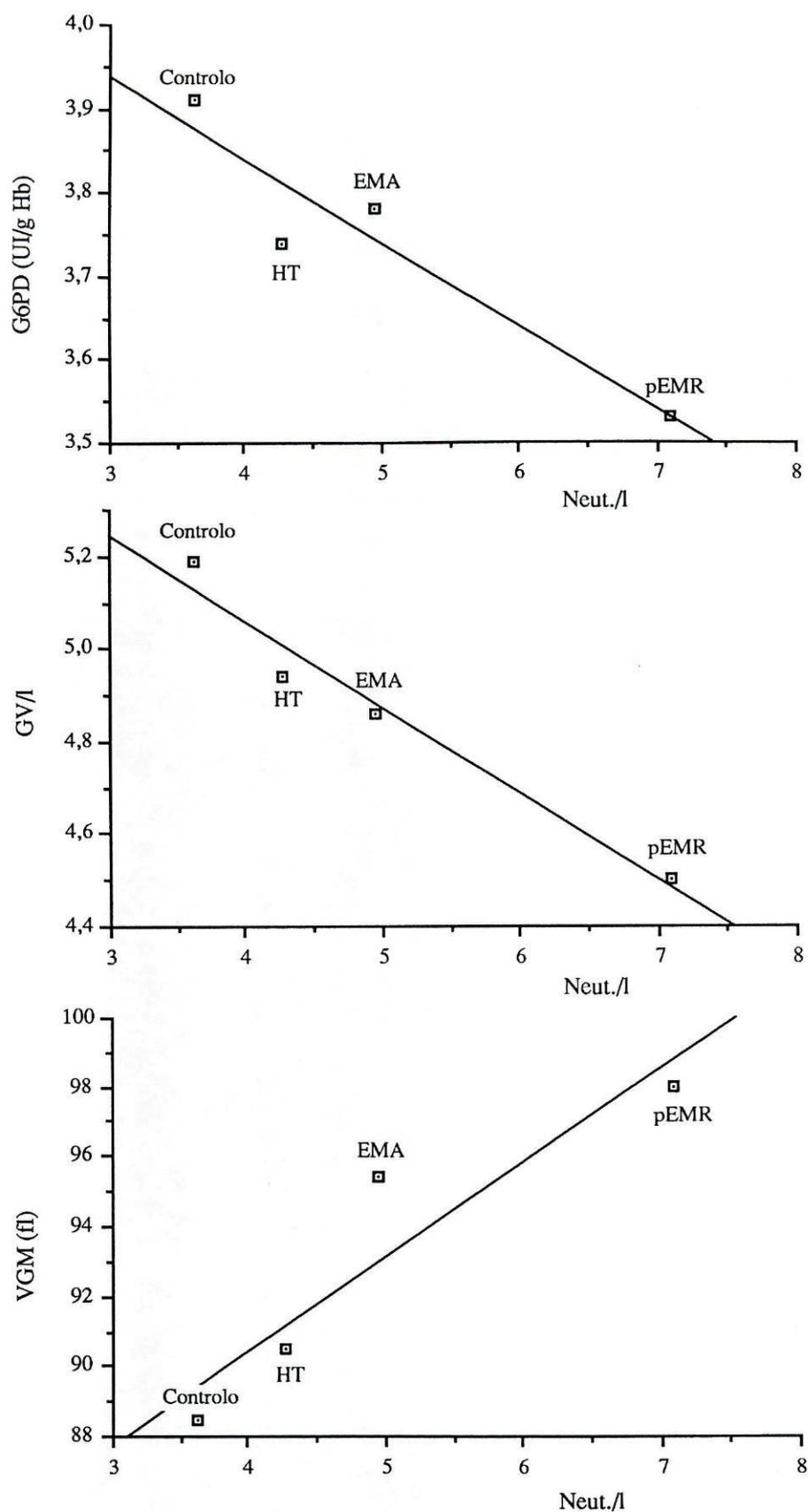


Fig. 11.: Correlação entre os valores médios das concentrações de neutrófilos com os valores médios da actividade enzimática da G6PD eritrocitária ($R = 0,900$), do número de GV/l ($R = 0,963$) e do volume globular médio ($R = 0,864$), observadas na população controlo, HT, EMA e pEMR.

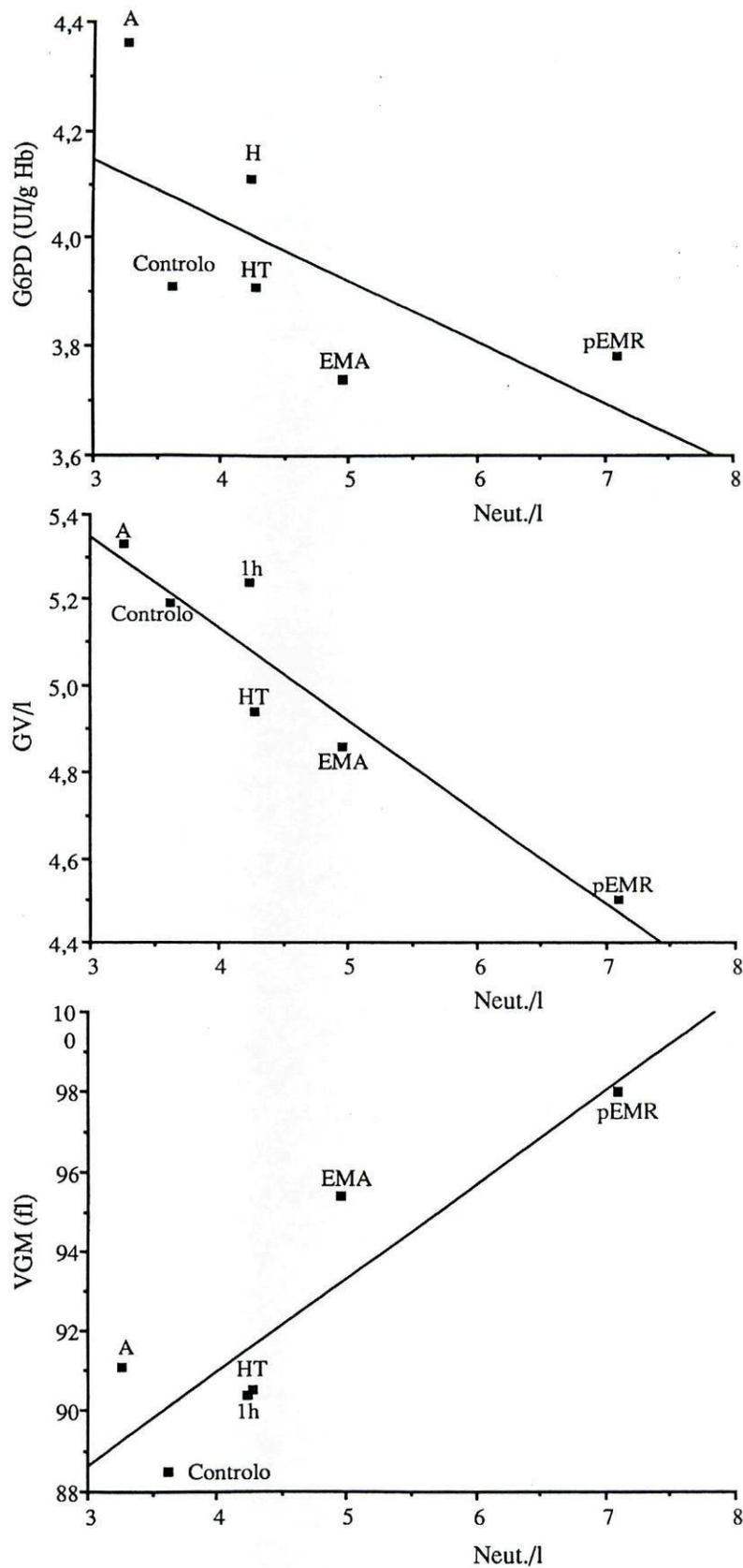


Fig. 12.: Correlação entre os valores médios das concentrações de neutrófilos com os valores médios da actividade enzimática da G6PD eritrocitária ($R = 0,440$), do número de GV/l ($R = 0,893$) e do volume globular médio ($R = 0,793$), observadas na população controlo, HT, EMA, pEMR, A e 1 h.

2.4. - Estudo do Perfil Proteico da Membrana Eritrocitária.

À semelhança do que se referiu para o exercício físico, também aqui o estudo do perfil proteico da membrana eritrocitária em gel corado pelo azul de Coomassie e pela prata, não evidenciou modificações significativas nas bandas dos diferentes grupos, nem o aparecimento evidente de novas bandas. De facto, eram também aqui, visíveis várias bandas, muito ténues e difusas, localizadas entre a banda 4.2 e 5, e ainda uma zona de coloração difusa no início do “stacking gel”, que se intensificava nas amostras dos doentes em risco de DCV (Fig. 13).

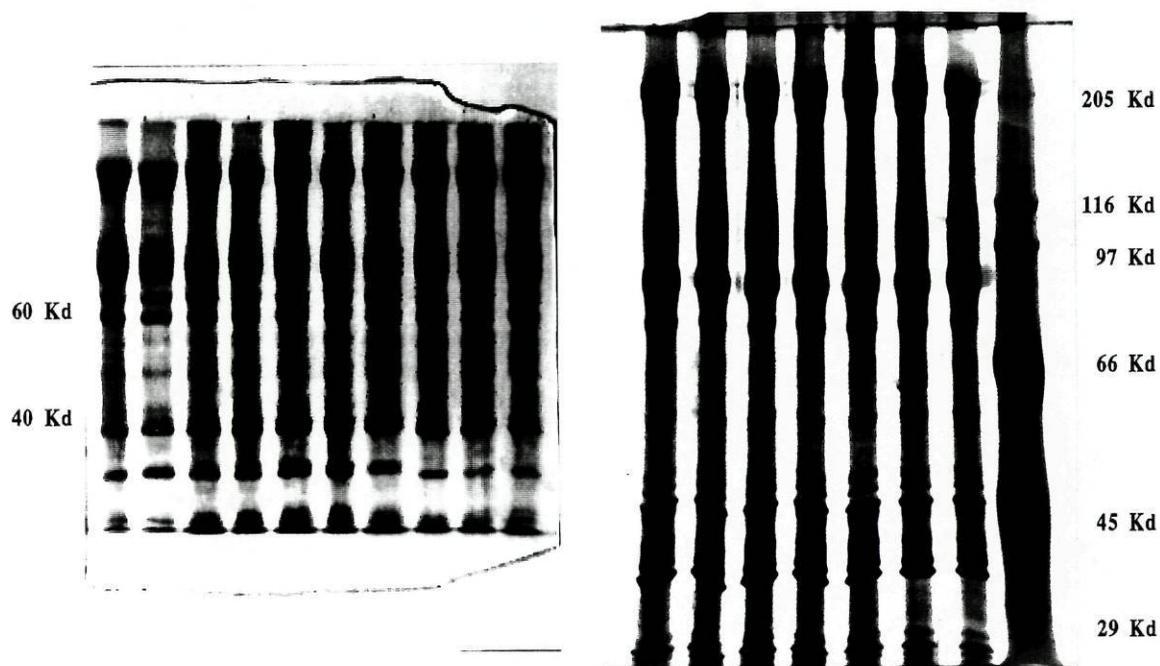


Fig. 13: Perfil proteico da membrana eritrocitária, após electroforese e revelação pelo azul de Coomassie (à esquerda) e pela prata (à direita), apresentam-se alguns casos integrados nos quatro grupos estudados (Controlo, HT, EMA e pEMR). De notar as várias bandas, ténues e difusas, migrando entre a zona de 60 e de 40 Kd, bem como o aspecto difuso e de intensidade diferente no início do “stacking gel”.

2.5. - Estudo do Perfil da Proteína Banda 3 da Membrana Eritrocitária.

Os resultados do estudo do perfil da proteína banda 3, apresentados na Figura 14 e quantificados na Tabela 13, evidenciam modificações significativas no perfil da banda 3 em qualquer um dos grupos patológicos. As alterações observadas são, aliás, semelhantes às já observadas para o exercício físico, isto é, um aumento dos AgEPM e uma redução no monómero de banda 3 e nos fragmentos peptídicos.

O perfil da banda 3 dos grupos HT e EMA apresenta valores similares para todas as bandas. Nestes, observam-se os valores mais elevados de AgEPM e os mais baixos do monómero de banda 3 e dos fragmentos peptídicos totais. O grupo pEMR, embora com modificações significativas nos AgEPM, no monómero de banda 3 e nos fragmentos peptídicos totais, relativamente ao controlo, apresenta valores menos distantes destes, que os outros dois grupos de risco. De notar ainda que os fragmentos de 40 Kd sofrem uma redução significativa no grupo EMA e também no pEMR, enquanto nos de 60 Kd a redução só é significativa no grupo EMA.

	Controlo (n = 29)	HT (n = 12)	P	EMA (n = 24)	P	pEMR (n = 22)	P
AgEPM	9,8 ± 6,0	21,3 ± 5,5	< 0,001,	21,7 ± 5,1	< 0,001	18,3 ± 6,9	< 0,001
Banda 3	62,9 ± 4,4	56,1 ± 2,8	< 0,001	55,6 ± 2,6	< 0,001	58,1 ± 6,4	0,002
Frag. Tot.	28,3 ± 5,7	22,6 ± 4,5	0,004	22,8 ± 5,4	0,001	23,8 ± 6,9	0,013
60 Kd	10,1 ± 2,3	8,6 ± 1,7	s.s.	8,6 ± 2,3	0,027	9,6 ± 2,4	s.s.
40 Kd	14,8 ± 3,7	11,8 ± 2,3	0,01	11,9 ± 3,2	0,003	12,0 ± 3,4	0,006
20 Kd	2,9 ± 1,2	2,3 ± 0,9	s.s.	2,4 ± 1,2	s.s.	2,2 ± 2,1	s.s.

Tab. 13: Perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária nos três grupos de risco (HT, EMA e pEMR) e no grupo Controlo. Apresentam-se os valores percentuais (média ± d.p.) da banda 3, seus agregados (AgEPM), e fragmentos peptídicos (60, 40 e 20 Kd). Cada um dos valores é comparado com o valor correspondente no grupo controlo, pelo teste t de Student.

É interessante observar que os três grupos de risco apresentam um perfil significativamente diferente do controlo, mas que o perfil é semelhante entre eles.

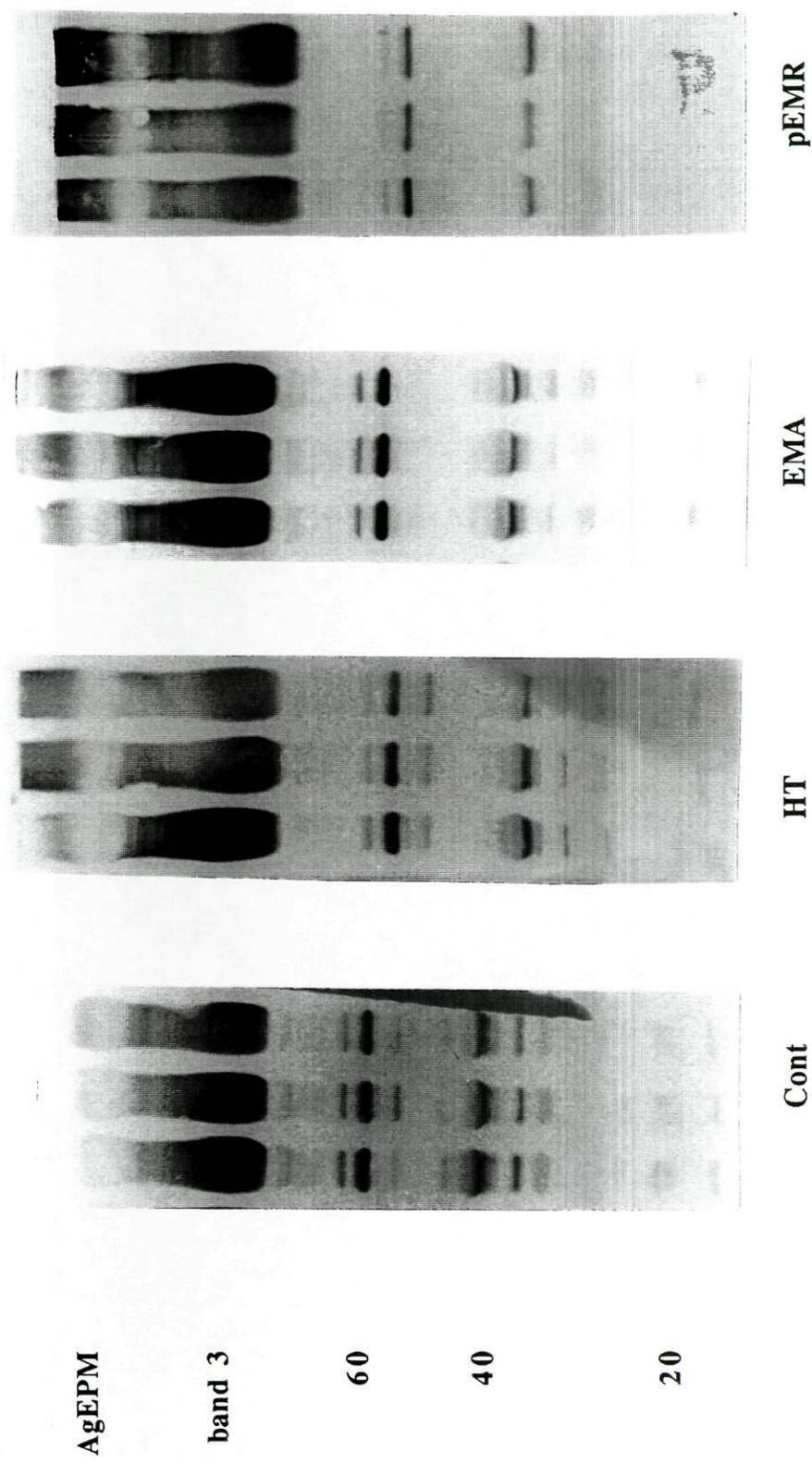


Fig. 14: Apresentam-se alguns exemplos do perfil da banda 3, obtido por "western blotting" para a banda 3, nos diferentes grupos de risco (HT, EMA e pEMR) e no grupo controle. O anticorpo monoclonal anti-banda 3 usado reconhece a proteína banda 3 (90-100 Kd), os seus agregados (AgEPM) e os seus fragmentos peptídicos de 60 Kd, 40 Kd e 20 Kd.

2.6. - "Western Blotting" para Avaliação de IgG's Ligadas à Membrana Eritrocitária.

