UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**ESTUDO DAS PROTEÍNAS DA MEMBRANA
ERITROCITÁRIA DE MAMÍFEROS DE TREZE
ORDENS DA CLASSE MAMMALIA**

ELVIRA MARIA GUERRA-SHINOHARA

Tese para a obtenção de grau de DOUTOR

Orientador:

Prof. Assoc. Orlando César de O. Barretto

SÃO PAULO
1996

15132

ASUNTO:
2.01.02.00-6
2.02.02.00-0

ELVIRA MARIA GUERRA-SHINOHARA

**ESTUDO DAS PROTEÍNAS DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA
DE MAMÍFEROS DE TREZE ORDENS DA CLASSE
MAMMALIA**

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção do Grau de Doutor

Prof. Assoc. **Orlando César de Oliveira Barretto**

Presidente e Orientador

Prof. Dr. **Paulo Augusto Achucaro Silveira**

1º. Examinador

Prof. Dr. **Nelson Marques**

2º. Examinador

Profa. Dra. **Luiz Otávio de Medeiros**

3º. Examinador

Profa. Dra. **Primavera Borelli**

4º. Examinador

São Paulo, 30 de agosto de 1996.

**Obrigado Senhor pela minha vida, pela minha família,
pelos meus amigos, ... -**

**Às minhas famílias, Guerra e Shinohara, pelo carinho,
incentivo e apoio.**

**Ao meu esposo Sergio Shinohara, pela compreensão,
companheirismo e colaboração.**

Aos meus filhos, Daniel e Pedro Vitor.

Ao Prof. Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto, meu orientador e amigo, cujo conhecimento e orientação levaram a esta tese, pelo estímulo, amizade e confiança.

AGRADECIMENTOS

Às Diretorias do Instituto Adolfo Lutz cujo apoio foi fundamental para a minha capacitação, bem como, pelo decisivo apoio na obtenção de material de consumo.

Ao Laboratório de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por me permitir usar suas dependências para a execução prática deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, Ex-Diretor da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, por todo apoio e amizade nestes anos de Instituto Adolfo Lutz.

Ao Dr. Luiz Ítalo Niero, Chefe da Seção de Hematologia, Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio, e a **Josuelita Gonçalves dos Santos** e **Gizelle Thame** pelo auxílio técnico, e aos demais funcionários da Seção de Hematologia pelo incentivo.

Ao Prof. Dr. Adayr Mahfuz Saliba, Diretor da Fundação Zoológico de São Paulo, pela gentil permissão e apoio na obtenção das amostras de sangue de mamíferos.

Aos Dr. José Daniel Luzes Fedullo, Dra. Sandra Helena Ramiro Correa e Dr. Marcelo A. B.V. Guimarães, da Fundação Zoológico de São Paulo, pelo espírito científico, boa vontade e pela amizade durante todo trabalho.

Aos funcionários da Fundação Zoológico de São Paulo, em especial ao **João Alberto Normanha Lima, Antoninho de Assis Teixeira, Maria José Caldeirane e Denise Martins Sanchez**, pela colaboração e atenção em todos os momentos.

Ao **Prof Dr. Eduardo Harry Birgel**, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, pelo seu conhecimento e disponibilidade de colaborar sempre, abrindo as portas do Laboratório de Pesquisa daquele Departamento.

À **Regina Mieko Sakata Mirandola** e aos pós-graduandos **Thiago de Azevedo Noronha, Patrício Marques de Souza e Juarez Pinto Fernandes Távora**, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo pela colaboração na obtenção das amostras.

Ao **Dr. Adauto Luis Veloso Nunes**, Diretor do Zoológico Municipal de Sorocaba e aos funcionários deste Zoológico, pela colaboração na obtenção das amostras dos mamíferos.

Ao Prof. **Dr. Guilherme Tardim Barbosa**, Diretor da Fundação Rio-Zoo, e aos veterinários **Dr. Luiz Paulo Luzes Fedullo e Dra. Vera Lúcia Oliveira**, pela colaboração na obtenção de amostras, e atenção dispensada em minha visita aquele Zoológico.

À **Dra. Flávia Borgo**, do Departamento de Assistência do Jockey Club de São Paulo pela colaboração na obtenção de amostras de sangue para este trabalho.

Ao **3º Batalhão da Polícia Militar de São Paulo, em nome do Comandante Coutinho**, pela colaboração com amostras de sangue dos cachorros pastor-alemão.

Ao **Dr. Jules M. R. Soto**, Coordenador do Museo Oceanográfico do Vale do Itajaí, da UNIVALI - Universidade do Vale do Itajaí, e também a toda sua equipe, nossos agradecimentos pelo esforço, atenção e espírito

científico, colaborando por várias vezes enviando amostras de sangue mamíferos marinhos.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia - INPA, em nome da **Profa. Dra. Vera M. F. da Silva** do Laboratório de Mamíferos Aquáticos, pela atenção e colaboração no envio de amostras de sangue de peixe-boi e boto da Amazônia.

Aos Veterinários do Biotério do Instituto Adolfo Lutz, **Dr. José Eduardo de Raeffray Barbosa, Dr. José Augusto de Raeffray Barbosa, Dra. Evelyn Oliver Sarmento, Dra. Cintia Pup Genzani e Dra. Thama Cláudia Dias de Miranda**, pela colaboração na obtenção das amostras.

À **Kimiyó Nonoyama, Marilena Oshiro, Leika Mayumi Nakayama, Rosemeire Fagundes Nascimento, Luz Helena Santana Garzon, Sidnéia Bruno e Lara Sbarro**, pelo apoio técnico e convivência no Laboratório de Investigação Médica LIM-23 da Faculdade de Medicina da USP.

À **Sarah Tetner Burstein, Alderica B.M. Luiz e Deolinda Valéria Martins Pereira** da Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz Divisão de Serviços Básicos.

À **Profa. Dra. Adelaíde José Vaz** pela colaboração na revisão do texto.

Ao Pesquisador Científico do Instituto Adolfo Lutz, **Dr. Valter Ruvieri**, pela amizade e colaboração técnica-científica.

À **Kátia Gomes Castellão**, Biologista do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração e amizade em todos os momentos.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, a instituição universitária que tem sido tão importantes para a minha formação.

Às Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani e Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai, do Departamento de Radiologia - Laboratório de Oncologia Experimental, LIM - 24 da Faculdade de Medicina, por permitir a utilização do equipamento de densitometria.

Aos colegas de pós-graduação **Prof. Amauri Antiquera Leite e Profa. Tereza Maria Dantas de Medeiros**, pela colaboração técnica, amizade, pela certeza de que todos os esforços seriam compensados, e por todos os momentos que compartilhamos juntos.

Ao Antonio Roberto de Sousa Ferreira e aos Srs Justino da Silva e José Carlos Barbugian da Seção de Fotografia da Divisão de Serviços Básicos do Instituto Adolfo Lutz, pela paciência e auxílio técnico na realização das fotografias deste trabalho.

Às Chefias das Seções de Vírus Produtores de Exantemas, Bacteriologia e ao Laboratório de Hepatites, da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, por possibilitarem a utilização de alguns equipamentos imprescindíveis à realização deste trabalho.

Aos pós-graduandos do Instituto de Biociências da USP, **Alexandre Reis Percequillo e Gilson Evaristo lack Ximenes** pelo auxílio na classificação dos mamíferos.

Aos Prof. Dr. Hudson Hubner França e Prof Dr. Cássio Rosas, grandes amigos, pelos cuidados e dedicação dispensada.

Aos meus amigos, que de modo direto ou indireto compartilharam comigo todos os momentos ...

ABREVIATURAS

ACD - ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose
BIS - N,N'-metileno -bis - acrilamida
CHCM - concentração da hemoglobina corpuscular média
DFP - diisopropil fluoro-fosfato
EDTA - etileno diamino tetracético
Esp - espectrinas
fl - femtolítros
GAPD- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Ht - hematócrito (%)
Hb - concentração da hemoglobina (g%)
He - número de hemácias (/ mm³)
HCM - hemoglobina corpuscular média
HUM - humano
K₃EDTA - etileno diamino tetracético tripotássico
NEM - N-etilmaleimida
PAS - ácido periódico-Schiff
PEPS- Pepstatin A (isolareryl-val-val-sta-ala-sta)
PHMB - para-hidroximercuribenzoato
PM - peso molecular
PMSF - fluoreto fenil metil sulfonil
PSI - Puro sangue inglês
VCM - volume corpuscular médio
SDS - dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida- dodecil-sulfato de sódio
SEM - sem inibidor de proteases
TEMED - N,N,N',N'- tetraetileno diamino
TLCK - Na-p-Tosil-L-lisina Clorometil Cetona
TRIS - tris-hidroximetilaminometano

ÍNDICE

Páginas

I - INTRODUÇÃO

I.1. - Generalidades.....	1
I.2. - Eritrócito dos mamíferos.....	2
I.3. - Eritrócito do humano	5
I.3.1. - Proteínas da membrana eritrocitária humana	5
I.3.2.- Lípides da membrana eritrocitária humana	14
I.3.3. - Alterações das proteínas da membrana eritrocitária humana	15
I.4. - Estudo das proteases	16

II - OBJETIVOS 20

III - MATERIAL E MÉTODOS

III.1. - Casuística	21
III.2. - Coleta do material	22
III.3. - Determinações hematimétricas	22
III.4. - Estudo da membrana eritrocitária	23
III.4.1. - Preparo do estroma eritrocitário	23
III.4.2. - Dosagem de proteínas e solubilização do estroma	24
III.4.3. - Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	
III.4.3.1.- Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	25
III.4.3.2. - Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE utilizando gradiente exponencial segundo FAIRBANKS	25
III.4.3.3. - Cálculo do peso molecular das bandas das proteínas	26
III.4.3.4. - Critério adotado para a nomenclatura das bandas diferentes	27
III.4. - Soluções utilizadas nas preparações do estromas e das eletroforeses em gel de poliacrilamida (concentração final)	27
III.5. - Procedência dos reagentes	29

IV - RESULTADOS

Taxonomia das espécies estudadas (Tabela 5)	30
Distribuição dos eritrogramas segundo as espécies estudadas (Tabela 6)	34
Morfologia dos eritrócitos dos mamíferos	39
Figuras 13, 14 e 15	45
Tabela 7	46
Figuras 16, 17 e 18	47
Figuras 19, 20, 21, 22, 23 e 24	48

Tabela 8 (ordem <i>Primates</i>)	49
Figuras 25, 26, 27 e 28	50
Tabela 9 (ordem <i>Pinnipedia</i>)	51
Figuras 29, 30, 31, 32, 33 e 34	52
Figuras 35, 36, 37, 38, 39 e 40	53
Tabela 10 (ordem <i>Carnivora</i>)	54
Figuras 41, 42, 43, 44, 45 e 46	56
Figuras 47, 48, 49, 50, 51 e 52	57
Tabela 11 (ordem <i>Rodentia</i>)	58
Figuras 53, 54 e 55	59
Tabelas 12 (ordem <i>Sirenia</i>) e 13 (ordem <i>Chiroptera</i>)	60
Figuras 56, 57, 58, 59, 60 e 61	61
Tabela 14 (ordem <i>Cetacea</i>)	62
Figuras 62, 63 e 64	63
Figuras 65, 66, 67 e 68	64
Figuras 69, 70, 71, 72, 73 e 74	65
Figuras 75, 76, 77, 78, 79 e 80	66
Tabela 15 (ordem <i>Artiodactyla</i>)	67
Figuras 81, 82, 83 e 84	69
Tabelas 16 (ordem <i>Didelphimorphia</i>) e 17 (ordem <i>Lagomorpha</i>)	70
Figuras 85, 86, 87 e 88	71
Tabelas 18 (ordem <i>Proboscidea</i>) e 19 (ordem <i>Edentata</i>)	72
Figuras 89, 90, 91, 92 e 93	73
Tabela 20 (ordem <i>Perissodactyla</i>)	74
 V - DISCUSSÃO	 75
 VI - CONCLUSÕES	 101
 VII - RESUMO	 103
 VIII - ABSTRACT	 104
 VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 105

I - INTRODUÇÃO

I. 1. - GENERALIDADES

Mamíferos são animais que apresentam corpo usualmente coberto com pêlos; pele com várias glândulas; crânio com dois côndilos occipitais; maxilares geralmente com dentes diferenciados, em alvéolos; pernas adaptadas para andar, trepar, cavar, nadar, ou voar; artelhos com garras, unhas ou cascos; coração com quatro câmaras, apenas o arco aórtico esquerdo; pulmões grandes, elásticos; diafragma entre as cavidades torácica e abdominal; macho com pênis; fecundação interna; ovos pequenos ou diminutos, geralmente retidos no útero para o desenvolvimento; fêmeas com glândulas mamárias que secretam leite para alimentar os filhotes; temperatura do corpo regulada (STORER & USINGER, 1991),

Segundo STORER & USINGER (1991), a classe Mammalia é subdividida em duas subclasses. Na subclasse Prototheria esta a ordem *Monotremata*, onde estão os mamíferos que põem ovos (*Ornithorhynchus anatinus* - ornitorrinco). Na subclasse Theria, fazem parte os marsupiais (infraclasse Metatheria) e mamíferos placentários (infraclasse Eutheria).

Várias ordens de mamíferos estão extintas e são elas: *Multituberculata*; *Docodonta*; *Triconodonta*; *Pantotheria* (*Trituberculata*); *Symmetrodonta*; *Tillodontia*; *Taeniodonta*; *Condylarthra*; *Litopterna*; *Notoungulata*; *Astrapotheria*; *Pantodonta*; *Dinocerata*; *Pyrotheria* e *Embrithopoda*.

As demais ordens da classe mammalia, as quais não estão extintas são: *Monotremata*, *Didelphimorphia*, *Insectivora*, *Dermoptera*, *Chiroptera*, *Primates*, *Edentata* (*Xenarthra*), *Pholidota*, *Lagomorpha*, *Rodentia*, *Cetacea*, *Carnivora*, *Tubulidentata*, *Proboscidea*, *Hyracoidea*, *Sirenia*, *Perissodactyla*, *Pinnipedia* e *Artiodactyla*.

Algumas ordens não tem representantes no Brasil e são apresentadas na Tabela 1 com as regiões onde são encontrados.

Tabela 1 - Distribuição das ordens que não tem representantes no Brasil.

ORDEM	LOCAL
<i>Monotremata</i>	Leste da Austrália e Tasmânia
<i>Insectivora</i>	Hemisfério Norte, Índias Ocidentais e África
<i>Dermoptera</i>	Sudeste da Ásia e ilhas adjacentes
<i>Pholidota</i>	África e sudeste da Ásia
<i>Tubulidentata</i>	África
<i>Hyracoidea</i>	África e Síria

No Brasil existem as espécies pertencentes às ordens: *Didelphimorphia*, *Chiroptera*, *Primates*, *Edentata*, *Lagomorpha*, *Rodentia*, *Cetacea*, *Carnivora*, *Proboscidea*, *Sirenia*, *Perissodactyla*, *Pinnipedia* e *Artiodactyla*.

I.2. - ERITRÓCITO DOS MAMÍFEROS

Nos mamíferos, os eritrócitos diferem-se entre si em relação ao seu número, tamanho e forma (JAIN, 1986) e apresenta-se como célula desprovida de núcleo, com citoplasma rico em hemoglobina e membrana celular lipoprotéica; diferindo dos répteis e aves que apresentam eritrócitos nucleados.

Os caprinos, ordem *Artiodactyla*, apresentam eritrócitos de tamanho pequeno com $VCM = 18,54 \pm 1,84$ fl, com número de eritrócitos de $14,1 \times 10^6 \pm 2,45 /mm^3$ de sangue (BIRGEL, 1973) e são muito sensíveis à soluções hipotônicas (JAIN, 1986; PERK e cols., 1964).

O elefante, ordem *Proboscidea*, apresenta eritrócitos macrocíticos, sendo descrito na literatura VCM variando de 114 fl (JAIN, 1986) a 142 fl (NIRMALAN et al, 1967); o número de eritrócitos varia de $3,1$ a $4,1 \times 10^6 / \text{mm}^3$ (JAIN, 1986) e $2,5 \times 10^6 \pm 0,4 / \text{mm}^3$ de sangue (NIRMALAN et al, 1967), número este diminuído quando comparado ao humano.

A família *Cervidae* (cervos e veados) apresentam como característica interessante, o fato de alguns eritrócitos apresentarem a forma falciforme a temperatura ambiente ou a 4°C (WHITTEN, 1967; SIMPSON & TAYLOR, 1974; JAIN, 1986), sendo estas formas reversíveis, e induzidas naqueles animais que são homozigotos para cadeias- β^3 relacionadas ao aumento do pH e da pO_2 (SIMPSON & TAYLOR, 1974). WHITTEN, 1967 relata que estas formas falciformes diferem do eritrócito da anemia falciforme humana, pois as formas falciformes dos cervídeos são induzidas pela oxigenação, ao contrário do que ocorre na anemia falciforme onde ocorre a formação dos tactóides devido a desoxigenação; que estes eritrócitos não são rígidos; que a presença destas formas nos veados são inócuas não causando doença.

Os eritrócitos na família *Camelidae* (camelo, alpaca, lhama e vicunha) apresentam a forma de eliptócitos achatados (BANERJEE et al, 1962; RALSTON, 1975; LIVINE & KUIPER, 1973; JAIN & KEETON, 1974, AL-ALI et al, 1988), sendo muito resistentes à lise osmótica em soluções hipotônicas (PERK, 1963; LIVINE & KUIPER, 1973; YAGIL et al, 1974; KHODADAD & WEINSTEIN, 1983), estáveis à lise por irradiação sônica e à vinblastina (LIVINE & KUIPER, 1973). Os camelos apresentam de 10 a 19×10^6 eritrócitos/ mm^3 com tamanho médio e $7,2$ (comprimento) por $3,5 \mu\text{m}$ de largura (BANERJEE et al, 1962). As membranas dos eritrócitos dos camelídeos também diferem das membranas dos humanos na razão proteínas/lipídeos, apresentando a razão de $3:1$, enquanto que nos humanos esta razão é de $1,25:1$ (EITAN et cols, 1976; KHODADAD & WEINSTEIN, 1983).

O eritrócito humano maduro (circulante no sangue periférico), tem diâmetro de $7-8 \mu\text{m}$, área de superfície de $140 \mu\text{m}^2$, volume de 90 fl , e forma de disco bicôncavo (SCHRIER, 1985). São constituídos por uma membrana

lipoprotéica e um citoplasma rico em hemoglobina. Apresentam a capacidade de sofrer deformações passivas durante as várias passagens pelos microcapilares do baço, sem que sejam destruídos (MOHANDAS & CHASIS, 1993).

As primeiras observações sobre o esqueleto da membrana eritrocitária humana foram feitas por YU et al, em 1973, quando trataram membranas com TRITON X-100, um detergente não-iônico, e observaram que o TRITON X-100 solubilizava quase a totalidade dos lípides e proteínas integrais da membrana. Após a solubilização, havia a manutenção de um retículo protéico, e a forma da célula era preservada. O exame microscópio revelou que o retículo era formado por uma trama fibrilar auto associada, a qual foi chamada de "concha" de Triton (YU et al, 1973).

A membrana eritrocitária é constituída por uma camada bilipídica e um sistema de sustentação protéica. O modelo de membrana proposto por SINGER-NICHOLSON, 1972, mostra uma bicamada lipídica com as proteínas integrais imersas, e apresenta um esqueleto protéico periférico subjacente. (Figura 1)

Figura 1. Modelo do mosaico fluido para a membrana eritrocitária, mostrando a bicamada lipídica, as proteínas integrais representadas por corpos sólidos distribuídos no plano da membrana e pequena porção do citoesqueleto (modificado de SINGER & NICOLSON, 1972).

I.3. - ERITRÓCITO DO HUMANO

1.3.1. - Constituintes da Membrana Eritrocitária Humana

A membrana do eritrócito humano apresenta proporções quase semelhantes de proteínas e lipídeos (1,25:1). (SCHRIER, 1985; EITAN et al, 1976).

O esqueleto protéico é constituído por sua vez por proteínas integrais e proteínas periféricas.

As proteínas integrais são aquelas que possuem um segmento central hidrofóbico que interage com os lipídios da dupla camada lipídica, apresentam um segmento polar glicosilado que se estende para o exterior da hemácia e um outro segmento polar que se estende para a fase interna da membrana. As principais proteínas integrais são a proteína 3 (banda 3), a proteína 4.5 e as glicoforinas. Estas proteínas são extraídas somente através de detergentes fortes como o Triton X-100 (LIU & DERICK, 1992).

As proteínas periféricas são aquelas localizadas na face citossólica ou interna da membrana, mantendo estreitos contatos com a proteína 3, as glicoforinas, e com os lípidos da membrana, de modo que mantêm unidas as moléculas lipídicas, impedindo que os blocos de lípidos se desgarrem. São proteínas periféricas as espectrinas (proteínas 1 e 2), anquirina (proteína 2.1), proteína 4.1, proteína 4.2, dematina ou proteína 4.9, actina ou proteína 5. A extração destas proteínas é feita por tampões de concentrações e pH variáveis (SPEICHER et al, 1982; PALEK, 1995).

