

BOLETIM

Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação

Bulletin of the Portuguese Society of Hemorheology and Microcirculation

Directora: Carlota Saldanha **Editor:** Henrique Luz Rodrigues **Conselho Redactorial:** J. R. Faria de Abreu, José Pereira Albino, J. M. Vieira Barbas, Joaquim Barbosa, Henrique Completo Bento, J. P. Gorjão Clara, J. M. Braz Nogueira, Victor Oliveira, L. Mendes Pedro, Fausto J. Pinto, José Ribeiro, Luís Cunha Ribeiro, Luísa Sagreira, Lúcio Botas dos Santos, J. Martins e Silva, J. R. Carvalho de Sousa

Vol. 23 n.º 3 Julho, Agosto, Setembro 2008

Sumário / Summary

NOTA DE ABERTURA / EDITORIAL

- Histórias de projectos 3
- Projects and stories 3
C. Saldanha

ARTIGO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

I SIMPÓSIO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA – TROMBOFILIAS E GRAVIDEZ

- Hemostase na gravidez 5
- Hemostasis in pregnancy 5
Jorge Lima
- Trombofilias Hereditárias e Adquiridas 9
- Inherited and Acquired Thrombophilia during Pregnancy 9
Fátima Serrano

ARTIGO DE REVISÃO / REVIEW ARTICLE

- Erythrocyte Membrane 17
- Membrana Eritrocitária 17
Sofia de Oliveira

ACTUALIZAÇÃO BIBLIOGRÁFICA / ARCHIVES

- Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms 28
Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K, Yatera Y, Sabanai K, Tanimoto A, Nagasaki M, Tasaki H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Otsuji Y, Yanagihara N.

Referência da capa: Vénula pós-capilar (diâmetro aproximado: 30 mm) de rede microvascular em mesentério de rato (*Rattus norvegicus*), observada por microscopia intravital de transluminação. No interior do vaso sanguíneo visualizam-se leucócitos a interagir com a parede vascular. Imagem obtida por Henrique Sobral do Rosário (Instituto de Biopatologia Química – Prof.ª Doutora Carlota Saldanha, Faculdade de Medicina de Lisboa; Unidade de Biopatologia Vascular, Instituto de Medicina Molecular)

Esta publicação é subsidiada em 2008 por:

FCT: Fundação para a Ciência e Tecnologia (Ministério da Ciência e do Ensino Superior – Portugal)

Ao abrigo do: **Apoio do Programa Operacional Ciência, Tecnologia, Inovação do Quadro Comunitário de Apoio III**

O **Boletim** (ISSN 0872-4938) é publicado trimestralmente pela Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação. Isenta de registo no ICS nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 12.º do Decreto Regulamentar n.º 8/99, de 9 de Junho. **Depósito Legal** 30 525/89. **Tiragem** 100 exemplares **Distribuição** sócios, sociedades científicas afins, entidades oficiais e privadas de âmbito médico e áreas de educação da ciência. Todos os direitos estão reservados. **Preço de cada número avulso:** 5 €, a que acresce 2,5 € para portes de correio. **Editor, Proprietário, Administração e Secretariado:** Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação, a/c Instituto de Biopatologia Química, Faculdade de Medicina de Lisboa. **Endereço do Secretariado:** Apartado 4098- 1502 Lisboa Codex, Portugal. **Telefone** 217 985 136; **Fax:** 219 999 477 **Execução Gráfica:** Publicações Ciência e Vida, Lda. Apartado 44 – 2676-901 Odivelas. **Telef.:** 21 478 78 50; **Fax:** 21 478 78 59. **E-mail:** pub@cienciaevida.pt

Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação

Presidente Honorário: Prof. Doutor João Alcindo Martins e Silva

ÓRGÃOS SOCIAIS DA SPHM / BOARDS (2007-2009)

Direção / Executive Committee

Presidente

Prof.^a Doutora Maria Carlota
Saldanha Lopes

Vice-Presidentes

Prof. Doutor J. M. Braz Nogueira
Prof. Doutor Carlos Perdigão

Secretário-Geral

Dr. José António Pereira Albino

Tesoureiro

Prof. Doutor Flávio Reis

Secretários-Adjuntos

Prof. Doutor Henrique Luz Rodrigues
Prof. Doutor J. Ducla Soares
Dr. Jorge Lima

Assembleia Geral / General Assembly

Presidente

Prof. Doutor A. Diniz da Gama

1.º Secretário

Dr. João Paulo Guimarães

2.º Secretário

Dr. Miguel Frederico Leal Galvão

1.º Secretário Suplente

Dr. Luís Sargento

2.º Secretário Suplente

Dr. Paulo Ferreira da Silva

Conselho Fiscal / Finance and Audit Committee

Presidente

Prof. Doutor Victor Oliveira

1.º Vogal

Dr.^a Maria Helena Baptista Manso Ribeiro

2.º Vogal

Dr. Carlos Manuel dos Santos Moreira

Comissão de Delegados / Committee of Delegates

Delegado da Região Norte

– Dr. Manuel Campos

Delegado da Região Centro

– Dr. João Morais

Delegado da Região Sul e Regiões Autónomas

– Dr. Mário Marques

MEMBROS CONSULTIVOS, HONORÁRIOS E CORRESPONDENTES / / CONSULTIVE, HONORARY AND CORRESPONDENT MEMBERSHIP

Conselho Científico / / Scientific Council

A. Diniz da Gama
Axel Pries
Fernando Lacerda Nobre
Helena Saldanha Oliveira
J. Esperança Pina
J. Luís Providência
J. Martins e Silva
J. Fernandes e Fernandes
J. Rafael Ferreira
João Morais
José Ferro
Luís Silva Carvalho
Manuel Carrageta
Mário Andreia
Ricardo Seabra Gomes

Sócios Honorários / / Honorary Members

A. M. Ehrly (Alemanha)
Carlos Ribeiro (Portugal)
H. J. Meiselman (EUA)
Helmut Drexler (Alemanha)
J. F. Stoltz (França)
J. E. Tooke (G. Bretanha)
John A. Dormandy (G. Bretanha)
Joaquim Silva Carvalho (Portugal)
J. M. G. Toscano Rico (Portugal)
L. Teixeira Diniz (Portugal)
M. Boisseau (França)
Políbio Serra e Silva (Portugal)
Sandro Forconi (Itália)
Y. Isogai (Japão)

Sócios Correspondentes / / Correspondent Member

Adrian J. Barnes (G. Bretanha)
Alon Harris (USA)
D. Seiffge (Alemanha)
G. Caimi (Itália)
G. D. O. Lowe (G. Bretanha)
I. Juhan-Vague (França)
I. Salama Benarroch (Argentina)
J. Delaunay (França)
J. F. Brun (França)
Ricardo Manrique (Brasil)
Shi Yong-de (China)
T. Shiga (Japão)
Tao Chan (França)

FILIAÇÃO INTERNACIONAL

**EUROPEAN SOCIETY FOR CLINICAL HEMORHEOLOGY
EUROPEAN SOCIETY FOR MICROCIRCULATION**

HISTÓRIAS DE PROJECTOS / PROJECTS AND STORIES

Carlota Saldanha

Escolher o tema para o editorial cria um momento especial pois o desenvolvimento do mesmo é um modo de saudar os sócios e todos os visitantes do site. Há que seleccionar a hipótese sobre o que fazer. Como estamos em época de férias, deixo o conteúdo de tipo científico que tem contemplado os números anteriores e opto por fazer uma sumária descrição sobre a forma como são transmitidos aos pares os projectos. Estes constituem a razão de ser e traduzem o modo de estar do investigador com outrora o foi expresso por Albert Einstein: “o que de mais belo podemos experimentar é o misterioso. É a fonte de toda a verdadeira arte e ciência”. É uma frase completamente sedutora quando vivencial na resolução de problemas indutores de desenvolvimento, de condições de qualidade, de prevenção, de cura, de aprendizagem, de bem-fazer. Mas, como não somos utópicos, sabemos que essa perspectiva encerra forças negativas ou positivas de ansiedade, de dúvida e de insucesso. Estamos a resvalar para a dualidade, que é transversal às situações de criatividade, às de decisão e tão incomensurável em significado como a existência. Dualidade, assimetria, probabilidade sobre o que acontece ou não, adaptabilidade às explicações tendendo a posicionar-se e a confundir o indutor e o induzido numa miríade de efeitos sobre o investigador.

Quando procuramos contar a outrem a história sobre o projecto científico que vamos desenvolver preocupamo-nos por ter um princípio, seja a descrição sobre o estado da arte, seja o objectivo, seja a necessidade de encontrar explicação para os resultados previamente obtidos. À medida que prosseguimos muitas perspectivas para explorar se vislumbram qual mapa rodoviário, ou de via de transdução de sinal ou metabólica, fruto da incerteza da dinâmica dos sistemas biológicos. Vamos procurando justificar as exclusões, as recusas, até chegar à que mais consistência dá à hipótese geradora de perguntas pertinentes cuja resolução vai depender das metodologias tecnológicas de que dispomos. Ficaram pelo caminho rejeições que podem ser elas princípios de outras histórias ou vir a constituir resultados que outros obterão. O produto final pode ter utilidade imediata ou não, ou ainda mais tarde pode vir a ser rejeitado. O optimismo inicial com que o investigador narra o que quer fazer e como o irá fazer pode durante o percurso da realização do projecto ser substituído por estados de ansiedade, apreensão e de dúvida se as respostas obtidas divergirem das esperadas.

Mas, se descrevermos o projecto que preparámos para concretizar e para viabilizar uma solicitação cujo produto tem que ser utilizável com sucesso a forma narrativa será necessariamente diferente. O grau de certeza de obtenção de segurança do produto final é absoluto. Todas as etapas preparatórias foram baseadas em escolhas de pressupostos, assentes em dados seguros, que só podem conduzir a um fim duradouro dentro do previsto. O optimismo do narrador persistirá até à conclusão do produto cujo êxito se prevê. Se trará satisfação para todos depende, já não é tão certo. Mas o objecto concluído pode ser considerado como arte ou como ciência e o próprio ou as suas réplicas expostas para regalo e aprendizagem dos vindouros. O estado de espírito do narrador durante a realização do projecto não apresentará tantas oscilações como no anterior.

I SIMPÓSIO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA – TROMBOFILIAS E GRAVIDEZ

HEMOSTASE NA GRAVIDEZ

Jorge Lima*

RESUMO

A gravidez constitui um desafio para a hemostase. Na gravidez normal ocorrem profundas alterações nos mecanismos da hemostase. Estas alterações incluem um aumento dos prócoagulantes, em especial do fibrinogénio, uma diminuição dos anticoagulantes naturais e uma supressão da fibrinólise (aumento do PAI-2 placentário), contribuindo para um aumento do risco tromboembólico, durante esse período, mesmo na ausência de uma trombofilia hereditária ou adquirida.