A avaliação da ligação de IgG's à membrana eritrocitária por "western blotting", foi feita segundo a metodologia referida no ponto 1.2.1.1.

No seguimentos dos resultados obtidos, sugestivos de um processo de senescência acelerada, tornava-se conveniente verificar a coexistência de IgG's nos AgEPM observados com particular acuidade nos grupos de risco. O estudo das IgG's ligadas à membrana, foi feito em amostras do grupo controlo e do grupo pEMR, por ser este o grupo que apresentou modificações hematológicas evidentes e também uma leucocitose neutrofflica mais acentuada. Em paralelo, e com as mesmas amostras em idênticas condições de electroforese e transferência electroforética, fez-se o "western blotting" para a banda 3, por forma a estabelecer uma relação entre os agregados de banda 3 e de IgG's na membrana eritrocitária.

O método de revelação das IgG's pelo cloronaftol revelou-se, todavia, de baixa sensibilidade para este estudo. Assim, recorreu-se a outro método mais sensível, de quemiluminescência (ponto 1.2.1.1.) (Fig. 15 e Fig. 16).

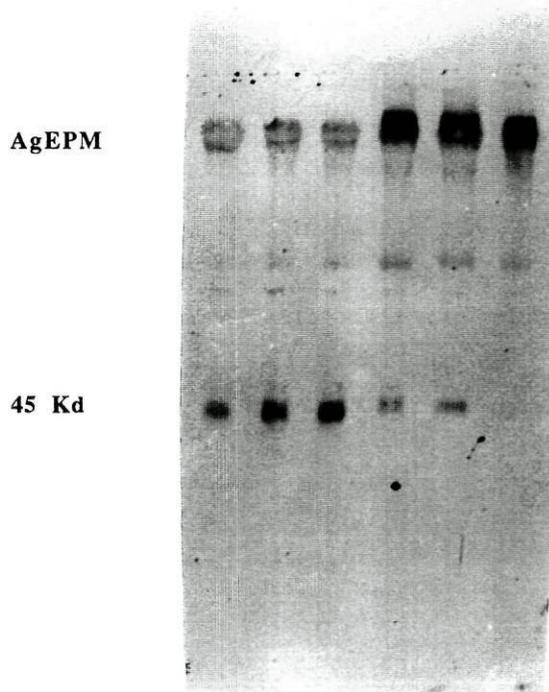


Fig. 15: "Western blotting para avaliação de IgG's ligadas à membrana eritrocitária. As três amostras da esquerda pertencem ao grupo controlo e as três amostras da direita ao grupo pEMR. De notar a diferença na intensidade das duas bandas que se observam (AgEPM e 45 Kd), para cada um dos dois grupos.

Os "immunoblotting" para as IgG's revelaram a presença de uma banda menor migrando na zona de 45 Kd e sem sobrepôr nenhuma das bandas no "immunoblotting" para a banda 3, e uma banda mais intensa migrando na mesma zona dos AgEPM, aliás, perfeitamente sobreponível a estes no "immunoblotting" para a banda 3. Nas amostras do grupo pEMR a banda de PM elevado é francamente mais intensa que a das amostras do grupo controlo (Fig. 15). Pelo contrário, a banda de menor PM é mais acentuada no grupo controlo. Acresce que esta banda não é detectável quando as membranas não são tratadas em condições redutoras (Fig. 16).

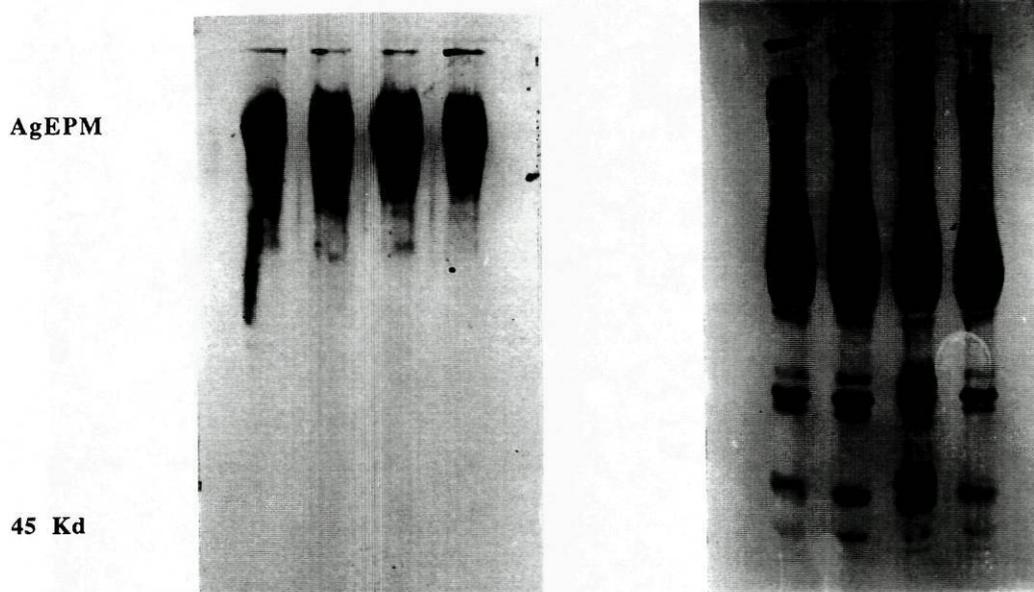


Fig. 16: Estudo paralelo do perfil da banda 3 (à direita), em amostras tratadas em condições redutoras, e de IgG's ligadas à membrana eritrocitária (à esquerda), em amostras não tratadas em condições redutoras. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo processo electroforético e de transferência.

Note-se a ausência da banda de 45 Kd observada nas amostras tratadas em condições redutoras (Fig. 15). De notar ainda a sobreposição dos AgEPM em ambos os "immunoblotts".

2.7. - Avaliação do Perfil Lipídico.

O estudo lipídico mostrou em todos os grupos patológicos um perfil lipídico de risco, com um ou vários parâmetros alterados (Tab. 14).

No grupo HT, para além da hipertensão, observou-se um aumento significativo de Col, TG, e Apo B. O grupo de EMA apresentou valores significativamente elevados de Col, LDLc e Apo B. Também no grupo pEMR se observaram alterações significativas de risco, nomeadamente um aumento de LDLc e de Apo B, e uma redução de HDLc.

Note-se que, à semelhança do que acontecia com o perfil da banda 3, o perfil lipídico do grupo pEMR, embora com diferenças significativas, relativamente ao grupo controlo, é aquele cujos valores estão menos distantes dos valores de controlo.

	Controlo (n = 29)	HT (n = 12)	P	EMA (n = 24)	P	pEMR (n = 22)	P
Col (mg/dl)	208 ± 43	235 ± 26	0,05,	252 ± 39	0,001	218 ± 40	s.s.
TG (mg/dl)	120 ± 57	371 ± 119	0,001	191 ± 99	s.s.	144 ± 53	s.s.
HDLc (mg/dl)	48 ± 15	41 ± 14	s.s.	47 ± 15	s.s.	40 ± 12	0,05
LDLc (mg/dl)	130 ± 42	146 ± 36	s.s.	161 ± 25	0,001	153 ± 45	0,05
Apo A1 (mg/dl)	136 ± 25	186 ± 39	0,001	173 ± 32	0,001	138 ± 30	s.s.
Apo B (mg/dl)	112 ± 23	152 ± 26	0,001	162 ± 25	0,001	137 ± 27	0,005

Tab. 14: Perfil lipídico nos três grupos de risco (HT, EMA e pEMR) e no grupo Controlo. Apresentam-se os valores (média ± d.p.) das concentrações de colesterol (Col), de triglicéridos (TG), de colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDLc), de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDLc) e das apolipoproteínas A1 e B (Apo A1 e Apo B). Cada um dos valores é comparado com o valor correspondente no grupo controlo, pelo teste t de Student.

3. - Discussão dos Resultados.

O estudo hematológico evidenciou um aumento de leucócitos no grupo HT e no grupo EMA, atingindo o valor máximo no grupo pEMR (Tab. 12). Este aumento de leucócitos totais deve-se predominantemente a uma elevação no número de neutrófilos. De facto, dos diferentes tipos de leucócitos, o neutrófilo é o único que apresenta um aumento significativo, relativamente ao controlo. Este aumento é também evidenciado pela alteração observada na relação dada pelo número de GV por neutrófilo (Tab. 12).

Verificou-se ainda que em paralelo com o aumento de leucócitos e em particular de neutrófilos, diminui o número de GV/l e a actividade da G6PD eritrocitária, enquanto o VGM aumenta. De facto, existe uma correlação negativa significativa com os dois primeiros e uma correlação positiva significativa com o último, o que sugere o envolvimento dos neutrófilos nestas modificações (Fig.11). Em ambos os grupos HT e EMA se observa um aumento no valor do VGM, que atinge o valor mais elevado no grupo pEMR, o qual apresenta também o valor mais alto de neutrófilos e o mais baixo de eritrócitos e de actividade da G6PD eritrocitária. Estas mesmas modificações, isto é, um aumento de neutrófilos em paralelo com um aumento no VGM e uma redução da actividade da G6PD eritrocitária, foram já referidas para o *stress* oxidativo imposto pelo exercício físico (Fig. 12). Pelo que, a hipótese avançada nessa altura é agora fortalecida com estes resultados. Segundo essa hipótese, o *stress* oxidativo determina lesões moleculares a nível da membrana eritrocitária, que se reflectem num aumento do volume celular, num aumento da %HbLM e numa alteração do perfil da banda 3, e que essas lesões marcando a célula para a morte, determinam a remoção dos eritrócitos senescentes, explicando a redução observada no número de GV/l. Além disso, os neutrófilos, pelas correlações observadas parecem contribuir para o desenvolvimento de *stress* oxidativo e proteolítico.

Os resultados do perfil da banda 3 observado para os diferentes grupos de risco está também de acordo com a hipótese avançada. De facto, observou-se nestes um perfil perfeitamente distinto daquele apresentado pelo grupo controlo (Tab. 13) (Fig. 14). Os AgEPM duplicam o seu valor em qualquer um dos três grupos de risco, enquanto o monómero de banda 3 e os fragmentos totais sofrem uma redução. Uma vez que o aumento apresentado pelos AgEPM resulta de uma redução quer do monómero, quer dos fragmento peptídicos totais, a sua formação poderá resultar da oxidação e "cross-linking" do monómero de banda 3 ou dos fragmentos, ou, ainda, resultar de proteólise de banda 3,

seguida de oxidação e "cross-linking" dos fragmentos proteolíticos, ou, finalmente, de ambos os processos.

Segundo a hipótese imunológica de remoção de eritrócitos senescentes, modificações na proteína banda 3 traduzem para a superfície exofacial da membrana eritrocitária modificações citoplasmáticas, quer decorrentes de um processo normal de senescência, quer decorrentes da existência de eritropatias (talassemias, drepanocitoses, enzimopatias) ou, ainda, decorrentes de lesões por tratamento com oxidantes (Lelkes *et al.*, 1983; Low *et al.*, 1985; Kannan *et al.*, 1988; Kannan *et al.*, 1991). Em todos os casos referidos se demonstrou a presença de imunocomplexos constituídos por agregados de banda 3 e auto-anticorpos anti-banda 3, do tipo IgG (Fig. 15 e 16). A agregação da banda 3, promovendo a aproximação dos locais de ligação do auto-anticorpo, favorece a interação antígeno-anticorpo e permite o estabelecimento de ligações bivalentes (Low, 1991).

Os anticorpos naturais para a banda 3 são específicos desta e ligam-se à proteína nativa por ligação monovalente, facilmente dissociável. De acordo com Lutz (1992a), estes anticorpos com baixa afinidade para a proteína nativa têm uma ligação preferencial a oligômeros de banda 3, com os quais estabelecem uma ligação bivalente e dificilmente dissociável. Esta preferência é aliás de extrema importância, pois existindo agregados de banda 3 apenas em eritrócitos senescentes ou lesados, conferir-lhe-á a capacidade para reconhecer entre um eritrócito normal e um eritrócito senescente ou lesado.

Afigura-se conveniente realçar aqui a sobreposição dos sinais de senescência eritrocitária com os sinais desenvolvidos por tratamento de eritrócitos com oxidantes e, por consequência a associação de lesões oxidativas ao processo de senescência. Em conformidade, um *stress* oxidativo superior ao fisiológico, deverá determinar um envelhecimento eritrocitário acelerado. Convém ainda relembrar que o eritrócito é uma célula que pela sua capacidade biosintética limitada, acumulará as lesões proteicas de natureza oxidativa que sofra ao longo da sua vida, já que é incapaz de as sintetizar, para substituição das proteínas lesadas.

O estudo paralelo do perfil da banda 3 e das IgG's ligadas à membrana, com as mesmas amostras em idênticas condições de electroforese e transferência electroforética, permitiu estabelecer uma relação entre os agregados de banda 3 e de IgG's na membrana eritrocitária. Os "immunobloting" para as IgG's revelaram a presença de uma banda menor migrando na zona de 45 Kd e sem sobrepôr nenhuma das bandas no "immunobloting" para a banda 3, e uma banda maior migrando na mesma zona dos

AgEPM, perfeitamente sobreponível a estes no “immunoblotting” para a banda 3. A banda de 45 Kd, que não é sobreponível a nenhum dos fragmentos de banda 3, poderá corresponder a um fragmento da molécula de IgG ligada a uma das proteínas da membrana eritrocitária, já que esta banda não é detectável quando as membranas não são tratadas em condições redutoras (Fig. 16).

Também o valor da %HbLM está elevado em qualquer um dos grupos de risco (Tab. 12), relativamente ao grupo controlo. A hemoglobina desnaturada liga-se à membrana eritrocitária, a nível do domínio citoplasmático da banda 3, promovendo a agregação de banda 3 e a ligação de IgG's (Low, 1985; Low *et al.*, 1991).

Apesar de as modificações nos parâmetros referentes ao hemograma serem menos acentuadas nos grupos HT e EMA, relativamente ao controlo, o perfil da banda 3 e o valor da %HbLM são significativamente diferentes nos três grupos de risco estudados, o que sugere que estes dois parâmetros são mais sensíveis ao *stress* oxidativo e proteolítico, podendo constituir marcadores precoces, de extraordinária sensibilidade. Além disso, e uma vez que iguais modificações são observadas no grupo HT e EMA, pode afirmar-se que são independentes da terapêutica ou do próprio enfarte de miocárdio.

São vários e bem conhecidos os factores de risco de doença cardiovascular, todavia, sabe-se também que esses factores de risco permitem prever apenas um terço dos eventos cardiovasculares. A elevada prevalência destes incidentes, justifica pois a procura constante de novos marcadores, mais sensíveis e precoces.

Nos últimos anos foi dada particular atenção e importância à hipótese de modificação oxidativa para a aterogénese. Segundo esta, os radicais activos de oxigénio desempenham um papel relevante no início e progressão da lesão aterosclerótica (Downey, 1990; Flaherty, 1991). O processo inicia-se com a infiltração e acumulação de lípidos na camada subendotelial, proliferação de células conhecidas como mediadoras de activação leucocitária, e termina com a formação da placa aterosclerótica. No espaço subendotelial a LDL é modificada oxidativamente, estando essa modificação ligada à acção de radicais de oxigénio, que podem ser produzidos por células musculares lisas, células endoteliais ou macrófagos. A LDL oxidada tem propriedades quimiotácticas para os monócitos, inibe a motilidade dos macrófagos e é fagocitada mais avidamente pelos macrófagos que a LDL nativa. Da oxidação das LDL no espaço subendotelial resultará o recrutamento de monócitos circulantes, a formação de macrófagos residentes e acumulação de LDL oxidada no interior desses macrófagos, de que resultarão as células “foam”.

Ao macrófago são atribuídas diversas acções adversas envolvidas no processo aterogénico (Steinberg, 1987), nomeadamente a secreção de citocinas que induzirão a proliferação de fibroblastos, células musculares lisas e células endoteliais. Algumas das citocinas secretadas pelo macrófago podem também desencadear o processo de activação de neutrófilos (Weiss, 1982; Uyesaka *et al.*, 1992b), os quais constituem também uma importante fonte de radicais de oxigénio e proteases. A acção de neutrófilos activados ou dos respectivos produtos de bioactivação é bem conhecida e largamente estudada *in vitro*, e tem evidenciado a sua interacção com os eritrócitos. Dessa interacção resultam, entre outras modificações, a lipoperoxidação de lípidos da membrana, a indução da desnaturação de hemoglobina, modificações nas proteínas de membrana, nomeadamente da banda 3, alterando a sua antigenicidade e promovendo a ligação de IgG's à membrana (Weiss, 1982; Claster *et al.*, 1984; Claster *et al.*, 1986; Claster *et al.*, 1987; Weiss *et al.*, 1988; Uyesaka *et al.*, 1992b).

3. - Nota Final de Discussão.

Em conformidade com os resultados e com o estado da arte sugere-se que o *stress* oxidativo e proteolítico iniciado pelos macrófagos, seja exacerbado pelos neutrófilos, também produtoras de radicais de oxigénio e proteases, capazes de interaccionar com os eritrócitos, por lesão oxidativa e proteolítica das proteínas da membrana, em particular com a proteína banda 3, alterando a sua antigenicidade e promovendo a ligação de IgG's, que poderão determinar a remoção da célula.

O eritrócito parece, pois, constituir um bom modelo de estudo de *stress in vivo*, nas doenças cardiovasculares, e possuir marcadores como a proteína banda 3 e a HbLM, capazes de fornecer informação cumulativa das lesões resultantes de um *stress* oxidativo e proteolítico.

Acresce ainda que no controlo analítico regular de pacientes em risco, será importante atentar em modificações no valor de leucócitos, particularmente de neutrófilos, paralelas a uma redução no valor de eritrócitos e a um aumento do VGM.

Capítulo VI

Capítulo VI

Estudos <i>in vitro</i>	164
1. Material e métodos	166
1.1. Estudo <i>in vitro</i> do perfil da banda 3 em fracções eritrocitárias de densidade crescente	166
1.2. Estudo <i>in vitro</i> da interacção de PMN activados com eritrócitos, e seu impacto sobre a proteína banda 3 da membrana eritrocitária	167
1.3. Estudo <i>in vitro</i> da interacção das serinoproteases quimiotripsina e elastase neutrofílica com os eritrócitos e com a proteína banda 3 da membrana eritrocitária	168
2. Resultados e discussão	170
2.1. Perfil da banda 3 em fracções eritrocitárias de densidade crescente	170
2.2. Interacção de PMN activados com eritrócitos	173
2.3. Interacção das serinoproteases quimiotripsina e elastase neutrofílica, com os eritrócitos e com a proteína banda 3 da membrana eritrocitária	176
3. Nota final de discussão	177

VI. Estudos *in vitro*.

Com o objectivo de clarificar alguns resultados obtidos e reforçar outros, procedeu-se a alguns estudos *in vitro*, nomeadamente ao estudo do perfil da banda 3 em fracções eritrocitárias obtidas por centrifugação em gradiente de densidade contínuo, ao estudo da interacção de neutrófilos activados com os eritrócitos e seu impacto a nível do perfil da banda 3, ao estudo da interacção das serinoproteases quimiotripsina e elastase neutrofílica com os eritrócitos e em particular sobre o perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária.