As proteínas periféricas constituem o citoesqueleto da membrana, um verdadeiro suporte físico da tênue bicamada lipídica; esta, embora represente a verdadeira separação entre o interior da célula e o meio externo, não possui forças moleculares interlipídicas suficientes para manter os lípidos unidos, necessitando da rede protéica subjacente.

Esta estrutura é estável e garante ao eritrócito a flexibilidade necessária à passagem pelos capilares e poros dos sinusóides esplênicos que apresentam aproximadamente 2 a 3 μm de diâmetro (MOHANDAS & CHASIS, 1993).

Para estudar as proteínas de membrana, foi necessário o uso de um método que após a hemólise dos eritrócitos, deixasse os estromas ou "ghosts" com pouca hemoglobina ligada, o que foi possível graças à lavagens repetidas destas membranas com tampão de baixa força iônica. (DODGE et al, 1963) Os estromas quase isentos de hemoglobina podem ser estudados através de sua desnaturação e posterior eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS (sulfato de dodecil sódio) (LAEMMLI, 1970; FAIRBANKS et al, 1971). Segundo estas técnicas, foi possível separar as proteínas de acordo com seu peso molecular e foram identificadas as bandas, ou as proteínas 1 (α -espectrina), proteína 2 (β -espectrina), proteína 2.1 (anquirina), proteína 3 (banda 3), proteína 4.1, proteína 4.2, proteína 4.5, proteína 4.9 (dematina), proteína 5 (actina), proteína 6 e proteína 7 (tropomiosina) em ordem decrescente do peso molecular, correspondentes a 240, 220, 210, 95, 80, 72, 55, 50, 43, 35 e 31 kDa, respectivamente. (Figura 2).

Figura 2. Posição eletroforética das frações protéicas da membrana eritrocitária em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo os sistemas de: (a) LAEMMLI e cols. , 1970 e (b) FAIRBANKS et al, 1971.

A seguir são apresentadas as principais características e organização protéica dentro da membrana, para cada proteína identificada através da eletroforese em gel de poliacrilamida e evidenciada pelo corante de azul de Coomassie.

I- Espectrinas

As espectrinas são representadas por dois tipos diferentes de proteínas: a proteína 1 ou α -espectrina, de peso molecular 240 kDa e com 2429 aminoácidos, e a proteína 2 ou β -espectrina, de peso molecular 220 kDa, com 2137 aminoácidos, ambas de conformação filamentosa. De cada uma delas há cerca de 200.000 moléculas por célula (MARCHESI & STEERS, 1968; MARCHESI, 1983).

As duas proteínas são compostas de segmentos homólogos repetitivos de 106 aminoácidos. A α -espectrina tem 20 segmentos homólogos e 2 não-homólogos, sendo um situado no centro da sequência e o outro na porção carboxi-terminal. A β -espectrina tem 17 segmentos homólogos repetitivos e segmentos não homólogos NH_2 e COOH terminais, que contem sítio de ligação da actina (NH_2 terminal) e o sítio de fosforilação COOH terminal (PALEK, 1995). A síntese da α -espectrina é regulada pelo gene SPTA1 que está localizado no cromossoma 1 e a β -espectrina pelo gene SPTB que está localizado no cromossoma 14 (PALEK, 1995).

As espectrinas constituem-se no principal componente da organização protéica (BODINE et al, 1984; AGRE, 1992), e elas se associam de maneira característica, sendo que uma molécula de α -espectrina se liga por sua extremidade à outra extremidade de uma molécula de β -espectrina, formando-se o heterodímero. Cada heterodímero se associa lateralmente a um outro heterodímero, mas de modo inverso, de maneira que lateralmente um α -monômero se aproxima de um β -monômero, formando-se assim a unidade fundamental estável, o tetrâmero de espectrina, que irá constituir a base da rede do citoesqueleto (SPEICHER & MARCHESI, 1982; SPEICHER & SPEICHER, 1989; PALEK, 1995), vide Figura 3.

Figura 3. Representação esquemática dos tetrâmeros de espectrinas, unidade fundamental do citoesqueleto da membrana eritrocitária e suas ligações com as proteínas 2.1, banda 3 e complexo juncional (PALEK, 1995).

Cada tetrâmero irá representar os lados e os raios de um hexágono. Este polígono é a forma preferencial de associação dos tetrâmeros de espectrina, embora possa haver pentágonos ou heptágonos (Figura 4).

Figura 4. Formação de polígonos a partir da polimerização da espectrina, conforme demonstrado por microscopia eletrônica de alta resolução da membrana eritrocitária (BARRETTO, 1992, baseado em LIU, 1987).

Os tetrâmeros se ligam entre si, por suas extremidades, através de um complexo juncional constituído pela actina, proteínas 4.1 e 4.9, aducina e tropomiosina; este complexo por sua vez, se liga à proteína integral glicoforina C, através da proteína 4.1. Além desta ligação com a glicoforina C, existe um sítio de ligação do tetrâmero de espectrina com a proteína 3, através da anquirina (proteína 2.1). Figura 5

Figura 5. Complexo juncional formado pela interação entre as proteínas da membrana eritrocitária que promove a formação do citoesqueleto (BARRETTO, 1992 a partir do modelo proposto por BENNET, 1989).

Constitui-se assim a rede básica do citoesqueleto situado na superfície interna da membrana, e este citoesqueleto tem pontos de fixação com as proteínas integrais, a glicoforina C e proteína 3.

II- Anquirina, proteína 2.1 ou sindeína

Esta proteína tem peso molecular de 210 kDa e está presente na quantidade de 100.000 moléculas por célula (BENNETT, 1982; SCHRIER, 1985), na proporção de uma molécula de anquirina para cada tetrâmero de espectrina. A anquirina 2.1 apresenta 1881 aminoácidos e a sua síntese é

regulada pelo gene ANK1 que está localizado no cromossoma 8 (PALEK, 1995). É uma proteína globular, embora assimétrica, com três segmentos: um deles com sítio de ligação para a proteína 3, outro com sítio de ligação para a espectrina, e um segmento regulador (BENNETT & STENBURCK, 1980).

Este segmento regulador sofre alterações na transcrição do mRNA correspondente dando origem a uma família de anquirinas, como as proteínas 2.2, 2.3, 2.4, classificadas até pouco tempo como produtos de degradação da anquirina (LUX et al, 1989). A anquirina é acetilada com ácidos graxos, de significado fisiológico desconhecido. É assim uma proteína que permite a interação entre espectrina e a proteína 3, exercendo papel fundamental na manutenção da estabilidade da membrana.

III- Proteína 3 ou banda 3

É a maior das proteínas integrais da membrana eritrocitária, sendo responsável por 25% da quantidade total de proteína de membrana. O seu peso molecular é de 90 a 100 kDa, e está presente na quantidade de 1.200.000 de moléculas por célula, o gene que regula a síntese da proteína 3 é o EPB3 e está localizado no cromossoma 17 (PALEK, 1995). A banda 3 é encontrada sob a forma de dímeros e tetrâmeros (STECK, 1978), sendo a forma de tetrâmeros a preferencial. Existe, assim, cerca de 250.000 tetrâmeros por célula. A proteína 3, na forma tetramérica, constitui o "canal" através do qual passam água e íons. Juntamente com glicoforina C, a proteína 3 constitui os pontos de fixação do citoesqueleto à membrana através das proteínas 2.1 e 4.9.

Além de ser a mais freqüente proteína transmembrana, com três segmentos, um interno (citoplasmático), outro entrelaçado à camada bilipídica, e um na superfície externa da membrana, esta proteína está também dissolvida no citoplasma.

O segmento citoplasmático é um importante sítio de ligação para várias enzimas glicolíticas como a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e aldolase, a hemoglobina e hemicromos.

A banda 3 é glicosilada em único sítio externo (Asn-642), e o aspecto difuso desta banda na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é devido a heterogeneidade das cadeias N-glican das moléculas individuais da banda 3 (PALEK, 1995).

IV- Proteína 4.1

A proteína 4.1 tem peso molecular de 80 kDa e há cerca de 200.000 moléculas por célula. A síntese desta proteína é regulada pelo gene EL1 que está localizado no cromossoma 1 (PALEK, 1995). É uma proteína com função marcadamente facilitadora de interações; reforça a ligação da espectrina à actina, intermedia a ligação entre a espectrina e a glicoforina C, liga-se à banda 3 e estabelece ligações com lípidos carregados negativamente da superfície interna da bicamada lipídica (TCHERNIA et al, 1981).

De maneira análoga à anquirina, a proteína 4.1 se apresenta sob duas formas, a 4.1a e 4.1b, derivadas de diferentes transcrições do mRNA correspondente. O eritrócito maduro é mais rico em 4.1a e os reticulócitos em 4.1b.

V- Proteína 4.2

A proteína 4.2 tem peso molecular de 72 kDa e está presente na proporção de 100.000 moléculas por célula (COHEN et al, 1993). A síntese da proteína 4.2 é regulada pelo gene EPB42 que está localizado no cromossoma 15 (PALEK, 1995). Esta proteína se liga às proteínas 3, 2.1, 4.1, embora não se saiba exatamente a magnitude de sua importância fisiológica, aparentemente estabiliza a ligação entre a anquirina e a proteína 3 (KORSGREN & COHEN, 1988).

VI- Proteína 4.5

Possui diversos peptídeos e representa a região eletroforética onde se encontra a catalase, uma proteína integral transmembrana envolvida no transporte de glicose nos eritrócitos (SNYDER et al, 1977).

VII- Proteína 4.9 ou dematina

A dematina tem peso molecular 48 kDa e liga-se à actina; sua função é desconhecida, e parece desempenhar função nos eritrócitos jovens (reticulócitos) (SIEGEL & BRANTON, 1983).

VIII- Actina ou proteína 5

É uma proteína com peso molecular de 43 kDa que no eritrócito se organiza em forma de filamento constituído de doze moléculas dispostas em duas fileiras anti-paralelas, cada qual com 6 moléculas, ao longo de outra proteína, a tropomiosina (COHEN, 1983).

A síntese da actina é regulada pelo gene ACTB que está localizado no cromossoma 7 (PALEK, 1995).

Existe cerca de 500.000 moléculas de actina por célula, e a actina participa do complexo juncional constituído pelas proteínas 4.1 e 4.9, proteína C, tropomiosina e aducina.

IX-Proteína 7 ou tropomiosina

É uma proteína composta por dois polipeptídeos de peso molecular de 31 kDa que se encontram na faixa a que se denominou banda 7. A tropomiosina tem a função de estabilizar os filamentos de actina, que se dispõem ao longo da tropomiosina (FOWLER & BENNETT, 1983; FOWLER & BENNETT, 1984).

A síntese da tropomiosina é regulada pelo gene TPM3 que está localizado no cromossoma 1 (PALEK, 1995).

X- Aducina

É uma proteína constituída por dois polipeptídeos de peso molecular 103 kDa e 97 kDa (PALEK, 1995), portanto, pertence à faixa protéica em que domina a proteína 3, formando um heterodímero presente na proporção de 30.000 moléculas por célula, e promove a ligação da actina à espectrina. A ligação da aducina à espectrina é inibida pela proteína 4.1, sugerindo que as duas proteínas possam competir pelo mesmo sítio da espectrina, mas parece

haver favorecimento da ligação da espectrina à proteína 4.1 (MISCHE et al, 1987).

XI- Proteína 6 ou gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase (GAPD)

É uma enzima monomérica, de peso molecular de 35 kDa. Em condições fisiológicas, dois terços do GAPD encontra-se ligado ao segmento citossólico da proteína 3, na forma inativa; a forma ativa é citossólica livre. A GAPD parece não participar das funções de equilíbrio ou da estrutura da membrana, assim como a hemoglobina pode se ligar à proteína 3. Estas formas ligadas à membrana representariam situações de repouso ou de proteção às proteases (KLIMAN & STECK, 1980, TSAI et al, 1982).

A síntese da banda 6 é regulada pelo gene GAPD e está localizado no cromossoma 12 (PALEK, 1995).

XII- Glicoforinas

São diferentes sialoglicoproteínas, com pesos moleculares de 35 a 47 kDa, cujos carboidratos representam 60% da molécula. Quatro glicoforinas são identificáveis através da coloração de PAS à eletroforese em poliacrilamida: A,B,C e D (ANSTEE & TANNER, 1986).

As glicoforinas A e B apresentam resíduos antigênicos dos grupos sanguíneos MNSs e contêm cerca de 90% de ácido siálico que conferem cargas negativas à superfície externa dos eritrócitos. Interagem ainda com a proteína 3 para auxiliar na estabilização do citoesqueleto (SCHRIER, 1985; ANSTEE & TANNER, 1986). As glicoforinas C e D carregam os antígenos do grupo Gerbich.

A glicoforina C é uma importante proteína transmembrana que estabelece contatos extra e intracelulares, ligando-se à proteína 4.1, ligação esta que parece ser importante para sua estabilização na membrana (ANSTEE & TANNER, 1986).

I.3.2. - Lípides da Membrana Eritrocitária Humana

Quase a totalidade dos lípides da membrana é constituída por fosfolípides e por colesterol não esterificado (razão molar de 1,3), o que corresponde a mais de 95% do total lipídico da membrana (PALEK, 1995). O restante é constituído por pequena quantidade de glicolípides, glicerídeos e ácidos graxos livres.

Existe aproximadamente 0,53 - 0,75 micromoles de fosfolípides por miligrama de proteína da membrana eritrocitária, correspondendo a 0,6 mg de fosfolípides por miligrama de membrana

Os fosfolípides estão divididos em subclasses, e na membrana eritrocitária cerca de 30% são constituídos por fosfatidilcolina, 28% por fosfatidiletanolamina, 14% fosfatidilserina e 25% esfingomiélin (SHOHET & BEUTLER, 1990). Estão presentes em quantidades mínimas, fosfatidilinosítídeos, ácido fosfatídico e poliglicerofosfatídeos, que parecem ter importância fisiológica, na modulação da ação de proteínóquinas, do nível de associação protéica da membrana e talvez interferiram no metabolismo do cálcio (SCHRIER, 1985).

A maior parte dos lípides da membrana está arranjada na forma de dupla camada, onde os grupos polares dos fosfolípides ficam posicionados para fora e os grupos não polares para dentro, formando um "core" hidrofóbico.

Esta dupla camada apresenta conformação assimétrica, com os fosfolípides catiónicos, fosfatidilcolina e esfingomiélin, encontrados predominantemente na metade externa da dupla camada, 68% e 70%, respectivamente, enquanto que os fosfolípides aniônicos, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, se localizam na metade interna da dupla camada. Os fosfolípides podem se movimentar no plano em que estão inseridos, e mais raramente, entre as camadas de um plano para o outro.

O colesterol, sendo hidrofóbico, é encontrado no "core" da dupla camada lipídica, entre os dois folhetos de lípides.

1.3.3. - Alterações das proteínas da membrana eritrocitária humana.

Uma série de distúrbios morfológicos do glóbulo vermelho humano está ligada a anomalias das proteínas de membrana ou de suas interações.

A esferocitose é uma doença hereditária caracterizada pela anemia hemolítica, com presença de esferócitos no esfregaço sanguíneo, e o aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos (PALEK & JAROLIN, 1995). As alterações moleculares da esferocitose hereditária são heterogêneas (COHEN et al, 1993), e podem ser divididas nos seguintes subgrupos: deficiência parcial de espectrinas; deficiências parciais combinadas de espectrinas e anquirinas; deficiência parcial da banda 3; deficiência de proteína 4.2 e outros defeitos mais raros (PALEK, 1995). Deficiências parciais de espectrinas tem sido descritas na literatura (AGRE et al, 1982; AGRE et al, 1985; GOMPERTS et al, 1972; MARCHESI et al, 1986), bem como a deficiência de α -espectrinas (MARCHESI et al, 1989); deficiência de β -espectrinas Kissimmee (BECKER et al, 1993); presença de β -espectrina instável (MARCHESI et al, 1992). As deficiências parciais de espectrinas e anquirinas foram relatadas por HANSPAL et al (1991) e COETZER et al (1988), enquanto que deficiências parciais de anquirina foram relatadas por LUX et al, 1990; COSTA et al, 1990. Por outro lado, a deficiência parcial de banda 3 foi relatada por JAROLIN et al (1992) e está relacionada a uma diminuição da densidade das partículas intramembrana e diminuição lateral e rotacional da mobilidade da banda 3.

Segundo PALEK & JAROLIN, 1995, o termo eliptocitose hereditária designa clinicamente, geneticamente, bioquimicamente um grupo heterogêneo de doenças hereditárias que apresentam eritrócitos elípticos. Tem sido descrito na literatura várias alterações protéicas da membrana eritrocitária relacionadas a defeitos na associação dímeros-dímeros das espectrinas em casos de eliptocitose (LIU et al, 1982; COETZER & ZAIL, 1982); deficiência parcial da proteína 4.1 (FEDDAL et al, 1991; FEO et al, 1980; LAMBERT & ZAIL., 1987; TCHERNIA et al, 1981); defeitos qualitativos e quantitativos de proteína 4.2 (CONBOY et al, 1991; CONBOY et al, 1986).

A piropoiquilocitose hereditária é uma doença rara, autossômica recessiva, com presença de micropoiquilocitose e microesferocitose no

esfregação sanguíneo, e os eritrócitos apresentam instabilidade térmica (PALEK, 1995). Tem sido relatado deficiências na associação dímero-dímero das espectrinas e instabilidade da membrana eritrocitária (LIU et al, 1981; KNOWLES et al, 1983a.; KNOWLES et al, 1983b.; PALEK et al, 1981).

I.4. - ESTUDO DAS PROTEASES

O termo protease é sinônimo de hidrolase e inclui todas as hidrolases que quebram ligações peptídicas, classificadas como EC 3.4 pela "Enzyme Commission". As proteases são subdivididas em exopeptidases, cuja ação está dirigida aos agrupamentos terminais aminó ou carboxílicos do peptídeo (EC 3.4.11-19), ou endopeptidases, que são enzimas que quebram ligações peptídicas internas dos peptídeos e que usualmente não contêm aminoácidos carregados terminais nos sítios ativos (EC 3.4.21-24, 99).

Tem sido sugerido que o termo endopeptidase seja utilizado como sinônimo de proteases (BOND & BUTLER, 1987). As endopeptidases são classificadas de acordo com os resíduos catalíticos essenciais e seu sítio ativo. Quatro classes de proteases tem sido identificadas como: serina-proteases (EC 3.4.21), cisteína-proteases (EC 3.4.22), aspartato-proteases (EC 3.4.23) e metalo-proteases (EC 3.4.24).

I.4.1. - Serina-proteases: são caracterizadas pela presença de serina em seu sítio ativo, e o mecanismo catalítico destas proteases envolve a ligação covalente dos substratos a este aminoácido (BOND & BUTLER, 1987). Existem duas famílias de serina-proteases: serina-proteases dos mamíferos, por exemplo a quimiotripsina (EC 3.4.21.1), tripsina (EC 3.4.21.4), elastase (EC 3.4.21.11), calicreína (EC 3.4.21.8) e as serina-proteases das bactérias, por exemplo a subtilisina (EC 3.4.21.14). Elas diferem uma da outra na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional, apesar de ser comum a geometria do sítio ativo e o mecanismo enzimático (NEURATH, 1989).

I.4.2. - Cisteína-proteases: anteriormente chamadas thiol proteases, contem um resíduo cisteína essencial que está envolvido em complexo covalente intermediário com substratos (BOND & BUTLER, 1987). Como exemplo de cisteína-proteases temos várias catepsinas lisossomais, proteases citossólicas ativadas pelo cálcio (calpains), proteases de planta (papaína e actidina). A papaína (EC 3.4.22.2) é a protease mais estudada das cisteínas-proteases (NEURATH, 1989).

I.4.3 - Aspartato-proteases: anteriormente chamadas de ácido-proteases, contem dois resíduos aspartato nos seus centros ativos, que estão envolvidos com a catálise. São exemplos de aspártico-proteases penicillopepsina bacteriana (EC 3.4.23.6), pepsina dos mamíferos (EC 3.4.23.1), e certas proteases dos fungos (NEURATH, 1989).

I.4.4 - Metallo-proteases: contem íons metálicos (usualmente zinco) no centro ativo. Os íons metálicos são uma parte integral de suas estruturas, e provavelmente aumenta a nucleofilicidade da H_2O e polariza a ligação peptídica para ser quebrada anteriormente pelo ataque nucleofílico. São exemplos, as carboxipeptidases A e carboxipeptidases B.

I.4.5 - Proteases de mecanismo catalítico desconhecidos são designadas temporariamente como EC 3.4.99, até que sejam totalmente purificadas e classificadas segundo o seu mecanismo de ação.

As proteases podem ser determinadas através do uso de inibidores de cada grupo, embora os inibidores possam inibir outro grupo.