Palavras-chave: Coagulação, hemostase, gravidez.

SUMMARY

Pregnancy is a challenge to hemostasis. There are profound physiological changes in the hemostatic mechanisms during healthy pregnancy. These include increases in the procoagulants, particularly fibrinogen, some reduction in the naturally occurring anticoagulants and suppression of fibrinolysis, which contribute to the increased risk of thromboembolism in this period even if there is no inherited or acquired thrombophilia.

Key-words: Coagulation, hemostasis, pregnancy.

* Especialista em Ginecologia e Obstetria
Hospital CUF Descobertas, Lisboa, Portugal
E-mail: jorge.lima@hospitalcufdescobertas.pt

INTRODUÇÃO

Durante a gravidez e logo nas fases iniciais ocorrem múltiplas adaptações fisiológicas¹. Estas alterações vão permitir a tolerância materna à unidade feto-placentária geneticamente incompatível, a nutrição e desenvolvimento fetal e a preparação e prevenção das eventuais adversidades que possam ocorrer no parto. As adaptações fundamentais da gravidez incluem resistência à acção da insulina, imunossupressão, hipervolemia e alterações pró-coagulantes. As mulheres jovens e saudáveis conseguem interagir perfeitamente com estas alterações e a gravidez termina com sucesso. No entanto, a presença de determinados factores hereditários ou adquiridos podem ter como consequência a ocorrência de complicações graves na gravidez. As complicações vasculares gestacionais são a principal causa de morbidade materno-fetal. As trombofilias têm sido implicadas como uma importante causa dessas complicações e as mulheres com estas alterações hematológicas têm um risco aumentado de complicações na gravidez, tal como aborto recorrente, pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intra-uterino, descolamento prematuro de placenta normalmente inserida (DPPNI) e morte fetal *in útero*². É fundamental conhecer a bioquímica e a fisiologia da hemostase para melhor compreensão de alguns aspectos fisiopatológicos e da terapêutica das trombofilias.

HEMOSTASE

As propriedades da hemostase são confinar o sangue circulante ao leito

vascular, manter a fluidez do sangue e prevenir a perda excessiva de sangue após uma lesão dos vasos³. Os três importantes compartimentos hemostáticos envolvidos neste equilíbrio são os vasos (endotélio e restante parede vascular), as proteínas plasmáticas (pró-coagulantes, anticoagulantes e do sistema fibrinolítico) e as plaquetas que devem ser normais em número e em função. Quando ocorre uma lesão vascular, independentemente do “agente agressor”, a exposição do colagénio subendotelial e da membrana basal conduz à adesão e agregação plaquetárias e activação da coagulação, levando à formação de um trombo hemostático que previne a saída de sangue do compartimento vascular e permite os eventos de reparação subsequentes. Duas vias distintas (intrínseca e extrínseca) conduzem à formação do coágulo de fibrina. Apesar de serem iniciadas por mecanismos distintos, ambas convergem para uma via comum. A via intrínseca é activada em resposta a alterações da parede vascular na ausência de lesão tecidual, enquanto a via extrínseca é activada quando ocorre uma agressão tecidual. A cascata é complexa e envolve a interacção de múltiplos factores, pelo que o potencial de disfunção pode ocorrer em qualquer uma das várias etapas. Tal como a formação do coágulo, também a sua destruição é importante no processo de reparação da lesão. A fibrinólise é mediada pelo activador tecidual do plasminogénio que se liga à fibrina activando a plasmina. A plasmina por sua vez degrada a fibrina podendo ser inactivada pela α_2 -antiplasmina e pela α_2 -macroglobulina. A fibrinólise é primariamente bloqueada pelo inibidor

do activador do plasminogénio produzido pelo endotélio (PAI-1) e pela placenta (PAI-2). Tal como noutros processos biológicos, o sistema da coagulação é regulado por vários mecanismos inibidores que têm por objectivo limitar a extensão das várias reacções bioquímicas e a possível disseminação do processo de coagulação, onde se destacam o sistema da proteína C / proteína S e a antitrombina III. A proteína C é activada na superfície endotelial, enquanto a trombina se liga à trombomodulina (receptor específico para a trombina), transformando a enzima prócoagulante (factor II) num potente activador da proteína C. A proteína C activada, na presença de fosfolípidos da membrana, cálcio e de um cofactor não enzimático (proteína S), inactiva os factores activados, Va e VIIIa, inibindo a coagulação. Outro mecanismo fundamental na regulação da hemostase é a inibição de serino-proteases (factores activados II, X, IX, XI, XII e calicreína), pela antitrombina III. A heparina, quando utilizada em terapêutica, vai interferir com a estrutura bioquímica da antitrombina III, aumentando assim a sua actividade inibitória sobre a hemostase (acção anticoagulante).

As prostaglandinas desempenham também uma função importante na fisiologia da hemostase. Os fosfolípidos das membranas das plaquetas e das células endoteliais são convertidos em ácido araquidónico pela enzima fosfolipase A_2 , que é activada pela trombina e pelo colagénio. O ácido araquidónico é convertido em prostaglandinas intermédias pela ciclo-oxigenase (COX). Nas plaquetas esses endoperóxidos cíclicos são convertidos em tromboxano A_2

(TxA_2), um vasoconstritor e dos mais potentes agregantes plaquetários descritos. Nas células endoteliais esses mesmos produtos têm um destino diferente sendo convertidos em prostaciclina (PGI_2), um potente antiagregante plaquetário e vasodilatador.

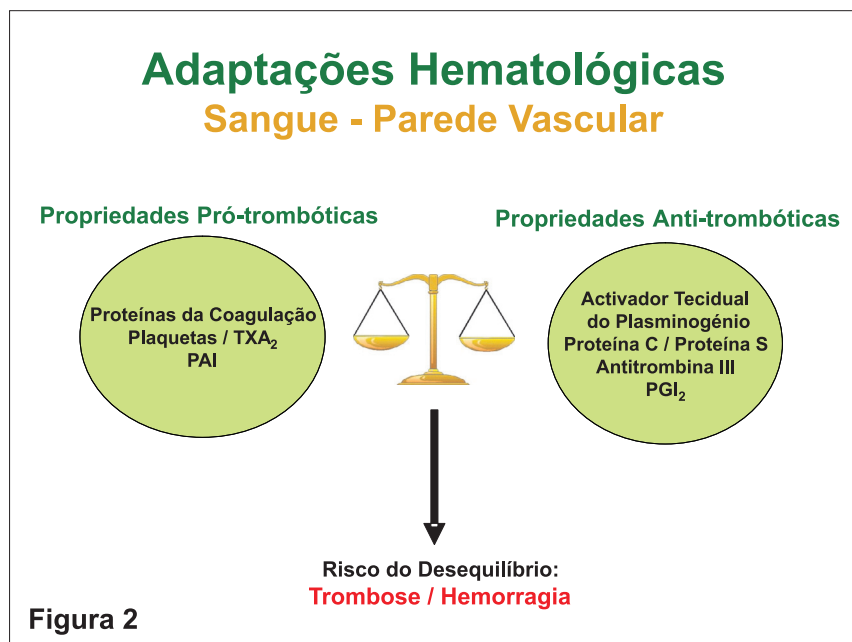
ADAPTAÇÕES HEMATOLÓGICAS DA GRAVIDEZ

Na gravidez normal ocorrem profundas alterações fisiológicas nos mecanismos hemostáticos com o desenvolvimento de um estado de hipercoagulabilidade⁴. Este estado pró-trombótico, condicionado pelos estrogénios, é devido ao aumento dos prócoagulantes (factores II, V, VIII, IX, X, XII, aumento major do fibrinogénio), à diminuição dos anticoagulantes naturais (proteína S, aumento marginal da resistência à proteína C activada na ausência da mutação do factor V Leiden) e à supressão da fibrinólise (aumento do PAI-2 placentário). Estas adaptações fisiológicas

Adaptações Hematológicas Gravidez

- Estado de Hipercoagulabilidade / Pró-trombótico
 - ↑ Procoagulantes
 - ↑ Factores II, V, VII, VIII, IX, X, XII
 - ↑ Major Fibrinogénio (300 – 600 mg/dL)
 - ↓ Anticoagulantes naturais
 - ↓↓ Proteína S
 - ↑ marginal APCR (na ausência da mutação FV Leiden)
 - Supressão da fibrinólise
 - ↑↑ PAI-2 (placenta)
- Proteínas Reguladoras
 - Proteína S
 - Total: sem alterações
 - Livre: ↓ significativa 2º e 3.º T (40%)
 - Proteína C e Antitrombina III
 - Sem alterações

Figura 1



cas, em conjunto com o aumento da volêmia, previnem a hemorragia anormal pós-parto e desempenham uma função sinérgica com a contração miométrial. A anexina V, um potente anticoagulante, tem uma elevada expressão na membranas apicais do sinciotrofoblasto da placenta, formando uma camada bidimensional sobre os fosfolípidos da membrana, evitando assim que esses sirvam de “suporte” para o sistema enzimático da coagulação. A ausência ou bloqueio desta proteína predispõe assim, para a activação da coagulação nos espaços intervilositários placentários, contribuindo de forma importante na fisiopatologia do aborto recorrente associado à síndrome de anticorpos antifosfolípidos⁵.

A tríade de Virchow está presente na gravidez sendo caracterizada por hipercoagulabilidade, estase venosa e por lesão vascular (lesão endotelial dos vasos pélvicos), que pode ocorrer mesmo no parto vaginal. Este conjunto de alterações favorece um aumento do risco de tromboembolismo

venoso na gravidez e puerpério, mesmo em mulheres sem trombofilias hereditárias ou adquiridas. O número de plaquetas tende a diminuir cerca de 10% durante a gravidez normal⁶. A descida mais pronunciada ocorre no último trimestre, mas apesar dos valores se manterem dentro dos de referência, pode ocorrer uma trombocitopenia gestacional ligeira em cerca de 6 a 7% das grávidas. Relativamente às proteínas reguladoras da hemostase, a concentração de proteína C e de antitrombina III não sofrem qualquer alteração durante a gravidez⁴. A concentração sérica de proteína S total não varia na gravidez enquanto a proteína S livre sofre uma redução significativa (40%) no 2.º e 3.º trimestres⁴. Do ponto de vista laboratorial, na gravidez normal não há alterações do tempo de protrombina e do tempo de tromboplastina parcial ativado (aPPT).

Na gravidez é fundamental a manutenção de um rigoroso equilíbrio entre as propriedades prótrombóticas e as antitrombóticas do sangue/parede vascular prevenindo quer a trombose quer a hemorragia.