O estudo do perfil da banda 3 em eritrócitos de diferentes densidades permitirá conhecer o perfil da banda 3 em eritrócitos de diferentes idades. A confirmar-se o processo de senescência acelerada proposto, verificar-se-á uma aproximação do perfil da banda 3 dos eritrócitos mais densos ao perfil observado nos eritrócitos expostos ao *stress* oxidativo e proteolítico imposto pelo exercício físico e pelo processo aterogénico. Em paralelo estudou-se a actividade da G6PD eritrocitária de cada uma das fracções, bem como o valor de hemoglobina ligada à membrana.

Porque o número de neutrófilos evidenciou correlações significativas com parâmetros relacionados com o processo de senescência e remoção eritrocitária, nomeadamente uma correlação negativa com a actividade da G6PD eritrocitária e uma correlação positiva com o número de eritrócitos e com o valor do VGM, procedeu-se ao estudo *in vitro* da acção de neutrófilos activados sobre eritrócitos, por forma a avaliar as modificações impostas pelos produtos de activação dos PMN, no valor de hemoglobina ligada à membrana, na actividade da G6PD eritrocitária e no perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária.

Uma vez que as alterações no perfil da banda 3, observadas no exercício físico e no doente cardiovascular, sugerem o desenvolvimento de um *stress* oxidativo e também proteolítico e o envolvimento de neutrófilos na criação desse *stress*, afigurou-se conveniente estudar a interacção de serinoproteases como a quimiotripsina e a elastase neutrofílica, com os eritrócitos e em particular com a proteína banda 3 da membrana eritrocitária.

1. - Material e Métodos.

1.1. - *Estudo in vitro do Perfil da Banda 3 em Fracções Eritrocitárias de Densidade Crescente.*

Este estudo foi executado em três amostras de sangue colhido em EDTA. Após a separação dos eritrócitos, segundo metodologia já descrita (cap. IV - 1.3.5.1.), e lavagem cuidadosa em PBS pH 7,4, procedeu-se à ressuspensão dos eritrócitos no tampão de lavagem, por forma a obter um hematócrito de 0,40 l/l.

Para o fraccionamento dos eritrócitos segundo as suas densidades, utilizou-se Percoll (Sigma) a pH 7,4 (90 ml), ao qual se adicionou diatrizoato de sódio (20 ml a 50% em água) e PBS (10 ml) (Rennie *et al.*, 1979). A adição de diatrizoato de sódio aumentará a osmolaridade do Percoll, e permitirá a formação de um gradiente de densidade contínuo, por centrifugação deste meio, a alta velocidade.

Em cada tudo de centrifugação foi colocado um volume de 30 ml do meio de separação e 5 ml da suspensão eritrocitária. A centrifugação teve lugar a 15.000 rpm durante 20'.

Em duas das amostras recolheram-se apenas duas fracções, uma de 2 ml de eritrócitos de menor densidade e outra de 3 ml dos eritrócitos mais densos, ou seja, uma do topo e outra do fundo do tubo.

Na terceira amostra recolheram-se quatro fracções, isto é, para além das duas fracções de menor e maior densidade recolheram-se também duas fracções de eritrócitos de densidade intermédia.

De cada uma das fracções, depois de convenientemente lavadas em PBS pH 7,4, foi retirada uma alíquota para estudo da actividade da G6PD eritrocitária (cap. IV - 1.3.3.) e outra para estudo quantitativo e qualitativo dos eritrócitos (cap. IV - 1.3.1.). O restante de cada uma delas foi usada para isolamento e preparação de membranas eritrocitárias (cap. IV - 1.3.5.2.). De seguida, em cada uma das amostras de membranas, foi avaliada a concentração proteica (cap. IV - 1.3.5.3.), a %HbLM (cap. IV - 1.3.5.4.) e o perfil da proteína banda 3 por "western blotting" (cap. IV - 1.3.7.).

1.2. - *Estudo in vitro da Interação de PMN Activados com Eritrócitos e seu Impacto sobre a Proteína Banda 3 da Membrana Eritrocitária.*

Este estudo foi executado em duas fases, usando em ambas uma amostra de sangue com EDTA (10 ml), colhida ao mesmo indivíduo, com intervalo de cerca de duas semanas. Na primeira fase o estudo foi feito em suspensões globulares de eritrócitos e neutrófilos em proporções similares às observadas no grupo pEMR (1 PMN/500 GV) e em proporções inferiores (1 PMN/200 GV). Na segunda fase usaram-se proporções de 1 PMN/300 GV e 1 PMN/200 GV.

O isolamento de eritrócitos e PMN foi obtido por centrifugação em gradiente descontínuo de dupla densidade (Histopaque) (cap. IV - 1.3.5.1.). Após a centrifugação obtêm-se três camadas celulares, bem individualizadas. Os eritrócitos constituem a camada inferior, localizada no fundo do tubo, os granulócitos representam a camada celular intermédia e a terceira camada celular, a do topo, é constituída por células mononucleares. As plaquetas encontram-se suspensas no plasma, que constitui a camada líquida do topo. Consegue-se desta forma isolar e separar numa só operação de centrifugação os eritrócitos e os granulócitos.

A população eritrocitária isolada deve ser lavada convenientemente em PBS pH 7,4 e de seguida preparar uma suspensão eritrocitária a 10^9 GV/ml (Weiss *et al.*, 1988).

Entretanto, deve também preparar-se a suspensão de granulócitos, começando por lavar e ressuspender as células em HBSS (Hanks balanced salt solution, sem Ca^{++} e sem Mg^{++} - Sigma) e de seguida avaliar o número de neutrófilos viáveis presentes na suspensão preparada. Para este estudo da viabilidade leucocitária utilizou-se o método de exclusão do azul de tripan, que consiste em adicionar o corante (0,2% de "trypan blue" - Sigma) a uma alíquota da suspensão leucocitária (na proporção de 1/2) e enumerar microscopicamente, no reticulado de uma câmara de Neubauer, o número de granulócitos viáveis, capazes de extrusar o corante. Os granulócitos não viáveis, são incapazes de impedir a entrada do corante, sendo por isso facilmente identificáveis pela coloração azul, conferida pelo corante. Conhecido o número de PMN viáveis da suspensão e a concentração da suspensão eritrocitária, calculam-se o volume necessário para preparar 1,5 ml de uma suspensão celular constituída por granulócitos viáveis e eritrócitos nas proporções pretendidas (1 PMN/500 GV, 1 PMN/300 GV, 1 PMN/250 GV e 1 PMN/200 GV).

Para a activação dos PMN utilizou-se o forbolmiristatoacetato (PMA) (Sigma)

(Esaguy *et al.*, 1991). Este, depois de dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma) a 20 mg/ml, é congelado a -20°C , podendo conservar-se como solução stock (Methods in Enzymology). Na altura dos ensaios prepara-se a partir desta, uma solução de PMA a 20 $\mu\text{g/ml}$ em HBSS, da qual se retirará o volume necessário para adição às suspensões globulares, por forma a obter uma concentração final de PMA de 1 $\mu\text{g/ml}$. Logo que preparadas as suspensões globulares de eritrócitos e PMN, e adicionado o PMA, procede-se à incubação a 37°C , com agitação suave, durante 1 hora. O branco do ensaio será constituído por uma suspensão de eritrócitos adicionada de PMA na mesma concentração que as outras suspensões.

Decorrido o período de incubação, retiram-se as suspensões e colocam-se em gelo, a fim de parar a reacção. Segue-se a separação dos PMN dos eritrócitos, por centrifugação em gradiente de dupla densidade (Histopaque) e a sua regeição. Os eritrócitos provenientes do branco do ensaio e das suspensões eritrocitárias expostas à acção de PMN activados, são convenientemente lavados em PBS pH 7,4 e de seguida ressuspensos no tampão de lavagem, por forma a obter um hematócrito de cerca de 0,40 l/l. Desta suspensão, retirou-se uma alíquota para estudo da actidade da G6PD eritrocitária (cap. IV - 1.3.3.). De imediato procede-se ao isolamento e preparação das membranas eritrocitárias (cap. IV - 1.3.5.2.) de cada uma das amostras eritrocitárias e, de seguida, à avaliação das respectivas concentrações proteicas das suspensões membranares (cap. IV - 1.3.5.3.), à avaliação da %HbLM (cap. IV - 1.3.5.4.) e ao estudo do perfil da banda 3 por "western blotting" (cap. IV - 1.3.7.).

1.3. - *Estudo in vitro da Interação das Serinoproteases Quimiotripsina e Elastase Neutrofílica com os Eritrócitos e com a Proteína Banda 3 da Membrana Eritrocitária.*

Para estudo da interacção da quimiotripsina com os eritrócitos, os ensaios foram executados numa amostra de sangue proveniente do mesmo indivíduo, aplicando a mesma metodologia e diferentes concentrações de quimiotripsina - 2,5, 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

A amostra de sangue com EDTA (10 ml) é submetida a uma centrifugação em gradiente descontínuo de dupla densidade (Histopaque) (cap. IV - 1.3.5.1.), para isolamento dos eritrócitos, os quais se lavam de seguida, cuidadosamente, em PBS pH 7,4 e se ressuspendem no tampão de lavagem, para um hematócrito de, aproximadamente, 0,40 l/l. Desta suspensão é retirada uma alíquota para estudo da

actividade enzimática da G6PD eritrocitária (cap. IV - 1.3.3.) e também do eritrograma (cap. IV - 1.3.1.). O restante é repartido em volumes de 1,5 ml em diferentes tubos.

Aos tubos teste, contendo a suspensão eritrocitária, adiciona-se o volume necessário de uma solução de quimiotripsina a 100 $\mu\text{g/ml}$ em PBS, por forma a obter a concentração pretendida de quimiotripsina num volume final de 3 ml, que se perfaz com PBS pH 7,4. Ao tubo do branco adiciona-se tampão para o volume final de 3 ml.

As diferentes suspensões preparadas são colocadas num banho de água a 37° C, com agitação suave, por um período de 1 hora. Decorrido esse tempo procede-se a uma extensa lavagem dos eritrócitos, após o que se ressuspendem para o hematócrito de 0,40 l/l. Desta suspensão retirar-se-á de novo uma alíquota para estudo da actividade enzimática da G6PD eritrocitária (cap. IV - 1.3.3.) e também do eritrograma (cap. IV - 1.3.1.). De imediato preparam-se as membranas dos eritrócitos tratados com diferentes concentrações de quimiotripsina (cap. IV - 1.3.5.2.). Para cada uma das amostras de membranas, foi avaliada a concentração proteica (cap. IV - 1.3.5.3.), a %HbLM (cap. IV - 1.3.5.4.) e feito o "western blotting" para estudo do perfil da banda 3 (cap. IV - 1.3.7.).

No estudo da interacção da elastase neutrofilica com os eritrócitos usou-se a mesma metodologia e avaliaram-se os mesmos parâmetros. As concentrações de elastase, usadas nas suspensões eritrocitárias, foram sempre superiores ao valor de referência da concentração sérica para a elastase (0,022 $\mu\text{g/ml}$) e incluíram valores de 0,05; 0,10; 0,25; 0,30 e 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

2. - Resultados e Discussão.

2.1. - Perfil da Banda 3 em Fracções Eritrocitárias de Densidade Crescente.

Este estudo, realizado em fracções eritrocitárias de densidade crescente, visa avaliar as modificações do perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária com a idade da célula, e comparar essas alterações com aquelas observadas no *stress* oxidativo que acompanha o exercício físico e o processo aterogénico. Foram também estudados outros parâmetros em que se haviam observado modificações com o *stress* oxidativo, como a G6PD, a %HbLM, VGM e CHGM. O valor da modificação observada entre a fracção menos densa e a mais densa, para cada um dos parâmetros estudados, nos três ensaios realizados, é apresentado nas Tabelas 15 e 16.

	AgEPM	Banda 3	Frag.	60	40	20
$\Delta\%$ 1º ens. (>d)	+ 8,4	+ 5,0	- 13,4	- 5,6	- 4,6	- 3,2
$\Delta\%$ 2º ens. (>d)	+ 8,3	+ 2,9	- 18,0	- 0,8	- 7,1	- 2,5
$\Delta\%$ 3º ens. (>d)	+ 20,4	+ 4,7	- 25,1	- 6,2	- 14,4	- 4,5

Tab. 15: Valor das modificações com a densidade (>d), observadas no perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária. Apresentam-se as diferenças entre os eritrócitos da fracção menos densa e da fracção mais densa.

No perfil da banda 3 com a densidade (Tab. 15) observa-se, em qualquer um dos três ensaios, um aumento dos AgEPM e uma redução dos fragmentos totais. Ou seja, verifica-se uma aproximação ao perfil observado nos DCV e no exercício físico.

Em todos os ensaios se observa uma redução da actividade da G6PD eritrocitária com a densidade e um aumento da hemoglobina ligada à membrana. Os eritrócitos das fracções de maior densidade são de menor volume e com uma concentração hemoglobínica aumentada, como é evidenciado pelas modificações no VGM e na CHGM.

	G6PD (UI/gHb)	HbLM (%x10 ⁻⁴)	VGM. (fl)	CHGM (g/dl)
$\Delta\%$ 1 ^o ens. (>d)	- 0,94	+ 49	- 2,8	+ 2,1
$\Delta\%$ 2 ^o ens. (>d)	- 0,49	+ 98	- 7,7	+ 1,3
$\Delta\%$ 3 ^o ens. (>d)	- 0,80	+ 115	- 1,6	+ 1,0

Tab. 16: Valor das modificações com a densidade (>d), observadas na actividade da G6PD eritrocitária, na hemoglobina ligada à membrana e nos índices hematimétricos - VGM e CHGM. Apresentam-se as diferenças entre os eritrócitos da fracção menos densa e da fracção mais densa.

Como foi referido, no último ensaio procedeu-se a um fraccionamento eritrocitário, por forma a obter quatro fracções eritrocitárias de densidade crescente e poder observar a evolução dos diferentes parâmetros a estudar. O resultado desse estudo, referente ao perfil da banda 3 é apresentado na Figura 17 e quantificado na Tabela 17.

	AgEPM	Banda 3	Frag.	60	40	20
1 ^a fr. (<d)	11,9	49,9	38,2	10,9	20,4	6,9
2 ^a fr.	30,1	51,9	18,0	5,1	10,8	2,1
3 ^a fr.	30,0	52,7	17,3	5,6	8,6	3,1
4 ^a fr. (>d)	32,3	54,6	13,1	4,7	6,0	2,4

Tab. 17: Perfil da proteína banda 3 da membrana de eritrócitos de densidade crescente. Apresentam-se os valores percentuais de cada uma das bandas, quantificadas densitometricamente.

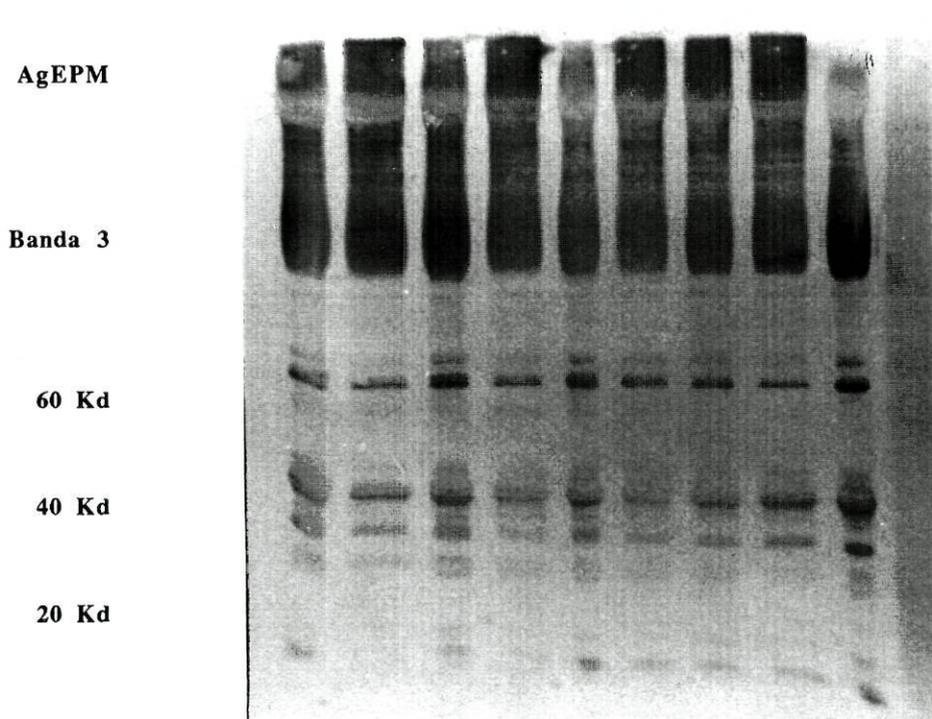


Fig. 17: Perfil da proteína banda 3 da membrana de eritrócitos de densidade crescente. Os quatro primeiros perfis da direita correspondem a eritrócitos de densidade crescente (da direita para a esquerda). Seguem-se dois blocos de dois, correspondendo, para cada um deles, o da direita a eritrócitos de baixa densidade e o da esquerda a eritrócitos muito densos.

As alterações oxidativas e proteolíticas no perfil da banda 3, por senescência, parecem acumular-se e ocorrer desde o início da vida do eritrócito maduro, pois as fracções de densidade média apresentam já essas alterações, embora menos acentuadas.

Da observação visual do “western blotting” é, aliás, bem evidente o aumento de AgEPM e a redução de banda 3 e dos respectivos fragmentos proteolíticos. A observação visual do “western blotting” sugere também uma redução do total de proteína banda 3, pelo que se procedeu à quantificação densitométrica das áreas de cada uma das bandas, para as quatro fracções eritrocitárias. Os resultados são apresentados na Tabela 18.