I.4.6. - Inibidores de proteases

I.4.6.1. -Inibidores de serina-proteases

Todas as serina-proteases são inibidas pelo diisopropil-fluorofosfato (DFP), muitas pelo fenilmetilsulfonil -fluoride (PMSF), algumas pelo clorometil cetona (TLCK - N-p-tosil-L lisina clorometil cetona ou TPCK (l-1-tosylamido-2-feniletil clorometil cetona) (NEURATH, 1989). O DFP e o PMSF são inibidores irreversíveis.

I.4.6.2. -Inibidores de cisteína-proteases

O PMSF e clorometil cetonas podem também inibir algumas cisteínas proteases (BOND & BUTLER, 1987).

As cisteínas proteases são inibidas através de baixas concentrações de para-hidroximercuribenzoato, e reagentes alquilantes (tais como iodoacetato, iodoacetamida, e N-etilmaleimida - NEM) (NEURATH, 1989). O NEM e o para-hidroximercuribenzoato não são específicos para cisteínas-proteases podendo inativar outras proteínas (NORTH, 1989).

I.4.6.3. - Inibidores de aspartato-proteases

As aspartato-proteases são inibidas pelas pepstatinas (pentapeptídeos acilados isoladas dos actinomicetos; componentes diazoacetil, tais como diazoacetil-L-phe-metil ester, também as inibem mas poderão também inibir outras proteases. São inibidores reversíveis e apresentam solubilidade limitada (NORTH, 1989).

I.4.6.4. -Inibidores de metalo-proteases

As metalo-proteases são inibidas por agentes quelantes tais como o EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) e 1,10 fenantrolina. Estes inibidores são reversíveis, podem também desestabilizar algumas serinas-proteases.

Tabela 2 - Classes de proteases, E.C., exemplos de proteases e inibidores de proteases.

PROTEASES	E.C.	PROTEASES MAIS COMUNS	INIBIDORES (MODO DE AÇÃO)
Serina-proteases	3.4.21	quimiotripsina, tripsina, calicreína, etc	DFP (irreversível) PMSF (irreversível) TLCK (irreversível)
Cisteína-proteases	3.4.22	catepsinas lisossomais (B,L,H,N,S,M,T), calpainas, etc	PHMB (irreversível), NEM (irreversível), PMSF e TLCK.
Aspartato-proteases	3.4.23	catepsina D e E, pepsina	PEPSTATIN A (reversível)
Metalo-proteases	3.4.24	termolisina	EDTA (reversível)
Proteases de mecanismo catalítico desconhecido	3.4.99		

II - OBJETIVOS

Uma vez que na literatura há alguns relatos de estudos de proteínas de membrana eritrocitária de mamíferos isolados mas não um estudo comparativo, propôs-se:

II.1. - Estudar sistematicamente as proteínas da membrana eritrocitária de mamíferos e classificá-las de acordo com seu peso molecular.

II.2. - Verificar se as eventuais frações protéicas observadas eram reais novas bandas protéicas ou produtos de proteólise.

III - MATERIAL E MÉTODOS

III.1. - CASUÍSTICA

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de animais adultos, de ambos os sexos, da classe Mammalia pertencentes as ordens: *Primates*, *Pinnipedia*, *Carnivora*, *Rodentia*, *Proboscidea*, *Didelphimorphia*, *Lagomorpha*, *Sirenia*, *Artiodactyla*, *Perissodactyla*, *Cetacea*, *Edentata* e *Chiroptera*.

Os animais estudados foram provenientes: da Fundação Zoológico de São Paulo, do Zoológico Municipal de Sorocaba, do Zoológico do Rio de Janeiro (Fundação Rio- Zoo), do Biotério do Instituto Adolfo Lutz, do 3o. Batalhão de Choque da Polícia Militar do Estado de São Paulo, do Jockey Club de São Paulo, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, da Associação Paulista dos Criadores de Caprinos, do Museo Oceanográfico da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) e do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

Foram estudadas 1 espécie da ordem *Didelphimorphia*, 7 espécies da ordem *Primates*, 2 da ordem *Pinnipedia*, 11 da ordem *Carnivora*, 6 da ordem *Rodentia*, 1 da ordem *Edentata*, 1 da *Lagomorpha*, 1 da ordem *Proboscidea*, 9 espécies da ordem *Artiodactyla*, 2 da ordem *Perissodactyla*, 3 da ordem *Cetacea*, 1 da Ordem *Sirenia* e 1 da *Chiroptera*.

Para cada animal foi preenchido um protocolo com as seguintes informações: nome científico e popular da espécie, condições de saúde e sexo do mamífero.

Foram realizados eritrogramas para excluir deste estudo quaisquer animais que apresentassem distúrbios hematológicos.

Foram estudados vinte humanos voluntários saudáveis, funcionários do Instituto Adolfo Lutz, que serviram como padrão

controle das proteínas de membrana eritrocitária. Para cada um destes indivíduos, foram realizados o hemograma e curva de fragilidade osmótica.

III.2. - COLETA DO MATERIAL

Foram colhidas amostras de sangue utilizando o anticoagulante ACD e K_3EDTA . O sangue colhido com ACD foi utilizado para o estudo das proteínas de membrana eritrocitária e aquele colhido com K_3EDTA foi utilizado para determinações hematimétricas. O sangue após a coleta, foi mantido a 4°C até o seu processamento. Na hora da coleta, foram realizados os esfregaços sanguíneos sem a presença de anticoagulante.

III.3. - DETERMINAÇÕES HEMATIMÉTRICAS

Foram determinados o número de eritrócitos, a concentração de hemoglobina, o hematócrito, o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos eritrócitos dos mamíferos.

A determinação do hematócrito foi realizada tal como é padronizada para sangue de humanos. No entanto, para os sangues de ovinos e caprinos, os capilares de hematócrito foram centrifugados por maior tempo, 10 a 15 minutos, respectivamente (JAIN, 1986).

A avaliação da morfologia da série eritrocitária foi realizada em esfregaços de sangue periférico, após coloração pelo corante de Leishmann.

Os esfregaços sanguíneos de todos os animais foram fotografados, em um único dia, sob as mesmas condições de luz, aumento de 1.000 X, no mesmo microscópio para comparação do tamanho dos eritrócitos.

Para os eritrócitos dos voluntários humanos foram realizadas as curvas de fragilidade osmótica segundo DACIE & LEWIS, 1985, após a coleta do sangue e incubadas por 24 horas.

III. 4. - ESTUDO DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA

III. 4.1- Preparo do estroma eritrocitário

O sangue total de todas as amostras foi centrifugado a 4°C, 1.000 X g por 15 minutos para a retirada do plasma, leucócitos e plaquetas. Em seguida, os eritrócitos foram lavados três vezes em solução de NaCl 154 mM a 4°C, aliquotados em oito partes, posteriormente lisados em tampão fosfato de baixa força iônica (5mM e pH 8,0) segundo DODGE e cols.,(1963), na proporção de 1:40, contendo diferentes inibidores de proteases (Tabela 3).

Foram realizadas várias lavagens com o tampão fosfato de baixa força iônica, até que os estromas ficassem totalmente livres de hemoglobina. Após a preparação, estes estromas foram aliquotados e mantidos a -70°C até a realização das eletroforeses.

Tabela 3 - Classificação das proteases e de seus inibidores, e as concentrações finais dos inibidores no tampão de lise dos eritrócitos

Alíquota	Inibidores de proteases	Classes das proteases	Concentração final
1	SEM INIBIDOR	-----	-----
2	PMSF	cisteína/serina - proteases	200 μ M
3	NEM	cisteína - proteases	200 μ M
4	EDTA	metalo - proteases	1000 μ M
5	DFP	serina - proteases	100 μ M
6	TLCK	cisteína/serina - proteases	100 μ M
7	PEPSTATIN	aspartato - proteases	1 μ M
8	POOL (todos inibidores)	serina/cisteína/aspartato e metalo-proteases	(nas mesmas concentrações)

A alíquota 8 foi preparada com o pool de inibidores, utilizando os inibidores PMSF, NEM, EDTA, DFP, TLCK e Pepstatin em concentrações finais iguais àquelas apresentadas na tabela.

III. 4.2. - Dosagem de proteínas e solubilização do estroma

A concentração de proteínas dos estromas foram determinadas pelo método de LOWRY (1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão. A solubilização das proteínas foi feita por adição de solução solubilizante (vide III.5.2) aos estromas na proporção de 1:2 (solubilizante/estroma), e incubação em banho-maria fervente, durante 5 minutos.

III.4.3. - Eletroforeses em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo LAEMMLI (1970) e segundo FAIRBANKS e cols. (1971).

III.4.3.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Foram utilizadas placas de vidro de 12,5 por 16,5 centímetros e espaçadores de 1mm de espessura.

Foi utilizado gel de corrida com 10% de acrilamida e gel de alinhamento com 3% de acrilamida, segundo LAEMMLI, 1970. Foram aplicados volumes de estromas solubilizados correspondentes a 80 μ g de proteínas. A corrida eletroforética foi feita a 25 volts, durante 18 horas, em tampão Tris-glicina pH 8,3 (Tris 0,05M e glicina 0,4M), contendo SDS 3,468 mM (0,1%).

Após a corrida eletroforética, foi feita a coloração do gel em solução contendo azul de Comassie R 0,605 mM, *overnight*, e posterior descoloração em solução de ácido acético a 10%.

A seguir as placas foram fotografadas e realizadas as densitometrias através do densitômetro Ultrosan XL Laser, LKB BROMMA - PHARMACIA, com software gelscan/92.

III.4.3.2. - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando gradiente exponencial segundo FAIRBANKS e cols. (1971)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando gradiente exponencial é indicada para a determinação de proteínas de altos pesos moleculares, evidenciando bem as espectrinas (1 e 2) e as anquirinas.

Foram utilizadas placas de vidro com 15,5 por 16,5 cm, e espaçadores de 1 mm.

Foram feitas placas em geis de poliacrilamida em gradiente exponencial com concentrações variando de 3 a 17% de acrilamida, e gel alinhador com 3% de acrilamida. Foram aplicados volumes de ghost correspondentes a 100 µg de proteínas. A corrida eletroforética foi feita a 25 volts durante 24 horas, em tampão Tris-acetato EDTA pH 7,4 (Tris 40mM, acetato de sódio 20mM, EDTA 2mM), contendo SDS 3,468 mM (0,1%).

As placas de gel em gradiente exponencial foram coradas com solução contendo azul de Comassie R 0,605 mM, *overnight*, e após descoradas com solução de ácido acético a 10%. A seguir as placas foram fotografadas.

As densitometrias foram realizadas através do densitômetro Ultrosan XL Laser, LKB BROMMA - PHARMACIA, com software gelscan/92.

III.4.3.3. - Cálculo de peso molecular (PM) das bandas de proteínas

Foram calculados os pesos moleculares das diversas proteínas segundo WEBER & OSBORN (1969), utilizando como padrão primário os kits da PHARMACIA de alto e baixo peso molecular, que continham as proteínas miosina (PM 212 kDa); α 2-macroglobulina (PM 170 kDa); β -galactosidase (PM 116 kDa); transferrina (PM 76 kDa); desidrogenase glutâmica (PM 53 kDa), fosforilase B (94 kDa); albumina (67 kDa); ovoalbumina (43kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor da tripsina (20,1 kDa) e α lactoalbumina (14,4 kDa) (PHARMACIA, Sweden), e como padrão secundário foram utilizados os estromas de membrana eritrocitária humana, de pesos moleculares conhecidos.

Os pesos moleculares foram determinados usando-se as mobilidades encontradas no SDS-PAGE a 10% de poliacrilamida, através do software gelscan/92 da PHARMACIA.

III.4.3.4.- Critério adotado para a nomenclatura das bandas diferentes

As bandas encontradas que diferem daquelas do padrão humano foram identificadas pela nomenclatura da banda de peso molecular imediatamente superior, acrescidas de X_1 , X_2 , ...

III.5. - SOLUÇÕES UTILIZADAS NAS PREPARAÇÕES DOS ESTROMAS E DAS ELETROFORESES EM GEL DE POLIACRILAMIDA (CONCENTRAÇÃO FINAL).

III.5.1. - Tampão de lise dos eritrócitos

tampão fosfato de sódio 5mM pH 8,0

III.5.2. - Solução solubilizante

Tris 0,154 M pH 6,8; glicerol 3,575 M; SDS 0,107 M; Azul de bromofenol 0,0574 mM e dithiothreitol 0,384 M.

III.5.3- Gel de alinhamento (*stacking gel*) com 3% acrilamida.

Tris 125 mM pH 6,8; SDS 3,466 mM (0,1%); acrilamida 422 mM; Bis 5,186 mM; persulfato de amonio 4,380 mM e TEMED 3,298 mM.

III.5.4.- Gel de corrida (*running gel*) com 10% de acrilamida

Tris 375 mM pH 8,8; SDS 3,456 mM (0,1%); acrilamida 1,405 M; Bis 17,272 (8,25 ml); persulfato de amonio 1,459 mM e TEMED 1,651 mM.

III.5.5.- Gel de corrida para gradiente exponencial

Gel A - Acrilamida 595 mM (4,23%); BIS 10,282 mM; persulfato de amonio 6,792 mM; TEMED 1,883mM; SDS 8,306 mM (0,24%);

Tampão 10 x Fairbanks , pH 7,4.

- Tris 46,51 mM
- Acetato de sódio 23,26 mM
- EDTA 2,326 mM

Gel B - Acrilamida 2,781 M (19,8%); BIS 48,08 mM; Persulfato de amonio 1,911 mM; TEMED 1,775 mM; SDS 8,064 (0,12%); glicerol 0,971 M;

Tampão 10 x Fairbanks, pH 7,4

- Tris 46,51 mM
- Acetato de sódio 23,26 mM
- EDTA 2,326 mM

Estas duas soluções foram colocadas em um formador de gradiente (BIO-RAD) e distribuídos com o auxílio de uma bomba peristáltica (INCIBRÁS BP-100), conferindo um gradiente exponencial de 3,0 a 17% de acrilamida.

III.5.6.- Tampão de corrida (LAEMMLI)

Tris 0,05M; glicina 0,4M e SDS 3,468 mM (0,1%).

III.5.7.- Tampão 10 X FAIRBANKS, (estoque)

Tris 400mM; acetato de sódio 200mM e EDTA 20mM.

III.5.8.- Tampão de corrida para eletroforese em gradiente exponencial (FAIRBANKS)

Tampão 10 x Fairbanks pH 7,4

- Tris 40 mM
- Acetato de sódio 20 mM
- EDTA 2mM

SDS 3,468 mM (0,1%)

III.5.9.- Solução de azul de Coomassie R-250 a 0,05%

Azul de Coomassie R-250 0,605 mM; ácido acético 1,749 mM; isopropanol 3,253 M.

III.6. - PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES

Tabela 4 - Procedência dos reagentes

REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Acetato de sódio	Mallinckrodt- Quimis
Ácido acético glacial	Merck
Ácido cítrico	Vetec
Acrilamida	BIO-RAD
Azul de Coomassie	BIO-RAD
Azul de bromofenol	BIO-RAD
BIS (N, N'-metileno-bis-acrilamida)	BIO-RAD
Citrato de sódio	Merck
Dextrose	Reagen
Dithiothreitol	BIO-RAD
DFP (diisopropil fluoro-fosfato)	SIGMA
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
Glicina	BIO-RAD
Glicerol	Merck
EDTA (etileno diamino tetracético)	Merck (Tritriplex III)
Isopropanol	Merck
NEM (N-etilmaleimida)	SIGMA
Persulfato de amônio	BIO-RAD
PHMB (p-hidroximercuribenzoato)	SIGMA
Pepstatin A (isovaleril-val-val-sta-ala-sta)	SIGMA
PMSF (fluoreto fenil metil sulfonil)	SIGMA
SDS (dodecil sulfato de sódio)	SIGMA
TEMED (N,N,N',N'-tetraetileno diamino)	BIO-RAD
TLCK (Na-p-Tosil-L-lisina Clorometil Cetona)	SIGMA
TRIS (tris-hidroximetilaminometano)	BIO-RAD

RESULTADOS

Tabela 5 - Taxonomia das espécies estudadas segundo as ordens e famílias a que pertencem (WILSON & REEDER, 1993).

ORDEM	FAMÍLIA	ESPÉCIE	NUMERO DE ANIMAIS (n)	NOME POPULAR
<i>Didelphimorphia</i>	Didelphidae	<i>Didelphis marsupialis</i>	8	Gambá
<i>Primates</i>	Cebidae	<i>Cebus apella</i>	15	Macaco prego
<i>Primates</i>	Cebidae	<i>Alouatta sp</i>	6	Bugio
<i>Primates</i>	Cebidae	<i>Ateles paniscus chamek</i>	4	Macaco Aranha
<i>Primates</i>	Pongidae	<i>Gorilla gorilla</i>	1	Gorila
<i>Primates</i>	Pongidae	<i>Pongo pygmaeus</i>	2	Orangotango
<i>Primates</i>	Cercopithecidae	<i>Erythrocebus pata</i>	2	Macaco pata
<i>Primates</i>	Cercopithecidae	<i>Papio cynocephalus</i>	1	Babuíno
<i>Pinnipedia</i>	Otariidae	<i>Arctocephalus tropicalis</i>	2	Lobo marinho subantártico
<i>Pinnipedia</i>	Otariidae	<i>Arctocephalus australis</i>	1	Lobo marinho das ilhas do sul
<i>Carnivora</i>	Felidae	<i>Acinonyx jubatus</i>	1	Guepardo

ORDEM	FAMÍLIA	ESPÉCIE	NUMERO DE ANIMAIS (n)	NOME POPULAR
<i>Carnivora</i>	Felidae	<i>Felis concolor</i>	1	Suçuarana
<i>Carnivora</i>	Felidae	<i>Panthera onca</i>	3	Onça
<i>Carnivora</i>	Felidae	<i>Panthera leo</i>	6	Leão
<i>Carnivora</i>	Felidae	<i>Panthera tigris</i>	2	Tigre
<i>Carnivora</i>	Felidae	<i>Panthera pardus</i>	2	Leopardo
<i>Carnivora</i>	Procyonidae	<i>Procyon cancrivorus</i>	1	Mão Pelada
<i>Carnivora</i>	Procyonidae	<i>Nasua nasua</i>	6	Quati
<i>Carnivora</i>	Canidae	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	6	Lobo guará
<i>Carnivora</i>	Canidae	<i>Cerdocyon thous</i>	6	Cachorro do mato
<i>Carnivora</i>	Canidae	<i>Canis familiaris</i>	13	Cachorro Pastor Alemão
<i>Rodentia</i>	Caviidae	<i>Cavia porcellus</i>	14	Cobaia
<i>Rodentia</i>	Muridae	<i>Rattus norvegicus</i>	9	Rato - Sprague Dawley

Continuação da Tabela 5.

ORDEM	FAMÍLIA	ESPÉCIE	NUMERO DE ANIMAIS (n)	NOME POPULAR
<i>Rodentia</i>	Muridae	<i>Mus musculus</i>	12	Camundongo - Swiss
<i>Rodentia</i>	Myocastoridae	<i>Myocastor coypus</i>	2	Ratão do banhado
<i>Rodentia</i>	Dasyproctidae	<i>Dasyprocta sp.</i>	4	Cutia
<i>Rodentia</i>	Cricetidae	<i>Mesocricetus auratus</i>	8	Hamster
<i>Lagomorpha</i>	Leporidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	15	Coelho - Nova Zelândia
<i>Edentata</i>	Bradypodidae	<i>Bradypus tridactylus</i>	2	Bicho preguiça
<i>Proboscidea</i>	Elephantidae	<i>Elephas maximus</i>	1	Elefante
<i>Artiodactyla</i>	Camelidae	<i>Camelus bactrianus</i>	3	Camelo
<i>Artiodactyla</i>	Giraffidae	<i>Giraffa camelopardalis</i>	1	Girafa
<i>Artiodactyla</i>	Cervidae	<i>Cervus elaphus</i>	2	Cervo nobre
<i>Artiodactyla</i>	Cervidae	<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	1	Veado campeiro
<i>Artiodactyla</i>	Cervidae	<i>Mazama gouazoubira</i>	3	Veado catigueiro
<i>Artiodactyla</i>	Bovidae	<i>Ovis aries</i>	15	Carneiro

Continuação da Tabela 5.

ORDEM	FAMÍLIA	ESPÉCIE	NUMERO DE ANIMAIS (n)	NOME POPULAR
<i>Artiodactyla</i>	Bovidae	<i>Bos taurus</i>	6	Boi - taurino
<i>Artiodactyla</i>	Bovidae	<i>Bos indicus</i>	15	Boi - zebuino
<i>Artiodactyla</i>	Bovidae	Híbrido <i>Bos indicus/ Bos taurus</i>	2	Boi - Girolanda
<i>Artiodactyla</i>	Bovidae	<i>Capra hircus</i>	19	Cabra alpina
<i>Perissodactyla</i>	Tapiridae	<i>Tapirus terrestres</i>	1	Anta
<i>Perissodactyla</i>	Equidae	<i>Equus caballus</i>	13	Cavalo puro sangue inglês
<i>Perissodactyla</i>	Equidae	<i>Equus caballus</i>	6	Cavalo mangalarga
<i>Cetacea</i>	Platanistidae	<i>Pontoporia blainvillei</i>	1	Toninha ou Franciscana
<i>Cetacea</i>	Iniidae	<i>Inia geoffrensis</i>	6	Boto da Amazônia
<i>Cetacea</i>	Delphinidae	<i>Stenella frontalis</i>	1	Golfinho pintado
<i>Chiroptera</i>	Molossidae	<i>Tadarida brasiliensis</i>	1	Morcego
<i>Sirenia</i>	Trichechidae	<i>Trichechus inunguis</i>	4	Peixe-boi

Continuação da Tabela 5.