REFERÊNCIAS

1. Kaaja RJ, Greer IA. Manifestations of chronic disease during pregnancy. *JAMA* 2005; 294:2751-7.
2. Kujovich JL. Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:414-24.
3. Bick LR, Murano G. Physiology of hemostasis. *Clin Lab Med* 1994; 14(4):677-707.
4. Stirling Y, Woolf L, North WR et al. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 1984;52(2):176-82.
5. Rand J, Eerden PV, Wu XX, et al. Defective annexin A5 crystallization: a mechanism for pregnancy losses in the antiphospholipid syndrome. *Tromb Res* 2005;115(1):77-81.
6. Ratnam S, Arulkumaran S, Biswas A. Disorders of platelets in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 1994;49(8):585-94.

TROMBOFILIAS HEREDITÁRIAS E ADQUIRIDAS

*Fátima Serrano**

RESUMO

Para além de um risco aumentado de trombose materna, a trombofilia tem recentemente vindo a ser associada a várias complicações obstétricas. Neste artigo é efectuada uma revisão sobre as eventuais implicações para a gravidez desta entidade.

Palavras-chave: Trombofilia, complicações obstétricas.

ABSTRACT

Thrombophilia has recently been associated with adverse pregnancy outcome, such as recurrent pregnancy loss, fetal growth restriction, placental abruption and preeclampsia. In this article, the author reviews thrombophilia's potential role in these pregnancy complications.

Key-words: Thrombophilia, pregnancy complications

* Especialista em Ginecologia e Obstetria
Maternidade Dr. Alfredo da Costa, Lisboa, Portugal.
E-mail: fatima_serrano@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A trombofilia é uma desordem multigénica causada por defeitos hereditários e adquiridos, sendo definida como uma predisposição para a trombose¹.

Para além de um risco aumentado de trombose materna, a trombofilia tem vindo a ser apontada como uma das causas possíveis de algumas complicações obstétricas como a perda embriofetal recorrente, a morte fetal tardia inexplicada, o descolamento de placenta normalmente inserida (DPPNI), a restrição de crescimento intra-uterino e a pré-eclâmpsia. Estudos desenvolvidos nesta área têm chamado a atenção para um aumento da prevalência de alguns marcadores de risco trombótico genético (mutações para a Protrombina G20210A, Metilenotetrahidrofolato Redutase e Factor V de Leiden) e adquirido (Anticorpos Antifosfolípidos), em mulheres com este tipo de insucesso obstétrico. Contudo os resultados destas investigações não são consensuais, diferindo os estudos no tamanho da amostra, metodologia, definição de grupos de risco, número e tipo de polimorfismo²⁻⁶.

TROMBOFILIA HEREDITÁRIA E GRAVIDEZ

Todos os anos novas formas de trombofilia hereditária são identificadas sendo o seu significado clínico determinado pelo seu risco trombótico e pela frequência na população em geral (Quadro I).

A gravidez normal associa-se a alterações profundas da hemostase. Para além de um aumento das concentrações dos factores procoagulantes (f. VIII, V e fibrinogéneo) verifica-se também uma diminuição de alguns anticoagulantes naturais (proteína S) e aumento da resistência adquirida à proteína C activada². Estas adaptações fisiológicas relacionam-se com o desenvolvimento normal da circulação placentar e constituem um mecanismo protector da hemorragia do parto. Contudo, aumentam o risco de trombose materna.

O tromboembolismo venoso (TEV) é seis vezes mais frequente na grávida do que na mulher não grávida, sendo o tromboembolismo pulmonar a causa mais comum de morte materna no mundo ocidental. A idade materna, a cesariana e a presença de trombofilia aumentam o risco de TEV durante a gravidez e puerpério⁸.

Quadro I – Trombofilias Hereditárias

	Transmissão	População geral Caucasianos (%)	População com TVP (%)	TVP na Gravidez (%)
Défiência Antitrombina III	Autossómica Dominante	0.02	1 a 2	60
Défiência Proteína C	Autossómica Dominante	0.2 a 0.5	3 a 4	10 a 30
Défiência Proteína S	Autossómica Dominante	0.08	2	10 a 30
FV Leiden	Autossómica Dominante	5	20 a 40	40
Protrombina G20210A	Autossómica Dominante	2 a 5	6	30
MTHFR C677T (homozigotia)	Autossómica Recessiva	10	?	?

Adaptado de Seligsohn & Lubetsky (2001). Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med*; 344: 1222-31.

Se a associação entre AVC e Síndrome de Anticorpos Antifosfolípidos está bem estabelecida, entre trombose arterial e trombofilia hereditária é ainda controversa. Contudo, indivíduos com mutações para a Protrombina ou FV Leiden parecem apresentar maior risco de desenvolver um acidente vascular cerebral trombótico⁸. Um estudo realizado em 12 grávidas saudáveis que tiveram um acidente isquêmico transitório durante a gestação, revelou uma elevada incidência de trombofilia (83%), apontando para a necessidade de estudo destas mulheres⁸.

O sucesso de uma gravidez depende do desenvolvimento de uma adequada circulação uteroplacentar. As trombofilias podem interferir com este processo, dando origem a trombozes e alterações da implantação e invasão trofoblástica, com consequentes complicações vasculares placentares. Na última década assistiu-se a uma multiplicação de investigações evidenciando uma estreita associação entre a trombofilia e algumas patologias obstétricas como sejam a perda embriofetal, a restrição de crescimento intra-uterino (RCIU), o DPPNI e a pré-eclâmpsia grave. O estado da arte é ainda inicial, apresentando a maior parte das investigações insuficiências metodológicas (estudos geralmente retrospectivos, sem grupo controlo, diferindo no tamanho da amostra, na definição de grupos de risco, incluindo vários tipos de perdas, diferentes idades gestacionais e tipo de polimorfismo). No entanto, a maior parte dos autores são unânimes quanto à existência de uma associação entre trombofilia e insucesso obstétrico.

O estudo NOHA realizado em 32.700 mulheres evidencia a associa-

ção entre as mutações para o FV Leiden e Protrombina e a perda fetal após a 10.^a semana de gestação, aumentando a trombofilia múltipla o risco de perda recorrente de gravidez⁹. Estes resultados não são contudo consensuais. Um outro estudo multicêntrico, prospectivo, publicado no mesmo ano e englobando 4.885 grávidas norte-americanas, mostrou achados contraditórios, não tendo encontrado uma correlação entre a presença de heterozigotia para o factor V de Leiden e complicações obstétricas¹⁰. Na Maternidade Dr. Alfredo da Costa (MAC), uma investigação efectuada em 73 mulheres com antecedentes de aborto recorrente ou perda fetal inexplicada, mostrou também uma elevada prevalência (41%) de trombofilia¹¹.

A pré-eclâmpsia é uma patologia específica que afecta cerca de 6% das gestações¹². Vários estudos foram publicados sobre a associação entre trombofilia congénita e pré-eclâmpsia. Infelizmente a maior parte destas investigações incluiu várias formas de pré-eclâmpsia (critérios, graus de gravidade) e diferentes idades gestacionais, sendo difícil estabelecer uma relação consistente entre estas duas entidades^{3,4,5,6}. Aparentemente, apenas a mutação para o factor V de Leiden é citada por todos os autores como inequivocamente associada a maior incidência de pré-eclâmpsia^{13,14}. Recentemente um estudo multicêntrico desenhado por Mello *et al.*¹⁵, comparou a frequência de trombofilia entre mulheres com antecedentes de pré-eclâmpsia e mulheres com gravidezes normais de termo. Foi encontrada uma prevalência de trombofilia hereditária significativamente maior nas mulheres com antecedentes de pré-

-eclâmpsia grave (50.7%) do que nas do grupo controle (17.2%). As trombofilias mais frequentes foram o FV Leiden, as mutações para Protrombina G20210A e MTHFR C677T, o síndrome de anticorpos antifosfolípidos e a hiperhomocisteinemia. As mulheres com formas graves de pré-eclâmpsia apresentavam uma probabilidade 17 vezes superior de serem portadoras de trombofilia múltipla.

TROMBOFILIAS ADQUIRIDAS E GRAVIDEZ

As principais "condições trombofílicas" adquiridas incluem o SAAF, a trombocitemia essencial, a hiperhomocisteinemia, a gravidez, a utilização de ACO e THS, a trombocitopenia induzida pela heparina, as neoplasias, a doença de Behçet e a doença inflamatória intestinal¹⁶. O Síndrome de Anticorpos Antifosfolípidos é, no entanto, pela sua especificidade, aquele com maior relevância na área da obstetrícia.

SÍNDROMA DE ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

Em 1950 foi pela primeira vez descrita, em doentes com LES, a existência de um inibidor que *in vitro* bloqueava as reacções de coagulação fosfolípido-dependentes, então denominado anticoagulante lúpico (AL). Alguns destes indivíduos apresentavam também testes serológicos falsos positivos para a sífilis¹⁷. Uma década depois, Bowie *et al* associavam o AL com a existência de trombose venosa¹⁸. Em 1975 foi pela primeira vez descrita a possível relação entre os

anticorpos antifosfolípidos (AAF) e o insucesso obstétrico¹⁹. Desde essa altura vários trabalhos confirmaram uma estreita associação entre os AAF, o aborto recorrente e a morte fetal. No entanto, foi apenas em 1987 que o conceito de Síndrome de Anticorpos Antifosfolípidos (SAAF) foi publicado, chamando a atenção para a existência de uma entidade independente de uma doença autoimune (LES ou outra)²⁰.

Os AAF encontram-se em 2 a 4 % da população obstétrica geral e em 11 a 22 % de mulheres com perda recorrente de gravidez. Os mais bem caracterizados são o anticoagulante lúpico (AL) e a anticardiolipina (aCL). Cerca de 70% das doentes com AL têm também anticorpos contra a cardiolipina, sendo actualmente consensual que o AL é o AAF associado a maior risco de trombose^{21,22}. Recentemente a anti- β -2-Glicoproteína I foi também incluída nos critérios laboratoriais de SAAF²². Uma miríade de outros anticorpos antifosfolípidos: anti-fosfatidilserina, anti-fosfatidiletanolamina, anti-fosfatidilglicerol, anti-fosfatidilcolina, anti-fosfatidilinositol e anti-anexina V, têm também sido descritos. De acordo com os consensos actuais^{22,23}, estes últimos AAF não devem ser considerados com critério para SAAF.

A anticardiolipina, o anticoagulante lúpico e a anti- β -2-Glicoproteína estão associados a perda recorrente de gravidez, e a fenómenos tromboembólicos: o chamado Síndrome de Anticorpos Antifosfolípidos (SAAF)^{22,23}. No entanto, a presença dos AAF deve ser interpretada dentro de um contexto clínico, pois estão ocasionalmente presentes em mulheres sem doença. Apenas níveis moderados ou elevados de aCL devem ser critério para o

SAAF. Os testes devem ser repetidos (pelo menos duas determinações) com intervalo igual ou superior a 12 semanas.