Da análise das áreas das diferentes bandas, nas diferentes fracções eritrocitárias, é evidente a formação de agregados de banda 3 a partir dos fragmentos peptídicos de banda 3, já que o total das áreas, bem como a área referente ao monómero de banda 3 se mantêm

constantes e só a área dos fragmentos totais sofre redução de valor semelhante ao aumento da área dos AgEPM. Todavia, na fracção de eritrócitos mais densos, observa-se já uma redução na área total de proteína banda 3 e na área correspondente ao monómero de banda 3, o que indica perda ou proteólise da banda 3 e dos respectivos fragmentos de 60, 40 e 20 Kd e a eventual produção de fragmentos proteolíticos de peso molecular inferior ao “cutoff” da nitrocelulose, e que, por esse motivo, não são detectáveis no “western blotting”. A perda destes fragmentos, que, pelas suas dimensões, atravessam a nitrocelulose no decorrer da transferência electroforética das proteínas e se perdem no tampão de electroforese, explica ainda o aumento percentual do monómero de banda 3, no perfil da proteína banda 3 (Tab. 17).

	AgEPM	Banda 3	Frag.	60	40	20	total
1ª fr. (<d)	1770	7477	5725	1635	3054	1036	14972
2ª fr.	4550	7837	2710	764	1627	319	15098
3ª fr.	4234	7409	2427	785	1213	429	14070
4ª fr. (>d)	4138	6894	1677	596	771	310	12709

Tab. 18: Quantificação densitométrica das áreas (μm^2) de cada uma das bandas que definem o perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária, em eritrócitos de densidade crescente.

O eritrócito sofre e acumula, desde o início da sua vida, agressões oxidativas e proteolíticas, às quais as proteínas são particularmente sensíveis, como é aliás bem evidente na proteína banda 3 da membrana eritrocitária. Além disso, a proteólise da banda 3 que parece favorecer a formação de AgEPM, apresenta um valor acentuado nos eritrócitos de maior densidade.

2.2. - *Interacção de PMN Activados com Eritrócitos*

Neste estudo pretendeu-se estabelecer uma correlação *in vitro* entre as modificações eritrocitárias observadas no DCV e no exercício físico, com a activação de neutrófilos ou,

mais precisamente, com os produtos de bioativação de neutrófilos. É reconhecido que estes constituem importantes fontes de radicais de oxigénio e proteases, ambos capazes de determinar modificações eritrocitárias, nomeadamente a nível das proteínas de membrana, alterando a sua antigenicidade e marcando a célula para a morte (Weiss *et al.*, 1988; Weiss *et al.*, 1990; Ward, 1991; Weiss *et al.*, 1992).

As suspensões globulares de eritrócitos e PMN foram preparadas em proporções PMN/GV semelhantes às observadas no grupo pEMR e em proporções de PMN superiores a esse valor, eventualmente atingidas nos locais de inflamação e em locais com oclusão parcial do lúmen vascular.

As diferenças observadas no perfil da banda 3, relativamente ao branco (GV + PMA), são apresentadas na Fig.18 e quantificadas na Tabela 19.

AgEPM

Banda 3

60 Kd

40 Kd

20 Kd

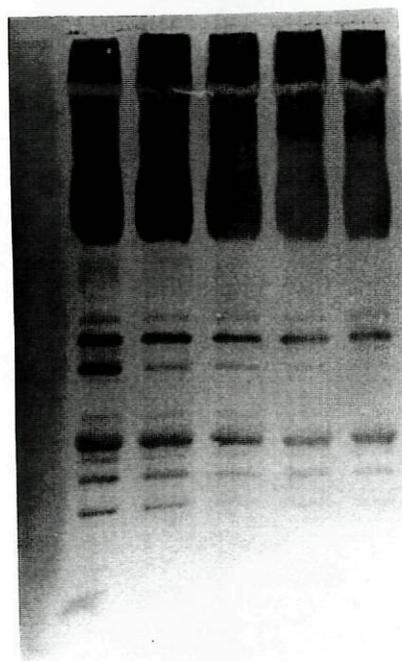


Fig. 18: Perfil da proteína banda 3 da membrana de eritrócitos expostos à acção de PMN activados, em suspensões globulares de eritrócitos e PMN activados, em proporções diferentes.

Os perfis apresentados referem-se, da esquerda para a direita, a um padrão de PM, a eritrócitos sem PMA, a eritrócitos com PMA, a uma suspensão a 1 PMN/300 GV e a 1 PMN/200 GV.

Na suspensão globular a 1 PMN/500 GV as modificações no perfil da banda 3 são muito ténues, com uma ligeira redução no monómero de banda 3 e um aumento, também ténue, dos AgEPM. Nas suspensões globulares a 1 PMN/300 GV e a a 1 PMN/200 GV verificam-se já modificações que se acentuam da primeira para a segunda. Observa-se um aumento dos AgEPM, um aumento do monómero de banda 3 e uma diminuição dos

fragmentos peptídicos totais.

PMN/GV	AgEPM	Banda 3	Frag.	60	40	20
1/500	+ 0,4	- 0,2	- 0,2	- 0,1	+ 0,8	- 0,9
1/300	+ 2,3	+ 0,8	- 3,5	- 0,8	- 2,0	- 0,7
1/200	+ 3,8	+ 3,0	- 5,7	- 0,8	- 3,2	- 1,7

Tab. 19: Modificações determinadas no perfil da proteína banda 3 da membrana de eritrócitos expostos à acção de PMN activados, em suspensões globulares de eritrócitos e PMN em proporções diferentes - 1/500, 1/300 e 1/200. O valor das modificações em pontos percentuais é calculado em relação ao branco do ensaio.

Para a concentração mais elevada de PMN observou-se uma acentuação dos resultados obtidos na suspensão anterior, isto é, os AgEPM aumentaram ainda mais, o monómero de banda 3 sofreu um aumento maior e os fragmentos peptídicos tomaram um valor ainda mais reduzido. Este perfil da banda 3, com um aumento aparentemente paradoxal do monómero da banda 3, poderá explicar-se pela produção de fragmentos de peso molecular inferior ao “cutoff” da nitrocelulose, que não serão detectáveis no “western blotting”; poderá também explicar-se por perda de pequenas porções de membrana, com alteração do perfil global da proteína banda 3.

O estudo densitométrico de cada uma das bandas que definem o perfil da banda 3 (Tab. 20), confirmou a quase ausência de modificações na primeira concentração mais baixa de neutrófilos (1 PMN/500 GV) e mostrou que as modificações observadas no perfil da banda 3 (Tab. 19), resultam predominantemente da proteólise do monómero de banda 3 e dos respectivos fragmentos proteolíticos.

Na concentração de 1 PMN/500 GV, a mais próxima daquela observada nas amostras estudadas (pEMR), embora se observem modificações, elas são muito ténues, sobretudo se comparadas com as observadas nos pacientes de risco. Todavia, como já foi referido, é altamente provável que nos locais de inflamação a concentração de neutrófilos seja extraordinariamente superior e ainda que a estase e refluxo sanguíneo nos locais de oclusão parcial do lúmen vascular, favoreçam a interacção dos produtos de bioactivação

com os eritrócitos. Além disso, enquanto no tubo de ensaio a exposição foi de 1 hora, *in vivo* será provavelmente de dias, semanas ou meses. De facto, as modificações oxidativas e proteolíticas do perfil da banda 3 acentuam-se para concentrações de PMN superiores, particularmente as modificações proteolíticas. No “western blotting” é evidente, por simples observação visual, a proteólise do monómero de banda 3 e dos fragmentos peptídicos (Fig. 18).

PMN/GV	AgEPM	Banda 3	Frag.	60	40	20	total
1/500	+35	-14	-22	-22	+80	-80	-1
1/300	-12	-585	-268	-115	-62	-91	-865
1/200	+32	-849	-753	-174	-313	-266	-1570

Tab. 20: Modificações determinadas no perfil da proteína banda 3, definido por quantificação densitométrica das áreas (μm^2) de cada uma das bandas, observadas na membrana de eritrócitos expostos à acção de PMN activados, em suspensões globulares de eritrócitos e PMN em proporções diferentes - 1/500, 1/300 e 1/200. O valor das modificações em μm^2 é calculado em relação ao branco do ensaio.

As modificações impostas na actividade da G6PD eritrocitária e na %HbLM foram muito ténues. Na actividade da G6PD eritrocitária observou-se uma redução de 0,8, 0,22 e 0,11 para as suspensões a 1 PMN/500 GV, 1 PMN/300 GV e 1 PMN/200 GV, respectivamente. Na determinação da %HbLM encontraram-se aumentos de 91, 6 e 10 para as suspensões globulares de concentração em PMN crescente.

2.3. - *Interacção das Serinoproteases, Quimiotripsina e Elastase Neutrofílica com o Eritrócito e em particular com o Perfil da Proteína Banda 3 da Membrana Eritrocitária.*

Uma vez que no “western blotting” para estudo da interacção de neutrófilos activados com a proteína banda 3, sugeria modificações proteolíticas importantes, procedeu-se ao estudo da interacção isolada da quimiotripsina, uma serinoprotease bem

conhecida pela sua capacidade de degradação da proteína banda 3 (Claster *et al.*, 1991), e da elastase do neutrófilo, que é também uma serinoprotease (Edwards, 1994b).

Da interacção da quimiotripsina com eritrócitos resulta uma redução dos AgEPM, uma redução no monómeros da banda 3 e um aumento dos fragmentos peptídicos (Tab. 21 e Fig. 19). Estas modificações apresentam o seu valor mais acentuado na concentração de 10 µg/µl. A sua acção proteolítica parece exercer-se predominantemente sobre o monómero de banda 3 e, em menor extensão sobre os fragmentos peptídicos. No VGM e na HbLM observa-se um aumento que é, todavia, menor para as concentrações mais elevadas de quimiotripsina.

As modificações impostas nos eritrócitos e no perfil da proteína banda 3, por acção da elastase dos neutrófilos, em concentrações crescentes, são apresentadas na Tabela 22 e na Fig. 20. A interacção da elastase com os eritrócitos parece ter um mecanismo diferente do da quimiotripsina. No perfil da banda 3 observa-se, por acção da elastase, um aumento progressivo dos AgEPM, uma redução do monómero de banda 3 e também uma redução nos fragmentos peptídicos. A elastase parece promover a proteólise do monómero de banda 3 e o "cross-linking" dos fragmentos proteolíticos resultantes, o que sugere que a proteólise da proteína banda 3 pela elastase do neutrófilo, favorece a formação de AgEPM.

3.1. - *Nota final de discussão.*

O estudo de fracções eritrocitárias de diferentes densidades mostrou que o envelhecimento eritrocitário é acompanhado de uma redução da actividade da G6PD, uma redução no volume da célula, de que resulta um aumento da concentração intracelular de hemoglobina, e um aumento da HbLM. Ao longo da sua vida o eritrócito sofre agressões oxidativas e proteolíticas, que se tornam particularmente acentuadas no eritrócito senescente. O perfil da proteína banda 3 da membrana eritrocitária mostra uma diminuição dos fragmentos peptídicos da banda 3, um aumento dos AgEPM e um aumento do monómero de banda 3, com o envelhecimento eritrocitário. A redução dos fragmentos peptídicos de banda 3 pode resultar de agregação dos fragmentos, com formação de AgEPM, ou, ainda, resultar de uma proteólise extensa, com produção de fragmentos que pelo seu baixo peso molecular não sejam detectados no "western blotting". Ainda, a perda de pequenas porções de membrana, que se sabe ocorrer durante a vida da célula, explica a redução do VGM e o aumento de CHGM e pode também determinar a redução de proteína banda 3 que se observa nos eritrócitos de maior densidade.

Quimiot. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2,5	5	10	15	20
AgEPM	- 1,6	- 6,4	- 4,5	- 3,3	- 1,3
Banda 3	+ 1,8	+ 0,3	- 4,0	- 1,9	- 1,2
Frag, totais	+ 3,0	+ 6,1	+ 8,2	+ 5,0	+ 2,0
60 Kd	+ 1,8	+ 3,6	+ 4,3	+ 3,4	- 0,5
40 Kd	+ 1,2	+ 2,5	+3,9	+ 1,4	+ 2,1
VGM (fl)	+ 3,8	+ 5,8	+ 4,6	- 0,1	- 5,7
HbLM ($\% \times 10^{-4}$)	+ 487	+ 310	+ 183	+ 178	+ 217

Tab. 21: Modificações determinadas no perfil da proteína banda 3 da membrana de eritrócitos expostos à acção de quimiotripsina, em concentrações crescentes de 2,5; 5; 10; 15 e 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. O valor das modificações em pontos percentuais é calculado em relação ao branco do ensaio.

AgEPM

Banda 3

60 Kd

40 Kd

20 Kd

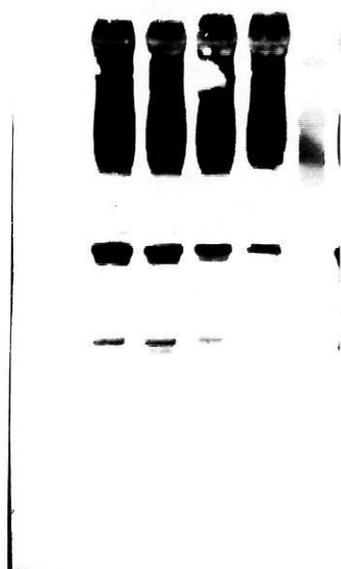


Fig. 19: Perfil da proteína banda 3 da membrana de eritrócitos expostos à acção de quimiotripsina em concentrações crescentes.

Os perfis apresentados à esquerda de um padrão de PM, referem-se, da direita para a esquerda, ao perfil da proteína banda 3 de eritrócitos expostos à acção de quimiotripsina, em concentrações de 5; 10 e 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Elastase ($\mu\text{g/ml}$)	0,05	0,10	0,25	0,30	1,00
AgEPM	+ 1,0	+ 2,6	+ 2,9	+ 4,2	+ 4,8
Banda 3	- 1,3	- 1,0	- 4,1	- 3,3	- 1,7
Frag. totais	+ 0,1	- 2,3	- 1,5	- 1,6	- 3,6
60 Kd	- 0,2	- 1,1	+ 0,5	- 0,1	- 2,7
40 Kd	+ 0,7	- 0,6	- 1,4	- 0,9	- 0,2
20 Kd	- 0,4	- 0,6	- 0,6	- 0,6	- 0,7
VGM (fl)	+ 2,1	+ 1,6	+ 0,3	+ 1,7	+ 0,8
HbLM($\% \times 10^{-4}$)	+ 61	+ 31	- 9,5	+ 37	+ 84

Tab. 22: Modificações determinadas no perfil da proteína banda 3 da membrana de eritrócitos expostos à acção de elastase neutrofílica, em concentrações crescentes de 0,05; 0,10; 0,25; 0,30 e 1,00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. O valor das modificações em pontos percentuais é calculado em relação ao branco do ensaio.

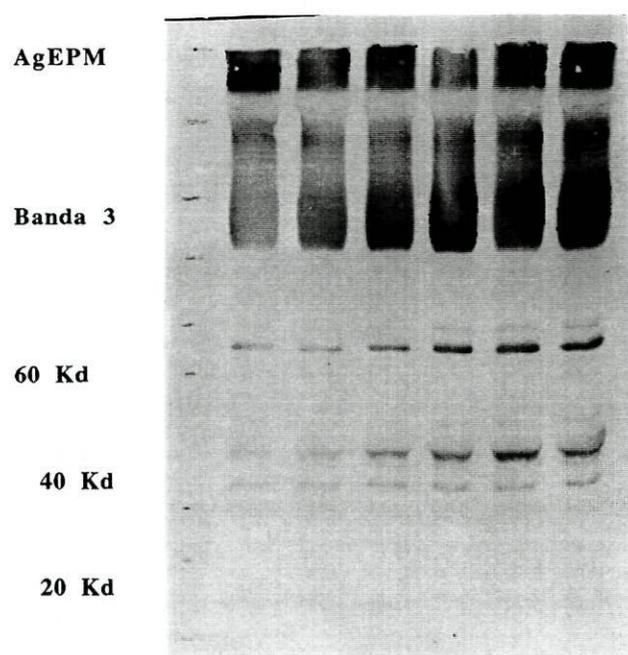


Fig. 20: Perfil da proteína banda 3 da membrana de eritrócitos expostos à acção de elastase neutrofílica em concentrações crescentes.

Os perfis apresentados à direita de um padrão de PM, e à esquerda de um controlo, referem-se, da direita para a esquerda, ao perfil da proteína banda 3 de eritrócitos expostos à acção de elastase neutrofílica, em concentrações de 0,05; 0,10; 0,25; 0,30 e 1,00 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

A activação *in vitro* de PMN, que é acompanhada de produção de radicais activos de oxigénio e de proteases, entre outros produtos, determina o mesmo tipo de modificações na G6PD eritrocitária e na HbLM, embora mais ténues. No perfil da proteína banda 3 observam-se também alterações semelhantes, ou seja, um aumento dos AgEPM e uma redução dos fragmentos.

As mesmas modificações foram observadas por exposição de eritrócitos à acção isolada de elastase do neutrófilo. No entanto, as modificações observadas por acção dos PMN activados são mais acentuadas que as resultantes da acção isolada da elastase, o que sugere que outros produtos de bioactivação dos PMN estejam também envolvidos, potenciando essa acção. De notar ainda que a proteólise da banda 3 por acção da elastase foi acompanhada de um aumento do VGM. Este aumento é também observado nos DCV e no exercício físico e sugere que a proteólise da banda 3 ou o “cross-linking” dos fragmentos proteolíticos, com formação dos AgEPM, possam determinar uma disfunção da proteína. Como se sabe, a banda 3 é também designada por canal aniónico, por mediar a troca de aniões entre a célula e o meio exterior.

A perda de proteína banda 3 observada nas fracções eritrocitárias de maior densidade (Tab. 15) e nos eritrócitos expostos à acção dos produtos de bioactivação dos PMN (Tab. 19) pode resultar da produção de fragmentos não detectáveis, devido ao seu baixo peso molecular, ou à vesiculação da membrana. De facto, o “cross-linking” da banda 3, com formação de AgEPM, pode determinar, por deslocação de diferentes moléculas para a zona de agregação, a formação de regiões membranares de fraca interacção com o citosqueleto, de que poderá resultar a vesiculação da membrana, isto é, a perda de pequenas porções de membrana, em que as vesículas poderão conter, entre outros constituintes, banda 3 não ligada ao citosqueleto. Este processo de vesiculação da membrana, devido a modificação das interacções verticais e horizontais entre as proteínas da membrana eritrocitária, é, aliás, o mecanismo subjacente à esferocitose hereditária, por deficiência ou depleção da banda 3 (Palek *et al.*, 1993). No primeiro caso, a presença de banda 3 modificada, incapaz de estabelecer uma ligação normal com o citosqueleto, permitirá a formação de pequenas vesículas contendo banda 3 e, eventualmente, outras proteínas não estruturais e lípidos. No caso de depleção em banda 3, o reduzido número de moléculas de banda 3 permite a existência de áreas da membrana eritrocitária em que a proteína banda 3 está ausente, e, por consequência, uma deficiente ligação destas áreas ao citosqueleto, que permitirá a formação e perda de vesículas da membrana, de natureza predominantemente lipídica. Aliás, neste mesmo trabalho Palek *et al.* referem que a

agregação de banda 3, induzida por agentes agregantes, conduz também à formação e perda de vesículas da membrana, em que a banda 3 e as proteínas do citosqueleto estão ausentes, ou seja, em que as vesículas são também de natureza predominantemente lipídica.