Tabela 6 - Distribuição dos eritrogramas segundo as espécies estudadas.

ORDEM FAMÍLIA	NOME CIENTIFICO NOME POPULAR		Eritrócitos /mm ³	Hemoglobina g%	Hematócrito %	VCM fl	HCM pg	CHCM %
<i>Didelphimorphia</i> Didelphidae	Didelphis marsupialis Gambá	Média dp	5,0 1,0	12,8 2,6	41,3 6,7	82,5 8,1	25,3 2,9	30,9 2,5
<i>Primates</i> Cebidae	Cebus apella Macaco prego	Média dp	6,0 0,8	14,5 1,7	44,6 4,1	74,2 8,2	24,1 2,0	32,5 3,1
<i>Primates</i> Cebidae	Alouatta sp Bugio	Média dp	5,0 0,2	13,1 1,6	43,3 4,0	86,3 7,9	24,4 1,4	29,6 0,7
<i>Primates</i> Cebidae	Ateles paniscus chamek Macaco aranha	Média dp	5,8 0,2	16,5 0,6	51,0 1,0	88,7 0,6	28,6 0,2	32,2 0,5
<i>Primates</i> Pongidae	Gorilla gorilla Gorila		4,5	12,6	43	95,6	28	29,3
<i>Primates</i> Pongidae	Pongo pigmaeus Orangotango	Média dp	4,7 0,1	13,3 0,4	44,0 1,0	93,6 4,1	28,4 1,4	30,3 0,1
<i>Primates</i> Cercopithecidae	Erythrocebus pata Macaco pata							
<i>Primates</i> Cercopithecidae	Papio cynocephalus Babuíno		4,3	10,4	37	86	24,2	28,1
<i>Pinnipedia</i> Otariidae	Arctocephalus tropicalis * Lobo marinho subantártico	Média dp		13,2 0,3				34,8 3,4
<i>Pinnipedia</i> Otariidae	Arctocephalus australis * Lobo marinho das ilhas do sul			11,2				32

* As amostras de sangue apresentaram hemólise.

Tabela 6 - Distribuição dos eritogramas segundo as espécies estudadas.

ORDEM FAMÍLIA	NOME CIENTÍFICO NOME POPULAR		Eritrócitos /mm ³	Hemoglobina g%	Hematócrito %	VCM fl	HCM pg	CHCM %
<i>Carnivora</i> Felidae	<i>Acinonyx jubatus</i> Guepardo		7,4	12,8	39	52,7	17,3	32,8
<i>Carnivora</i> Felidae	<i>Felis concolor</i> Suçuarana							
<i>Carnivora</i> Felidae	<i>Panthera onca</i> Onça							
<i>Carnivora</i> Felidae	<i>Panthera leo</i> leão	Média dp	8,0 1,5	13,3 2,6	42,0 5,0	53,5 3,5	16,8 0,2	31,5 2,3
<i>Carnivora</i> Felidae	<i>Panthera tigris</i> Tigre	Média dp	6,2 1,7	12,3 3,6	36 11	57,5 2,0	19,7 0,4	34,3 0,5
<i>Carnivora</i> Felidae	<i>Panthera pardus</i> Leopardo	Média dp	6,8	14,8	43	63,2	21,8	34,4
<i>Carnivora</i> Procyonidae	<i>Procyon cancrivorus</i> Mão pelada							
<i>Carnivora</i> Procyonidae	<i>Nasua nasua</i> Quati	Média dp	6,3 0,9	12,1 2,0	38,6 4,2	62,3 8,2	19,5 3,0	31,2 1,9
<i>Carnivora</i> Canidae	<i>Chrysocyon brachyurus</i> Lobo guará	Média dp	5,3 0,5	13,1 0,7	40,3 3,2	76,6 5,2	25,0 2,2	32,6 1,1
<i>Carnivora</i> Canidae	<i>Cerdocyon thous</i> Cachorro do mato	Média dp	6,6 1,3	16,0 0,8	46,0 2,6	71,8 9,7	25,1 4,1	34,9 1,7

Tabela 6 - Distribuição dos eritogramas segundo as espécies estudadas.

ORDEM FAMÍLIA	NOME CIENTÍFICO NOME POPULAR		Eritrócitos / mm ³	Hemoglobina g%	Hematócrito %	VCM fl	HCM pg	CHCM %
<i>Carnívora</i> Canidae	Canis familiaris Cachorro pastor alemão	Média dp	6,6 0,6	18,9 1,5	52,1 4,4	78,8 6,0	28,6 2,0	36,4 0,8
<i>Rodentia</i> Caviidae	Cavia porcellus Cobaia	Média dp	5,0 0,5	14,7 1,3	42,0 4,3	84,9 3,3	29,7 1,1	35,0 1,0
<i>Rodentia</i> Muridae	Rattus norvegicus Rato - Sprague Dawley	Média dp	7,2 0,3	16,0 0,8	43,0 0,7	59,8 1,9	22,2 1,0	37,1 1,3
<i>Rodentia</i> Muridae	Mus musculus Camundongo - Swiss	Média dp	6,5 0,7	15,3 0,7	45,7 2,0	70,7 6,9	23,7 2,6	33,5 0,6
<i>Rodentia</i> Myocastoridae	Myocastor coypus Ratão banhado	Média	6,7	17,4	54,0	80,6	26,0	32,2
<i>Rodentia</i> Dasyproctidae	Dasyprocta sp. Cutia	Média dp	6,4 1,9	14,1 3,1	44,3 11,4	69,8 3,6	22,7 2,6	32,3 1,1
<i>Rodentia</i> Cricetidae	Mesocricetus auratus Hamster	Média dp	6,8 0,6	16,6 0,9	46,9 3,0	69,7 7,0	24,6 1,4	35,6 2,8
<i>Lagomorpha</i> Leporidae	Oryctolagus cuniculus Coelho	Média dp	5,6 1,0	14,0 2,1	39,3 7,1	70,5 10,1	25,2 2,7	36,0 2,6
<i>Edentata</i> Bradypodidae	Bradypus tridactylus Bicho preguiça	Média dp	3,0 0,2	10,6 1,2	29,5 2,5	98,3 1,8	35,5 1,5	36,1 0,8

Tabela 6 - Distribuição dos eritogramas segundo as espécies estudadas.

ORDEM FAMÍLIA	NOME CIENTIFICO NOME POPULAR		Eritrócitos / mm ³	Hemoglobina g%	Hematócrito %	VCM fl	HCM pg	CHCM %
<i>Proboscidea</i> Elephantidae	Elephas maximus Elefante	Média	3,0	12,0	34,0	113,3	40,0	35,3
<i>Artiodactyla</i> Camelidae	Camelus bactrianus Camelo	Média dp	11,2 1,3	13,8 1,3	31,5 1,5	28,3 2,0	12,3 0,3	43,6 1,9
<i>Artiodactyla</i> Giraffidae	Giraffa camelopardalis Girafa	Média	14,3	11,9	34,0	23,8	8,3	35,0
<i>Artiodactyla</i> Cervidae	Cervus elaphus Cervo nobre	Média	7,2	11,0	31,0	43,1	15,3	35,5
<i>Artiodactyla</i> Cervidae	Ozotoceros bezoarticus Veado campeiro	Média	10,0	8,4	28,0	28,0	8,4	30,0
<i>Artiodactyla</i> Cervidae	Mazama gouazoubira Veado catingueiro							
<i>Artiodactyla</i> Bovidae	Ovis aries sp Carneiro	Média dp	5,4 0,5	15,0 1,0	38,0 2,1	70,0 5,2	27,6 2,2	39,4 2,8
<i>Artiodactyla</i> Bovidae	Bos taurus Boi - taurino	Média dp	5,2 0,4	9,7 0,8	26,5 2,7	50,6 3,6	18,6 0,9	36,8 1,1
<i>Artiodactyla</i> Bovidae	Bos indicus Boi - zebuino	Média dp	8,7 2,1	12,3 1,6	36,1 5,2	41,6 6,4	14,2 2,7	34,1 5,1

Tabela 6 - Distribuição dos eritrogramas segundo as espécies estudadas.

ORDEM FAMÍLIA	NOME CIENTIFICO NOME POPULAR		Eritrócitos / mm ³	Hemoglobina g%	Hematócrito %	VCM fl	HCM pg	CHCM %
<i>Artiodactyla</i> Bovidae	Bos indicus/Bos taurus Boi - Girolanda	Média dp	6,3 0,9	12,0 0,1	35,0 1,0	56,8 6,1	19,5 2,5	34,3 0,7
<i>Artiodactyla</i> Bovidae	Capra hircus Cabra - alpina	Média dp	11,7 1,0	11,8 1,5	29,2 3,1	25,1 2,5	10,1 1,2	40,6 5,5
<i>Perissodactyla</i> Tapiridae	Tapirus terrestres Anta							
<i>Perissodactyla</i> Equidae	Equus caballus Cavalo Puro Sangue Inglês	Média dp	10,2 0,7	16,0 1,1	44,8 4,1	43,8 2,3	15,7 0,6	35,9 1,5
<i>Perissodactyla</i> Equidae	Equus caballus Cavalo mangalarga							
<i>Cetacea</i> Platanistidae	Pontoporia blainvillei Toninha							
<i>Cetacea</i> Iniidae	Inia geoffrensis Boto da Amazonia	Média dp	3,8 0,5	12,3 1,3	36,2 6,25	102,3 4,36	32,6 1,8	31,8 2,9
<i>Cetacea</i> Delphinidae	Stenella frontalis Golfinho pintado							
<i>Sirenia</i> Trichechidae	Trichechus inunguis Peixe-boi	Média dp	2,1 0,3	9,9 0,8	29,3 2,5	136,3 7	46,2 2,8	33,9 0,4
<i>Chiroptera</i> Molossidae	Tadarida brasiliensis Morcego

Fig 7

Tapirus terrestris
Anta

Equus caballus
Cavalo Puro Sangue Inglês

Homo sapiens
Homem

Arctocephalus tropicalis
Lobo marinho subantártico

Arctocephalus australis
Lobo marinho das ilhas do sul

Chrysocyon brachyurus
Lobo guará

Cerdocyon thous
Cachorro do mato

Canis familiaris
Cachorro pastor alemão

Fig 8

Procyon cancrivorus
Mão pelada

Nasua nasua
Quati

Homo sapiens
Homem

Acinonyx jubatus
Guepardo

Felis concolor
Suçuarana

Panthera onca
Onça

Panthera leo
leão

Panthera tigris
Tigre

Panthera pardus
Leopardo

Fig 9

Myocastor coypus
Ratão banhado

Dasyprocta sp.
Cutia

Homo sapiens
Homem

Cavia porcellus
Cobaia

Rattus norvegicus
Rato - Sprague Dawley

Mus musculus
Camundongo - Swiss

Mesocricetus auratus
Hamster

Camelus bactrianus
Camelo

Giraffa camelopardalis
Girafa

Homo sapiens
Homem

Mazama gouazoubira
Veado catingueiro

Cervus elaphus
Cervo nobre

Ozotoceros bezoarticus
Veado campeiro

Ovis aries sp
Carneiro

Capra hircus
Cabra - Alpina

Bos taurus
Boi - taurino

Fig 11

Bos indicus
Boi - zebuino

Tadarida brasiliensis
morcego

Homo sapiens
Homem

Didelphis marsupialis
Gambá

Bradypus tridactylus
Bicho preguiça

Oryctolagus cuniculus
Coelho

Trichechus inunguis
Peixe-boi

Inia geoffrensis
Boto da Amazonia

Elephas maximus
Elefante

Padronização da concentração dos inibidores de proteases na membrana eritrocitária humana utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS - PAGE).

Fig 13

Fig 14

Estudo da ação do para-hidroximercuribenzoato sobre as proteínas de membrana eritrocitária humana.

Fig 15

Tabela 7

Distribuição das densitometrias (%) das proteínas de membrana eritrocitária de voluntários humanos.

Voluntários	Esp	3	4.1	4.2	4.5	5	6	7	Esp/banda3
1	25,1	29,3	6,5	7,9	6,5	8,8	4,9	3,6	0,9
2	28,6	25,9	5,7	9,7	6,0	16,7	3,8	3,7	1,1
3	28,0	29,1	5,4	10,0	3,9	6,7	4,1	2,1	1,0
4	31,6	25,7	7,1	6,7	3,0	7,2	5,2	2,6	1,2
5	28,2	33,0	6,9	9,1	3,7	6,0	3,4	2,4	0,9
6	28,5	30,5	7,6	9,1	5,8	9,9	6,4	2,3	0,9
7	33,5	39,2	5,2	6,3	3,5	5,6	5,4	1,3	0,9
8	29,3	26,3	6,5	8,4	2,5	8,6	3,4	1,6	1,1
9	26,5	28,5	8,3	7,9	4,8	8,6	3,6	2,1	0,9
10	32,9	32,3	5,1	5,5	3,0	9,3	5,0	1,9	1,0
11	35,0	32,0	5,2	5,7	3,7	8,2	4,7	5,4	1,1
12	32,6	32,0	7,1	8,0	4,5	7,6	6,2	2,0	1,0
13	36,4	35,6	5,7	6,6	2,7	7,7	3,5	1,7	1,0
14	33,4	30,4	8,6	7,8	3,5	8,3	6,1	1,5	1,1
15	36,6	33,4	7,4	7,2	2,9	5,7	4,3	2,5	1,1
16	33,6	33,0	8,3	7,9	5,9	5,5	3,6	2,2	1,0
17	32,9	32,3	5,1	5,5	3,0	9,3	5,0	1,9	1,0
18	34,2	31,2	8,1	8,3	4,2	7,2	5	1,8	1,1
19	36,7	31,1	6,0	6,0	2,8	7,0	3,7	3,2	1,2
20	35,6	32,0	7,1	5,7	2,0	7,3	4,4	4,4	1,1
Média	32,0	31,1	6,6	7,5	3,9	8,1	4,6	2,5	1,0
dp	3,5	3,2	1,2	1,4	1,3	2,4	1,0	1,1	0,1

PRIMATES

Fig 16

Fig 17

Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS - PAGE
segundo LAEMMLI

Fig 18

Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS - PAGE
segundo FAIRBANKS

PRIMATES

LAEMMLI

FAIRBANKS

Pongo pygmaeus
Orangotango

HUM
PMSF
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PHMB
POOL
HUM

Ateles paniscus chamek
Macaco aranha

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
TLCK
PEPS
POOL
HUM

Alouatta sp
Bugio

HUM
PMSF
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PHMB
POOL
HUM

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
POOL
HUM

Orangotango

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
TLCK
PEPS
POOL
HUM

Macaco aranha

HUM
PMSF
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PHMB
POOL
HUM

Bugio

Tabela 8
Distribuição das densitometrias (%) e dos peso moleculares (kDa) das proteínas de membrana eritrocitária de animais pertencentes a Ordem Primates.

Proteínas		Esp	3	4.1	4.2	4.5	5	5X ₁	6	7	Esp/banda3
Homem	%	32,0	31,1	6,6	7,5	3,9	8,1		4,6	2,5	1,0
	kDa	240	100	80	72	55	43		35	31	
Macaco prego	%	30,6	29,8	6,7	9,4	7,0	9,2		4,5	2,7	1,0
	kDa	257	118	82	71	56	42		34	30	
Bugio	%	29,0	35,2	7,3	8,4	4,6	8,3	2,3	4,4	2,3	0,8
	kDa	245	169	85	73	55	44	40	35	31	
Macaco aranha	%	40,5	30,4	4,3	6,5	4,0	6,1		2,7	1,1	1,3
	kDa	240	155	82	73	55	43		35	32	
Gorila	%	41,8	29,2	6,6	7,1	3,7	7,9		3,4	2,3	1,4
	kDa	260	98	80	70	54	42		34	31	
Orangotango	%	30,6	31,6	4,5	5,4	5,2	8,3	2,5	4,4	3,5	1,0
	kDa	239	100	80	72	54	43	40	35	32	
Macaco pata	%	40,7	30,6	5,2	9,5	5,1	6,2		3,6	1,8	1,3
	kDa	263	102	80	74	55	43		36	31	
Babuíno	%	40,0	28,3	5,7	5,9	3,2	6,7		2,6	1,5	1,4
	kDa	251	98	79	73	54	43		36	31	

PINNIPEDIA

LAEMMLI

FAIRBANKS

50

Arctocephalus tropicalis
Lobo marinho subantártico

Lobo marinho subantártico

Arctocephalus australis
Lobo marinhos das ilhas do sul

Lobo marinho das ilhas do sul

Tabela 9

Distribuição das densitometrias (%) e dos pesos moleculares (kDa) das proteínas da membrana eritrocitária de animais pertencentes a ordem *Pinnipedia*.

Proteínas		Esp	3	4.1	4.2	4.5	4.5X ₁	5	5.X ₁	6	7	Esp/banda3
Lobo marinho subantártico*	%	34,3	25,4	5,3	7,7	5,9	4,8	8,8	4,4	2,8	0,7	1,4
	kDa	240	107	80	71	56	47	43	41	36	32	
Lobo marinho das ilhas do sul*	%	45,6	25,1	5,9	7,2	1,0	3,0	11,6	3,5	2,2	1,4	1,8
	kDa	242	103	81	72	58	47	43	40	35	31	

CARNIVORA

LAEMMLI

FAIRBANKS

HUMANO
SUÇUARANA
ONÇA PRETA
ONÇA PINTADA
LEÃO
LEOPARDO
MÃO PELADA
LOBO GUARÁ
PADRÃO BAIXO PM

HUMANO
SUÇUARANA
ONÇA PRETA
ONÇA PINTADA
LEÃO
LEOPARDO
MÃO PELADA
LOBO GUARÁ
PADRÃO BAIXO PM

Fig 29

LAEMMLI

LAEMMLI

HUM
Cachorro Pastor Alemão
HUM

QUATI
HUMANO

Canis familiaris

Fig 31

Nasua nasua

Fig 32

Cerdocyon thous Cachorro mato

Fig 33

Fig 34

Cachorro mato

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
TLCK
PEPS
POOL
HUM

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
TLCK
PEPS
POOL
HUM

Panthera tigris
Tigre

Fig 39

Panthera leo
Leão

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
TLCK
PEPS
POOL
PMSF
HUM

Fig 37

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
PMSF
HUM

Fig 35

Acinonyx jubatus
Guepardo

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
TLCK
PEPS
POOL
HUM

LAEMMLI

CARNIVORA

Fig 40

Tigre

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
TLCK
PEPS
POOL
PMSF
HUM

Fig 38

Leão

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
PMSF
HUM

Fig 36

Guepardo

FAIRBANKS

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
TLCK
PEPS
POOL
HUM

Tabela 10

Distribuição das densitometrias (%) e dos peso moleculares (kDa) das proteínas de membrana eritrocitária de animais pertencentes a Ordem *Carnivora*.

Proteínas		Esp	2X ₁	2X ₂	2X ₃	3	3X ₁	4.1	4.2	4.5	4.5X ₁	5	5.X ₁	6	7	Esp/banda3
Guepardo	%	30,5				30,5	4,2	5,2	5,8	2,8	2,2	6,2	2,2	5,2	1,4	1,0
	kDa	241				134	92	77	73	53	46	43	39	35	32	
Suçuarana	%	41,2				23,7		4,5	7,3	5,4	5,4	7,6		2,7	2,4	1,7
	kDa	251				114		78	73	56	45	43		35	32	
Onça	%	31,5				24,6		5,1	8,9	12,5		10,8		4,4	2,2	1,3
	kDa	243				114		80	75	58		44		35	32	
Leão	%	36,2				27,9	2,5	6,4	7,1	3,7		5,4	3,9	3,5	1,4	1,3
	kDa	238				114	91	78	75	56		44	40	35	32	
Tigre	%	37,7				28,3		7,3	8,0	4,8		7,5	2,7	3,3	2,1	1,3
	kDa	235				107		78	74	56		44	39	35	32	
Leopardo	%	30,0	3,0	1,7	8,9	22,0		3,0	7,0	5,4	2,0	6,6	4,2	2,4	2,5	1,4
	kDa	240	215	185	162	112		78	75	56	45	43	39	35	31	
Mão pelada	%	49,4				24,2		6,7	4,3	2,7		7,3		3,8	1,6	2,0
	kDa	260				100		75	70	58		42		35	31	
Quati	%	43,9				27,6		7,8	8,1	1,2		6,2		3,7	2,3	1,6
	kDa	236				105		78	71	59		43		35	32	

* As amostras de sangue apresentaram hemólise.