Deve haver pelo menos um critério clínico e um serológico para o diagnóstico de SAAF. Recentemente, no 11.º Congresso Internacional sobre AAF realizado em 2005 em Sidney²², estes critérios foram revistos (Quadro II).

A trombose venosa (TV), particularmente a TV profunda dos membros inferiores, é a manifestação clínica mais frequente do SAAF. Ocorre em

10 a 60 % dos doentes, apresentando cerca de metade destes história de tromboembolismo pulmonar²⁴. As trombozes arteriais mais frequentes (AIT e AVC), atingem o SNC contribuindo para 50% das trombozes arteriais associadas ao SAAF. No entanto, qualquer leito vascular (arterial ou venoso) pode ser atingido, podendo a trombose no SAAF ocorrer em localizações pouco frequentes noutros estados protrombóticos²⁴.

Em mulheres não tratadas, verificam-se 90% de abortos ou mortes fetais, sendo as taxas de prematu-

Quadro II – Critérios para Síndrome de Anticorpos Antifosfolípidos (revisão e actualização)

Deve existir pelo menos um critério clínico e um serológico para o diagnóstico de SAAF.

Critérios Clínicos

1. Trombose Vascular

Um ou mais episódios de trombose arterial, venosa ou de pequenos vasos, confirmado por exames de imagem ou por exame histopatológico

2. Patologia Obstétrica

- a) Uma ou mais mortes in utero inexplicadas de fetos morfológicamente normais (> 10 sem gestação)
- b) Um ou mais nascimentos prematuros (< 34 semanas), de fetos morfológicamente normais, associados a eclâmpsia ou pré-eclâmpsia grave ou insuficiência placentar.
- c) Três ou mais abortos espontâneos consecutivos (< 10 sem), excluídas causas anatómicas, hormonais e cromossómicas

Critérios Laboratoriais

1. Anticoagulante lúpico (AL) positivo em duas ou mais ocasiões, com pelo menos 12 semanas de intervalo, detectado com as normas da *International Society on Thrombosis and Haemostasis*;
2. Ac anticardiolipinas (IgG ou IgM) valores acima do percentil 99 ou > 40GPL ou MPL em duas ou mais ocasiões, com pelo menos 12 semanas de intervalo, medido através de ELISA standart;
3. Anticorpos anti-Beta2-GP1 (IgG ou IgM) valores acima do percentil 99 medidos em duas ou mais ocasiões, com pelo menos 12 semanas de intervalo, medido através de ELISA standart.

In Miyakis S, Lockshin T, Branch D, *et al.* (2006). International Consensus Statment on an update of the Classification criteria for definite antiphospholipid Syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 4: 297.

ridade e restrição de crescimento intra-uterino de 37 e 30%^{21,25}.

A associação entre pré-eclâmpsia e síndrome antifosfolipídica tem também sido descrita em vários estudos^{12,13,14}. Desde o 8.º Encontro Internacional sobre Antifosfolípidos realizado em 1998 em Saporó, os critérios clínicos para este síndrome passaram a incluir o parto antes das 34 semanas de gestação associado a pré-eclâmpsia ou a insuficiência placentar¹³. Num estudo efectuado em 300 grávidas com pré-eclâmpsia severa, 16% apresentavam títulos moderados ou elevados de anticorpos anticardiolipina, resultado concordante com as investigações atrás referidas¹⁵. Na última revisão casuística efectuada na MAC em 51 gestações com SAAF primário foi também encontrada uma taxa de pré-eclâmpsia²⁶ muito elevada (21,5%), o que contrasta com a taxa geral da instituição (6 %).

A evidência de áreas de enfarte e necrose em placentas destas mulheres apontam para fenómenos de trombose ao nível da circulação utero-placentar como causa das perdas fetais. Os anticorpos antifosfolípidos, por lesão directa do endotélio e interferência com os fosfolípidos endoteliais, poderiam levar à diminuição da relação Prostaciclina/Tromboxano, a alterações da função plaquetar, apoptose, e afectar a actividade das proteínas C e S, entre outros. Para além da trombose, a vasculopatia decidual por imunocomplexos e o efeito directo dos AAF no trofoblasto têm sido implicados na perda fetal²⁷. Todos estes mecanismos levariam a tromboses e vasculopatia decidual. Contudo, nenhum deles explica adequadamente a heterogeneidade de complicações obstétricas deste síndrome.

Tendo por base estes pressupostos fisiopatológicos, vários tratamentos têm sido propostos para o SAAF na gravidez. As estratégias iniciais tentaram suprimir o sistema imunitário, tendo os corticoides sido a primeira droga a ser escolhida. A aspirina em doses baixas (60 a 85 mg/dia) é usada, tal como noutras situações obstétricas para suprimir a produção de Tromboxano. A heparina iria actuar no final da cadeia, impedindo o enfarte e a trombose placentar²⁸. Na última década surgiram alguns trabalhos propondo unicamente a aspirina no tratamento destas mulheres mas sem bons resultados²⁹. Em relação à imunoglobulina endovenosa, existem algumas publicações com resultados controversos³⁰. Inicialmente considerada como uma alternativa para a prednisona, a heparina de baixo peso molecular é actualmente, associada à aspirina, o agente com melhores resultados e o recomendado no tratamento deste síndrome na gravidez^{30,31}.

O FUTURO

O futuro reserva-nos de certeza alguns desafios aliantes.

A avaliação da trombofilia fetal, assunto emergente, é ainda controverso. Um papel para o feto nestas mecanismos trombóticos foi sugerido por alguns estudos que demonstraram uma associação entre a mutação para o FV Leiden fetal em gestações associadas a MFIU e enfartes placentares. O sucesso da profilaxia com heparina, medicamento que não passa a barreira placentar, na prevenção destas perdas fetais e tromboses placentares, deixa, no entanto, por explicar o nexo de causalidade entre estas situações.

Por outro lado, a existência de trombozes em placentas de grávidas com antecedentes de insucesso obstétrico, levanta a questão pertinente da eventual existência de trombofilias até agora desconhecidas. Investigações recentes sugerem que novas trombofilias tais como a proteína Z e os polimorfismos para os receptores da proteína C endotelial possam também estar associadas com a perda precoce da gravidez e outras patologias vasculares placentares.

Contudo e depois de toda esta informação, várias questões ainda se levantam:

Qual a prevalência das trombofilias nas diferentes populações?

Que mulheres rastrear? Investigar uma mulher apenas com uma perda fetal e sem outros factores de risco é controverso. Os custos inerentes a um estudo de trombofilia não podem ser menosprezados na política de saúde das populações.

Quem tratar? Será que o nexo de causalidade entre a presença de trombofilia e a complicação obstétrica está bem estabelecido? Justifica os custos e os efeitos secundários de uma terapêutica?

Assim, e até que investigações mais bem desenhadas clarifiquem estes assuntos, os clínicos devem abster-se de efectuar o rastreio indiscriminado de trombofilia, devendo este ser reservado apenas para o estudo de mulheres com antecedentes de trombose arterial ou venosa, e de casos seleccionados de formas graves e precoces de pré-eclâmpsia, DPPNI, RCIU, morte fetal inexplicada e aborto recorrente.

REFERÊNCIAS

1. Seligsohn & Lubetsky (2001). Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med*; 344: 1222-31.
2. Bremme K. (2002). Haemostasis in normal pregnancy. In Brenner, Marder & Conard (Coords.), *Women's Issues in Thrombosis and Hemostasis* (pp. 151-167). Martin Dunitz Ltd, London.
3. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D (1997). Factor V Leiden and MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia. *Thromb Haemost*; 77: 1052-4.
4. Kupferminc M, Eldor A, Steinman N (1999). Increased frequency of thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med*; 340: 9-13.
5. Rigo J, Nagy B, Fintor L (2000). Maternal and neonatal outcome of preeclamptic pregnancies: the potential role of Factor V Leiden mutation and 5,10 MTHFR. *Hypertens Pregnancy*; 19: 163-72.
6. Lindqvist P, Svensson P, Marsaal K, Grenner L, Luterkort M, Dahlback B. (1999). Activated protein C resistance and pregnancy. *Thromb Haemost*; 81: 532-7.
7. Gree I (1999). Thrombosis in pregnancy: maternal and fetal issues. *Lancet*. 353: 1258-65.
8. Kupferminc M, Yair D, Bornstein N, Lessing J, Eldor A (2000) Transient focal neurological deficits during pregnancy in carriers of inherited thrombophilia. *Stroke*; 31:892-5
9. Lissalde-Lavigne G, Fabbro-Peray P, Cochery-Nouvellon E et al (2005). Factor V Leiden and prothrombin G20210A polymorphisms as risk factors for miscarriage during a first intended pregnancy: the matched case-control 'NOHA first' study. *J Thromb Haemost*. 3(10): 2178-84.
10. Dizon-Townson *et al.* (2005). The Relationship of the Factor V Leiden Mutation and Pregnancy Outcomes for Mother and Fetus. *Obstetrics & Gynecology*. 106:517-524.
11. Serrano F, Lermann R, Lopes C, Cardoso A, Nogueira I. "Trombofilia numa população de mulheres com Insucesso Obstétrico". Poster apresentado no 3.º Congresso da Maternidade Dr. Alfredo da Costa, Ginecologia e Obstetrícia no Século XXI. Lisboa, 2005.
13. Sibai B (2005). Thrombophilia and Severe Preeclampsia. *Hypertension*, (Dec): 46(6):1252-3.
14. Serrano F (2006). Trombofilia e Pré-eclâmpsia. *Arq. da Maternidade Alfredo da Costa*. Julho, 50-54.
15. Mello G, Parretti E, et al (2005). Thrombophilia is significantly Associated with severe Preeclampsia. Results of a large-scale, case-controlled study. *Hypertension*, (Dec): 46 (6):1270-74.
16. Dentali F, Crowther M (2006). Acquired Thrombophilia during Pregnancy. *Obstet Gynecol Clin N Am*. 33:375-388.
17. Conley C, Hartmann R (1952). A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 31: 621-622.
18. Bowie E, Thompson J, Pascuzzi C (1963). Thrombosis in Systemic lupus Erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med*. 62:416-430.
19. Nilsson I, Asted B, Hedner U (1975). Intrauterine Death and circulating anticoagulant. *Acta Med Scand*. 197: 153-159.
20. Harris E (1987). Syndrome of the black swan. *Br J Rheumatol*. 26: 324-326.
21. Geis W, Branch W (2001). Obstetric implications of antiphospholipid antibodies: pregnancy loss

- and other complications. *Clinical Obstetrics and Gynecology*; 44 (1), 2-10.
22. Miyakis S, Lockshin T, Branch D *et al* (2006). International Consensus Statement on an update of the Classification criteria for definite antiphospholipid Syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 4: 297.
 23. Wilson W, Gharavi A *et al.* (1999). International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: Report of an International Workshop. *Arthritis & Rheumatism* (42), 1309-11.
 24. Branch D, Eller A (2006). Antiphospholipid Syndrome and Thrombosis. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 49 (4): 861-74.
 25. Branch D (1990). Antiphospholipid antibodies and pregnancy maternal implications. *Seminars in Perinatology*; 14 (2):139-46.
 26. Júlio C, Serrano F, Amaral N, Lermann R, A Borges A, Nogueira I. "Síndrome de Ac. Antifosfolípidos Primário e Gravidez. Experiência de 10 anos". Poster apresentado no III Congresso Internacional do Colégio Ibero-Americano de Reumatologia, Lisboa, 2005.
 27. Mackworth-Young C (2004). Antiphospholipid syndrome: multiple mechanisms. *Clin Exp Immunol*. 136:393-401.
 28. Esplin, M (2001). Management of antiphospholipid syndrome during pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 44 (1):20-28.
 29. Rai R, Cohen H, Dave M, Regan L (1997). Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with antiphospholipid antibodies. *British Medical Journal*, 314:253-257.
 30. Branch D, Peacemen A *et al.* (2000). A multicenter, placebo-controlled pilot study of intravenous immune globulin treatment of antiphospholipid syndrome during pregnancy. *Am J Obst and Gynec*, 182:122-127.
 31. Lima J (2006). Trombofilias e gravidez. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação*. 21 (5):6-23.