Os resultados obtidos nestes testes *in vitro* permitem definir a proteína banda 3 como um marcador sensível ao envelhecimento eritrocitário e às agressões oxidativas e proteolíticas impostas pelos produtos de bioativação dos PMN. É evidente que *in vivo* coexistem diferentes células e compostos fisiológicos (antioxidantes e antiproteases) que poderão inibir as modificações referidas e que os estudos *in vitro* nem sempre serão extrapoláveis para o que ocorre *in vivo*. Todavia, é importante salientar a semelhança do perfil da banda 3 da membrana de eritrócitos senescentes e de eritrócitos sob *stress* oxidativo e proteolítico, criado por PMN activados *in vitro*, com o perfil da banda 3 *in vivo*, no doente cardiovascular e no exercício físico.

Capítulo VII

Capítulo VII

Considerações finais 183

Considerações finais 184

VII. Considerações finais.

A leucocitose neutrofilica é comum a diversas situações patológicas, que incluem doenças de carácter inflamatório e infeccioso, agudas ou crónicas. É ainda frequente no recém-nascido e em situações ditas “fisiológicas”, como a gravidez e exercício físico. Frequentemente, a leucocitose neutrofilica é acompanhada de uma ligeira anemia, que por ter uma etiologia pouco definida e esclarecida, é referida por designações que referem a patologia ou a situação que associam, mas não a causa. São exemplos deste tipo de anemia a “anemia do atleta” e a “anemia das doenças crónicas”. Acresce que algumas destas situações, nomeadamente o exercício físico e as doenças cardiovasculares, associam o desenvolvimento de um *stress* oxidativo e proteolítico. No exercício físico esse *stress* é atribuído a um aumento do metabolismo celular, aumento do “turnover” da hemoglobina e activação leucocitária (Zerba *et al.*, 1990; Field *et al.*, 1991; Sen *et al.*, 1992; Jenkins *et al.*, 1993). No início e progressão do processo aterogénico a modificação oxidativa das LDL tem particular importância e denuncia o desenvolvimento do *stress* oxidativo e proteolítico nesta patologia. Em qualquer dos casos parece desenvolver-se um *stress* oxidativo e proteolítico na rede vascular e/ou no espaço subendotelial em que poderão interagir células activadas do espaço extravascular (macrófagos, linfócitos, células musculares lisas), da parede vascular e do espaço intravascular (neutrófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas). No centro desta interacção parece estar o macrófago que, para além de produzir radicais de oxigénio e libertar proteases, secreta citocinas capazes de induzir a activação e proliferação das células do espaço extravascular e da parede vascular, também elas secretoras de mediadores inflamatórios. Algumas das citocinas secretadas pelas células inflamatórias têm capacidade de activar células da circulação sanguínea, nomeadamente o neutrófilo, o linfócito e as plaquetas (Weiss, 1982; Klebanoff *et al.*, 1986; Uyesaka *et al.*, 1992a; Uyesaka *et al.*, 1992b; Lowe, 1993; Mehri *et al.*, 1993).

Os neutrófilos activados constituem importantes fontes de radicais de oxigénio e proteases que, sendo libertados na rede vascular poderão difundir-se e exercer a sua acção oxidativa e proteolítica sobre as células endoteliais, sobre constituintes plasmáticos e sobre as células sanguíneas vizinhas, nomeadamente sobre o eritrócito.

O eritrócito é uma célula particularmente sensível a agressões oxidativas e/ou proteolíticas por ter uma capacidade de recuperação limitada. Os lípidos de membrana eventualmente modificados por oxidação podem ser substituídos por outros de origem

plasmática, todavia, as lesões oxidativas ou proteolíticas das proteínas, acumular-se-ão, uma vez que o eritrócito é incapaz de síntese proteica.

Ao longo da sua vida de 120 dias o eritrócito sofre e acumula modificações físicas e químicas, decorrentes de um processo de senescência normal. Entre essas modificações incluem-se a redução de área da membrana, redução da actividade enzimática, activação de proteases, ligação de hemoglobina à membrana, oxidação de lípidos e proteínas de membrana, modificações na fragilidade e reologia do eritrócito. Estas modificações senescentes têm um tradutor a nível da membrana - a proteína banda 3 - que, por esse motivo é também designada por neoantigénio de senescência. À proteína modificada ligar-se-ão auto-anticorpos anti-banda 3 que, em conjunto com o complemento, mediarão a remoção do eritrócito senescente, por fagocitose. A antigenicidade da banda 3 pode resultar da sua proteólise, agregação ou ainda da exposição de epítomos habitualmente ocultos e ter origem em lesões bioquímicas diversas.

Estas mesmas modificações decorrentes do processo de senescência eritrocitária, foram já evidenciadas *in vitro* em eritrócitos expostos à acção de neutrófilos activados ou à acção isolada de produtos de bioactivação dos neutrófilos ou de oxidantes. Além disso, é sabido que o desenvolvimento precoce de lesões físicas ou químicas, como acontece em células talassémicas, células falsiformes, células com enzimopatias ou tratadas com oxidantes, determina a remoção prematura das células, em termos cronológicos.

Afigura-se, portanto, razoável que as situações de *stress* oxidativo e proteolítico sejam acompanhadas de leucocitose neutrofilica e de lesões oxidativas e proteolíticas do eritrócito, com tradução a nível da proteína banda 3, cuja modificação será reconhecida pelo sistema imune e mediará a remoção prematura dos eritrócitos lesados.

Com este trabalho mostrou-se que o eritrócito, um dos alvos dos produtos de bioactivação leucocitária, pode constituir um bom modelo de estudo e um potencial marcador de *stress* oxidativo e proteolítico.

O estudo das modificações leucocitárias e eritrocitárias observadas no exercício físico e no doente em risco, revelou uma correlação negativa do número de neutrófilos com o número de eritrócitos e com a actividade da G6PD eritrocitária, e uma correlação positiva com o VGM. De referir ainda que estas modificações se acentuam, nas amostras de doentes cardiovasculares, com o risco, definido pela avaliação dos factores de risco tradicionais. Estas correlações indiciam o envolvimento dos neutrófilos num processo de envelhecimento eritrocitário acelerado, que provavelmente compromete a sobrevivência de eritrócitos mais velhos, que são particularmente sensíveis a um *stress* oxidativo e

proteolítico. O estudo do neoantigénio de senescência, a proteína banda 3 da membrana eritrocitária, mostrou nos doentes em risco um perfil perfeitamente distinto daquele apresentado por uma população controlo. Observou-se uma redução do monómero de banda 3 e dos respectivos fragmentos peptídicos e um aumento de agregados de elevado peso molecular, denotando, portanto degradação da banda 3, que parece favorecer a formação de agregados de elevado peso molecular. O grupo pós-enfarte de miocárdio recente, com modificações eritrocitárias e leucocitárias mais acentuadas revelou a existência de um número superior de IgG's ligadas à membrana eritrocitária, relativamente ao grupo controlo, que migram na mesma região dos agregados de elevado peso molecular, sugerindo a ligação de IgG's aos agregados de banda 3.

O exercício físico intenso de curta duração apresenta modificações mais ténues no perfil da banda 3, observando-se apenas redução dos fragmentos peptídicos de banda 3 em favor dos agregados de elevado peso molecular. Todavia, o perfil da banda 3 antes do exercício físico numa amostragem de indivíduos constituída predominantemente por indivíduos que exercitam de uma forma regular e intensa, é muito próximo daquele apresentado pelos pacientes em risco. Também a HbLM aumenta significativamente nos grupos de risco e nos indivíduos que fazem exercício físico regular e intenso, relativamente ao controlo.

Do estudo do *stress* imposto por um exercício físico intenso de curta duração e de um *stress* contínuo, como o que ocorre nos doentes em risco e nos indivíduos que exercitam regularmente, parece-nos razoável afirmar que o *stress* imposto por um exercício físico intenso de curta duração determina lesões oxidativas ténues que, todavia, se acumulam e são evidentes no perfil da banda 3 dos indivíduos que exercitam regularmente. Da mesma forma, os doentes em risco sofrem um *stress* oxidativo contínuo, também evidente no perfil da banda 3. A menor distância dos valores do perfil de banda 3, apresentados pelo grupo de enfarte de miocárdio recente, dever-se-ão a um *stress* mais intenso, determinante de lesões oxidativas que despoletaram a remoção dos eritrócitos senescentes com mais lesões oxidativas acumuladas, como o evidencia, aliás, a redução significativa do número de GV/l neste grupo.

O estudo do perfil da banda 3 em eritrócitos de diferente densidade mostrou uma aproximação ao perfil de *stress* oxidativo e proteolítico, com redução dos fragmentos peptídicos e aumento dos AgEPM e do monómero de banda 3. Este aumento paradoxal do monómero de banda 3, pode resultar de uma proteólise envolvendo outro tipo de proteases ou de uma proteólise mais acentuada, que determine a produção de fragmentos

proteolíticos de peso molecular muito baixo e por isso não detectáveis, ou, ainda, resultar da vesiculação da membrana eritrocitária. A agregação de banda 3 poderá determinar a formação de áreas de fraca ligação com o citosqueleto, favorecendo a vesiculação e perda de pequenas porções de membrana eritrocitária. Os eritrócitos mais densos apresentam uma menor actividade de G6PD, uma redução no VGM e um aumento no valor da %HbLM. A mesma modificação para a G6PD e para a HbLM foi observada nas situações de *stress*, ao contrário do VGM que apresenta nestas uma elevação e que poderá eventualmente estar relacionado com inactivação da banda 3, que é também mediadora da troca de aniões.

Estudos *in vitro*, feitos em eritrócitos expostos à acção de neutrófilos activados, em concentrações crescentes, determinaram modificações no perfil da banda 3 semelhantes às observadas no eritrócito de maior densidade, com redução dos fragmentos peptídicos e aumento dos AgEPM e do monómero de banda 3. Verificou-se ainda que essas modificações se acentuam com a concentração de neutrófilos.

A acção isolada de elastase do neutrófilo sobre eritrócitos, impôs um perfil de banda 3 semelhante ao observado nas situações de *stress*, isto é, redução dos fragmentos peptídicos e do monómero de banda 3 e um aumento dos AgEPM. Observou-se também neste caso um aumento do VGM e da %HbLM.

Embora conhecendo o risco de extrapolar os resultados obtidos *in vitro* para o que ocorre *in vivo*, poderá dizer-se que os neutrófilos estão de facto envolvidos na resposta e no desenvolvimento de *stress* oxidativo e proteolítico, determinante de lesões oxidativas e proteolíticas cumulativas nos eritrócitos, cuja extensão será provavelmente modulada pela actividade dos mecanismos de defesa antioxidante e pela acção de antiproteases, em oposição à acção dos radicais de oxigénio, proteases e outros produtos de bioactivação de células inflamatórias.

Em conformidade com os resultados, o eritrócito constitui um bom modelo de estudo de *stress* oxidativo e proteolítico e possui marcadores sensíveis a esse *stress*, como a proteína banda 3 e a HbLM, capazes de fornecer informação cumulativa das lesões resultantes de um *stress* oxidativo e proteolítico.

Considerando a importância das DCV, pela sua prevalência e complicações associadas (a primeira causa de morte em Portugal), e, ainda, que os factores de risco tradicionais permitem prever apenas um terço dos eventos cardiovasculares, ressalta a importância do estudo de novos marcadores de risco. Este trabalho sugere que o estudo do perfil da proteína banda 3 e do valor da %HbLM devem ser avaliados como potenciais

marcadores clínicos de risco, quiçá mais sensíveis e mais precoces que os tradicionais, que permitam tomar medidas profiláticas atempadas (Julian, 1987; Rifkind *et al.*, 1987; Prentice, 1993; Law *et al.*, 1994). Acresce ainda que no contróle analítico será importante também atentar em modificações no valor de leucócitos e em particular de neutrófilos, paralelas a uma redução no valor de eritrócitos e a um aumento do VGM.

Nesta área das DCV afigura-se importante um estudo mais amplo destes potenciais marcadores clínicos de risco, em ligação estreita com a clínica, e a procura de outros. De facto, afigura-se também importante a avaliação da exteriorização dos fosfolípidos acídicos do folheto interno da membrana eritrocitária, que têm uma acção pró-coagulante, pelas alterações lipídicas associadas a esta patologia e, ainda, por constituir uma modificação do eritrócito senescente. Acresce que a hiperlipidemia favorece a exteriorização desses aminofosfolípidos na membrana de eritrócitos (Lupu *et al.*, 1993) e também de plaquetas (Sánchez-Yague *et al.*, 1987).

Estudos laboratoriais recentes apontam para a importância da viscosidade plasmática e sanguínea nestes eventos. Os estudos genéticos apontam para uma predisposição genética para o desenvolvimento de DCV, que pode, todavia, ser favorecida ou contrariada por hábitos alimentares, hábitos tabágicos e por estilos de vida adequados.

É frequente a afirmação de que a prática de exercício físico regular confere resistência à doença, nomeadamente às DCV (Lindheim *et al.*, 1994). Por outro lado, é também reconhecido que o exercício físico intenso e prolongado predispõe o indivíduo para complicações infecciosas, sobretudo a nível respiratório (Weidner, 1994), e menos frequentemente para crises hemolíticas. É pois evidente a existência de um limiar de *stress* oxidativo e proteolítico, a partir do qual o exercício físico deixa de ser benéfico para tornar-se nocivo. O estudo da proteína banda 3 e da HbLM no *stress* imposto pelo exercício físico poderá permitir no futuro estabelecer o limite benéfico do exercício físico.

Em nota de conclusão afigura-se conveniente a continuação do estudo destes potenciais marcadores clínicos de DCV e de risco fisiológico e a procura de novos marcadores no eritrócito. Pretende-se ainda alargar este estudo à esferocitose, com uma prevalência considerável no Norte de Portugal. É uma patologia hereditária que envolve frequentemente modificações da proteína banda 3 da membrana eritrocitária e associa frequentemente crises hemolíticas graves em estados infecciosos, inflamatórios e na gravidez.

Capítulo VIII

Capítulo VIII

Bibliografía

Bibliografia

- Akerboom T. P. M., Bartosz, G., Sies, H. "Low- and high-K_m transport of dinitrophenyl glutathione in inside out vesicles from human erythrocytes." *Biochim. Biophys. Acta* 00 BXM 75477 : 1 (1992)
- Alessio, H. M. "Exercise-induced oxidative stress." *Med. Sci. Sports Exerc.* 25 : 218 (1993)
- Amsterdam, E. A., Pan, H.-L., Rendig, S., Symons, J. D., Fletcher, M. P., Longhurst, J. C. "Limitation of myocardial infarct size in pigs with a dual lipoygenase-cyclooxygenase blocking agent by inhibition of neutrophil activity without reduction of neutrophil migration." *J. Am. Coll. Cardiol.* 22 : 1738 (1993)
- Anderson, R. A., Lovrien, R. E. "Glycophorin is linked by band 4.1 protein to the human erythrocyte membrane skeleton." *Nature* 307 : 655 (1984)
- Apell, K. C., Low, P. S. "Partial structural characterization of the cytoplasmic domain of the erythrocyte membrane protein, band 3." *J. Biol. Chem.* 256 : 11104 (1981)
- Arese, P. "Favism - a nature model for the study of hemolytic mechanisms." *Rev. Pure Appl. Pharmacol. Sci.* 3 : 123 (1982)
- Aviram, M. "Platelets and the arterial wall lesion." *Curr. Opin. Lipidol.* 3 :344 (1992)
- Bach-Gansmo, E. T. Halvorsen, S., Godal, H. C., Skj0nsberg, O. H. "Impaired coagulation of fibrinogen due to disgestion of the C-terminal end of α -chain by human neutrophil elastase." *Thromb. Res.* 73 : 61 (1994)
- Barber, J. R., Clarke, S. "Membrane protein carboxyl methylation increases with human erythrocyte age. Evidence for an increase in the number of methylatable sites." *J. Biol. Chem.* 258 : 1189 (1983)
- Bast, A., Haenen, G. R. M. M., Doelman, C. J. A. "Oxidants and antioxidants: state of the art." *Am. J. Med.* 91 : 3C-2S (1991)
- Bates, D. A., Winterbourn, C. C. "Haemoglobin denaturation, lipid peroxidation and haemolysis in phenylhydrazine-induced anaemia." *Biochim. Biophys. Acta* 798 : 84 (1984)
- Bennet, V., Stenbuck, P. J. "Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane." *J. Biol. Chem.* 255 : 6424 (1980)
- Benowitz, N. L., Fitzgerald, G. A., Wilson, M., Zhang, Q. "Nicotine effects on eicosanoid formation and hemostatic function: comparison of transdermal nicotine and cigarette smoking." *J. Am. Coll. Cardiol.* 22 : 1159 (1993)
- Bensinger, T. A., Chilar, R. K., Beutler, E. "Prolonged maintenance of 2,3-DPG in liquid blood storage: use of an internal CO₂ trap to stabilize pH." *J. Lab. Clin. Med.* 89 : 498 (1977)