Continuação Tabela 10

Proteínas		Esp	2X ₁	2X ₂	2X ₃	3	3X ₁	4.1	4.2	4.5	4.5X ₁	5	5.X ₁	6	7	Esp/banda3
Lobo guará	%	40,1				31,8		6,4	6,7	2,0		7,2		3,6	2,3	1,3
	kDa	240				102		78	70	56		42		35	32	
Cachorro do mato	%	28,5				20,3		10,6	8,6	7,9	7,2	8,4		5,5	1,8	1,4
	kDa	255				108		81	72	53	47	43		35	31	
Cachorro pastor alemão	%	47,1				26,0		6,5	7,0	3,9		6,8		2,2	1,2	1,8
	kDa	262				110		83	75	53		44		35	32	

Mesocricetus auratus
Hamster

Fig 45

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
TLCK
PEPS
POOL
HUM

Rattus norvegicus
Rato Sprague-Dawley

Fig 43

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
TLCK
PEPS
POOL
HUM

Cavia porcellus
Cobaia

Fig 41

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
PHMB
POOL
HUM

LAEMMLI

RODENTIA

FAIRBANKS

Fig 46

Hamster

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
TLCK
PEPS
POOL
HUM

Fig 44

Rato Sprague-Dawley

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
TLCK
PEPS
POOL
HUM

Fig 42

Cobaia

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
PHMB
HUM

Dasyprocta sp.

Cutia

Mycastor coypus

Ratão banhado

Mus musculus

Camundongo

LAEMMLI

RODENTIA

FAIRBANKS

Cutia

Ratão banhado

Camundongo

Tabela 11

Distribuição das densitometrias (%) e dos peso moleculares (kDa) das proteínas de membrana eritrocitária de animais pertencentes a Ordem *Rodentia*.

Proteínas		Esp	3	4.1	4.2	4.2X ₁	4.5	4.5X ₁	5	6	7	Esp/banda3
Cobaia	%	41,4	30,4	9,0		2,9	2,8		8,5	3,3	0,6	1,4
	kDa	260	126	82		62	55		43	36	32	
Rato - Sprague Dawley	%	40,0	30,9	10,2		3,3	4,1		4,8	0,3	2,5	1,3
	kDa	240	100	72		62	52		42	35	31	
Camundongo	%	37,4	33,2	7,9	5,9		4,7		8,3	1,1	1,5	1,1
	kDa	240	106	78	73		55		44	35	31	
Ratão do banhado	%	39,5	32,1	12,1			2,7		6,3	3,7	0,6	1,2
	kDa	240	112	82			56		44	36	32	
Cutia	%	42,5	28,0	11,1		4,3	3,6		7,7	2,2	2,2	1,5
	kDa	264	113	82		62	54		44	36	32	
Hamster	%	39,1	25,5	12,9			6,9	3,9	9,1	1,4	1,5	1,5
	kDa	251	110	76			56	46	43	36	31	

SIRENIA

LAEMMLI

FAIRBANKS

Trichechus inunguis
Peixe - boi

Fig 53

Fig 54

Peixe - boi

CHIROPTERA

LAEMMLI

FAIRBANKS

Tadarida brasiliensis
Morcego

Fig 55

Tabela 12

Distribuição das densitometrias (%) e dos peso moleculares (kDa) das proteínas de membrana eritrocitária de animais pertencentes a Ordem Sirenia.

Proteínas		Esp	3	3X ₁	4.1	4.2X ₁	4.5	4.5X ₁	4.5X ₂	5	6	7	Esp/banda3
Peixe-boi	%	29,8	31,2	4,5	11,1	3,4	2,4	2,9	3,2	5,2	1,8	0,6	1,0
	kDa	257	126	92	83	67	55	47	45	43	36	32	

Tabela 13

Distribuição das densitometrias (%) e dos pesos moleculares (kDa) das proteínas de membrana eritrocitária de animais pertencentes a Ordem Chiroptera.

Proteínas		Esp	3	4.1/4.2	4.2X ₁	4.5	4.5X ₁	5	5X ₁	6	7	Esp/banda3
Morcego	%	32,0	26,2	9,5	5,1	5,4	4,6	3,7	6,7	4,0	2,7	1,2
	kDa	240	104	77	71	56	47	44	39	35	32	

CETACEA

LAEMMLI

FAIRBANKS

Pontoporia blainvillei

Toninha

Fig 56

Fig 57

Toninha

Stenella frontalis

Golfinho pintado

Fig 58

Fig 59

Golfinho pintado

Inia geoffrensis

Boto da Amazônia

Fig 60

Fig 61

Boto da Amazônia

Tabela 14
Distribuição das densitometrias (%) e dos pesos moleculares (kDa) das proteínas de membrana eritrocitária de animais pertencentes a Ordem Cetacea .

Proteínas		Esp	2X ₁	3	4.1/4.2	4.2X ₁	4.5	5	5 X ₁	6	7	Esp/banda3
Toninha *	%	24,6		27,3	6,7	6,2	6,4	8,7	1,6	10,6	8,0	0,9
	kDa	242		96	72	64	53	42	38	34	31	
Golfinho pintado*	%	29,0	5,0	29,2	8,0	4,8	15,1	4,5		2,4	0,8	1,0
	kDa	252	205	110	80	66	56	43		35	31	
Boto da Amazonia	%	42,7		33,4	10,9		2,9	7,6		2	0,4	1,3
	kDa	243		118	78		58	44		36	31	

* As amostras de sangue apresentaram hemólise.

ARTIODACTYLA

LAEMMLI

FAIRBANKS

HUMANO
CERVO NOBRE
VEADO CAMPEIRO
BOI - ZEBUÍNO
BOI - TAURINO
BOI - MISTIÇO
CARNEIRO
CABRA
CABRA

HUMANO
CERVO NOBRE
VEADO CAMPEIRO
BOI - ZEBUÍNO
BOI - TAURINO
BOI - MISTICO
CARNEIRO
CARNEIRO
CABRA

Fig 62

Fig 63

HUM
CERVO NOBRE
VEADO CATINGUEIRO
VEADO CAMPEIRO
CARNEIRO
BOI - TAURINO
BOI - ZEBUÍNO
CABRA
PADRÃO BAIXO PM

Fig 64

ARTIODACTYLA

LAEMMLI

LAEMMLI

Ovis aries
Carneiro

Fig 65

Ovis aries
Carneiro

Fig 67

Capra hircus

Cabra

Fig 68

Fig 66

Carneiro

ARTIODACTYLA

LAEMMLI

FAIRBANKS

Camelus bactrianus

Camelo

Fig 69

Giraffa camelopardalis

Girafa

Fig 71

Mazama gouazoubira

Veado catingueiro

Fig 73

Fig 70

Fig 72

Fig 74

Veado catingueiro

Girafa

Camelo

ARTIODACTYLA

LAEMMLI

FAIRBANKS

Bos indicus

Boi zebuino

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
PMSF
HUM

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
PMSF
HUM

Fig 76

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
PMSF
HUM

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
PMSF
HUM

Bos taurus

Boi taurino

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
PMSF
HUM

Fig 78

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
PMSF
HUM

Boi taurino

Hibrido *Bos indicus/Bos taurus*

Boi híbrido
Girolanda

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
PMSF
HUM

Fig 79

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
PMSF
HUM

Boi híbrido
Girolanda

Tabela 15

Distribuição das densitometrias (%) e dos peso moleculares (kDa) das proteínas de membrana eritrocitária de animais pertencentes a Ordem *Artiodactyla*.

Proteínas		Esp	2X ₁	2X ₂	3	3X ₁	4.1	4.2	4.2X ₁	4.5	4.5X ₁	5	6	7	Esp/banda3
camelo	%	38,7			28,5	5,3	5,1	6,3	4,0	4,6		5,5	1,8	1,6	1,4
	kDa	236			106	89	82	71	62	55		43	36	31	
Girafa	%	25,2	24,8	6,6	24,6		6,5	5,2		2,9		4,4	2,7	0,9	1,0
	kDa	243	182	152	104		79	73		57		42	35	31	
Cervo nobre	%	27,1	9,4	6,6	22,5		5,9	6,0	2,1	5,5	5,4	6,8	3,1	0,6	1,2
	kDa	235	194	162	102		79	72	59	53	46	43	35	31	
Veado campeiro	%	30,4	6,1	13,7	19,1		7,2	5,7		7,1	4,6	4,2	1,6	1,6	1,6
	kDa	245	203	179	104		81	73		54	47	43	35	31	
Veado catingueiro	%	26,3	7,2	14,8	26,1		6,2	8,3	3,9	3,0	1,6	3,7	2,6	1,8	1,0
	kDa	243	196	161	105		79	74	60	54	49	43	35	30	
Carneiro	%	29,5	12,5	5,4	31,5		4,8	5,4	1,6	1,3		4,5	1,1	3,1	0,9
	kDa	243	194	166	99		82	73	64	53		43	36	31	

Continuação da Tabela 15

Proteínas		Esp	1X ₁	1X ₂	3	3X ₁	4.1	4.2	4.2X ₁	4.5	4.5X ₁	5	6	7	Esp/banda3
Boi	%	33,3	5,4	5,5	22,7		9,3	2,4	3,1	4,9	5,8	3,0	1,9		1,5
Taurino	kDa	271	202	166	108		78	66	56	47	43	35	30		
Boi	%	40,8		5,8	22,8		10,6	4,1	3,0	3,2	6,6	3,6	1,5		1,8
Zebuino	kDa	280		165	106		77	68	55	48	43	35	31		
Bovino	%	32,2	3,8	5,5	27,7		11,4	4,1	3,7	4,8	5,2	3,5	1,0		1,2
Girolanda	kDa	270	205	166	107		78	68	54	48	43	35	31		
Cabra	%	29,8	17,4	5,9	32,5		3,5	3,2	1,4	1,1	2,4	1,3	2		0,9
Alpina	kDa	246	176	153	95		80	74	68	52	43	35	31		

DIDELPHIMORPHIA

LAEMMLI

Didelphis marsupialis Gamba

FAIRBANKS

LAGOMORPHA

LAEMMLI

Oryctolagus cuniculus Coelho

FAIRBANKS

Coelho

Gamba

Tabela 16
Distribuição das densitometrias (%) e dos peso moleculares (kDa) das proteínas de membrana eritrocitária de animais pertencentes a Ordem *Didelphimorphia*.

Proteínas		Esp	3	4.1	4.2	4.5	4.5X ₁	5	6	7	Esp/banda3
Gambá	%	42,0	29,3	5,4	8,8	4,4	2,9	4,7	1,2	1,7	1,4
	kDa	237	103	78	71	55	46	43	35	31	

Tabela 17
Distribuição das densitometrias (%) e dos pesos moleculares (kDa) das proteínas de membrana eritrocitária de animais pertencentes a Ordem *Lagomorpha*.

Proteínas		Esp	3	4.1/4.2	4.2X ₁	4.5	5	5X ₁	6	7	7X ₁	Esp/banda3
Coelho	%	40,8	28,9	7,4	1,4	2,7	8,0	2,6	2,4	1,6	4,8	1,4
	kDa	243	104	77	69	60	44	40	36	32	20	

PROBOSCIDEA

LAEMMLI

FAIRBANKS

EDENTATA

LAEMMLI

FAIRBANKS

Tabela 18
Distribuição das densitometrias (%) e dos peso moleculares (kDa) das proteínas de membrana eritrocitária de animais pertencentes a Ordem *Proboscidea*.

Proteínas		Esp	3	4.1	4.2	4.2X ₁	4.5	5	6	7	Esp/banda3
Elefante	%	39,6	22,7	5,4	5,1	14,4	4,2	5,1	1,7	1,9	1,7
	kDa	264	106	86	81	63	55	43	35	32	

Tabela 19
Distribuição das densitometrias (%) e dos peso moleculares (kDa) das proteínas de membrana eritrocitária de animais pertencentes a Ordem *Edentata*.

Proteínas		Esp	3	4.1/4.2	4.5	4.5X ₁	5	5 X ₁	6	7	Esp/banda3
Bicho preguiça	%	36,8	28,0	10,2	6,2	3,5	10,8	3,7	2,6	0,8	1,3
	kDa	250	123	82	58	47	44	37	35	32	

PERISSODACTYLA

LAEMLI

FAIRBANKS

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
HUM
PMSF

HUM
SEM
PMSF
NEM
EDTA
DFP
PEPS
POOL
HUM
PMSF

Equus caballus
Cavalo mangalarga

Cavalo mangalarga

Equus caballus
Cavalo puro sangue inglês

Tapirus terrestres

Anta

Tabela 20

Distribuição das densitometrias (%) e dos peso moleculares (kDa) das proteínas de membrana eritrocitária de animais pertencentes a Ordem *Perissodactyla*.

Proteínas		Esp	3	4.1	4.5	4.5x ₁	5	6	7	Esp/banda3
Anta	%	28,0	35,2	12,3	5,4	5,4	6,7	3,5	1,5	0,8
	kDa	242	111	78	57	47	44	37	32	
Cavalo - PSI	%	41,2	38,8	8,6	1,7	4,5	10,1	1,0	1,5	1,1
	kDa	255	99	79	52	47	43	35	31	
Cavalo -Mangalarga	%	41,1	32,0	10,7	3,0	3,0	10,7	1,2	1,4	1,3
	kDa	239	97	78	57	48	43	35	32	

DISCUSSÃO

1. Generalidades

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de mamíferos pertencentes a treze ordens da classe Mammalia. O número de amostras analisadas dependeu da disponibilidade de acesso ao animal, pois as amostras de animais provenientes de zoológicos foram obtidas somente quando o animal estivesse sendo contido por outro motivo, e na oportunidade foi colhido sangue para este estudo. Uma vez que estes animais são altamente sensíveis à contenção, todo o material foi obtido sob anestesia prévia, evitando assim riscos para o próprio animal, bem como para os funcionários.

2. Morfologia

Os eritrócitos de camundongos e de mamíferos pequenos tem sido utilizados para o estudo da senescência dos glóbulos vermelhos e da síntese de proteínas de membrana do eritrócito durante a eritropoese (WHITFIELD et al, 1983).

O eritrócito maduro dos mamíferos apresenta-se como célula anucleada, podendo variar o seu tamanho e seu número por unidade de volume segundo a espécie estudada. A maioria das espécies dos mamíferos apresenta eritrócitos com tamanho menor do que o eritrócito humano (WHITFIELD et al, 1983).

Observamos que os animais pertencentes à ordem *Primates* apresentam eritrócitos com tamanho semelhante ao eritrócito humano (vide Figura 7); já os animais pertencentes à ordem *Carnivora* apresentam eritrócitos microcíticos (Figura 8 e 9). Observamos microcitose acentuada nos eritrócitos dos animais pertencentes à ordem *Artiodactyla* (vide Tabela 6 e Figura 11). Os camelos apresentam eritrócitos na forma de eliptócitos microcíticos (Figura 11), o que já tem sido relatado na literatura (RALSTON, 1975; LIVINE &

KUIPER, 1973; JAIN & KEETON, 1974; KHODADAD & WEINSTEIN, 1983). Os roedores (ratos, camundongo, hamster, cobaia) apresentam eritrócitos menores do que os eritrócitos humanos, mas, o ratão do banhado apresenta eritrócitos macrocíticos (Figura 10). O morcego, o coelho e o cavalo apresentam eritrócitos microcíticos (Figura 12). O gambá apresenta microcitose e presença de microesferócitos, característica esta comum aos oito animais estudados (Figura 12). Os bichos-preguiça apresentam anisocitose moderada com microcitose e macrocitose (Figura 12). O elefante apresenta macrocitose, o que já foi descrito por NIRMALAN et al, 1967 e JAIN, 1986 (Figura 12). Os peixes-boi apresentam anisocitose, com presença de várias hemácias em alvo e esferócitos (Figura 12).

Estes achados permitem supor que estas diferenças possam advir de características próprias das proteínas de membrana eritrocitária de cada espécie, embora possa haver outros fatores que possam influir na determinação, em cada espécie, do tamanho dos eritrócitos e do número por unidade de volume de sangue (DAL COLLETO, FULKER, BARRETTO, KOLYA, 1993).

3. Proteínas da membrana eritrocitária

3.1. Inibidores de proteases

Na primeira fase dos experimentos foi utilizado o inibidor de proteases PMSF na concentração final de 200 μ M na preparação dos estromas dos eritrócitos dos mamíferos. Como foram observadas proteínas diferentes daquelas encontradas no estroma de membrana eritrocitária de humanos, foi de nosso interesse saber se as novas bandas eram proteínas diferentes ou produtos de degradação de proteínas existentes que sofreram a ação de proteases; assim, foi realizada uma segunda fase de experimentos, onde realizamos outra coleta de sangue dos mamíferos estudados, preparou-se os estromas de eritrócitos de cada espécie dividindo-se o volume de papa de eritrócitos em oito partes, utilizando vários inibidores de proteases, como mostra a Tabela 2.

Nas primeiras amostras de sangue de mamíferos, onde fizemos o estudo da ação dos inibidores de proteases utilizamos o para-

hidroximercuribenzoato na concentração de 100 μM (inibidor de cisteínas proteases), quando observamos que este inibidor solubilizava bandas de proteínas. Nesta época pudemos verificar que o PHMB exerce ação química direta sobre as espectrinas e a actina. Assim sendo, substituímos o para-hidroximercuribenzoato por outro inibidor de proteases, utilizando daí para frente o TLCK que é inibidor de cisteína/serina proteases.

A ação de compostos orgânicos mercuriais sobre as proteínas da membrana eritrocitária têm sido relatada na literatura (RALSTON & CRISP, 1981; CHETRITTE et al, 1983; CLARK & RALSTON, 1990), pois estes compostos solubilizam as proteínas periféricas tais como as espectrinas, actina, anquirinas, proteína 4.1 e proteína 4.2 da membrana eritrocitária. RALSTON & CRISP, 1981 relatam que a solubilização da proteína 4.1 só ocorre em altas concentrações destes compostos ao contrário do que acontece com a solubilização da espectrinas e actina. Na figura 15 é apresentada a eletroforese das proteínas de membrana eritrocitária humana de estromas preparados com várias concentrações de para-hidroximercuribenzoato, como inibidor de proteases, propriedade esta advinda da ação química direta, já descrita, sobre algumas proteínas.

Nas figuras 13 e 14 são apresentadas as eletroforeses das proteínas da membrana eritrocitária humana de estromas preparados com vários inibidores de proteases.

Concentrações finais de 1 a 10 mM de EDTA são citadas na literatura como concentração efetiva para inibir metalo-proteases (DUNN, 1989). No entanto, observamos que o EDTA na concentração de 10 mM, quando utilizada na preparação de estromas de membrana eritrocitária humana, faz com que aparecesse uma banda de baixo peso molecular, o que pode ser observado nas figuras 13 e 14. Para estudar a ação do EDTA sobre as proteínas da membrana eritrocitária humana, preparamos outros estromas, mas utilizando concentrações menores de EDTA (5mM, 3mM e 1mM) e também preparamos estromas utilizando outros inibidores de proteases, um "pool" com todos inibidores mais EDTA 5mM, outro "pool" com todos inibidores com EDTA a 3mM, "pool" com todos inibidores mais EDTA a 1mM e um estroma sem a utilização de inibidores. Observamos que o EDTA nas

concentrações de 5mM e 3mM faz com que apareça uma banda de baixo peso molecular, o que pode ser observado também no "pool" (todos inibidores mais 5mM de EDTA) e no pool com 3mM de EDTA. Considerando que no estroma preparado sem inibidor não aparece esta banda de baixo peso molecular e também não aparece nos estromas preparados com os demais inibidores (PMSF, NEM, DFP, Pepstatin e TLCK), supomos que o EDTA em concentrações mais altas deva degradar algumas das proteínas da membrana eritrocitária (Figura 14).

3.2. Proteínas da membrana eritrocitária dos mamíferos

A classe Mammalia é subdividida em duas subclasses: a subclasse Prototheria onde encontramos os monotremados ou mamíferos que põem ovos, representada pelo ornitorrinco, e a subclasse Theria onde estão os marsupiais e os mamíferos placentários. A subclasse Theria por sua vez é subdividida nas infraclasses Panthotheria, Metatheria e Eutheria.

Na infraclasse Panthotheria estão as ordens *Symmetrodonta* e *Panthotheria* (*Trituberculata*), que estão extintas.

Na infraclasse Metatheria estão os marsupiais ou mamíferos com bolsa, estes animais apresentam ossos epipúbicos usualmente presentes; dentes incisivos desiguais nos dois maxilares; fêmea geralmente com marsúpio (bolsa ventral) ou dobras marsupiais circundando mamilos no abdome; útero e vagina duplos; usualmente sem placenta; ovos fecundados internamente e começo do desenvolvimento no útero; mas após alguns dias os fetos prematuros saem e rastejam até o marsúpio onde um se prende firmemente por sua boca a um mamilo e aí permanece (como "feto mamário") até estar completamente formado; depois disto os pequenos filhotes recorrem ao marsúpio para se abrigar (STORER & USINGER, 1991).

Mamíferos placentários são aqueles sem bolsa ou ossos marsupiais; vagina única; o feto desenvolve-se inteiramente dentro do corpo da fêmea, preso por uma placenta à parede do útero e com crescimento do cório (STORER & USINGER, 1991).