ERYTHROCYTE MEMBRANE

Sofia de Oliveira¹

ABSTRACT

In the sixties and seventies erythrocytes, or red blood cells (RBCs), have been extensively studied, much have been learned about this special cell particularly concerning its metabolism and gas transporter function. During the following years RBCs have lost their interest; however in this last decade with use of new approaches and the application of modern techniques, new data become again RBC in an interesting subject of study. Among the new data, one in particular is very poorly understood, I am referring to the adhesion molecules in RBC surface, that until now its presence was recognized and required in the other blood cells (such as neutrophils, lymphocytes, and platelets), or in endothelium cells.

In this paper I will talk about RBC membrane, its composition and organization, focus on its lipid and protein components and functions.

INTRODUCTION

Over the last 40 years red blood cells (RBCs) have been subject of

many studies and articles. Much has been learnt from classical biochemical approaches about RBCs composition and membrane organization. RBCs have a characteristic that make this “simple” cell a unique model of study: ability to maintain its discoid shape and yet allowing cytoskeleton rearrangements that permit it to pass through capillaries. Mature RBCs in blood flow are the product of a differentiation process that starts in the bone marrow as hematopoietic stem cells differentiate to nucleate RBCs. After extrusion of nuclei and degradation of endoplasmic reticulum, reticulocytes emerge in the circulation, where they rapidly develop into mature RBCs 8- μ m biconcave disk and with a 120 days life span¹. During its life-time RBCs protein content and also lipid one, will be affected. RBCs suffer vesiculation processes however they can not synthesized *de novo* proteins or lipids so this leads to a different membrane composition during RBC life.

RBC membrane is composed by: 19.5% (w/w) of water, 39.5% of proteins, 35.1% of lipids and 5.8% of carbohydrates². It has been identified by mass-spectrometry 340 different membrane proteins¹, being Band 3

¹ Unidade de Biologia Microvascular e Inflamação, Instituto de Medicina Molecular, Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, 1649-028 Lisboa Portugal.

(B3) and glycophorin A (GPA) the two most abundant integral proteins of the red cell membrane, present in approximately 10^6 copies per cell^{3,4}. RBC membrane has also lipid-rich domains usually called as lipid rafts or just rafts.

At the beginning RBCs were seen just as a gas transporter, their main function was to assure the transport of oxygen and carbon dioxide to and from tissues. Later RBCs adhesion was associated to functions such occlusion of sites of vascular interruption by platelets or as a preliminary stage in the migration of leukocytes out of blood stream and into tissues⁴. Accordingly, just in the last decade it has become clear that RBCs express on their surface many molecules known to provide adhesion functions in other cells^{5,6,7}. Additionally RBCs are being recognized to have other functions, that 40 years ago were unthinkable, such the transport of iC3b/C3b-carrying immune complexes¹.

In this work I will talk about RBC membrane composition and organization, focus on its lipid and protein components and functions.

RBC membrane lipids

RBC membrane is an asymmetric lipid bilayer and its membrane lipids composition is determinant to RBC shape and membrane fluidity².

The RBC membrane is composed by: 60% of phospholipids, essentially phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), sphingomyelin (SM) and phosphatidylserine (PS). It has also some phospholipidic minor components such as phosphatidylinositol (PI), PI-monophosphate (PIP), PI-4,5-bisphosphate (PIP₂), phosphatidic acid (PA), lysophosphatidylcholine (Lyso-PC) and lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PE). Non-sterified cholesterol represents about 30% of the lipidic RBC compound, and the last 10% are glycolipids².

The asymmetry of the membranes plays an important role in the interactions between the cells and the outer environment. These RBCs have flippases and floppases so they can maintain the asymmetry by a flip-flop mechanism that is ATP-dependent.

In human RBC, PS and PE are located almost exclusively in the inner monolayer where PC and SM are minimally present. This arrangement is crucial to the cell homeostasis. For example, an exposure of PS in the outer surface leads to several mechanisms to achieve cell death, apoptosis².

Mature RBC cannot synthesize lipids *de novo*. Therefore these "simple" cells depend on lipid exchange and acylation of fatty acids, with plasma lipoproteins, as a mechanism for phospholipids repair and renewal².

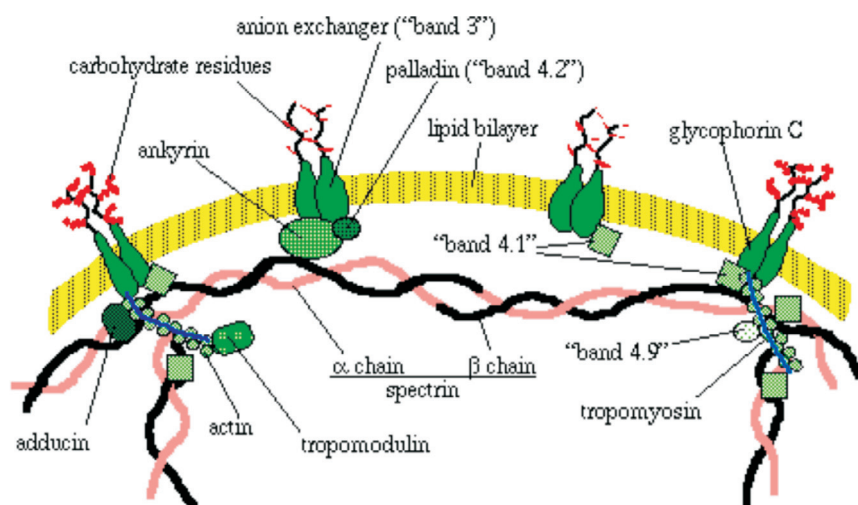


Figure 1 – Diagram of RBC membrane (<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/rbcmembrane.html>)

LIPID-RICH MICRODOMAINS/ LIPID RAFTS

Lipid rafts are characterized by having a low density and being insoluble in cold nonionic detergents. They have several acronyms such as detergent-resistant membranes (DRM), triton-insoluble membranes (TIM) and triton-insoluble floating fractions (TIFF)⁸.

Lipid rafts are membrane microdomains with a high level of organization given by its enrichment in cholesterol and glycosphingolipids (such as gangliosides (Gang) and sulfatides)^{8,9} that contain saturated fatty acylchains^{2,8}. Bulk plasma membrane contains less cholesterol, SM and Gang, and more phospholipids with unsaturated acyl chains. These components ensure a higher fluidity than rafts that have high level of organization and different composition as I said earlier⁹.

Rafts cover over 4% of total RBC membrane proteins¹⁰. The major integral proteins in RBC rafts are stomatin, flotillin-1 and flotillin-2^{2,11}. Duffy protein receptor and glycosylated phosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-proteins: CD55, CD58, CD59) are also characteristic of lipid rafts⁸. Proteins that are associated to rafts become dissociated in the absence of cholesterol.

The size of lipid rafts has been studied in very different approaches that originate some conflicting results and interpretations. A conservative interpretation is that lipid rafts are probably structures with an average diameter in the range of 100nm to 200nm⁹. Not all the lipid rafts have identical protein or lipid composition, for example there is a subclass of these microdomains called caveolae that contains caveolin.

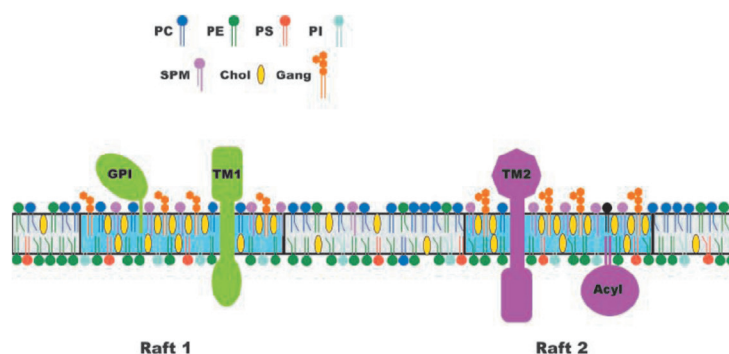


Figure 2 – Diagram of two different types of lipid rafts⁸

RBC MEMBRANE PROTEINS

Membrane proteins can be classified as “peripheral proteins” (for instance spectrin) when apparently are associated with only one face of the bilayer, or “integral proteins” (for example band 3) when they are strongly embedded into or through the lipid bilayer by hydrophobic domains within their amino acid sequences. Alternatively, membrane proteins can be grouped as (1) “cytoskeleton proteins” for those which belong to cytoskeleton, such as spectrin and actin; (2) “integral proteins” for those which are integrated in lipid bilayer, such as Band 3 (B3) and glycoporphins (GPs); and (3) “anchoring proteins” for the ones that instance ankyrin and protein 4.2².

RBC membrane proteins are regulated by several post-translational mechanisms such as phosphorylation, methylation and glycosylation.

INTEGRAL PROTEINS

Band 3 (B3)

Protein B3 is the major integral protein present in RBC membrane

with 12-14 transmembrane (TM) segments³, and there are about 10^6 copies per cell. It is a 911 amino acid multispinning membrane protein with molecular weight of 100KDa, also known as anion exchanger (AE1) that conducts bicarbonate-chloride exchange in RBCs⁴.