- Beppu, M., Takanashi, M., Murikami, K., Kato, T., Kikugawa, K. "Modification of glycophorin A during oxidation of erythrocyte membrane." *Biochim. Biophys. Acta* 1023 : 413 (1990)
- Beppu, M., Misukami, A., Ando, K., Kikugawa, K. "Antigenic determinants of senescent antigen of human erythrocytes are located in sialylated carbohydrate chains of band 3 glycoprotein." *J. Biol. Chem.* 267 : 14691 (1992)
- Betke, K., Brewer, G. J., Kirkman, H. N., Luzzatto, L., Motulski, A. G., Ramot, B., Siniscalco, M. "Norlisation des techniques d'étude de la glucose-6-phosphate Déshydrogenase. Rapport d'un Groupe Scientifique de l'OMS. *Org. Mond. Santé Sér. Rapp. Techn.* 366 : 4 (1967)
- Beutler, E., West, C. D., Blume, K. G. "The removal of leukocytes and platelets from whole blood." *J. Lab. Clin. Med.* 88 : 328 (1976)
- Beutler, E., Blume, K. G., Kaplan, J. C., Lohr, G. W., Ramot, B., Valentine, W. N. "International Committee for Standardization in Haematology: recommended methods for red cell enzyme analysis." *Br. J. Haematol.* 35 : 331 (1977)
- Beutler, E. "Red Cell Metabolism: a Manual of Biochemical Methods." Ed. Grune & Stratton, New York (1984a)
- Beutler, E. "Sensitivity to drug-induced hemolytic anemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency." Reprinted from *Banbury Report - Genetic variability in responses to chemical exposure*, 16 : 205 (1984b)
- Bistran, B. R., Schwartz, J. Istfan, N. W. "Cytokines, muscle proteolysis, and the catabolic response to infection and inflammation." *Infection and inflammation* 200 : 220 (1992)
- Boivin, P. "Structures, Métabolismes et Physiologie des Globules Rouges Humains." em *Hématologie*, Editions Techniques Encycl. Méd. Chir. (Paris-France), pag. 13-000-R-10 (1994)
- Bonithon-Kopp, C., Levenson, J., Scarabin, P.-Y., Guilanneaf, M.-T., Kirzin, J.-M., Malmejac, A., Guize, L. "Longitudinal associations between plasma viscosity and cardiovascular risk in a middle-aged French population." *Atherosclerosis*, 104 : 173 (1993)
- Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Bastholm, L., Nielsen, M. H., Bainton, D. F. "Human neutrophil granules and secretory vesicles." *Eur. J. Haematol.* 51 : 187 (1993)
- Bosch, F. H., Werre, J. M., Schipper, L., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Huls, T., Willekens, F. L. A., Wichers, G., Halie, M. R. "Determinants of red blood cell deformability in relation to cell age." *Eur. J. Haematol.* 52 : 35 (1994)
- Bradford, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding." *Anal. Biochem.* 72 : 255 (1976)

- Brovelli, A., Seppi, C., Pescarmona, G. P., Zanella, A., Balduini, C. "Membrane properties in some hemolytic anemias." *Biomed. Biochim. Acta* 46 : S77 (1987)
- Brovelli, A., Castellana, M. A., Minetti, G., Piccinini, G., Seppi, C., Balduini, C., Renzis, M. R., Balduini, C. "Conformational changes and oxidation of membrane proteins in senescent human erythrocytes." *Red Blood Cell Aging*. Editores M. Magnani and A. De Flora, Plenum Press, New York, pg 59 (1991)
- Buja, L. M., Willerson, J. T. "Role of inflammation in coronary plaque disruption." *Circulation* 89 : 503 (1994)
- Bull, B. S., Breton-Gorius, J., Beutler, E. "Morphology of erythron." em *Hematology*. Editores Williams W. J., Beutler, E., Erslev, A. J., Lichtman, M. A., McGraw-Hill Publishing Comp. cap. 30, pg. 297 (1991)
- Buttke, T. M., Sandstrom, P. A. "Oxidative stress as a mediator of apoptosis." *Immunol. Today* 15 : 7 (1994)
- Cannon, J. G., Fielding, R. A., Meydani, M., Fiatarone, M. A., Orencole, S. F., Dinarelo, C. A., Evans, W. J. "Increased interleukin 1 β in human skeletal muscle after exercise." *Am. J. Physiol.* 257 : R451 (1989)
- Cannon, J. G., Orencole, S. F., Fielding, R. A., Meydani, M., Meydani, S. M., Fiatarone, M. A., Blumberg, J. B., Evans, W. J. "Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release." *Am. J. Physiol.* 259 : R1214 (1990)
- Casey, J. R., Pirraglia, C. A., Reithmeier, R. A. F. "Enzymatic deglycosylation of human band 3, the anion transport protein of the erythrocyte membrane. Effect on protein structure and transport properties." *J. Biol. Chem.* 267 : 11940 (1992)
- Castellana, M. A., Piccinini, G., Minetti, G., Seppi, C., Balduini, C., Balduini, C. "Oxidation of membrane proteins and functional activity of band 3 in human red cell senescence." *Arch. Gerontol. Geriatr. suppl.* 3, 101 (1992)
- Cerutti, P.A. "Proxidant states and tumor promotion" *Science* 227 : 375 (1985)
- Charo, I. F. "Monocyte-endothelial cell interactions." *Curr. Opinion Lipidol.* 3 :335 (1992)
- Chasis, J. A., Mohandas, N. "Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations." *J. Cell Biol.* 103 : 344 (1986)
- Chasis, J. A., Reid, M. E., Jensen, R. H., Mohandas, N., Martincic, K. "Signal transduction by glycophorin A: role of extracellular and cytoplasmic domains in a modulatable process." *J. Cell Biol.* 107 : 1352 (1988)

- Chen, M-J, Sorette, M. P., Chiu, D. T.-Y., Clark, M. R. "Prehemolytic effects of hydrogen peroxide and t - butylhydroperoxide on selected red cell properties." *Biochim. Biophys. Acta* 1066 : 193 (1991)
- Chillar, R. K., Bensinger, T. A., Beutler, E. "Maintenance of low screen filtration pressure in blood stored in a new liquid medium: BAGPM." *J. Lab. Clin. Med.* 89 : 504 (1977)
- Clark, M. R. "Senescence of red blood cells: progress and problems." *Physiol. Rev.* 68 : 503 (1988)
- Clark, M. R., Sorette, M. P. "Characterization of antibody that binds *in vivo* to normal human red blood cells." *Red Blood Cell Aging*, Editores M. Magnani and A. De Flora, Plenum. Press, New York, (1991)
- Claster, S., Chiu, D. T-Y, Quintanilha, A., Lubin, B. "Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells." *Blood* 64 : 1079 (1984)
- Claster, S., Chiu, D. T-Y, Quintanilha, A., Lubin, B. " *Blood* 68 : 30a (1986)
- Claster, S., Quintanilha, A., Schott, M. A., Chiu, D., Lubin, B. "Neutrophil-induced K⁺ leak in human red cells: a potential mechanism for infection-mediated hemolysis." *J. Lab. Clin. Med.* 109 : 201 (1987)
- Claster, S., Quintanilha, A. "Neutrophil-induced erythrocyte injury." *Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology and Medicine*, Editor Alexandre Quintanilha, Plenum Press, New York, pag. 255 (1988)
- Claster, S., Quintanilha, A., Lumen, B., Chiu, D., Lubin, B. "Activated neutrophil-induced membrane damage in vitamin E-deficient erythrocytes." *Ann. New York Acad. Sciences* 570 : 428 (1989)
- Claster, S., White, E., Woolworth, V., Quintanilha, A. "Degradation of erythrocyte glycophorin results in increased membrane bound hemoglobin." *Arch. Biochem. Biophys.* 285 :147 (1991)
- Clozel, M., Kuhn, H., Hefti, F., Baumgartner, H. R. "Endothelial dysfunction and subendothelial monocytes macrophages in hypertension. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition." *Hypertension* 18 : 132 (1991)
- Cochrane, C. G. "Cellular injury by oxidants." *Am. J. Med.* 91 : 3C-23S (1991)
- Coetzer, T., Zail, S. "Membrane protein complexes in GSH-depleted red cells." *Blood* 56 : 159 (1980)
- Connor, J., Pak, C. C., Schroit, A. J. "Transbilayer movement of phosphatidylserine in erythrocytes: inhibition of transport and preferential labeling of a 31 000-Dalton protein by sulfhydryl reactive reagents." *Biochem.* 27 : 848 (1988)
- Connor, J., Schroit, A. J. "Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells." *J. Biol Chem.* 269 : 2399 (1994)

Contreras, M. Hewitt, P. "Clinical blood transfusion." em Post Graduate Haematology cap. 10, pg. 269, Editores Hoffbrand, A. V., Lewis, S. M., Heinemann Medical Books (1990a)

Contreras, M. Lubenko, A. "Antigens in human blood." em Post Graduate Haematology cap. 10, pg. 230, Editores Hoffbrand, A. V., Lewis, S. M., Heinemann Medical Books (1990b)

Corbett, J. D., Golan, D. E. "Band 3 and glycoporphin are progressively aggregated in density-fractioned sickle and normal red blood cells. Evidence from rotational and lateral mobility studies." J. Clin. Invest. 91 : 208 (1993)

Corry, W. D., Meiselman, H. J., Hochstein, P. "t-Butyl hydroperoxide-induced changes in the physicochemical properties of human erythrocytes." Biochim. Biophys. Acta 597 : 224 (1980)

Czerwinski, M., Wasniowska, K., Steuden, I., Duk, M., Wiedlocha, A., Lisowska, E. "Degradation of the human erythrocyte membrane band 3 studied with the monoclonal antibody directed against an epitope on the cytoplasmic fragment of band 3" Eur. J. Biochem. 174 : 647 (1988)

Dacie, J. V., Lewis, S. M. "Preparation and staining methods for blood and bone-marrow films." em Practical Haematology. Editores Dacie, J. V., Lewis, S. M., Churchill Livingstone, cap. 7, pg 75 (1991a)

Dacie, J. V., Lewis, S. M. "Basic haematological techniques." em Practical Haematology. Editores Dacie, J. V., Lewis, S. M., Churchill Livingstone, cap. 5, pg 37 (1991b)

Dacie, J. V., Lewis, S. M. "Appendices. Buffers" em Practical Haematology. Editores Dacie, J. V., Lewis, S. M., Churchill Livingstone, cap. 32, pg 538 (1991c)

Davidson, W. D., Tanaka, K. R. "Factors affecting pentose phosphate pathway activity in human red cells." Brit. J. Haematol. 23 : 371 (1972)

Davies, K. J. A. "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects." J. Biol. Chem. 262 : 9895 (1987a)

Davies, K. J. A., Goldberg, A. L. "Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes." J. Biol. Chem. 262 : 8220 (1987b)

Davies, K. J. A., Goldberg, A. L. "Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells." J. Biol. Chem. 262 : 8227 (1987c)

DeFlora, A., Benatti, U., Guida, L., Forteleoni, G., Meloni, T. "Favism: disordered erythrocyte calcium homeostasis." Blood 66 : 294 (1985)

DeForge, L. E., Preston, A.M., Takeuchi, E., Kenney, J., Boxer, L.A., Remick, D. G. "Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress." J. Biol. Chem. 268 : 25568 (1993)

- Delaunay, J. "Hereditary hemolytic anemias due to defects in membrane proteins." *Current Opin. Hematol.* : 59 (1993)
- Dhermy, D., Simeon, J., Wautier, M-P, Boivin, P., Wautier, J-L "Role of membrane sialic acid content in the adhesiveness of aged erythrocytes to human cultured endothelial cells." *Biochim. Biophys. Acta* 904 : 201 (1987)
- Dodge, J. T., Mitchell, C., Hanahan, D. J. "The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes." *Arch. Biochem. Biophys.* 100 : 119 (1963)
- Downey, J. M. "Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion." *Annu. Rev. Physiol.* 52 : 487 (1990)
- Duarte, J. A., Carvalho, F., Bastos, M. L., Soares, J. M. C., Appell, H.-J. "Do invading leukocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative *stress* in exercised muscle, or are they important for its recovery?" *Eur. J. Appl. Physiol.* 68 : 48 (1994)
- Dubbelman, T. M. A. R., Bruijne, A. W., van Steveninck, J. "Photodynamic effects of protoporphyrin on red blood cell deformability." *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 77 : 811 (1977)
- Duchois, P., Kandoussi, A., Fievet, P., Fourrier, J. L., Bertrnad, M., Koren, E., Fruchart, J. C. "Apolipoprotein A-I containing lipoproteins in coronary artery disease." *Atherosclerosis* 68 : 35 (1987)
- Duijn, G. V., Verkleij, A. J., Kruijff, B. "Influence of phospholipid peroxidation on the phase behavior of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in aqueous dispersions." *Biochem.* 23 : 4969 (1984)
- Dzandu, J. K., Deh, M. E., Wise, G. E. "A re-examination of the effects of chymotrypsin and trypsin on the erythrocyte membrane surface topology." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126 : 50 (1985)
- Edwards, S. W. "The generation and recognition of neutrophil-activating factors: structure and function of neutrophil receptors." em *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*. Editor Edwards, S. W. Cambridge University Press, cap. 3, pg 77 (1994a)
- Edwards, S. W. "The development and structure of mature neutrophils." em *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*. Editor Edwards, S. W. Cambridge University Press, cap. 2, pg 33 (1994b)
- Ehlenberger, A. G., Nussenzweig, V. "The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis." *J. Exp. Med.* 145 : 357 (1977)
- Elbach, P., Weiss, J. "A reevaluation of the roles of the O₂-dependent and O₂-independent microbicidal systems of phagocytes." *Rev. Infect. Diseases* 5 : 843 (1983)
- Elgsaeter, A., Mikkelsen, A. "Shapes and shape changes *in vitro* in normal red blood cells." *Biochim. Biophys. Acta.* 1071 : 273 (1991)

- Ernst, E., Hammerschmidt, D. E., Bagge, U. "Leukocytes and the risk of ischemic diseases." *JAMA* 257 : 2318 (1987)
- Erslev, A. J. "March hemoglobinuria and sports anemia." em *Hematology*, Edirores Williams, W. J., Beutler, E, Erslev, A. J., Lichtman, M. A., McGraw-Hill Pub. Comp., cap. 62, pg 653 (1991)
- Esaguy, N., Águas, A. P., Vilanova, M., Silva, M. T. "Activation of human neutrophils by phorbol ester decreases the cytoplasm compactness and the lactoferrin content of the granulocytes." *J. Leukocyte Biol.* (1991)
- Fagan, J. M., Waxman, L., Goldberg, A. L. "Red blood cells contain a pathway for the degraation of oxidant-damaged hemoglobin that does not require ATP or ubiquitin." *J. Biol. Chem.* 261 : 5705 (1986)
- Fairbarn, M. S., Blackie, S. P., Pardy, R. L., Hogg, J. C. "Comparison of effects of exercise and hyperventilation on leukocyte kinetics in humans" *J. Appl. Physiol.* 75 : 2425 (1993)
- Ferro, T. J., Hocking, D. C., Johnson, A. "Tumour necrosis factor-x alters pulmonary vasoreactivity via neutrophil-derived oxidants." *Lung Cell. Mol. Physiol.* 9 : L462 (1993)
- Ferry, A., Rieu, M. "Adaptation des systèmes physiologiques à l'activité physique." *Med./Sci.* 10 : 863 (1994)
- Ferroni, L., Giuliani, A., Marini, S., Caprari, P., Salvati, A. M., Condo, S. C., Ramacci, M. T., Giardina, B. "A new monoclonal antibody to an age sensitive band 3 transmembrane segment" *Red Blood Cell Aging*. Editores M. Magnani and A. De Flora, Plenum Press, New York, pg351 (1991)
- Field, C. J., Gougeon, R., Marliss, E. B. "Circulating mononuclear cell numbers and function during intense exercise and recovery." *J. Appl. Physiol.* 71 : 1089 (1991)
- Flaherty, J. T. "Myocardial injury mediated by oxygen free radicals." *Am. J. Med.* 91 : 3C-79S (1991)
- Flynn, T. P., Allen, D. W., Johnson, J. G., White, J. G. "Oxidant damage of the lipids and proteins of the erythrocyte membranes in unstable hemoglobin disease. Evidence for the role of peroxidation." *J. Clin. Invest.* 71 : 1215 (1983)
- Fossel, E. T., Zanella, C. L., Fletcher, J. G., Hui, K. K. S. "Cell death induced by peroxidized low-density lipoprotein: endopepsis." *Cancer Res.* 54 : 1240 (1994)
- Frei, B., England, L., Ames, B. N. "Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 : 6377 (1989)
- Fridovich, I. "Superoxide radical: an endogenous toxicant." *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23 : 239 (1983)
- Friedman, M. H., Fry, D. L. "Arterial permeability dynamics and vascular disease." *Atherosclerosis* 104 : 189 (1993)

- Fries, L. F., Siwik, S. A., Malbran, A., Frank, M. M. "Phagocytosis of target particles bearing C3b-IgG covalent complexes by human monocytes and polymorphonuclear leukocytes." *Immunol.* 62 : 45 (1987)
- Gabriel, H., Schwarz, L., Steffens, G., Kindermann, W. "Immunoregulatory hormones, circulating leukocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities." *Int. J. Sports Med.* 113 : 359 (1992)
- Gaczynska, M., Bartosz, G., Judkiewicz, L., Rosin, J. "Abnormal degradation of erythrocyte membrane proteins in hereditary spherocytosis." *Clin. Chim. Acta* 168 : 7 (1987)
- Gaczynska, M. "Changes in the proteolytic activity of human erythrocyte membrane during red cell aging." *Biochim. Biophys. Acta* 981 : 173 (1989)
- Gaczynska, M., Bartosz, G., Judkiewicz, L. "Changes in proteolytic susceptibility of erythrocyte membrane proteins in hereditary spherocytosis." *Clin. Chim. Acta* 198 : 267 (1991)
- Gaetani, G. D., Parker, J. C., Kirkman, H. N. "Intracellular restraint: a new basis for the limitation in response to oxidative stress in human erythrocytes containing low-activity variants of G6PD." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71 : 3584 (1974)
- Galili, U., Clark, M. R., Shohet, S. B. "Excessive binding of natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G to sickle erythrocytes may contribute to extravascular cell destruction." *J. Clin. Invest.* 77 : 27 (1986)
- Garcia, J. H., Liu, K. F., Yoshida, Y., Lian, J., Chen, S., del Zoppo, G. J. "Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (wistar rat)." *Am. J. Pathol.* 144 : 188 (1994)
- Ginis, I., Tauber, A. I. "Activation mechanisms of adherent human neutrophils." *Blood* 76 : 1233 (1990)
- Giral, P. "Atherosclerosis in multiple vascular beds." *Curr. Opinion Lipidol.* 3 : 268 (1992)
- Giuliani, A., Marini, S., Ferroni, L., Condo, S. G., Ramacci, M. T., Giardina, B. "Anion exchange protein (band 3) in human erythrocytes characterized by different abnormalities." *Clin. Chim. Acta* 220 : 211 (1993)
- Golovtchenko-Matsumoto, A. M., Matsumoto, I., Osawa, T. "Degradation of band-3 glycoprotein *in vitro* by a protease isolated from human erythrocyte membranes." *Eur. J. Biochem.* 121 : 463 (1982)
- Goodman, J. R., Gamble, D., Kay, M. M. B. "Distribution and function of multiple anion transporter proteins in brain tumor cell lines in relation to glucose transport." *Brain Res. Bull.* 33 : 411 (1994)
- Green, G. A., Rehn, M. M., Kalra, V. K. "Cell-bound autologous immunoglobulin in erythrocyte subpopulations from patients with sickle cell disease." *Blood* 65 : 1127 (1985)