Ordem *Didelphimorphia*

Foram estudados as proteínas da membrana eritrocitária de *Didelphis marsupialis* (LINNAEUS, 1758), gambá, que é um marsupial brasileiro pertencente à infraclasse Metatheria da subclasse Theria da classe Mammalia.

O gambá apresenta proteínas de membrana eritrocitária semelhantes às encontradas no eritrócito humano, apresentando espectrinas, anquirina 2.1, proteínas 5, 6 e 7 com pesos moleculares semelhantes aos do humano. Apresenta banda 3 com peso molecular de 103 kDa, proteína 4.1 e 4.2 com pesos moleculares próximos aos do humano, tendo como característica apresentar a banda 4.1 com concentração bem menor do que a proteína 4.2, (5,4 e 8,8% respectivamente), como pode ser observado na figura 81.

Em relação à ação dos inibidores observamos que o DFP inibiu proteases (serinas proteases), não apresentando uma banda correspondente às anquirinas, quando os demais inibidores não inibiram e apresentaram esta proteína (Figura 82). Observamos ainda que quando utilizamos o NEM (inibidor de cisteína proteases) houve o aparecimento de uma banda difusa, correspondente a 55 kDa (Figura 81). No entanto, uma vez que o NEM pode modificar quimicamente uma proteína através de sua ação sobre a lisina, histidina e cisteína (MAHLER & CORDES, 1971), esta banda de 55 kDa pode ser o produto de degradação de uma proteína de peso molecular maior. Entretanto, no "pool" de inibidores usados, onde também se encontra o NEM na mesma molaridade, não se observa a banda aumentada de peso molecular de 55 kDa, sugerindo que pode haver competição entre os inibidores pelo substrato protéico.

RALSTON (1985) estudou as proteínas da membrana eritrocitária de marsupiais pertencentes às espécies: *Macropus eugenii* ("Tammar wallaby"), *Macropus rufus* (canguru vermelho), *M. rufogriseus banksianus* ("red-necked Wallaby") e *Trichosurus vulpeculata* ("brush-tail opossum"), observou não haver diferenças entre os perfis eletroforéticos entre as espécies estudadas. Observou ainda que o padrão eletroforético das proteínas da

membrana eritrocitária dos marsupiais era semelhante ao padrão eletroforético das proteínas da membrana eritrocitária do humano; no entanto, a banda 3 apresentou peso molecular de 100 kDa, na região da proteína 4 apareciam duas bandas relacionadas a 4.1 e 4.2 humanas. A quantidade de proteína 6 presente nos marsupiais é bem menor do que a quantidade desta proteína na membrana eritrocitária humana, resultados estes concordantes com os nossos encontrados no *Didelphis marsupialis*, pois encontramos concentrações relativas de banda 6 de 1,2% para o gambá e 4,6% para o homem, vide tabela 7 e 16.

RALSTON (1985) refere que: "todas as proteínas reconhecidas como componentes do citoesqueleto e da fixação à membrana eritrocitária foram encontradas nos marsupiais, em forma muito similar. Igualmente a divisão da banda 4.1 em duas sub-bandas foi encontrada nos marsupiais. À luz da distância evolutiva entre primatas e marsupiais, a semelhança nas proteínas de citoesqueleto afirma a importância funcional destas proteínas".

A seguir serão apresentados os mamíferos placentários pertencentes à subclasse Theria, infraclasse Eutheria.

Ordem Primates

A ordem *Primates* é subdividida em duas subordens: a subordem Prosimii e Anthropeidea. A subordem Anthropeidea, por sua vez, é subdividida em três superfamílias, que são: 1. Ceboidea (Platyrrhina), que são representadas pelos macacos do Novo Mundo (macaco prego, bugio e macaco aranha); 2. Cercopithecoidea (Catarrhini), macacos do Velho Mundo (macaco Rhesus, macaco pata, babuíno, etc); 3. Hominoidea, macacos antropóides e homem (STORER & USINGER, 1991). Em nosso trabalho foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de macacos do Novo Mundo (macaco prego, bugio e macaco aranha), de macacos do Velho Mundo (macaco pata e babuíno) e de macacos pertencentes à superfamília Hominoidea (orangotango e gorila).

Cebus apella, (ERXLEBEN, 1777), macaco prego, família Cebidae - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às

proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresentou peso molecular de 118 kDa com aspecto difuso; as proteínas 4.1 e 4.2 apresentam pesos moleculares de 82 e 71 kDa, respectivamente. (Figuras 16, 17 e 18)

Alouatta sp., (LACÉPÈDE, 1799), bugio, família Cebidae - apresentou espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresentou peso molecular de 169 kDa com aspecto difuso; as proteínas 4.1 e 4.2 apresentam pesos moleculares de 85 e 73 kDa, respectivamente, vide figuras 19 e 20. Não houve diferença no perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases, vide figuras 19 e 20.

Ateles paniscus chamek, (E. GEOFFROY ST. HILAIRE, 1806), macaco aranha, família Cebidae - apresentou espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresentou peso molecular de 155 kDa com aspecto difuso; as proteínas 4.1 e 4.2 apresentam pesos moleculares de 82 e 73 kDa, respectivamente. Não houve diferença nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases. (Vide figuras 21 e 22)

Gorilla gorilla, (I. GEOFFROY ST. HILAIRE, 1852), gorila, família Pongidae - apresentou todas as proteínas da membrana eritrocitária semelhantes àquelas proteínas da membrana eritrocitária humana. (Figuras 16, 17 e 18)

Pongo pigmaeus, (LACÉPÈDE, 1799), orangotango, família Pongidae - apresenta todas as proteínas da membrana eritrocitária semelhantes àquelas proteínas da membrana eritrocitária humana, vide figuras 23 e 24. No estudo das proteases, observamos que somente quando utilizamos o para-hidroximercuribenzoato houve o desaparecimento da espectrinas e actina (banda 5) devido a solubilização destas proteínas o que já foi escrito na literatura (RALSTON & CRISP, 1981; CLARK & RALSTON, 1990; CHETRITTE et al, 1983).

Erythrocebus pata, (TROVESSART, 1897), macaco pata, família Cercopithecidae - apresenta todas as proteínas da membrana eritrocitária

semelhantes àquelas proteínas da membrana eritrocitária humana, vide figuras 16 e 18.

Papio cynocephalus, (ERXLEBEN, 1777), babuíno, família Cercopithecidae - apresenta todas as proteínas da membrana eritrocitária semelhantes àquelas proteínas da membrana eritrocitária humana, vide figuras 16 e 18.

BALLAS et al, em 1981, estudaram as proteínas da membrana eritrocitária de macacos Rhesus e observaram que estes macacos apresentam concentrações diminuídas de banda 6, ou gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, sendo significativamente menor do que a concentração desta enzima no eritrócito humano.

Em 1987, LEE et al, estudaram as mudanças das proteínas da membrana eritrocitária de fetos de babuínos, babuínos recém-nascidos e babuínos adultos, e observaram que os eritrócitos adultos diferiram dos eritrócitos fetais devido a presença de quatro polipeptídeos que estariam relacionados com o desenvolvimento do fenótipo adulto. Em nosso trabalho não detectamos estes polipeptídeos, embora tenhamos utilizado poliacrilamida a 10%, que discrimina melhor que a concentração de 15%, usada por aqueles autores. Somente pudemos detectar, usando gradiente, metodologia mais apropriada para proteínas de alto peso molecular, uma banda entre a proteína 2.1 e a 3, que poderia ser uma das proteínas relatas por LEE et al, p165 ou p155.

Os macacos do Velho Mundo e os Hominoidea apresentam as proteínas da membrana eritrocitária semelhantes qualitativa e quantitativamente, às proteínas de membrana eritrocitária do humano. Já os macacos do Novo Mundo apresentam a banda 3 com peso molecular maior do que a banda 3 humana, e as proteínas 4.1 e 4.2 também apresentam peso molecular pouco maior do que aquela encontrada no humano.

PALATNIK et al, 1990, estudaram o perfil eletroforético e os pesos moleculares de peptídeos obtidos a partir da ação de proteases comerciais de ***Streptomyces griseus*** e similares àquelas obtidas com quimiotripsina, e observaram que os macacos do Novo Mundo (***Saimiri sp.*** e ***Cebus sp.***) foram resistentes à digestão pelas proteases quimiotripsina e pronase. Uma banda

forte correspondente à banda 4.5 foi observada no Saimiri nos eritrócitos tratados e não tratados com proteases. Observaram que a banda 3 dos macacos do Novo Mundo são maiores do que o peso molecular da banda 3 do eritrócito humano, e apresentam peso molecular de 108 kDa (*Saimiri*) e 113 kDa (*Cebus*), valores estes concordantes com os nossos resultados. Os autores acima, relatam que a digestão com quimiotripsina ou pronase dos eritrócitos do chimpanzé (*Pan troglodytes*) divide a banda 3 em dois peptídeos de 62 kDa e 64 kDa; e a digestão dos eritrócitos de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), produziu fragmentos de 63 kDa. Observaram que a banda 3 dos macacos do Velho mundo apresentam peso molecular de 112 kDa (chimpanzé) e 100 kDa (macaco Rhesus). Por fim os autores sugerem que a banda 3 com altos pesos moleculares apresentam resistência à digestão com pronase, apesar de a banda 3 do chimpanzé ter peso molecular de 112 kDa e ser digerida pela pronase.

Portanto, em relação à banda 3, os nossos achados mostram um padrão dos macacos Hominoideos e do Velho Mundo semelhante ao humano, e um peso molecular maior nos macacos do Novo Mundo, sugerindo que os macacos do Velho Mundo e o homem pertencem ao mesmo grande grupo, em termos de evolução.

Ordem Pinnipedia

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária do lobo marinho subantártico e do lobo marinho das ilhas do sul, ambos pertencentes à família Otariidae.

Arctocephalus tropicalis, (E. GEOFFROY ST. HILAIRE and F. CUVIER, 1826), lobo marinho subantártico - Uma das amostras de sangue enviada era de um espécime vivo, de uma fêmea adulta (vide figuras 25 e 26), capturada na praia de Gravatá, Santa Catarina. A outra amostra de sangue enviada era de um espécime morto (20 horas após a morte), de *Arctocephalus tropicalis*, fêmea subadulta, capturada na praia de Torres no Rio Grande do Sul, vide figuras 27 e 28. Os *Arctocephalus tropicalis* apresentam as espectrinas, proteína 2.1, proteínas 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresentam banda 3 com peso

molecular de 107 kDa, com aspecto de banda bem definida (não difuso) e proteínas 4.1 e 4.2 com pesos moleculares semelhantes ao da membrana eritrocitária humana. Observamos o aparecimento de uma banda difusa de peso molecular próximo a 56 kDa quando preparamos os estromas sem inibidor (Figura 25). Esta banda persistiu após o emprego de inibidores, o que permite sugerir que possa se tratar de uma nova proteína. No entanto, esta banda pode ser oriunda de hemólise e produto de degradação de enzimas leucocitárias presentes no sangue enviado. Entretanto, o curioso aumento desta banda observado ao se empregar o NEM, sugere que o NEM, como é conhecido (MAHLER & CORDES, 1971), pode exercer ação química direta sobre as proteínas, rompendo ligações peptídicas envolvendo lisina, histidina e cisteína, provocando o aparecimento de uma família de novos peptídeos, explicando o aspecto difuso da banda.

Arctocephalus australis, (E. GEOFFROY ST. HILAIRE and F. CUVIER, 1826), lobo marinho das ilhas do sul - esta amostra foi obtida de um espécime morto (cerca de 6 horas), fêmea imatura, na praia de Capão da Canoa no Rio Grande do Sul. O perfil eletroforético desta espécie é semelhante ao encontrado no ***Arctocephalus tropicalis*** (vide figuras 27 e 28). Da mesma maneira que o ***Arctocephalus tropicalis***, encontramos também uma banda difusa na região de 56 kDa, à qual se pode extrapolar a discussão feita.

Ordem Carnivora

A ordem *Carnivora* é subdividida em duas sub-ordens: 1. Creodonta, que está extinta e 2. Fissipedia.

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de mamíferos pertencentes às famílias Felidae (guepardo, suçuarana, onça, leão, tigre e leopardo), família Procyonidae (mão pelada e quati), família Canidae (lobo guará, cachorro do mato e cachorro pastor alemão), famílias estas pertencentes a subordem Fissipedia.

Acynonyx jubatus, (BROOKES, 1828), guepardo - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresenta peso molecular de 134

kDa, bem definida; as proteínas 4.1 e 4.2 apresentam pesos moleculares de 77 e 73 kDa, respectivamente, vide figuras 35 e 36. Entre a banda 3 e a proteína 4.1, observou-se o aparecimento de duas bandas nítidas com pesos moleculares de aproximadamente 92 e 83 kDa. Como estas bandas persistem após o uso de inibidores de proteínas, estas proteínas podem tratar-se de novas proteínas participantes da estrutura protéica da membrana. Não houve diferença no perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases (Figuras 35 e 36).

Felis concolor, (LINNAEUS, 1758), suçuarana - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresenta peso molecular de 114 kDa, bem definida; as proteínas 4.1 e 4.2 apresentam pesos moleculares de 78 e 73 kDa, respectivamente, vide figuras 29 e 30. Na região da banda 4.9 se observa uma banda nítida com concentração maior (5,41%) que a humana (1,0%) (PALEK, 1995).

Panthera onca, (OKEN, 1816), onça - foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de duas onças preta e uma onça pintada. Apesar de se considerar que elas pertençam à mesma espécie, observamos que a onça pintada apresenta duas anquirinas além da anquirina 2.1. Embora o número de amostras estudado seja pequeno, não possibilitando qualquer afirmação sobre diferenças entre estes animais, este aspecto deverá ser considerado quanto ao estudo com inibidores. A onça apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresenta peso molecular de 114 kDa, bem definida; as proteínas 4.1 e 4.2 apresentam pesos moleculares de 78 e 75 kDa, respectivamente, vide figuras 29 e 30.

Panthera leo, (OKEN, 1816), leão - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresenta peso molecular de 114 kDa, bem definida; as proteínas 4.1 e 4.2 apresentam pesos moleculares de 78 e 75 kDa, respectivamente, vide figuras 37 e 38. Quando utilizamos os vários inibidores de proteases, percebe-se que, ao se utilizar o NEM, observa-se uma

banda difusa na região da banda 4.5, o que poderá constituir-se, da mesma maneira do que foi discutido para o *Arctocephalus tropicalis* e o *Didelphis marsupialis*, em produtos de ação química direta sobre outras proteínas de peso molecular maior.

Panthera tigris, (OKEN, 1816), tigre - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresenta peso molecular de 107 kDa, bem definida; as proteínas 4.1 e 4.2 apresentam pesos moleculares de 78 e 74 kDa, respectivamente, vide figuras 39 e 40. Não houve diferença nos perfis eletroforéticos das proteínas quando foram utilizados os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases.

Panthera pardus, (OKEN, 1816), leopardo - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresenta peso molecular de 108 kDa, bem definida; as proteínas 4.1 e 4.2 apresentam pesos moleculares de 78 e 75 kDa, respectivamente. O leopardo, no entanto, apresenta três anquirinas além da 2.1, vide figuras 29 e 30, que não desapareceram após o uso do PMSF sómente. Estas formas podem representar espécies moleculares obtidas de diferentes transcrições do RNA mensageiro do gene da anquirina, ou mesmo de transformações pós-translacionais.

Procyon cancrivorus, (STORR, 1780), mão pelada - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresenta peso molecular de 100 kDa, bem definida; as proteínas 4.1 e 4.2 apresentam pesos moleculares de 75 e 70 kDa, respectivamente. (Figuras 29 e 30)

Nasua nasua, (STORR, 1780), quati - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 4.1, 4.2, 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresenta peso molecular de 105 kDa, apresentando aspecto bem definido. (Figura 32)

Chrysocyon brachyurus, (HAMILTON SMITH, 1839), lobo guará - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 4.1, 4.2, 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresenta peso molecular de 102 kDa, apresentando aspecto bem definido. (Figura 29 e 30)

Cerdocyon thous, (HAMILTON SMITH, 1839), cachorro do mato - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 4.1, 4.2, 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresenta peso molecular de 108 kDa, apresentando aspecto bem definido, figuras 33 e 34.

Canis familiaris, (LINNAEUS, 1758), cachorro pastor alemão - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 4.1, 4.2, 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. A banda 3 apresenta peso molecular de 110 kDa, apresentando aspecto bem definido, figura 31.

Em relação às proteínas da membrana eritrocitária, observamos que os carnívoros pertencentes à família Canidae, sub-ordem Fissipedia, (cachorro do mato, cachorro pastor alemão e lobo guará) apresentam o mesmo perfil eletroforético, e que este perfil é semelhante ao da família Otariidae, apesar de esta família pertencer a outra ordem, Pinnipedia, e de ser um mamífero marinho.

Os animais estudados pertencentes à família Felidae em geral apresentam perfis eletroforéticos semelhantes das proteínas da membrana eritrocitária, chamando atenção o guepardo, pois este mamífero apresenta banda 3 com peso molecular maior do que os outros Felidae.

Em geral, os carnívoros apresentam a relação espectrinas/banda 3 maior do que a razão espectrinas/banda 3 do humano (vide tabela 10), indicando maior concentração relativa das espectrinas em relação à banda 3, com exceção do guepardo.

Ordem Rodentia

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de mamíferos pertencentes à família Caviidae (cobaia); família Muridae (rato Sprague-Dawley e camundongo); à família Myocastoridae (ratão do banhado); família Dasypoctidae (cutia) e família Cricetidae (hamster).

Cavia porcellus, (PALLAS, 1766), cobaia - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteína 4.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Observamos, no entanto, ausência da proteína 4.2; apresenta banda 3 com peso molecular de 126 kDa, com aspecto

de banda bem definida. Não houve diferença no perfil eletroforético das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases (PMSF, NEM, EDTA DFP, Pepstatin, pool e estroma sem inibidor), indicando que não houve ação de proteases. Quando utilizamos o para-hidroximercuribenzoato na concentração de 100 μ M, observamos que a razão espectrinas/banda 3 caiu de 1,3 (quando utilizamos o PMSF como inibidor para 1,0; que a concentração relativa de banda 5 foi de 4,5% com o uso PHMB e de 9,1% com PMSF. De um modo objetivo, podemos dizer que o PHMB, agiu sobre as espectrinas, 4.1 e proteína 5 da cobaia (vide figuras 41 e 42).

Rattus norvegicus, (FISCHER, 1803), rato - Sprague-Dawley - apresenta as espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresentam banda 3 com peso molecular de 103 kDa, apresentam duas proteínas correspondentes às bandas 4.1 e 4.2 de peso molecular a 72 kDa, e banda 6 bastante diminuída em relação ao humano, que tem concentrações relativa de 4,6% para 0,3 % no rato-Sprague-Dawley. (Figuras 43 e 44)

Mus musculus, (LINNAEUS, 1758), camundongo - apresenta as espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresentam banda 3 com peso molecular de 106 kDa; as proteínas 4.1 e 4.2 exibem peso molecular de 78 e 73 kDa, respectivamente (vide figuras 47 e 48). A banda 6 é bastante diminuída em relação ao humano, que tem concentrações relativa de 4,6% para 0,5 % no camundongo. Não houve diferença nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que a falta ou diminuição da banda 6 não é decorrente de proteólise.

Sabe-se que a enzima glicose-3-fosfato desidrogenase constitui, se não toda, quase o total da banda 6, e assim sendo se espera que a atividade desta enzima seja diminuída nos glóbulos vermelhos desta espécie. Realmente, BALLAS et al, 1985 e BALLAS (1987), estudando ratos e camundongos, respectivamente, não encontraram atividade da G3PD ligada à membrana, mas tão somente no citoplasma.

Os camundongos tem fornecido aos pesquisadores um importante material de estudo das proteínas da membrana, pois em 1978, GREENQUIST

e colaboradores descreveram uma linhagem deficiente de espectrinas tipo *sph/sph* que apresentavam aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos, o que permitiu a realização de uma série de estudos fundamentais que elucidaram o papel das espectrinas na manutenção do citoesqueleto do glóbulo vermelho. Quatro variantes de camundongos com herança recessiva para esferocitose tem sido descritas (AGRE, 1992) apresentando defeitos nas proteínas do citoesqueleto, *sph/sph*, *ha/ha*, *nb/nb* e *ja/ja* (BROOKOFF et al, 1982; BERNSTEIN, 1980; REINHART et al, 1988; BODINE et al, 1984). Os eritrócitos do *ha/ha* contem 30% da quantidade de espectrinas enquanto que os eritrócitos *sph/sph* apresentam síntese reduzida de α -espectrinas, exibindo apenas traços (BROOKOFF et al, 1982), os eritrócitos do camundongo *nb/nb* apresentam uma diminuição na quantidade de espectrinas e exibe ausência de anquirina 2.1 e a mutação do *ja/ja* leva a ausência da expressão da β -espectrina (BODINE et al, 1984). Deficiência de anquirina semelhante ao defeito do camundongo *nb/nb* tem sido relatado por COETZER et al, 1988 em um tipo de esferocitose severa em humanos. As espectrinas são essenciais para a manutenção da forma e estabilidade dos eritrócitos (GREENQUIST et al, 1978), e a sua deficiência tem sido encontrada em humanos que apresentam anemia esferocítica grave (AGRE et al, 1982).