Band 3 has an N-terminal cytoplasmic domain (amino acid 1-359) that can be associated to several proteins. This domain is responsible for the main membrane anchorage site to the cytoskeleton. Therefore it is very important for the flexibility and rigidity of RBC. The N-terminal domain is the site for binding of ankyrin, protein 4.2, and protein 4.1- membrane proteins responsible for the anchoring of membrane to RBC cytoskeleton- and also glycolytic enzymes and haemoglobin^{2,3,13-20}. The B3 C-terminal domain (amino acid 360-911) carries out the anion exchange. It is formed by 12-14 TM segments with a short cytoplasmic tail (33 amino acids). Additionally it is responsible for the binding of carbonic anhydrase II^{3,4,13-20}. B3 exists in RBC membrane as dimers (70%), tetramers and higher order oligomers (30%). The tetrameric form binds ba-

sically protein 4.2 and ankyrin⁴. Altogether, B3 and respective associated proteins are known as the B3 macrocomplex. B3 macrocomplex is also related with glycophorin A and RhAG and/or Rh complex⁴.

Band 3 configuration can be modulated by phosphorylation – by action of phosphotyrosine kinases (PTKs) like p53/56^{Lyn} – or dephosphorylation – by phosphotyrosine phosphatase (PTP). These reactions are responsible for example for the release of GEs to the cytoplasm and consequently activation of them^{15,17,21,22}.

Several B3 gene mutations have been already described such as B3 Coimbra, B3 Tuscaloosa, B3 Montefiore and B3 Fukuoka^{2,3,23-25}. Several of these mutations affect RBC cytoskeleton interactions by altering the association point of B3 with ankyrin, protein 4.2 and/or protein 4.1. Others can lead to the reduction of B3 levels in RBC membrane affecting RBC functions in the human body^{4,23-25}

Glycophorins: Glycophorin A (GPA)

Sialic acid residues are abundant in negatively charged RBC surface; this negative net charge is mostly from the sialic residues (60%) present in Glycophorin A (GPA), but also in other glycophorins (GPs), B3 and some glycolipids. These negative surface charges of RBC plays a crucial role in modulating RBC-RBC interactions and as well RBC interactions with vascular endothelium and other circulating blood cells^{2,6}.

Glycophorins or sialoglycoproteins are about 2% of total RBC membrane proteins^{2,26} among there GPA is the major constituent repre-

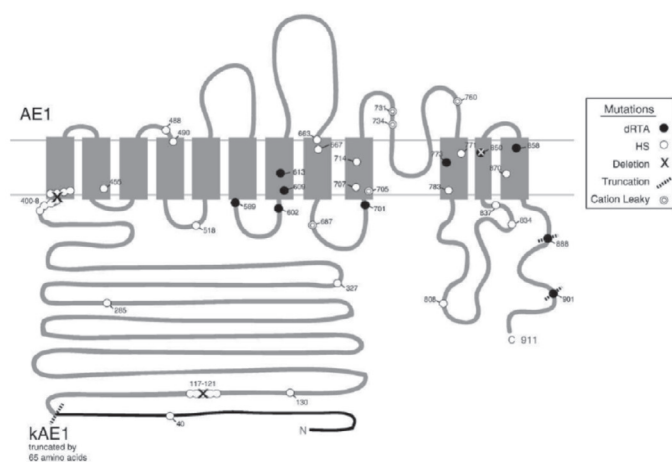


Figure 3 – Illustration of protein Band 3 and its possible mutations⁴

senting 1.6% of total RBC membrane protein. Others such as GPB/E, similar to GPA, and GPC/D are present in lower amount. Interestingly GPC/D are non erythroid-specific.

Glycophorins have three domains¹, a cytoplasmic domain, which contains a cluster of basic residues that are located near the plasma membrane², a hydrophobic domain which exists as a single α -helix spanning the lipid bilayer, and³ a extracellular domain which is heavily glycosylated².

GPA is a 131 amino acid syaloglycoprotein with an extracellular N-terminal. It has a single TM span and a cytosolic C-terminal tail. Nowadays, it is known that there is an important connection between GPA and B3 during their biosynthesis and trafficking to plasma membrane^{2,4}. In fact B3 is critical for GPA synthesis and its stability, and GPA is not indispensable for B3 expression. This GP is associated to B3 in RBC membrane maybe so, it is present in similar amounts than B3 (10^6 copies per cell). The interaction between these two main integral proteins of RBC membrane originate the Wright (Wr^b) antigen^{3,4}. The Wr^b antigen results from by the interaction of Glu⁶⁵⁸ B3 with a site or sites located either near the end of the extracellular domain of GPA or in the adjacent TM domain (TM8)^{3,4}. Additionally antibodies to GPA decrease the lateral and rotational mobility of B3, and monoclonal antibodies of the Wr^b blood type antigen immunoprecipitates both B3 and GPA.

Total surface charge density is not affected in GPA-deficient red cells. However, they exhibit increased glycosylation of B3, probably due to the addition of excessive sialic acid, which should have been present on the GPA

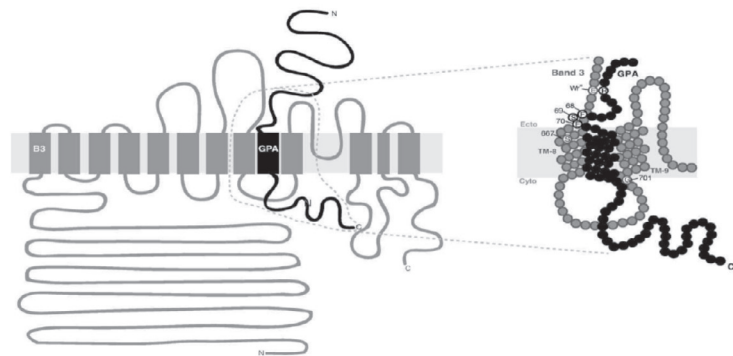


Figure 4 – Illustration of Band 3 and GPA interaction⁴

protein². These cells maintain a normal RBC shape and deformability, thus suggesting that GPA may not be crucial to the RBC mechanical stability, deformability and shape change.

Blood Group Antigens

Human beings are mainly classified into distinct groups according to the ABO blood group system however other blood groups systems have been identified.

There are about 243 different determinants known in RBC membrane that belong to 19 distinct blood group systems.

Some of the more acknowledged are Rh blood group, P blood group, Lutheran blood group, Kell blood group, Lewis blood group, Puffy blood group, Kiddy blood group, LW blood group, li blood group and the Diego and Wright blood group antigens on B3. There are also some other minor blood group antigens such as Chido and the Rodgers blood group systems.

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchor Proteins

GPI anchors are glycolipid complex structures, highly conserved

with a common core region of a PI molecule to which are attached 4 sugars, one N-glucosamine and 3 mannoses.

Many membrane proteins are regulated by GPI anchor proteins such as (1) enzymes (for example acetylcholinesterase); (2) complementary defence proteins (DAF and CD55); (3) immunologic proteins; (4) receptors².

ANCHORING AND CYTOSKELETON PROTEINS

There are two major complexes responsible for the attachment of cytoskeleton network to the RBC membrane. In the first one, B3, as a membrane integral protein, binds to ankyrin/ protein 4.2 as establishing the interactions with the spectrin/actin complex. In the second one, has GPC/D, as membrane integral protein, binds to protein 4.1 complex and establish another interaction to spectrin/actin complex, connecting the RBC membrane to its cytoskeleton^{2,16,18-20,27-34}.

At this point we can assume that “peripheral proteins” can be subdivided into “anchoring” and “cytoskeleton” proteins.

provided into “anchoring” and “cytoskeleton” proteins.

Ankyrin is an anchoring protein and its major role is to create a tight association between spectrin and B3. The binding can be modulated by the extent of phosphorylation by the action of protein kinase A, casein kinase I or cyclic AMP-independent protein kinase. Protein 4.2 is also an anchoring protein that interacts with ankyrin and participates also in B3 macrocomplex structure. This protein has also an important role in the interaction between B3 macrocomplex and Rh complex by its connection with CD47².

Concerning the “cytoskeleton proteins” we have three foremost ones: spectrin α and β , actin and protein 4.1. These three proteins form the “junctional complex”². The erythrocyte membrane-cytoskeleton interactions can be modulated by phosphorylation of 4.1R by PKC, PKA, calmodulin or casein kinase I, which in turns leads to a decrease on the interactions between 4.1R-spectrin-actin and also 4.1R-Band 3 or 4.1R-GPC/D³⁵⁻³⁸.

DISEASE STATES OF RED CELL MEMBRANE

Even nowadays in clinical haematology, RBC shape abnormalities are still widely utilized for first step-diagnoses before further detailed characterization of the phenotypes and genotypes of RBC membrane disorders. An interesting and functional hypothesis has been proposed that RBC membrane disorders can be regarded either as: (1) abnormalities in vertical interactions of membrane components, or (2) those in their horizontal interactions².

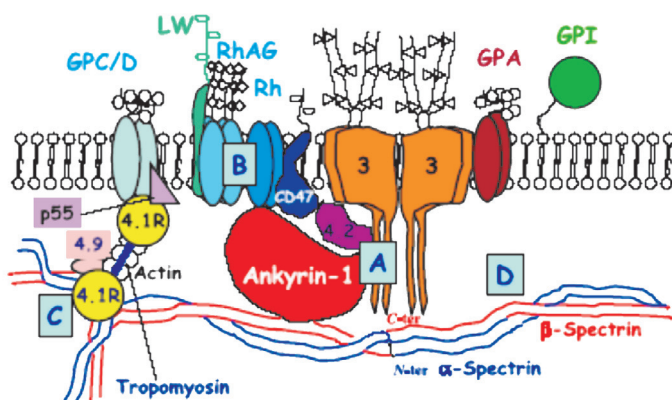


Figure 5 – Diagram of the two major points of interaction between RBC membrane and cytoskeleton. A: Band 3 macrocomplex; B: Rh complex C: Protein 4.1 complex²⁴

An abnormality in vertical interactions occurs mainly in spectrin-ankyrin-B3 interactions, the protein 4.1-GPC linkage and also at the level of the interaction of skeletal proteins with membrane lipids (PE and PS mainly)². The abnormalities in horizontal interactions usually concern either the self-association of spectrin to form its tetramers, which are the most important component of the cytoskeleton network or the interactions of this to protein 4.1 and/or actin².

Mutations in genes that codified proteins are the reason why these RBC membrane disorders occur, and are usually connected to several diseases²³⁻²⁵.

The diseases that are associated to peripheral proteins are Hereditary Spherocytosis (HS), Hereditary Elliptocytosis (HE) and Southeast Asian Ovalocytosis (SAO)^{23-25]}².

For example a deficiency of spectrin occurs in HE and HS while a B3 disorder is associated with SAO or HS too. In Europe about 30% of the cases of HE has a deficiency in protein 4.1 levels in RBC membrane.

Sometimes a deficiency in a protein can lead to a secondary reduction

of another one. This happens for instance with a rare type of HS, where the reduction or even absence of protein 4.2 are associated to the secondary decrease of CD47 levels, affecting the B3 macrocomplex-Rh complex interaction²³⁻²⁵.