- Grimm, R. H., Jr, Neaton, J. D., Ludwig, W. "Prognostic importance of the white blood cell count for coronary, cancer, and all-cause mortality." JAMA 254 : 1932 (1985)
- Hall, T. G., Bennett, V. "Regulatory domains of erythrocyte ankyrin." J. Biol. Chem. 262 : 10537 (1987)
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." Biochem. J. 219 : 1 (1984)
- Halliwell, B. "Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease." Am J. Med. 91 : 3C-14S (1991)
- Hargreaves, W. R., Giedd, K. N., Verkleij, A., Branton, D. "Reassociation of ankyrin with band 3 in erythrocyte membranes and in lipid vesicles." J. Biol. Chem. 255 : 11965 (1980)
- Harlan, J. M. "Leukocyte - endothelial interactions." Blood 65 : 513 (1985)
- Harlow, E., Lane, D. ed. Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press N.Y. (1988)
- Harris, S. J., Winzor, D. J. "Interactions of glycolytic enzymes with erythrocyte membranes." Biochim. Biophys. Acta 1038 : 306 (1990)
- Harris, N. R., Benoit, J. N., Granger, D. N. "Capillary filtration during acute inflammation: role of adherent neutrophils." Am.J. Physiol. 265 : H1623 (1993)
- Hebbel, R. P., Miller, W. J. "Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunological and oxidative determinants of hemolytic anemia." Blood 64 : 733 (1984)
- Heinrich, J., Balleisen, L., Schulte, H., Assmann, G., van de Loo, J. "Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from PROCAM study in healthy men." Arterioscler. Thromb. 14 : 54 (1994)
- Henson, P. M., Johnston, Jr. R. B. "Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins." J. Clin. Invest. 79 : 669 (1987)
- Herrmann, A., Devaux, P. F. "Alteration of aminophospholipid translocase activity during *in vivo* and artificial aging of human erythrocytes." Biochim. Biophys. Acta 1027 : 41 (1990)
- Hogman, C. F., Akerblom, O., Hedlund, K., Rosén, I., Wiklund, L. "Red cell suspensions in SAGM medium. Further experience of *in vivo* survival of red cells, clinical usefulness and plasma-saving effects." Vox Sang. 45 : 217 (1983)
- Hutton, R. A. "Normal haemostasis." in Postgraduate Haematology. Editores Hoffbrand, A. V., Lewis, S. M. Heinemann Med. Books, cap.21, pg 560 (1990)

- Imanishi, H., Nakai, T., Abe, T., Takino, T. "Gluthathione metabolism in red cell aging." *Mech. Ageing Developp*, 32 :57 (1985)
- Jain, S. K., Hochstein, P. "Polymerization of membrane components in aging red blood cells." *Biochem. Biophys. Research Comm.* 92 : 247 (1980)
- Jain, S. K. "Evidence for membrane lipid peroxidation during the *in vivo* aging of human erythrocytes." *Biochim. Biophys. Acta* 937 : 205 (1988)
- Jandl, J. H. "Physiology of red cells." em *Blood*. Editor Jandl, J. H., Little, Brown and Company, cap. 2, pg 49 (1987)
- Jarolim, P., Palek, J., Rubin, H. L., Prchal, J. T., Korsgren, C., Cohen, C. M. "Band 3 Tuscaloosa: Pro327- Arg327 substitution in the cytoplasmatic domain of erythrocyte band 3 protein associated with spherocytic hemolytic anemia and partial deficiency of protein 4.2." *Blood*, 80 : 523 (1992)
- Jenkins, R. R., Goldfarb, A. "Introduction: oxidant *stress*, aging, and exercise." *Med. Sci. Sports Exerc.* 25 : 210 (1993)
- Jennings, M. L., Anderson, M. P., Monaghan, R. "Monoclonal antibodies against human erythrocyte band 3 protein. Localization of proteolytic cleavage sites and stilbenedisulfonate-binding lysine residues." *J. Biol. Chem.* 261 : 9002 (1986)
- Johnson, R. M., Ravindranath, Y., El-Alfy, M., Goyette Jr, G. "Oxidant damage to erythrocyte membrane in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: correlation with *in vivo* reduced glutathione concentration and membrane protein oxidation." *Blood* 83 : 1117 (1994)
- Julian, D. G. "Secondary prevention of myocardial infarction." *Atherosclerosis - Developments, Complications and Treatment*, Editores J. Shepherd et al., pag. 133. Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division) (1987)
- Kannan, R., Labotka, R., Low, P.S. "Isolation and characterization of the hemicrome-stabilized membrane protein aggregates from sickle erythrocytes." *J. Biol. Chem.* 263 : 13766 (1988)
- Kannan, R., Yuan, J., Low, P.S. "Isolation and partial characterization of antibody and globin-enriched complexes from membranes of dense human erythrocytes." *Biochem. J.* 278 : 57 (1991)
- Kawachi, I., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., Manson, J. E., Rosner, B., Speizer, F. E., Hennekens, C. H. "Smoking cessation and time course of decreased risks of coronary heart disease in middle-aged women." *Arch. Intern. Med.* 154 : 169 (1994)
- Kay, M. M. B. "Mechanisms of removal of senescent cells by human macrophages *in situ*." *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72 : 3521 (1975)

- Kay, M. M. B. "Isolation of the phagocytosis-inducing IgG-binding antigen on senescent somatic cells." *Nature* 289 : 491 (1981)
- Kay, M. M. B., Goodman, S. R., Sorensen, K., Whitfield, C. F., Wong, P., Zaki, L., Rudloff, V." Senescent cell antigen is immunologically related to band 3." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 1631 (1983)
- Kay, M. M. B. "Localization of senescent cell antigen on band 3." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 5753 (1984)
- Kay, M. M. B., Flowers, N., Goodman, S. R., Bosman, G. "Alteration in membrane protein band 3 associated with accelerated erythrocyte aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 5834 (1989)
- Kay, M. M. B. Marchalonis, J. J., Hughes, J., Watanabe, K., Schluter, S. F. "Definition of a physiologic aging autoantigen by using synthetic peptides of membrane protein band 3: localization of the active antigenic sites." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 : 5734 (1990)
- Kay, M. M. B. "Band 3 in aging and neurological disease." *Ann. New York Acad. Sci.* 621 : 179 (1991a)
- Kay, M. M. B., Hughes, J., Zagon, I., Lin, F. "Brain membrane protein band 3 performs the same functions as erythrocyte band 3." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 2778 (1991b)
- Kay, M. M. B. Marchalonis, J. J., Schluter, S. F., Bosman, G. "Human erythrocyte aging: cellular and molecular biology." *Transf. Med. Rev.* 3 : 173 (1991c)
- Khansari, N., Fudenberg, H. H. "Phagocytosis of senescent erythrocytes by autologous monocytes: requirement of membrane-specific autologous IgG for immune elimination of aging red blood cells." *Cell. Immunol.* 78 : 114 (1983)
- Klebanoff, S. J., Vadas, M. A., Harlan, J. M., Sparks, L. H., Gamble, J. R., Agosti, J. M., Waltersdorff, A.M. "Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor." *J. Immunol.* 136 : 4220 (1986)
- Klebanoff, S. J. "Phagocytic cells: products of oxygen metabolism." *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Cap. 23, Editores Gallin, Goldstein and Snyderman, Raven press Ltd. New York (1988)
- Kondo, T., Muraio, M., Taniguchi, N."Glutathione S-conjugate transport using inside-out vesicles from human erythrocytes." *J. Biochem.* 125 : 551 (1982)
- Kosower, N. S. "Altered properties of erythrocytes in the aged." *Am. J. Hematol.* 42 : 241 (1993)
- Krinsky, N. "Mechanism of action of biological antioxidants." *P.S.E.B.M.* 200 : 248 (1992)
- LaBelle, E. F., Singh, S. V., Srivastava, S. K., Awasthi, Y. C. "Dinitrophenyl glutathione efflux from human erythrocytes is primary active ATP-dependent transport." *Biochem. J.* 238 : 443 (1986)

- Laemmli, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227 : 680 (1970)
- Lam, J. Y. T., Latour, J.-G., Lésperance, J., Waters, D. "Platelet aggregation, coronary artery disease progression and future coronary events." *Am. J. Cardiol.* 73 : 333 (1994)
- Law, M. R., Wald, N. J., Thompson, S. G. "By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease?" *Br. Med. J.* 308 : 367 (1994)
- Lehr, H. A., Seemuller, J., Hubner, C., Menger, M. D., Messmer, K. "Oxidized LDL-induced leukocyte/endothelium interaction *in vivo* involves the receptor for platelet-activating factor." *Arterioscler. and Thromb.* 13 : 1013 (1993)
- Lehrer, R. I., Ganz, T. "Antimicrobial Polypeptides of human neutrophils (rev)." *J. Am. Soc. Hematol.* 76 : 2169 (1990)
- Lelkes, G., Lelkes, G., Merse, K. S., Hollan, S. R. "Intense, reversible aggregation of intramembrane particles in non-haemolysed human erythrocyte. A freeze fracture study." *Biochim. Biophys. Acta* 732 : 48 (1983)
- Lew, H., Pyke, S., Quintanilha, A. T. "Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats." *FEBS letters* 185 : 262 (1985)
- Libby, P., Clinton, S. K. "The role of macrophages in atherogenesis." *Curr. Opin Lipidol.* 4 : 355 (1993)
- Lijnen, P., Fagard, R., Staessen, J., Thijs, L., Amery, A. "Erythrocyte membrane lipids and cationic transport systems in men." *J. Hypertension.* 10 : 1205 (1992)
- Lindenthal, S., Schubert, D. "Monomeric erythrocyte band 3 protein transports anions." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 6540 (1991)
- Lindheim, S. R., Notelovitz, M., Feldman, E. B., Larsen, S., Khan, F. Y., Lobo, R. A. "The independent effects of exercise and estrogen on lipids and lipoproteins in postmenopausal women." *Obstet. Gynecol.* 83 : 167 (1994)
- Liu, S-C, Derick, L. H., Zhai, S., Palek, J. "Uncoupling of the spectrin-based skeleton from the lipid bilayer in sickled red cells." *Science* 252 : 574 (1991)
- Lorand, L., Weissman, L. B., Epel, D. L., Bruner-Lorand, J. "Role of the intrinsic transglutaminase in the Ca^{2+} -mediated crosslinking of erythrocyte proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73 : 4479 (1976)
- Loscalzo, J., Sniderman, A. "Cardiovascular disease and hyperlipidaemia." *Curr. Opin Lipidol.* 4 : 273 (1993)

- Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M., Belcastro, A. N. "Are indices of free radical damage related to exercise intensity?" *Eur. J. Appl. Physiol.* 56 : 313 (1987)
- Low, P. S., Westfall, M. A., Allen, D. P., Appell, K. C. "Characterization of the reversible conformational equilibrium of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3." *J. Biol. Chem.* 259 : 13070 (1984)
- Low, P. S., Waugh, S. M., Zinke, K., Drenckhahn, D. "The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging." *Science* 227 : 531 (1985)
- Low, P. S. "Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions." *Biochim. Biophys. Acta* 864 : 145 (1986)
- Low, P. S. "Role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in initiating red cell removal." *Red Blood Cell Aging*. Editores M. Magnani e A. De Flora, Plenum Press, New York, pag 173 (1991)
- Lowe, G. D. O. "Blood viscosity and cardiovascular risk." *Curr. Opinion in Lipidol.* 4 : 283 (1993)
- Lupu, F., Moldovan, N., Ryan, J., Stern, D., Simionescu, N. "Intrinsic procoagulant surface induced by hypercholesterolemia on rabbit aortic endothelium." *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 4 : 743 (1993)
- Lutz, H. U., Bussolino, F., Flepp, R., Fasler, S., Stammler, P., Kasatchkine, M. D., Arese, P. "Naturally occurring anti-band-3-antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 : 7368 (1987)
- Lutz, H. U. "Erythrocyte clearance." *Blood Cell Biochemistry*, vol. 1, Erythroid Cells, cap. 4, editores J. R. Harris, Plenum Press, New York and London, pag 81 (1990)
- Lutz, H. U., Stammler, P., Kock, D., Taylor R. P. "Opsonic potencial of C3b-anti-band 3 complexes when generated on senescent and oxidatively stressed red cells or in fluid phase." *Red Blood Cell Aging*. Editores M. Magnani e A. De Flora, Plenum Press, New York, pg 367 (1991)
- Lutz, H. U. "Naturally occurring anti-band 3 antibodies: their dual specificity in providing potency." *Progress in Cell Research*, vol. 2, Cap. 23, Editores E. Bamberg e H. Passow, Elsevier Science Publishers B. V., pag 239 (1992a)
- Lutz, H. U. "Naturally occurring anti-band 3 antibodies." *Transf. Med, Rev.* 6 : 201 (1992b)
- Luzzatto, L. "Inherited haemolytic states: G6PD deficiency." *Clin. Haematol.* 4 : 83 (1975)
- Luzzatto, L., Battistuzzi, G. "Glucose-6-phosphate dehydrogenase." *Adv. Hum. Genet.* 14 : 217 (1985)
- Lynch, R. E., Fridovich, I. "Effects of superoxide on the erythrocyte membrane." *J. Biol. Chem.* 253 : 1838 (1978)

- Mackie, L. H., Frank, R. S., Hochmuth, R. M. "Erythrocyte density separation on discontinuous "Percoll" gradients." *Biorheol.* 24 : 227 (1987)
- MacKinnon, L. T. "Exercise and immunology." Editor MacKinnon, L. T., Human Kinetics Books (1992)
- Magnusson, M. K., Sigfusson, N., Sigvaldason, H., Johannesson, G. M., Magnusson, S., Thorgeirsson, G. "Low iron-binding capacity as a risk factor for myocardial infarction." *Circulation* 89 : 102 (1994)
- Manson, H. M., Hess, M. L. "Neutrophil infiltration of the myocardium: a potential mechanism for free radical necrosis." em *Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology and Medicine*, Editor Quintanilha A., Plenum Press, New York, pag. 255 (1988)
- Mascher, E., Lundahl, P. "High performance agarose gel chromatography in sodium dodecyl sulfate of integral membrane proteins from human red cells, with special reference to the glucose transporter." *Biochim. Biophys. Acta* 856 : 505 (1986)
- McCarthy, D. A., Macdonald, I., Grant, M., Marbut, M., Watling, M., Nicholson, S., Deeks, J. J., Wade, A. J., Perry, J. D. "Studies on the immediate and delayed leucocytosis elicited by brief (30-min) strenuous exercise." *Eur. J. Appl. Physiol.* 64 : 513 (1992)
- McPherson, R. A., Sawyer, W. H., Tilley, L. "Rotational diffusion of the erythrocyte integral membrane protein band 3: effect of hemichrome binding." *Biochem.* 31 : 512 (1992)
- Meister, A. "On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione" *Biochem. Pharmacol.* 44 : 1905 (1992)
- Menotti, A., Scanga, M., Morisi, G. "Serum triglycerides in the prediction of coronary artery disease (an italian experience)." *Am. J. Cardiol.* 73 : 29 (1994)
- Merhi, Y., Lam, J. Y. T., Lacoste, L. L., Latour, J-G, Guidoin, R., Waters, D. "Effects of thrombocytopenia and shear rate on neutrophil and platelet deposition on endothelial and medial arterial surfaces." *Arteriosc. Thromb.* 13 : 951 (1993)
- Morellini, M., Collona-Romano, S., Meloni, T., Battistuzzi, G., Gandini, E. "Glucose-6-phosphate dehydrogenase of leukocyte subpopulations in normal and enzyme deficient individuals." *Haematologica* 70 : 390 (1985)
- Morrison, M., Grant, W., Smith, H. T., Mueller, T. J., Hsu, L. "Catabolism of the anion transport protein in human erythrocytes." *Biochem.* 24 : 6311 (1985)
- Mueller, T. J., Morrison, M. "Detection of a variant of protein 3, the major transmembrane protein of the human erythrocyte." *J. Biol. Chem.* 252 : 6573 (1977)
- Mugge, A., Lopez, A. G. "Do leukocytes have a role in hypertension?" *Hypertension* 17 : 331 (1991)

- Muller, H., Lutz, H. U. "Binding of autologous IgG to human red blood cells before and after ATP-depletion. Selective exposure of binding sites (autoantigens) on spectrine-free vesicles." *Biochim. Biophys. Acta* 729 : 249 (1983)
- Nagy, I. Z. "Functional consequences of free radical damage to cell membranes." em *Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology and Medicine*, Editor Quintanilha A., Plenum Press, New York, pag. 199 (1988)
- Nash, G. B., Gratzner, W. B. "Structural determinants of the rigidity of the red cell membrane." *Biorheol.* 30 : 397 (1993)
- Nehlsen-Cannarella, S. L., Nieman, D. C., Jessen, J., Chang, L., Gusewitch, G., Blix, G. G., Ashley, E. "The effects of acute moderate exercise on lymphocyte function and serum immunoglobulin levels." *Int. J. Sports Med.* 12 : 391 (1991)
- Nieman, D. C., Nehlsen-Cannarella, S. L. "The effects of acute and chronic exercise in immunoglobulins." *Sports Med.* 11 : 183 (1991a)
- Nieman, D. C., Nehlsen-Cannarella, S. L., Donohue, K. M., Chritton, D. B. W., Haddock, B. L., Stout, R. W., Lee, J. W. "The effects of acute moderate exercise on leukocyte and lymphocyte subpopulations." *Med. Sci. Sports Exerc.* 23 : 578 (1991b)
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Johnson, R., Lebeck, L., Davis, J. M., Nehlsen-Cannarella, S. L. "Effects of brief, heavy exertion on circulating lymphocyte subpopulations and proliferative response." *Med. Sci. Sports Exerc.* 24 : 1339 (1992)
- Nieman, D. C., Miller, A. R., Henson, D. A., Warren, B. J., Gusewitch, G., Johnson, R. L., Davis, J. M., Butterworth, D. E., Nehlsen-Cannarella, S. L. "Effects of high- vs moderate-intensity exercise on natural killer cell activity." *Med. Sci. Sports Exerc.* 25 : 1126 (1993)
- Olson, J. A., Kobayashi, S. "Antioxidants in health and disease: overview." *P.S.E.M.B.* 200 : 245 (1992)
- Ouwerkerk, R., Damen, P., Haan, K., Staal, G. E. J., Rijksen, G. "Hexose monophosphate shunt activity in erythrocytes related to cell age." *Eur. J. Hematol.* 43 : 441 (1989)
- Palek, J., Jarolim, P. "Molecular defects in hereditary spherocytosis." em *Red Cells and their Disorders*, Editor Palek, J. *Current Science*, pg 99 (1993)
- Parks, D. A., Granger, D. N. "Xantine oxidase: biochemistry, distribution and physiology." *Acta Physiol. Scand.* 548 : 87 (1986)
- Pfafferott, C., Meiselman, H. J., Hocshtein, P. "The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability." *Blood* 59 : 12 (1982)
- Phan, S. H., Gannon, D. E., Varani, J., Ryan, U. S., Ward, P. A. "Xanthine oxidase activity in rat pulmonary artery endothelial cells and its alteration by activated neutrophil." *Am. J. Pathol.* 134 : 1201 (1989)