Myocastor coypus, (KERR, 1792), ratão do banhado - apresenta as espectrinas, anquirina 2.1, proteína 4.1, 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresentam banda 3 com peso molecular de 112 kDa e aparente ausência de proteína 4.2. Embora a eletroforese em poliacrilamida a 10% não consiga discriminar duas bandas, o gradiente permite exibir duas bandas de pesos moleculares quase idênticos, na região da banda 4.1, sugerindo as formas 4.1a e 4.1b. A proteína 4.2 parece não ser representada nesta espécie. Não houve diferença nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases sobre as bandas 4.2. (Figuras 49 e 50)

Dasyprocta sp, (ILLIGER, 1811), cutia - A SDS-PAGE em gradiente de acrilamida revela a existência de quatro bandas correspondentes à região das espectrinas, sendo a primeira fração, de peso molecular maior, bem representada em termos de concentração relativa, duas frações fracas, pouco

representadas e uma quarta fração forte, mais concentrada que a primeira, correspondente esta à mobilidade da espectrina 2 humana, de 220 kDa. A cutia apresenta ainda uma banda que corresponde à anquirina, mas com peso molecular ao redor de 200 kDa. Apresenta banda 3 com peso molecular de 113 kDa. Além disso, parece não contar com a banda 4.2. O uso de inibidores indicou que as bandas anômalas e a falta de alguma outra não foram produto de ação de proteases, sugerindo de que se tratam de reais espécies moleculares distintas. (figuras 51 e 52)

Mesocricetus auratus, (NEHRING, 1894), hamster - apresenta as espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresentam banda 3 com peso molecular de 110 kDa, e parece exibir somente uma banda com peso molecular de 76 kDa, correspondentes à região 4.1 e 4.2; apresenta banda 6 bastante diminuída (1,5%) em relação ao humano. Não houve diferença nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases. (Figuras 45 e 46)

Observamos que o rato Sprague-Dawley, camundongo e o hamster apresentaram banda 6 marcadamente diminuída. BALLAS, 1987, encontrou que os eritrócitos da cobaia contem metade da atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD) presente nas células humanas, e cerca de 60% de sua atividade está ligada à membrana. Os eritrócitos dos coelhos tem metade da quantidade da enzima dos glóbulos vermelhos humanos, sendo a distribuição da G3PD no coelho semelhante ao que ocorre no humano, ou seja, 70% da enzima está ligada à membrana. Já os eritrócitos do camundongo apresentam cerca de 2/3 da atividade da G3PD presente nos eritrócitos humanos, e sua atividade está adstrita ao citoplasma. Os eritrócitos dos ratos apresentaram 25% da atividade da G3PD dos eritrócitos humanos, e assim como os camundongos, tem a sua atividade adstrita também ao citoplasma. Nos humanos, 1/3 da atividade da enzima está no citoplasma e 2/3 estão ligados à membrana (BALLAS et al, 1985).

Ordem Lagomorpha

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de mamíferos pertencentes à família Leporidae (coelho).

Oryctolagus cuniculus, (LILLJEBORG, 1874), coelho - Nova Zelândia - apresenta as espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresentam banda 3 com peso molecular de 104 kDa; apresentam duas proteínas correspondentes à região 4.1/4.2 com pesos moleculares próximos à 77 kDa; apresenta uma proteína de baixo peso molecular mais rápida que a banda 7 humana. Não houve diferença nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases. (Figuras 83 e 84)

Ordem Edentata (Xenarthra)

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de mamíferos pertencentes à família Bradypodidae (bicho-preguiça).

Bradypus tridactylus, (LINNAEUS, 1758), bicho-preguiça - apresenta as espectrinas, anquirina 2.1, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresentam banda 3 com peso molecular de 123 kDa; apresentam duas proteínas correspondentes à região 4.1/4.2 de peso molecular 82 kDa. Não houve diferença nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases. (Figuras 87 e 88)

Ordem Proboscidea

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de mamíferos pertencentes à família Elephantidae (elefante).

Elephas maximus, (LINNAEUS, 1758), elefante - apresenta as espectrinas, anquirinas, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Exibe uma família de anquirinas, constituídas de 6 a 7 bandas menores, perfazendo 17,8 %, visualizadas no gradiente. A

banda 3 se apresenta menos difusa que a humana e tem um peso molecular de 106 kDa; As duas proteínas que correspondem à região 4.1/4.2 humana tem um peso molecular discretamente maior, com 86 e 81 kDa. Apresenta ainda uma proteína de peso molecular 63 kDa entre as proteínas 4.2 e 4.5 bem concentrada (14,4%). Não houve diferença nos perfis eletroforéticos desta proteína quando vários inibidores de proteases foram utilizados, indicando que ela não é um produto de degradação, mas uma novel proteína. (Figuras 85 e 86)

O elefante apresenta a razão espectrin/banda 3 de 1,7, maior do que aquela encontrada nos humanos (1,0).

Ordem Artiodactyla

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de mamíferos pertencentes às famílias: Camelidae (camelo); Giraffidae (girafa); Cervidae (cervo nobre, veado campeiro e veado catingueiro); Bovidae (carneiro, boi-taurino, boi-zebuino, boi-híbrido e cabra alpina).

Camelus bactrianus, (LINNAEUS, 1758), camelo - apresenta as espectrin, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Entretanto, e curiosamente, não se encontra a anquirina, como já foi observado por OMORPHOS et al (1989). Como, em humanos, a presença da anquirina é fundamental para garantir a ligação entre a espectrina à banda 3, a falta desta proteína deverá ser suprida por alterações estruturais e funcionais das outras proteínas, especialmente as espectrin e a banda 3, que teriam suas afinidades químicas garantidas por ligações diretas ou através de outra proteína. Observa-se, no entanto, que na eletroforese por gradiente há uma região difusa ocupada por polipeptídeos situada logo acima da banda 3. Ora, estes polipeptídeos poderiam representar os hipotéticos polipeptídeos de que estaríamos falando, talvez uma novel família de anquirinas de variados pesos moleculares, talvez propiciando ligações mais estáveis estruturais e funcionais entre as espectrin e a banda 3, conferindo ao citoesqueleto dos eritrócitos camelídeos uma admirável estabilidade já anotada por OMORFHOS et al (1989). Esta hipótese poderá ser estudada através do uso de anticorpos anti-anquirina, que poderão revelar se estes polipetídeos representariam as

funções da anquirina clássica colocada como paradigma nos humanos, contanto que aqueles apresentem epítomos compatíveis. Apresenta banda 3 com peso molecular de 106 kDa; exibe uma proteína com peso molecular de 89 kDa, outra de 82 kDa o que corresponderia à proteína 4.1, outra banda de 71 kDa correspondente à proteína 4.2. Não houve diferenças nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases. (Vide figuras 69 e 70)

Os eritrócitos dos camelos e lhamas apresentam-se como pequenos eliptócitos e são muito resistentes à lise (PERK, 1963). Os camelos apresentam a membrana eritrocitária rica em proteínas, com a razão proteínas/lípidos de 3/1 (EITAN et al, 1976). KHODADAD & WEINSTEIN, 1983, demonstraram que os eritrócitos das lhamas são muito resistentes a tratamentos que convertem os eritrócitos humanos à forma de espiculada, que são: incubação em meio hipertônico, depleção de energia e incubação com lisofosfatilcolina, e relacionaram este fato à constituição da membrana desta espécie. Observaram ainda que, apesar de os eritrócitos da lhama terem 1/3 da área de superfície do eritrócito humano, eles contêm um número similar de polipetídeos da banda 3 humana.

RALSTON, 1975, observaram padrões eletroforéticos semelhantes das espectrinas no camelo, boi e humano, no entanto, houve diferenças em relação às glicoproteínas e banda 3 nestas espécies.

Giraffa camelopardalis, (BRÜNNICH, 1772), girafa - apresenta as espectrinas, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresenta, no entanto, três prováveis anquirinas, visualizadas na eletroforese por gradiente de concentração, em que uma delas, a segunda apresenta uma concentração de 24,8% e um peso molecular de 182 kDa. A primeira fração, de peso molecular maior, parece, no entanto, não ser uma espécie molecular bem definida, pois ao se lançar mão dos inibidores, ela desaparece quando o DFP, inibidor de todas as serinas-proteases (NEURATH, 1989), está presente, sinal de que uma protease foi inibida, uma serina-protease, e assim se pode afirmar de que esta primeira banda é um produto de degradação, possivelmente de uma espectrina, e também da própria anquirina 2.1 subjacente à beta-espectrina, que não está

presente quando não se usa o DFP ou o "pool", e que aparece quando o DFP não é empregado. O PMSF, embora inibidor de serina-proteases, não o é de todas, ao contrário do DFP. Apresenta banda 3 com peso molecular de 104 kDa e pouca difusa. Exibe duas proteínas de pesos moleculares de 79 e 73 kDa, correspondentes à região 4.1 e 4.2 (Figuras 71 e 72).

Cervus elaphus, (LINNAEUS, 1758), cervo nobre - apresenta as espectrinas, anquirinas, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresenta duas anquirinas além da 2.1, com pesos moleculares de 194 kDa e 162 kDa; apresenta banda 3 com peso molecular de 102 kDa e notável definição, ao contrário do aspecto difuso encontrado nas demais espécies estudadas. Exibe duas proteínas de pesos moleculares 79 e 72 kDa na região correspondente as bandas 4.1 e 4.2; apresenta uma banda com peso molecular de 46 kDa com concentração relativa de 5,4%. (Vide figuras 62, 63 e 64)

Ozotoceros bezoarticus, (AMEGHINO, 1891), veado campeiro - apresenta as espectrinas, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresenta duas anquirinas além da 2.1, com pesos moleculares de 203 kDa e 179 kDa; apresenta banda 3 com peso molecular de 104 kDa. Exibe duas proteínas de pesos moleculares 81 e 73 kDa na região das bandas 4.1 e 4.2; apresenta uma banda entre as bandas 4.5 e 5, com peso molecular de 47 kDa ($4.5X_1$) e concentração relativa de 4,6%. (Vide Figuras 62, 63 e 64)

Mazama gouazoubira, (RAFINESQUE, 1817), veado catingueiro - apresenta as espectrinas, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresenta duas anquirinas além da 2.1, com pesos moleculares de 196 kDa e 161 kDa; apresenta banda 3 com peso molecular de 105 kDa, presença de duas proteínas de pesos moleculares 79 e 74 kDa na região das bandas 4.1 e 4.2; apresenta uma banda com peso molecular de 49 kDa ($4.5X_1$) com concentração relativa de 1,6%. (Vide Figuras 64, 73 e 74)

Ovis aries, (LINNAEUS, 1758), carneiro - apresenta as espectrinas, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresenta duas anquirinas além da 2.1, com pesos moleculares de 194 kDa e

166 kDa; apresenta banda 3 com peso molecular de 99 kDa, presença de duas proteínas de pesos moleculares 82 e 73 kDa na região das bandas 4.1 e 4.2. Não houve diferença nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases. (Vide figuras 63, 65, 66 e 67)

Bos taurus, (LINNAEUS, 1758), boi - taurino - apresenta as espectrinas, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Observamos presença de oligômeros de espectrinas. Apresenta uma anquirina além da 2.1, com peso molecular de 202 kDa; apresenta banda 3 com peso molecular de 108 kDa, apresenta uma proteína de peso molecular de 90 kDa e duas proteínas com mobilidades muito próxima com peso molecular de 78 kDa na região das bandas 4.1/4.2. Apresenta uma banda com peso molecular de 47 kDa com concentração relativa de 4,9%. (Vide figuras 62, 63, 64, 77 e 78) Não houve diferença nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases. (Vide figuras 77 e 78)

Bos indicus, (LINNAEUS, 1758), boi- zebuino - apresenta as espectrinas, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Observamos a presença de oligômeros. Apresenta banda 3 com peso molecular de 108 kDa; apresenta duas proteínas com mobilidades muito próxima com peso molecular de 77 kDa na região das bandas 4.1 e 4.2. Apresenta uma banda com peso molecular de 48 kDa com concentração relativa de 3,2%. (Vide Figuras 62, 63, 64, 75 e 76) Não houve diferença nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases. (Figuras 75 e 76)

Híbrido ***Bos taurus/Bos indicus***, boi-girolanda - apresenta as espectrinas, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresentou oligômeros de espectrinas. Apresenta uma anquirina além da 2.1, com peso molecular de 205 kDa; apresenta banda 3 com peso molecular de 107 kDa, apresenta duas proteínas com mobilidades muito próxima com peso molecular de 78 kDa na região das bandas 4.1 e 4.2. Apresenta uma banda com peso molecular de 48 kDa com concentração relativa de 4,8%. (Vide figuras 79 e 80) Não houve diferença nos perfis

eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases.

Ao se analisar as duas espécies de bovinos, inclusive o seu cruzamento, pode-se concluir que não houve diferenças entre elas, mostrando uniformidade genética quanto às proteínas da membrana eritrocitária.

NAKASHIMA & MAKINO, 1980, estudaram o estado de associação da banda 3 da membrana eritrocitária de bovinos e observaram que os bovinos apresentam banda 3 com peso molecular de 107 kDa, resultado semelhante aos nossos.

Capra hircus, (LINNAEUS, 1758), cabra - apresenta as espectrinas, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresenta duas anquirinas além da 2.1, com pesos moleculares de 176 kDa com cerca de 17,4% e 153 kDa com 5,9%; apresenta banda 3 com peso molecular de 95 kDa, presença de duas proteínas de pesos moleculares 80 e 74 kDa na região das bandas 4.1 e 4.2. (Figuras 68 e 63)

INABA & MAEDE, 1988, relataram a presença de uma glicoproteína de peso molecular 155 kDa em cabras com concentrações relativas de 15 a 20%. Os autores analisaram a sequência de aminoácidos desta glicoproteína (gp), e obtiveram que a gp155 é um novo polipeptídeo com estrutura e função desconhecida.

Ordem Perissodactyla

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de mamíferos pertencentes à família Equidae (cavalo mangalarga e cavalo puro sangue inglês) e pertencentes à família Tapiridae (anta).

Tapirus terrestres, (BRISSON, 1762), anta - apresenta as espectrinas, anquirinas, proteína 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresenta banda 3 pouco difusa com peso molecular de 111 kDa; exibe duas proteínas com pesos moleculares próximos à 78 kDa na região da banda 4.1, talvez 4.1a e 4.1b, não exibindo a 4.2. (Vide Figuras 92 e 93)

Equus caballus, (LINNAEUS, 1758), cavalo mangalarga e cavalo puro sangue inglês) - apresentam espectrinas, anquirina 2.1, proteína 4.1, 5 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. As proteína 6 apresenta-se bem diminuída, o que talvez se reflita no grau de atividade de G3PD, vide tabela 20. Não houve diferenças nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases. Não foram observadas diferenças entre as duas raças estudadas. (Figuras 89, 90 e 91)

Ordem Cetacea

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de mamíferos pertencentes às famílias: Platanistidae (toninha); Iniidae (boto da Amazônia) e Delphinidae (golfinho pintado).

Pontoporia blainvillei, (GRAY, 1846), toninha ou franciscana - a amostra de sangue enviada era de um espécime morto (cerca de 16 horas), fêmea, capturada na praia de Solidão no Rio Grande do Sul e a amostra de sangue apresentou hemólise. A toninha apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteínas 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresenta banda 3 com peso molecular de 94 kDa; apresenta duas bandas com pesos moleculares de 72 kDa e 64 kDa correspondentes à região 4.1/4.2. (Figuras 56 e 57)

Inia geoffrensis, (D'ORBIGNY, 1834), boto da Amazônia - estas amostras de sangue foram coletadas da veia caudal dos botos, como parte de um estudo sobre os movimentos e da biologia populacional do boto da Amazônia desenvolvido na Estação Ecológica do Mamirauá (Tefé, Amazonas). O boto da Amazônia apresenta espectrinas, proteínas 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Observa-se uma anquirina; apresenta banda 3 com peso molecular de 118 kDa; apresenta duas proteínas correspondentes à região 4.1/4.2, vide figuras 61 e 62. Não houve diferença nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases. (Figuras 60 e 61)

Stenella frontalis, (GRAY, 1866), golfinho pintado - a amostra enviada era de uma fêmea adulta, capturada no litoral sul do Brasil, esta

amostra de sangue apresentou hemólise. O golfinho pintado apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteínas 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Observa-se que há 3 anquirinas, de tal modo que a banda provavelmente 2.3 se apresenta bem evidente, observável no gradiente. Exibe banda 3 com peso molecular de 116 kDa, somente uma banda com peso molecular de 80 kDa correspondente à região 4.1/4.2, e apresenta uma banda difusa de peso molecular 56 kDa, que pode ser albumina em virtude de termos trabalhado com sangue hemolisado e o estroma ter se ligado à albumina sérica, vide figuras 58 e 59. Não houve diferença nos perfis eletroforéticos das proteínas quando utilizamos os vários inibidores de proteases, indicando que não houve ação de proteases.

Ordem Chiroptera

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de mamíferos pertencentes à família Molossidae (morcego).

Tadarida brasiliensis, (RAFINESQUE, 1814), morcego - apresenta espectrinas, anquirina 2.1, proteínas 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresenta banda 3 com peso molecular de 104 kDa; apresenta uma banda com peso molecular de 77 kDa correspondente à região 4.1/4.2 e outra banda fraca com peso molecular de 71 kDa. (Figura 55)

Ordem Sirenia

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de mamíferos pertencentes à família Trichechidae (peixe-boi).

Trichechus inunguis, (LINNAEUS, 1758), peixe-boi - as amostras de sangue enviadas provieram de animais mantidos em cativeiro no INPA-Manaus. O peixe-boi apresenta espectrinas, proteínas 5, 6 e 7 semelhantes às proteínas da membrana eritrocitária humana. Apresenta uma banda correspondente as anquirinas com peso molecular menor do que 210 kDa (anquirina 2.1); apresenta a banda 3 com peso molecular de 126 kDa; apresenta uma banda com peso molecular de 92 kDa e outra com peso molecular de 83 kDa, correspondentes à região 4.1/4.2, exibem ainda duas

proteínas próximas à banda 5 de pesos moleculares de 47 e 45 kDa. (Figuras 53 e 54)

LENARD, 1970, estudou as membranas eritrocitárias do humano, rato, cachorro, carneiro e porco, e observou que as cinco espécies estudadas apresentavam oito proteínas de pesos moleculares 255, 240, 108, 86, 45, 32 e 22 kDa. O autor submeteu as membranas antes da desagregação ao N-etilmaleimida-¹⁴C com a proposição de identificar as cadeias que possuíam grupamento sulfidríla ativo, e obteve que o NEM reage completamente com os grupamentos sulfidrílas da membrana, dando origem a quatro grupos de proteínas, não havendo diferenças entre as espécies estudadas.

Diferenças na mobilidade da banda 3 em SDS-PAGE tem sido relatadas na literatura (HOSEY & TAO, 1976 em coelhos; RALSTON, 1975 em camelos e bovinos; HOWARD et al, 1979 em camundongos) e pode ser visualizadas nas figuras apresentadas por KITAO et al, 1977).

WHITFIELD et al, 1983, estudaram as variações espécies-dependentes das proteínas da membrana eritrocitária e observaram que tanto o porco e o camundongo apresentam a banda 4.1b com pesos moleculares menor do que a banda 4.1b humana, que a banda 3 tem pesos moleculares maiores do que a humana e que as outras proteínas (espectrinas, actina, banda 2.1 e 4.2) apresentam pesos moleculares semelhantes nas duas espécies estudadas.

BARKER, 1991, estudou as proteínas da membrana eritrocitária e as glicoproteínas do rato, camundongo, carneiro e cachorro, e observou que as bandas 1, 2, 3, 4.2, 5 e 8 eram equivalentes às bandas humanas, e que a banda 3 apresentou algumas variações de pesos moleculares. Os resultados encontrados por BARKER (1991) são concordantes com os nossos, no entanto, no carneiro, os autores acima não encontraram a presença de anquirinas, devido ao fato, de eles não terem se utilizado do gradiente de gel de poliacrilamida.

GACZYNSKA et al, 1988, estudaram a auto-digestão das membranas eritrocitárias de humanos, coelhos, ratos, bovinos, suínos, hamsters e camundongos, submetendo eritrócitos à lavagens sucessivas após a retirada do "buffy coat" e posterior preparação dos estromas. Estes estromas foram ressuspensos em tampão fosfato 5mM (cerca de 2mg/ml) e incubados a 37°C. Após 0, 8,24 e 48 horas de incubação as alíquotas foram processadas e realizado as eletroforeses segundo LAEMMLI. Os autores analisaram a digestão das espectrinas e banda 3 dos ghosts sem incubação e incubados e observaram que não houve correlação entre a meia-vida, auto-digestão e conteúdo da membrana inicial. As concentrações relativas iniciais de espectrinas, encontradas pelos autores acima, foram de 19,7% $\pm$ 1,2 para o homem; 21,4% $\pm$ 0,4 para o bovino; 8,6% $\pm$ 1,0 para o rato; 32,5 % para o camundongo, 28,2% $\pm$ 2,1 para o hamster e 20,6 % $\pm$ 0,7 para o coelho. Estes valores em concentrações relativas são menores do que os nossos encontrados no homem (32,0%), boi taurino (33,3%), rato Sprague Dawley (40,0%), camundongo (37,4%) e hamster (39,1%).