RBC ADHESION MOLECULES

RBCs are generally considered nonadhesive cells. However, several studies have reported the expression of a large number of adhesion molecules in RBC^{1,5-7,39-48}. Adhesion molecules play a crucial role in cell-cell, and also cell-tissue, interactions and are also involved in a large range of biological functions such as erythropoiesis (differentiation, maturation, enucleation, and release of RBCs), self-recognition mechanisms, red cell turnover, and cell aging^{6,39,40}. During this aging process some adhesion molecules are down-regulated and others are expressed at different stages and remain on mature RBCs (Table I)³⁹

Mature RBCs express adhesion molecules for instance: CD44, CD47, CD58, LW/ICAM-4, and Lu³⁹. Many of these adhesion proteins belong to

Table I – Adhesion molecules expressed by circulating erythrocytes⁶

Adhesion molecule and alternate name(s)	Ligand/adhesive function
Indian [<i>In</i> / <i>Lu</i>]-related p80, CD44]	Hyaluronan, possibly also fibronectin
Rh-related integrin-associated protein (IAP, CD47)	Thrombospondin
Lymphocyte-associated antigen-3 (LFA-3, CD58)	CD2
CD99, MIC2 gene product	Lymphocyte CD99 is necessary for formation of T-cell rosettes
JMH (semaphorin K1, SEMA7A, CD108)	Possible role in adhesion of activated lymphocytes
Ok ^a (neurothelin, CD147)	Type IV collagen, fibronectin, laminin in other tissues
LW (ICAM-4, CD242)	Leukocyte integrins ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 3$, $\alpha v\beta 1$), platelet integrin ($\alpha IIb\beta 3$), vascular integrin ($\alpha v\beta 3$)
Lutheran (B-CAM/LU, CD239)	Laminin, possibly also integrins
Scianna (ERMAP)	Putative adhesive function
MER2 (CD151)	Forms laminin-binding complexes with integrins
CD36 (reticulocytes only), platelet glycoprotein IV, Nak ^a (platelets)	Thrombospondin (platelets)
VLA-4 (reticulocytes only), $\alpha 4\beta 1$ integrin (CD49d/CD29)	Thrombospondin, VCAM-1, fibronectin

the Immunoglobulin superfamily (IgSF) of proteins⁴⁰. Normal RBCs do not adhere to circulating cells and vessel walls under normal circumstances, suggesting that RBC adhesion molecules could be inaccessible to their ligands. However RBCs become more adherent during for instance normal haemostatic conditions (clot formation), inflammation process, pathologic occlusion conditions and sickle cell disease^{39-41,43}.

The adhesion molecules that I will describe briefly support the idea that RBCs have at least the potential capability of adhering to a number of ligands including thrombospondin, fibrinectin, laminin, hyaluronan, or to cells as endothelial cells and leukocytes.

LW/ICAM-4

LW is also known as ICAM-4 or CD242, this glycoprotein is an erythroid-specific membrane component that has a potential role in adhesion or cell interaction events including hemostasis and thrombosis^{5,6,39-42}. ICAM-4 apparently is expressed as part of the Rh macrocomplex in RBC membrane^{5,6}.

ICAM-4 has several structural similarities to the ICAM family that has as primary cellular counter-receptor leukocyte specific $\beta 2$ integrins⁴⁰. However ICAM-4 is an unusual ICAM because it interacts with several types of integrins expressed on blood and endothelium cells^{39,40,42}. This glycoprotein binds to CD11a/CD18 (LFA-1 or $\alpha_1\beta_2$ integrin), to CD11b/CD18 (Mac-1 or $\alpha_M\beta_2$ integrin), and to α_5 integrins on nonhemopoietic cells; $\alpha_4\beta_1$ on hemopoietic

cells, and $\alpha_{IIb}\beta_3$ on platelets⁴⁰⁻⁴². ICAM-4 as also been recently shown as a ligand for monocyte/macrophage-specific CD11c/CD18⁴⁰.

Selective binding of ICAM-4 to different integrins may be important for a variety of normal RBC function, and also relevant to the pathology of thrombotic events in sickle cell disease.

B-CAM/LU

B-CAM/LU was firstly described as a protein expressed at the basal surface of epithelial cells. This protein has a type-1 transmembrane glycoprotein containing five IgSF domains: two V-types and three C2-types^{5,6,43}.

B-CAM/LU is a laminin receptor relatively inactive in normal RBC surface although is highly expressed in sickle RBCs (SS RBCs) surface. The increase of adhesion to laminin in SS RBCs might be connected with the increase expression of B-CAM/LU in these cells⁴³.

CD47

CD47 is a 50KDa and highly glycosylated plasma membrane. It can also be called as integrin-associated protein (IAP) because its functions have been best studied in relation to integrin signalling. However now that is known that it can also interact with molecules and not just with integrins, CD47 seems to be a more appropriate name⁴⁷. It is a transmembrane glycoprotein with five membrane spanning domains and a single extracellular V-type immunoglobulin super family (IgSF) domain.

This glycoprotein is associated with Rh macrocomplex and with cytoskeleton of intact RBCs, and it is functionally coupled to heterotrimeric Gi proteins, signal regulatory protein (SIRP α), and cholesterol⁴⁴. CD47 is also a thrombospondin (TSP) family member receptor^{5,6,44-47} and it can interact with several integrins of β_1 , β_2 , and β_3 families modulating platelet activation, cell motility and adhesion, and leukocytes adhesion, migration and phagocytosis⁴⁴. CD47 cellular functions are well associated to the Ig domain that is required for the establishment of interactions with its associated integrins, its ligand TSP, and SIRP α ⁴⁴⁻⁴⁷.

In beginning CD47 was also associated to being a product of Rh gene because it was shown that in RBC Rh_{null} the CD47 levels decrease to even more low than usual. Although it is expressed in many different cells types in all tissues and in Rh_{null} individuals have normal levels of CD47 on cells other than RBCs⁴⁷.

In mature RBCs, with lack integrins, CD47 appears to mediate cell-cell interaction with SIRP α of splenic macrophages, to inhibit a phosphorylation cascade that blocks phagocytosis and prevents RBC clearance from the circulation⁴⁵.

As I said, CD47 also binds TSP and, in SS RBC, generate an intracellular signal that increases SS RBC adhesiveness that is associated to vaso-occlusive events⁴⁵⁻⁴⁷. CD47 SS RBCs structure is different from the structure of CD47 expressed in normal RBCs This structural change is responsible for the increase availability of SS RBCs adhere to endothelium using TSP as a mediator, although it levels are similar in the two types of RBCs⁴⁷).

Sialyl Moieties

AS I said before, RBC membrane carries sialylated glycoproteins and glycolipids. The sialic acid is negatively charged at physiological pH so it confers a halo negative charge that involves RBC that is called sometimes as zeta potencial. This charge generally help to prevent the interactions between RBCs and also with other blood cells, however now it appears that sialic acid residues, presented mainly in GPA, could facilitates cell-cell interaction of RBC.

Actually it was previously shown⁴⁸ that RBC are capable of interact, even with low affinity, with P-selectin, a integrin that contributes to the specificity of interactions among endothelial cells, platelets and leukocytes during inflammation, by a Le^{a/b} antigen present in RBC surface. Matsui *et al.* have shown in this study the decrease of adherence of normal and SS RBC to P-selectin, using a P-selective blocking monoclonal antibodies or sialyl Lewis tetrasaccharide. In pre-treating RBCs with sialidase reduces their adherence to activated endothelial cells and immobilized recombinant P-selectin⁴⁸.

Although there are several more sialic acid rich structures in RBC membrane that could be involved in this process with a much higher affinity^{5,6}.

At the end we just can assure that a lot of work has to be made to try to understand this “simple” cell and the processes that she is involved, having always in mind that erythrocyte is not “just” a gas transporter.