- Pinder, J. C., Pekrun, A., Maggs, A. M., Gratzner, W. B. "Interaction of the red cell membrane skeleton with the membrane." *Biochem. Soc. Transactions* 20 : 773 (1992)
- Pinder, J. C., Chung, A., Reid, M. E., Gratzner, W. B. "Membrane attachment sites for the membrane cytoskeletal protein 4.1 of the red blood cell." *Blood* 82 : 3482 (1993)
- Powers, S. K., Criswell, D., Lawler, J., Martin, D., Lieu, F.-K., Ji, L. L., Herb, R. A. "Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium." *Am. J. Physiol.* 265 : H2094 (1993)
- Prentice, C. R. M. "Antithrombotic therapy in the secondary prevention of myocardial infarction." *Am. J. Cardiol.* 72 : 175G (1993)
- Pryor, W. A., Godber, S. S. "Noninvasive measures of oxidative *stress* status in humans." *Free Rad. Biol. & Med.* 10 : 177 (1991)
- Pyke, S., Lew, H., Quintanilha, A. T. "Severe depletion in liver glutathione during physical exercise." *BBRC* 139 : 926 (1986)
- Quintanilha, A. "Oxidative effects of physical exercise." em *Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology and Medicine*, Editor Quintanilha A., Plenum Press, New York, pag. 187 (1988)
- Reimer, K. A., Tanaka, M., Murry, C. E., Richard, V. J., Jennings, R. B. "Evaluation of free radical injury in myocardium." *Toxicol. Pathol.* 18 : 470 (1990)
- Reinhart, W. H., Wyss, E., Arnold, D., Ott, P. "Hereditary spherocytosis associated with protein band 3 defect in a swiss kindred." *Br. J. Haematol.* 86 : 147 (1994)
- Rennie, C. M., Thompson, S., Parker, A. C., Maddy, A. "Human erythrocyte fractionation in Percoll density gradients." *Clin. Chim. Acta* 98 : 119 (1979)
- Repine, J. E. "Oxidant-antioxidant balance: some observations from studies of ischemia-reperfusion in isolated perfused rat hearts." *Am J. Med.* 91 : 3C (1991)
- Retelewska, W., Gaczynska, M., Bartosz, G., Judkiewicz, L. "Consequences of the presence of elongated variant of the major transmembrane protein (band 3 protein) in the human erythrocyte." *Clin. Chim. Acta* 198 : 255 (1991)
- Rifkind, B. M., Brook, J. G., Lenfant, C. "Coronary disease - primary prevention." *Atherosclerosis - Developments, Complications and Treatment*, Editor J. Shepherd et al. pag. 119. Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division) (1987)
- Rinaldi, G., Bohr, D. "Plasma membrane and its abnormalities in hypertension." *Am. J. Med. Sci.* 295 : 389 (1988)

- Rodriguez, A. B., Barriga, C., De la Fuente, M. "Phagocytic function of blood neutrophils in sedentary young people after physical exercise." *Int. J. Sports Med.* 12 : 276 (1991)
- Rohn, T. T., Hinds, T. R., Vincenzi, F. F. "Inhibition of the Ca pump of intact red blood cells by t-butyl hydroperoxide: importance of glutathione peroxidase." *Biochim. Biophys. Acta* 1153 : 67 (1993)
- Ronquist, G., Frithz, G., Gunnarsson, K., Arvidson, G. "Decreased erythrocyte cholesterol/phospholipid ratio in untreated patients with essential hypertension." *J. Internal. Med.* 232 : 247 (1992)
- Rosemeyer, M. A. "The biochemistry of G6PD, 6PGD and glutathione reductase." *Cell Biochem. Function* 5 79 (1987)
- Ross, R. "The pathogenesis of atherosclerosis - an update." *New Eng. J. Med.* 314 : 488 (1986)
- Saeed, T., Hamamy, H. A., Alwan, A. A. S. "Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency with diabetes mellitus." *Diabet. Med.* 2 : 110 (1985)
- Sakamoto, W., Fujie, K., Mino, M., Murota, S.-I. "Vitamin E and macrophage in Vitamin E - its usefulness in health and in curing diseases" Editores Mino et al., pag. 209 (1993)
- Salvo, G., Caprari, P., Samoggia, P., Mariani, G., Salvati, A. M. "Human erythrocyte separation according to age on a discontinuous "percoll" density gradient." *Clin. Chim. Acta* 122 : 293 (1982)
- Samdook, J., Sritsch, E., S., Maniatis, T. em *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Coldspring Arbor Laboratory Press U.S.A. (1989)
- Samuelsson, B. "Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation." *Science* 220 : 568 (1983)
- Sánchez-Yague, J., Cabezas, J. A., Llanillo, M. "Rearrangement of aminophospholipids in bilayers from sheep platelet plasma membranes and platelet liposomes by increasing their cholesterol levels." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 145 : 1362 (1987)
- Sang, K-H Q., del Pino, M., Levenson, J., Simon, A., Devynck, M.-A. "Wall shear *stress* and erythrocyte membrane microviscosity in hypertensive patients." *J. Hypertens.* 11 : S260 (1993a)
- Sang, K-H.Q, Levenson, J., Del Pino, M., Simon, A., Devynck, M. A. "*In vivo* shear flow and erythrocyte membrane fluidity in hypertensive patients." *Br. J. Clin. Pharmac.* 36 : 437 (1993b)
- Santos, M. T., Valles, J., Aznar, J. "Plasma lipid peroxides in patients with vascular disease and in middle-aged normal subjects with a high risk of atherosclerosis.
Livro Prof. Quintanilha vol I, 255.
- Santos-Silva, A., Guerra, F. C., Ribeiro, M. M., Teixeira, N. "Deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Estabelecimento de valores de referência da sua actividade no eritrócito. Estudo de dois hemizigotos." *Rev. Port. Farm.* 39 : 84 (1989)

- Sawchuk, A. P., Unthank, J. L., Davis, T. E., Dalsing, M. C. "A prospective, *in vivo* study of the relationship between blood flow hemodynamics and atherosclerosis in a hyperlipidemic swine model." *J. Vasc. Surg.* 19 : 58 (1994)
- Schlepper-Schafer, J., Kolb-Bachofen, V., Kolb, H. "Identification of a receptor for senescent erythrocytes on liver macrophages" *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 115 : 551 (1983)
- Schluter, K., Drenckhahn, D. "Co-clustering of denatured hemoglobin with band 3: its role in binding of autoantibodies against band 3 to abnormal and aged erythrocytes" *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83 : 6137 (1986)
- Schmid-Schonbein, G. W., Seiffge, D., DeLano, F. A., Shen, K., Zweifach, B. Z. "Leukocyte counts and activation in spontaneously hypertensive and normotensive rats." *Hypertension* 17 : 323 (1991)
- Schmitz, G., Williamson, E. "High-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and membrane protection." *Curr. Opin. Lipidol.* 2 : 177 (1991)
- Schofield, A. E., Tanner, M. J. A., Pinder, J. C., Clough, B., Bayley, P. M., Nash, G. B., Dluzewski, A. R., Reardon, D. M., Cox, T. M., Wilson, R. J. M., Gratzer, W. B. "Basis of unique red cell membrane properties in hereditary ovalocytosis." *J. Mol. Biol.* 223 : 949 (1992)
- Schuck, P., Schubert, D. "Band 3-hemoglobin associations. The band 3 tetramer is the oxyhemoglobin binding site." *FEBS* 293 : 81 (1991)
- Seaman, V. F., Knox, R. J., Nordt, F. J., Regan, D. H. "Red cell aging. I. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes." *Blood* 50 : 1001 (1977)
- Sen, C. K., Marin, E., Kretschmar, M., Hanninden, O. "Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization." *J. Appl. Physiol.* 73 : 1265 (1992)
- Sharma, R., Gupta, S., Ahmad, H., Ansari, G. A.S., Awasthi, Y. C. "Stimulation of human erythrocyte membrane ATPase by glutathione conjugates." *Toxicol. Applied Pharmacol.* 104 : 421 (1990)
- Sharp, N. C. C., Koutedakis, Y. "Sport and the overtraining syndrome: immunological aspects." *Brit. Med. Bull.* 48 : 518 (1992)
- Shephard, R. J., Verde, T. J., Thomas, S. G., Shek, P. "Physical activity and the immune system." *Can. J. Sprt. Sci.* 16 : 169 (1991)
- Shukla, S. D., Hanahan, D. J. "Identification of domains of phosphatidylcholine in human erythrocyte plasma membranes. Differential action of acidic and basic phospholipases A2 from *Agkistrodon Halys Blomhoffii*." *J. Biol. Chem.* 257 : 2908 (1982)
- Símonarson B. "Glutathione peroxidase, selenium and vit. E in defense against reactive oxygen species", *Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology and Medicine*, Ed. Alexandre Quintanilha, Plenum Press, NATO ASI Series, pag. 15 (1988)

- Singer, J. A., Jennings, L. K., Jackson, C. W., Dockter, M. E., Morrison, M., Walker, W. S. "Erythrocyte homeostasis: antibody-mediated recognition of the senescent state by macrophages." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 : 5498 (1986)
- Smedly, L. A., Tonnesen, M. G., Sandhaua, R. A., Haslett, C., Guthrie, L. A., Johnston, R. B., Jr "Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase." *J. Clin. Invest.* 77 : 1233 (1986)
- Smith, E. B. "Human atherosclerotic lesions and intervention." *Atherosclerosis - Developments, Complications and Treatment.* Editores J. Shepherd et al. pag. 175. Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division) (1987)
- Sprenger, H., Jacobs, C., Nain, M., Gressner, A. M., Prinz, H., Wesemann, W., Gemsa, D. "Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running." *Clin. Immunol. and Immunopathol.* 63 : 188 (1992)
- Srivastava, S. K., Beutler, E. "Glutathione metabolism of the erythrocyte. The enzymic cleavage of glutathione-hemoglobin preparations by glutathione reductase." *Biochem. J.* 119 : 353 (1970)
- Steck, T. L., Ramos, B., Strapazon, E. "Protolytic digestion of band 3 predominant transmembrane polypeptide of the human erythrocyte membrane." *Biochem.* 15 : 1154 (1976)
- Steck, T. L., Koziarz, J. J., Singh, M. K., Reddy, G., Kohler, H. "Preparation and analysis of seven major, topographically defined fragments of band 3, the predominant transmembrane polypeptide of human erythrocyte membranes." *Biochem.* 17 : 1216 (1978)
- Steinbeck, M. J., Roth, J. A. "Neutrophil activation by recombinant cytokines." *Rev. Infect. Diseases* 2 : 549 (1989)
- Steinberg, D. "Atherosclerosis from the viewpoint of cell biology." em *Atherosclerosis - Developments, Complications and Treatment.* Editor Shepherd, J. Excerpta Medica, pg 3 (1987)
- Sushil, K., Shohet, J. S. B. "A novel phospholipid in irreversibly sickled cells: evidence for *in vivo* peroxidative membrane damage in sickle cell disease." *Blood?* : 362 (1983?)
- Suzuki, T., Dale, G. L. "Membrane proteins in senescent erythrocytes." *Biochem. J.* 257 : 37 (1989)
- Szymanski, I. O., Odgren, P. R., Valeri, C. R. "Relationship between the third component of human complement (C3) bound to stored preserved erythrocytes and their viability *in vivo*." *Vox Sang.* 49 : 34 (1985)
- Tanner, M. J. A. "The major integral proteins of the human red cell." *Baillière's Clin. Haematol.* 6 : 333 (1993)
- Terkeltaub, R., Banka, C. L., Solan, J., Santoro, D., Brand, K., Curtiss, L. K. "Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte activity." *Arterioscl. Thromb.* 14 : 47 (1994)

- Thevenin, B. J-M, Periasamy, N., Shohet, S. B., Verkman, A. S. "Segmental dynamics of the cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 determined by time-resolved fluorescence anisotropy: sensitivity to pH and ligand binding." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 : 1741 (1994)
- Tilley, L., Mcpherson, R. A., Jones, G. L., Sawyer, W. H. "Structural organisation of band 3 in Melanasian ovalocytes." *Biochim. Biophys. Acta* 1181 : 83 (1993)
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. "Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76 : 4350 (1979)
- Tsuji, A., Ohnishi, S-I "Restriction of the lateral motion of band 3 in the erythrocyte membrane by the cytoskeletal network: dependence on spectrin association state." *Biochem.* 25 : 6133 (1986)
- Turrini, F., Arese, P., Yuan, J., Low, P. S. "Clustering of integral membrane proteins of the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis." *J. Biol. Chem.* 266 : 23611 (1991)
- Uyesaka, N., Hasegawa, S., Imai, H., Nakamura, T., Furhama, K. "Possible role of red cell deformability and microvasculature in microcirculation." *Japanese J. Physiol.* 42 : 891 (1992a)
- Uyesaka, N., Hasegawa, S., Ishioka, N., Ishioka, R., Shio, H., Schechter, A. N. "Effects of superoxide anions on red cell deformability and membrane proteins." *Biorheol.* 29 : 217 (1992b)
- Vandongen, R. "Platelet activating factor and the circulation." *J. Hypertension* 9 : 771 (1991)
- Vercellotti, G. M., van Asbeck, B. S., Jacob, H. S. "Oxygen radical-induced erythrocyte hemolysis by neutrophils. Critical role of iron and lactoferrin." *J. Clin. Invest.* 76 : 956 (1985)
- Walder, J. A., Chatterjee, R., Steck, T. L., Low, P. S., Musso, G. F., Kaiser, E. T., Rogers, P. H., Arnone, A. "The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane." *J. Biol. Chem.* 259 : 10238 (1984)
- Wall, A. C., Becker, A. E., van der Loos, C. M., Das, P. K. "Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology." *Circulation* 89 : 36 (1994)
- Ward, P. A. "Mechanisms of endothelial cell killing by H₂O₂ or products of activated neutrophils" *Am. J. Med.* 91 : 3C-89S (1991)
- Waugh, S. M., Low, P. S. "Hemichrome binding to band 3: nucleation of heinz bodies on the erythrocyte membrane." *Biochem.* 24 : 34 (1985)
- Waugh, S. M., Walder, J. A., Low, P. S. "Partial characterization of the copolymerization reaction of erythrocyte membrane band 3 with hemichromes." *Biochem.* 26 : 1777 (1987)

- Weidner, T. G. "Upper respiratory illness and sport and exercise." *Int. J. Sports. Med.* 15 : 1 (1994)
- Weiss, S. J. "The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils." *J. Biol. Chem.* 255 : 9912 (1980)
- Weiss, S. J. "Neutrophil-mediated methemoglobin formation in the erythrocyte. The role of superoxide and hydrogen peroxide." *J. Biol. Chem.* 257 : 2947 (1982)
- Weiss, S. J. "Oxygen, ischemia and inflammation." *Acta Physiol. Scand.* 548 : 9 (1986)
- Weiss, D. J., Klausner, J. S. "Neutrophil-mediated erythrocyte injury: a potential cause of erythrocyte destruction in the anemia associated with inflammatory disease." *Vet. Pathol.* 25 : 450 (1988)
- Weiss, D. J., Murtaugh, M. P. "Activated neutrophils induce erythrocyte immunoglobulin binding and membrane protein degradation." *J. Leuk. Biol.* 48 : 438 (1990)
- Weiss, D. J., Aird, B., Murtaugh, M. P. "Neutrophil-mediated immunoglobulin binding to erythrocytes involves proteolytic and oxidative injury." *J. Leuk. Biol.* 51 : 19 (1992)
- Williamson, J. R., Gardner, R. A., Boylan, C. W., Carroll, G. L., Chang, K., Marvel, J. S., Gonen, B., Kilo, C., Tran-Son-Tay, R., Sutura, S. P. "Microrheologic investigation of erythrocyte deformability in diabetes mellitus." *Blood*, 65 : 283 (1985)
- Winterbourn, C. C., Batt, R. D. "Lipid composition of human red cells of different ages." *Biochim. Biophys. Acta* 202 : 147 (1970)
- Winterbourn, C. C., Mcgrath, B. M., Carrell, R. W. "Reactions involving superoxide and normal and unstable haemoglobins." *Biochem. J.* 155 : 493 (1976)
- Wintrobe, M. M., Lukens, J. N., Lee, G. R. "The approach to the patient with anemia" in *Wintrobe's Clinical Hematology*. Editores Lee, G. R., Bithel, T. C., Foerster, J., Athens, J. W., Lukens, J. N., Lea & Febiger cap. 23, pg. 715 (1993)
- Woodhouse, P. R., Khaw, K. T., Plummer, M., Foley, A., Meade, T. W. "Seasonal variations of plasma fibrinogen and factor VII activity in the elderly: winter infections and death from cardiovascular disease." *Lancet* 343 : 435 (1994)
- Yang, X-C., Jing, T-Y., Resnick, L. M., Phillips, G. B. "Relation of hemostatic risk factors to other risk factors for coronary heart disease and to sex hormones in men." *Arterioscl. Thromb.* 13 : 467 (1993)
- Yuan, J., Kannan, R., Shinar, E., Rachmilewitz, E. A., Low, P. S. "Isolation, characterization, and immunoprecipitation studies of immune complexes from membranes of B-thalassemic erythrocytes." *Blood* 79 : 3007 (1992)
- Zerba, E., Komorowski, T. E., Faulkner, J. A. "Free radical injury to skeletal muscles of young, adult, and old mice." *Am. J. Physiol.* 258 : C429 (1990)
- Zwaal, R. F. A., Comfurius, P., Van Deenen, L. L. M. "Membrane asymmetry and blood coagulation." *Nature* 268 : 358 (1977)