REFERENCES

1. Erica M. Pasini, Morten Kirkegaard, Peter Mortensen, Hans U. Lutz, Alan W. Thomas and

- Matthias Mann (2006); In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells; *Blood* 108:791-801.
2. Yoshihito Yawata (2003); *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model*, Chapter Two (27-46), Five (81-113) and Nine (163-172); Wiley-VCH;
 3. J. Poole (2000); Red Cell Antigens on Band 3 and Glycophorin A; *Blood Reviews* 14:31-43.
 4. Rosalind C. Williamson, Ashley M. Toye (2008); Glycophorin A: Band 3 aid; *Blood Cells, Molecules and Diseases* 1-9.
 5. Marilyn J. Telen (2000); Red Blood Cell Surface Adhesion Molecules: Their Possible Roles in Normal Human Physiology and Disease; *Seminars in Hematology* 37(2):130-42.
 6. Marilyn J. Telen (2005); Erythrocyte Adhesion Receptors: Blood Group Antigens and Related Molecules; *Transfusion Medicine Reviews* 19(1): 32-44;
 7. George Garratty, Marilyn J. Telen and Lawrence D. Petz (2002); Red Cell Antigens as Functional Molecules and Obstacles to Transfusion; *Hematology* 445-62.
 8. Linda J. Pike (2003); Lipid Rafts: Bringing Order to Chaos; *Journal of Lipid Research* 44:655-67.
 9. Michael Merten, Christian Beythien, Kai Gutensohn, Peter Kühnl, Thomas Meinertz, Perumal Thiagarajan(2005); Sulfatides Activate Platelets Through P-Selectin and Enhance Platelet and Platelet-Leukocyte Aggregation; *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* 25:258-63.
 10. Benjamin U. Samuel. Narla Mohandas, Travis Harrison, Heather McManus, Wendell Rosse, Marion Reid and Kasturi Haldar (2001); The Role of Cholesterol and Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteins of Erythrocyte Rafts in Regulating Raft Protein Content and Malaria Infection; *The Journal of Biological Chemistry* 276(31): 29 319-29.
 11. Ulrich Salzer and Rainer Prohaska (2001); Stomatin, Flotillin-1 and Flotillin-2 Are Major Integral Proteins of Erythrocyte Lipid Rafts; *Blood* 97(4):1141-3.
 12. Sumanta Basu, Debasis Banerjee, Sarmila Chandra and Abhijit Chakrabarti (2007); Loss of Phospholipid Membrane Asymmetry and Sialylated Glycoconjugates from erythrocyte Surface in Haemoglobin E β -thalassaemia; *British Journal of Haematology* 141:92-9.
 13. Anna Maria Brunati Luciana Bordin, Giulio Clari, Peter James, Manfredo Quadroni, Elisabetta Bariotono, Lorenzo A. Pinna and Arianna Donella-Deana (2000); Sequential phosphorylation of protein band 3 by Syk and Lyn tyrosine kinases in intact human erythrocytes: identification of primary and secondary phosphorylation sites; *Blood* 96:1550-7.
 14. DaChuan Zang, Anatoly Kiyatkin, Jeffrey T. Bollen and Philip S. Low (2000); Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3; *Blood* 96:2925-33.
 15. M. Estela Campanella, Haiyan Chu, and Philip S. Low (2005); Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane; *Proceedings of National Academic sciences* 102:2402-7.
 16. ML Harrison, P Rathinavelu, P Arese, RL Geahlen, and PS Low (1991); Role of band 3 tyrosine phosphorylation in the regulation of erythrocyte glycolysis; *Journal of Biological Chemistry* 266: 4106-11.
 17. Philip S. Low, David P. Allent, Thomas F. Zononcheck, Prema Chari, Barry M. Willardson, Robert L. Geahlen and Marietta L. Harrison (1987); Tyrosine phosphorylation of Band 3 inhibits peripheral protein binding; *The Journal of Biological Chemistry* 262:4592-6.
 18. Roy E. Weber, Wolfgang Voelter, Angela Fago, Hartmut Echner, Estela Campanella and Philip S. Low (2004); Modulation of red cell glycolysis: interactions between vertebrate hemoglobins and cytoplasmic domains of band 3 red cell membrane proteins; *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287:454-64;
 19. Ryuichi Moriyama, Christian R. Lombardo, Ryan F. Workman and Philip S. Low (1993); Regulation of linkages between the erythrocyte membrane and its skeleton by 2,3-DPG; *The Journal of Biological Chemistry* 268:10 990-6.
 20. Yuxun Zhang, Lois R. Manning, Jill Falcones, Orah Platt and James M. Manning (2003); Human erythrocyte membrane band 3 protein influences hemoglobin cooperativity; *The Journal of Biological Chemistry* 278, 39565-39571;
 21. Luciana Bordin, Anna Maria Brunati, Arianna Donella-Deana, Bruno Baggio, Antonio Toninello and Giulio Clari (2002); Band 3 is an anchor protein and a target for SHP-2 tyrosine phosphatase in human erythrocytes; *Blood* 100:276-82.
 22. Yehudit Zipser, Adi Piade, Alexander Barbul, Rafi Korenstein and Nechama S. Kosower (2002); Ca²⁺ promotes erythrocyte band 3 tyrosine phosphorylation via dissociation of phosphotyrosine phosphatase from band 3; *Biochemistry Journal* 368:137-44.
 23. Jean Delaunay; *The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders*; Elsevier, Blood reviews 2006.
 24. MF McMullin (1999); *The molecular basis of disorders of the red cell membrane*; *Journal of Clinical Pathology*, vol. 32, pp. 245-248.
 25. Patrick G Gallagher (2005); *Red cell membrane disorders*; *American society of hematology* pp. 13-18;
 26. Natalia G. de Isla, Bibiana D. Riquelma, Rodolfo J. Rasia, Juana R. Valverde and Jean F. Stoltz (2003); Quantification of Glycophorin A and Glycophorin B on Normal Human RBCs by Flow Cytometry; *Transfusion* 43:1145-52.
 27. Barry M. Willardson, Bernard J.M. Thevenin, Marietta L. Harrison, William M. Kuster, Merrill D. Benson and Philip S. Low (1989); Localization of the ankyrin-binding site on erythrocyte membrane protein band 3; *The Journal of Biological Chemistry* 264:15 893-9.
 28. Diana M. Gilligan and Vann Bennett (1993); The junctional complex of the membrane skeleton; *Seminars in Hematology* 30:74-83.
 29. J. Aura Gimm, Xiuli An, Wataru Nunomura and Narla Mohandas (2002); Functional Characterization of Spectrin-Actin-binding domains in 4.1 family of proteins; *Biochemistry* 41:7275-82.
 30. Lydia Davis, Samuel E. Lux and Vann Bennett (1989); Mapping the Ankyrin-binding site to the human erythrocyte anion exchanger; *The Journal of Biological Chemistry* 264:9665-72.

31. Philip S. Low, Barry M. Willardson; Narla Mohandas, Mary Rossi and Stephen Shohet (1991); Contribution of the Band 3-Ankyrin interaction to erythrocyte membrane mechanical stability; *Blood* 77:1581-6.
32. Vann Bennett and Peter J. Stenbuck (1980); Association between Ankyrin and cytoplasmic domain of Band 3 isolated from the human erythrocyte membrane; *The Journal of Biological Chemistry* 255:6424-32.
33. V. Nicolas, I. Mouro-Chanteloup, C. Lopez, P. Gane, A. Gimm, N. Mohandas, J.-P. Cartron, C. Le Van Kim and Y. Colin (2006); Functional interaction between Rh proteins and the spectrin-based skeleton in erythroid and epithelial cells; *Transfusions Clinique et Biologique* 13:23-8.
34. Xiu-Li An, Yuichi Takakuwa, Wataru Nunomura, Sumie Manno and Narla Mohandas (1996); Modulation of band 3-ankyrin interaction by protein 4.1; *The Journal of Biological Chemistry* 271: 33 187-91;
35. Eleanor Ling, Yuri N. Danilov and Carl M. Cohens (1988); Modulation of red cell band 4.1 function by cAMP-dependent kinase and protein kinase C phosphorylation; *The Journal of Biological Chemistry* 263:2209-16.
36. Sumie Mannot, Yuichi Takakuwa and Narla Mohandas (2005); Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protei 4.1 phosphorylation; *The Journal of Biological Chemistry* 280:7581-7.
37. Yehudit Zipser, Adi Piade, Alexander Barbul, Rafi Korenstein and Nechama S. Kosower (2002); Ca²⁺ promotes erythrocyte band 3 tyrosine phosphorylation via dissociation of phosphotyrosine phosphatase from band 3; *Biochemistry Journal* 368:137-44.
38. Bong-Gyoon Han, Wataru Nunomura, Yuichi Takakuwa, Narla Mohandas and Bing K. Jap (2000); Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization; *Natural Structural and molecular biology* 7:871-5.
39. Patricia Hermand, Pierre Gane, Martine Huet, Vincent Jallus, Cécile Kaplans, H.H. Sonneborn; Jean-Pierre Cartron and Pascal Bailly (2002); Red Cell ICAM-4 Is a Novel Ligand for Platelets-activated α IIb β 3 Integrin; *The Journal of Biological Chemistry* 278(7):4892-8.
40. Eveliina Ihanus, Liisa M. Uotila, Anne Toivanen, Minna Varis and Carl G. Gahmberg (2007); Red-cell ICAM4 Is a Ligand for the Monocyte/Macrophage Integrin CD11c/CD18: Characterization of the Binding Sites on ICAM-4; *Blood* 109(2):802-10.
41. Mukul S. Goel and Scott L. Diamond (2002); Adhesion of Normal erythrocytes at Depresses Venous Shear Rates to Activated Neutrophils, Activated Platelets, and Fibrin Polymerized from Plasma; *Blood* 100(10) 3797-3803;
42. Tosti J. Mankelov, Frances A. Sping, Stephen F. Parsons, R. Leo Brady, Narla Mohandas, Joel A. Chasis, and David J. Anstee (2004); Identification of Critical Amino-acid Residues on the Erythroid Intercellular Adhesion Molecule-4 (ICAM-4) Mediating Adhesion to α V integrin; *Blood* 103 (4): 1503-8.
43. Qin Zen, Maisha Cottman, George Truskey, Robin Fraser, and Marilyn J. Telen (1999); Critical Factors in Basal Cell Adhesion Molecule/Lutheran-mediated Adhesion to Laminin; *The Journal of Biological Chemistry* 274(2):728-34;
44. Eric J. Brown and William A. Frazier (2001); Integrin-associated Protein (CD47) and its Ligands; *TRENDS in Cell Biology* 11(3):130-5.
45. Kris Noel Dahl, Connie M. Westhoff, and Dennis E. Discher (2003); Fractional attachment of CD47 (IAP) to the Erythrocyte Cytoskeleton and Visual Colocalization with Rh Protein Complexes; *Blood* 101(3):1194-9;
46. Julia E. Brittain, Jaewon Hans, Kenneth I. Ataga, Eugene P. Orringer, and Leslie V. Parise (2004); Mechanism of CD47-induced α 4 β 1 Integrin Activation and Adhesion in Sickle Reticulocytes; *The Journal of Biological Chemistry* 279 (41): 42 393-402;
47. Julia E. Brittain, Kathryn J. Mlinar, Christopher S. Anderson, Eugene P. Orringer, and Leslie V. Parise (2001); Integrin-associated Protein is an Adhesion receptor on Sickle Red Blood Cells for Immobilized Thrombospondin; *Blood* 97 (7):2159-64;
48. Neil M. Matsui, Lubor Borsig, Steven D. Rosen, Mitra Yaghmai, Ajit Varki and Stephen H. Embury (2001); P-selectin Mediates the Adhesion of Sickle Erythrocytes to the Endothelium; *Blood* 98(6):1955-62;

SPONTANEOUS MYOCARDIAL INFARCTION IN MICE LACKING ALL NITRIC OXIDE SYNTHASE ISOFORMS

Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K, Yatera Y, Sabanai K, Tanimoto A, Nagasaki M, Tasaki H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Otsuji Y, Yanagihara N.

BACKGROUND

The roles of nitric oxide (NO) in the cardiovascular system have been investigated extensively in pharmacological studies with NO synthase (NOS) inhibitors and in studies with NOS isoform-deficient mice. However, because of the nonspecificity of the NOS inhibitors and the compensatory interactions among NOS isoforms (nNOS, iNOS, and eNOS), the ultimate roles of endogenous NO derived from the entire NOS system are still poorly understood. In this study, we examined this point in mice deficient in all 3 NOS isoforms (triple n/i/eNOS(-/-) mice) that we have recently developed.

METHODS AND RESULTS

The triple n/i/eNOS(-/-) mice, but not singly eNOS(-/-) mice, exhibited markedly reduced survival, possibly due to spontaneous myocardial infarction accompanied by severe coronary arteriosclerotic lesions. Furthermore, the triple n/i/eNOS(-/-) mice manifested phenotypes that resembled

metabolic syndrome in humans, including visceral obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired glucose tolerance. Importantly, activation of the renin-angiotensin system was noted in the triple n/i/eNOS(-/-) mice, and long-term oral treatment with an angiotensin II type 1 receptor blocker significantly suppressed coronary arteriosclerotic lesion formation and the occurrence of spontaneous myocardial infarction and improved the prognosis of those mice, along with ameliorating the metabolic abnormalities.

CONCLUSIONS

These results provide the first direct evidence that genetic disruption of the whole NOS system causes spontaneous myocardial infarction associated with multiple cardiovascular risk factors of metabolic origin in mice *in vivo* through the angiotensin II type 1 receptor pathway, demonstrating the critical role of the endogenous NOS system in maintaining cardiovascular and metabolic homeostasis.

Circulation 2008 29; 117(17): 2211-23