INABA & MAEDE, 1988, relatam que o humano, o boi, o cavalo, o carneiro, o cachorro e a cabra apresentam eritrócitos com meia vida (tempo de circulação do eritrócito no sangue periférico) maior do que 100 dias e exibem a razão das proteínas 4.1a/4.1b de 1,2 a 1,8, enquanto que o coelho e o camundongo apresentam a razão 4.1a/4.1b menor que 0,5 e apresentam eritrócitos com meia vida diminuída (coelho $\pm$ 50 dias e camundongo $\pm$ 30 dias). Observaram ainda que, as membranas eritrocitária dos mamíferos estudados apresentam as proteínas 4.1a 4.2b, e estas proteínas apresentam diferença de 2 a 3 kDa nos seus pesos moleculares.

CONCLUSÕES

1. Não parece haver correlação entre as concentrações relativas de espectrinas e o volume corpuscular médio.

2. Não parece haver correlação entre as concentrações relativas de banda 3 e o volume corpuscular médio.

3. Parece haver uma correlação inversa entre as concentrações relativas das anquirinas e o volume corpuscular médio. Assim, a maior parte dos animais pertencentes à ordem dos *Artiodactyla* estudados (girafa, cervo nobre, veado campeiro, veado catingueiro, carneiro, cabra), que apresentam volume corpuscular baixo, exibe aumento significativo da concentração das anquirinas.

4. Observou-se, o aparecimento de uma banda difusa na região 4.5 no *Didelphis marsupialis* (gambá), *Arctocephalus tropicalis* e *Arctocephalus australis* (lobo marinho subantártico e lobo marinho das ilhas do sul) e *Panthera leo* (leão) quando os estromas são submetidos à ação do NEM na concentração de 200 μ M, e o não encontro desta banda nas demais espécies estudadas. Este fato poderia advir da hipótese de haver, nas três espécies, sequências de aminoácidos comuns que possibilitariam a ação química direta do NEM.

5. Observou-se que, nos mamíferos estudados, embora houvesse variações qualitativas e quantitativas das proteínas da membrana nas espécies estudadas, praticamente todas elas apresentaram as proteínas descritas no *Homo sapiens*, mostrando serem todas elas importantes na manutenção do citoesqueleto e da membrana como um todo.

6. Com exceção da cutia, que exhibe provavelmente quatro formas de espectrinas, todas as demais espécies exibiram duas formas, embora com variações qualitativas e quantitativas.

7. A banda 3 foi a proteína que mais exibiu variação, seja no peso molecular, com variação desde 95 kDa (***Capra hircus***, cabra) até 169 kDa (***Alouatta sp***, bugio), seja no aspecto difuso ou bem definido.

8. Houve na região 4.1/4.2 uma variabilidade grande, seja qualitativa, seja quantitativa com aparentes ausências de uma ou de outra. Alguns roedores, a cobaia, cutia, hamster exibiram somente uma banda protéica na região 4.1/4.2.

9. Entre os primatas, todas as proteínas apresentaram o mesmo padrão entre os Hominoidea (macacos antropóides, ***Gorilla gorilla*** e ***Pongo pygmaeus*** e homem, ***Homo sapiens***) e os do Velho Mundo (Cercopithecoidea, ***Papio cynocephalus*** e ***Erythrocebus pata***). Mas, os primatas do Novo Mundo (Ceboidea, ***Cebus apella***, ***Alouatta sp*** e ***Ateles paniscus chamek***) apresentaram variação do peso molecular da banda 3, apresentando no entanto o mesmo aspecto difuso dos outros primatas descritos anteriormente.

10. Com exceção do ***Didelphis marsupialis*** (gambá) e ***Giraffa camelopardalis*** (girafa), que apresentaram evidência da ação de serina-proteases sobre uma anquirina, as demais espécies não exibiram proteases intra-eritrocitárias ativas nas condições estudadas.

RESUMO

Foram estudadas as proteínas da membrana eritrocitária de quarenta e seis espécies diferentes pertencentes à treze ordens da classe Mammalia, através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Observamos que :

1. não parece haver correlação entre as concentrações relativas de espectrinas e o volume corpuscular médio.
2. não parece haver correlação entre as concentrações relativas de banda 3 e o volume corpuscular médio.
3. parece haver uma correlação inversa entre as concentrações relativas das anquirinas e o volume corpuscular médio. Assim, a maior parte dos animais pertencentes à ordem dos *Artiodactyla* estudados (girafa, cervo nobre, veado campeiro, veado catingueiro, carneiro, cabra), que apresentam volume corpuscular baixo, exibe aumento significativo da concentração das anquirinas.
4. observou-se, o aparecimento de uma banda difusa na região 4.5 no *Didelphis marsupialis* (gambá), *Arctocephalus tropicalis* e *Arctocephalus australis* (lobo marinho subantártico e lobo marinho das ilhas do sul) e *Panthera leo* (leão) quando os estromas são submetidos à ação do NEM na concentração de 200 μ M, e o não encontro desta banda nas demais espécies estudadas. Este fato poderia advir da hipótese de haver, nas três espécies, sequências de aminoácidos comuns que possibilitariam a ação química direta do NEM.
5. observou-se que, nos mamíferos estudados, embora houvesse variações qualitativas e quantitativas das proteínas da membrana nas espécies estudadas, praticamente todas elas apresentaram as proteínas descritas no *Homo sapiens*, mostrando serem todas elas importantes na manutenção do citoesqueleto e da membrana como um todo.
6. Com exceção da cutia, que exibe provavelmente quatro formas de espectrinas, todas as demais espécies exibiram duas formas, embora com variações qualitativas e quantitativas.
7. A banda 3 foi a proteína que mais exibiu variação, seja no peso molecular, com variação desde 95 kDa (*Capra hircus*, cabra) até 169 kDa (*Alouatta sp*, bugio), seja no aspecto difuso ou bem definido.
8. Houve na região 4.1/4.2 uma variabilidade grande, seja qualitativa, seja quantitativa com aparentes ausências de uma ou de outra. Alguns roedores, a cobaia, cutia, hamster exibiram somente uma banda protéica na região 4.1/4.2.
9. Entre os primatas, todas as proteínas apresentaram o mesmo padrão entre os Hominoidea (macacos antropóides, *Gorilla gorilla* e *Pongo pygmaeus* e homem, *Homo sapiens*) e os do Velho Mundo (Cercopithecoidea, *Papio cynocephalus* e *Erythrocebus pata*). Mas, os primatas do Novo Mundo (Ceboidea, *Cebus apella*, *Alouatta sp* e *Ateles paniscus chamek*) apresentaram variação do peso molecular da banda 3, apresentando no entanto o mesmo aspecto difuso dos outros primatas descritos anteriormente.
10. Com exceção do *Didelphis marsupialis* (gambá) e *Giraffa camelopardalis* (girafa), que apresentaram evidência da ação de serina-proteases sobre uma anquirina, as demais espécies não exibiram proteases intra-eritrocitárias ativas nas condições estudadas.

Erythrocyte membrane proteins from selected mammals of thirteen orders.

Forty six different mammal species from thirteen orders were investigated regarding their erythrocyte membrane proteins, using SDS-PAGE. The following data were observed:

1. No correlation was observed between mean corpuscular volume and spectrins concentration.
2. No correlation was observed between mean corpuscular volume and band 3 concentration.
3. It seems that there is inverse correlation between mean corpuscular volume and ankyrins concentration. Most of the studied animals belonging to *Artiodactyla*, which exhibit low mean corpuscular volume, present higher ankyrin concentration.
4. A diffuse band in 4.5 region was observed among the *Didelphis marsupialis*, *Arctocephalus tropicalis*, *Arctocephalus australis* and *Panthera leo* when the ghosts were treated with 200 μ M NEM, what was not found in the others species. This fact could be ascribed to hypothetical sequence of the lysine, histidine and cysteine which may be prone to NEM direct chemical action.
5. Although some qualitative and quantitative changes were observed among all the studied species, all of them seem to occur in the humans, disclosing that they are "house-keeping" proteins which participate as important pieces in the cytoskeleton structure and the membrane as well.
6. All the species presented two spectrins, with exception of *Dasyprocta sp.*, which exhibited four bands in the spectrins region.
7. The band 3 was the protein which showed the greatest variation, since 95 kDa in the *Capra hircus* up to 169 kDa in the *Alouatta sp.*, as well as in the aspect, diffuse or well defined.
8. A great variability was observed in the 4.1/4.2 region, with apparent absence of one or another. Some *Rodentia* exhibited only one protein in the 4.1/4.2 region.
9. Among the *Primates*, the Hominoidea and the Cercopithecoidea presented an uniform pattern, but the New World monkeys (*Cebus apella*, *Alouatta sp.* and *Ateles paniscus chamek*) exhibited a striking molecular weight band 3 variation, although keeping the common diffuse pattern.
11. All the studied species did not present the evidence of protease action upon the membrane proteins, except the *Didelphis marsupialis* and *Giraffa camelopardalis*, which disclosed a proteolytic action upon the ankyrin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRE, P.; ORRINGER, E. P.; BENNETT, V. - Deficient red-cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis. **New. Engl. J. Med.**, **306** (19):1155-1161, 1982.
- AGRE, P.; CASELLA, J. F.; ZINKHAM, W. H.; McMILLAN, C.; BENNETT, V. - Partial deficiency of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis. **Nature**, **314**: 380-383, 1985.
- AGRE, P. - Clinical relevance of basic research on red cell membranes. **Clin. Res.**, **40** (2): 176-186, 1992.
- AL-ALI, A. K.; HUSAYNI, H. A.; POWER, D. M. - A comprehensive biochemical analysis of the blood of the camel (*Camelus dromedarius*). **Comp. Biochem. Physiol.**, **89 B** (1): 35-37, 1988.
- AMEGHINO, 1891. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - **Walkers's Mammals of the World**. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- ANSTEE, D. J. & TANNER, M. J. A. - Structure and function of red cell membrane sialo-glicoproteins. **Br. J. Haematol.**, **64**: 211-215, 1986.
- BALLAS, S. K.; GOODMAN, A. M.; STOLL, D. B. - Differences in red cell membrane proteins in rhesus monkey erythrocytes. **Comp. Biochem. Physiol.**, **68 B**: 421-423, 1981.
- BALLAS, S. K.; KLIMAN, H. J.; SMITH, E. D. - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of rat erythrocytes has no membrane component. **Biochim. Biophys. Acta**, **831**: 142-149, 1985.
- BALLAS, S. K. - Comparative distribution of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in human, guinea-pig, rabbit and mouse erythrocytes. **Comp. Biochem. Physiol.**, **87 B** (4): 837-842, 1987.
- BANERJEE, S.; BHATTACAARJEE, R. C.; SINGH, T. I. - Hematological studies in the normal adult Indian Camel. (*Camelus dromedarus*). **Am. J. Physiol.**, **203**: 1185-1187, 1962.

- BARKER, R. N. - Electrophoretic analysis of erythrocyte membrane proteins and glycoproteins from different species. **Comp. Haematol. Int.**, **1**: 155-160, 1991.
- BARRETTO, O. C. O. P. - Distúrbios protéicos das anemias esferocíticas e eliptocíticas. **Boletim**, **14** (159): 10-16, 1992.
- BECKER, P. S.; TSE, W.T.; LUX, S.E.; FORGET, B.G. - β -Spectrin Kissimmee - a spectrin variant associated with autosomal dominant hereditary spherocytosis and defective binding to protein 4.1. **J. Clin. Invest.**, **92**: 612, 1993.
- BENNETT, V. - The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeleton. **Biochim. Biophys. Acta**, **988**: 107-121, 1989.
- BERNSTEIN, S. E. - Inherited hemolytic disease in mice: a review and update. **Lab. Anim. Sci.**, **30** (2): 197-205, 1980.
- BIRGEL, E. H. - Estudo do quadro eritrocitário de caprinos (*Capra hircus*, L.) normais, criados no Estado de São Paulo. São Paulo, FMVZ da USP, 1973. 92p. (Tese de Livre Docência).
- BODINE IV, D. M.; BIRKENMEIER, C. S.; BARKER, J. E. - Spectrin deficient inherited hemolytic anemias in the mouse: characterization by spectrin synthesis and mRNA activity in reticulocytes. **Cell**, **37**: (3) 721-729, 1984.
- BOND, J. S. & BUTLER, E. - Intracellular proteases. **Ann. Rev. Biochem.**, **56**: 333-364, 1987.
- BRISSON, 1762. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - **Walkers's Mammals of the World**. 4 th ed. Baltimore/London The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- BROOKES, 1828. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - **Walkers's Mammals of the World**. 4 th ed. Baltimore/London The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.

- BROOKOFF, D.; MAGGIO-PRICE, L.; BERNSTEIN, S.; WEISS, L. - Erythropoiesis in ha/ha and sph/sph mice, mutants which produce spectrin-deficient erythrocytes. *Blood*, **59** (3): 646-651, 1982.
- BRÜNNICH, 1772. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - *Walkers's Mammals of the World*. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- CHETRITE, G.; DUBREUIL, Y. L.; CASSOLY, R. - Studies on the fragmentation of erythrocyte ghost membrane with p-chloromercuribenzoate in the micromolar range. *Biochim. Biophys. Acta*, **731**: 16-22, 1983.
- CLARK, S. J. & RALSTON, G. B. - The dissociation of peripheral proteins from erythrocyte membranes brought about by p-mercuribenzenesulfonate. *Biochim. Biophys. Acta*, **1021**: 141-147, 1990.
- COETZER, T. & ZAIL, S. - Spectrin tetramer-dimer equilibrium in hereditary elliptocytosis. *Blood*, **59** (5): 900-905, 1982.
- COETZER, T. L.; LAWLER, J.; LIU, S. C.; PRCHAL, J. T.; GUALTIERI, R. J.; BRAIN, M. C.; DACIE, J. V.; PALEK, J. - Partial ankyrin and spectrin deficiency in severe, atypical hereditary spherocytosis. *New. Engl. J. Med.*, **318** (4): 230-234, 1988.
- COHEN, C. M. - The molecular organization of red cell membrane skeleton. *Semin. Hematol.*, **20** (3): 141-158, 1983.
- COHEN, C. M.; DOTIMAS, E.; KORSGREN, C. - Human erythrocyte membrane protein band 4.2 (Pallidin). *Semin. Hematol.*, **30** (2): 119-137, 1993.
- CONBOY, J.; MOHANDAS, N.; TCHERNIA, G.; KAN, Y. W. - Molecular basis of hereditary elliptocytosis due to protein 4.1 deficiency. *New. Engl. J. Med.*, **315** (11): 680-685, 1986.
- CONBOY, J. G.; SHITAMOTO, R.; PARA, M.; WINARDI, R.; KABRA, A.; SMITH, J.; MOHANDAS, N. - Hereditary elliptocytosis due to both qualitative and quantitative defects in membrane skeletal protein 4.1. *Blood*, **78** (9): 2438-2443, 1991.

- COSTA, F. F.; AGRE, P.; WATKINS, P. C.; WINKELMANN, J. C.; TANG, T. K.; JOHN, K. M.; LUX, S. E.; FORGET, B. G. - Linkage of dominant hereditary spherocytosis to the gene for the erythrocyte membrane-skeleton protein ankyrin. *New Engl. J. Med.*, **323** (15): 1046-1050, 1990.
- DACIE, J. V. & LEWIS, S. M. *Practical Haematology*. 6. ed. Churchill Livingstone, 1984. 453p.
- DAL COLLETO, G.M.D.; FULKER, D.W.; BARRETTO, O.C. de O.; KOLYA, M. - Genetic and environmental effects on blood cells. *Acta Genet. Med. Gemellol.*, **42**: 245-252, 1993.
- DODGE, J. T.; MITCHELL, C.; HANAHAN, D. J. - The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**: 119-130, 1963.
- D'ORBIGNY, 1834. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - *Walkers's Mammals of the World*. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- DUNN, B.M. - Determination of the proteases mechanism. In: _____ BEYNON, R.J.; BOND, J.S. eds. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford, IRL Press at Oxford University Press, 1989. p.57- 81, p.244. 259 p.
- EITAN, A.; ALONI, B.; LIVNE, A. - Unique properties of the camel erythrocyte membrane II. Organization of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **426**: 647-658, 1976.
- ERXLEBEN, 1977. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - *Walkers's Mammals of the World*. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- FAIRBANKS, G.; STECK, T. L.; WALLACH, D. F. H. - Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**: 2606-2617, 1971.
- FEDDAL, S.; BRUNET, G.; RODA, L.; CHABANIS, S.; ALLOISIO, N.; MORLÉ, L.; DUCLUZEAU, M. - T.; MARÉCHAL, J.; ROBERT, J. - M.; BENZ JR, E. J.; DELAUNAY, J.; BAKLOUTI, F. - Molecular

analysis of hereditary elliptocytosis with reduced protein 4.1. in the French Northern Alps. **Blood**, **78** (8): 2113-2119, 1991.

FEO, C. J.; FISCHER, S.; TIAU, J. P.; GRANGE, M. J.; TCHERNIA, G. - Premiere observation de l'absence d'une proteine de la membrane erythrocytaire (bande 4.1) dans un cas d'anemie elliptocytaire familiale. **Nouv. Rev. Fr. Hematol.**, **22**: 315-325, 1980.

FISCHER, 1803. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - **Walkers's Mammals of the World**. 4th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.

FOWLER, V. M. & BENNETT, V. Erythrocyte membrane tropomyosin. **J. Cell. Biol.**, **97**: 28 A, 1983.

FOWLER, V. M. & BENNETT, V. - Erythrocyte membrane tropomyosin. Purification and properties. **J. Biol. Chem.**, **259** (9): 5978-5989, 1984.

GACZYŃSKA, M.; BARTOSZ, G.; ROSIN, J.; SOSZYŃSKI, M. - Self-digestion of erythrocyte membranes of various mammalian species. **Comp. Biochem. Physiol.**, **91 B** (4): 617-618, 1988.

GEOFFROY ST. HILAIRE, E., 1806. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - **Walkers's Mammals of the World**. 4th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.

GEOFFROY ST. HILAIRE, E. 1852. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - **Walkers's Mammals of the World**. 4th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.

GEOFFROY ST. HILAIRE, E.; CUVIER, 1826. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - **Walkers's Mammals of the World**. 4th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.

GOMPERTS, E. D.; METZ, J.; ZAIL, S. S. - A red cell membrane protein abnormality in hereditary spherocytosis. **Br. J. Haematol.**, **23**: 363, 1972.

- GRAY, 1846. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - ***Walkers's Mammals of the World***. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- GREENQUIST, A. C.; SHOHET, S. B.; BERNSTEIN, S. E. - Marked reduction of spectrin in hereditary spherocytosis in the common house mouse. ***Blood***, **51** (6): 1149-1155, 1978.
- HANSPAL, M.; YOON, S. H.; YU, H.; HANSPAL, J. S.; LAMBERT, S.; PALEK, J.; PRCHAL, J. T. - Molecular basis of spectrin and ankyrin deficiencies in severe hereditary spherocytosis: evidence implicating a primary defect of ankyrin. ***Blood***, **77** (1): 165-173, 1991.
- HOSEY, M. M. & TAO, M. - An analysis of the autophosphorylation of rabbit and human erythrocyte membranes. ***Biochemistry***, **15** (7): 1561-1568, 1976.
- HOWARD, R. J.; SMITH, P. M.; MITCHELL, G. F. - Identification of differences between the surface proteins and glycoproteins of normal mouse (Balb/c) and human erythrocytes. ***J. Membr. Biol.***, **49**: 171-198, 1979.
- ILLIGER, 1811. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - ***Walkers's Mammals of the World***. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- INABA, M. & MAEDE, Y. - A new major transmembrane glycoprotein, gp 155, in goat erythrocytes. Isolation and characterization of its association to cytoskeleton through binding with band 3-ankyrin complex. ***J. Biol. Chem.***, **263** (33): 17763-17771, 1988.
- INABA, M. & MAEDE, Y. - Correlation between protein 4.1a/4.1b ratio and erythrocyte life span. ***Biochim. Biophys. Acta***, **944**: 256-264, 1988.
- JAIN, N. C. & KEETON, K. S. - Morphology of camel and llama erythrocytes as viewed with the scanning electron microscope. ***Br. Vet. J.***, **130**: 288-291, 1974.
- JAIN, N. C. - ***Schalm's Veterinary Hematology***. 4. ed. Philadelphia, Lea Febiger, 1986. 1.220 p.

- JAROLIN, P.; RUBIN, H.L.; BRABEC, V.; PALEK, J. - Band 3 Prague: A duplication of 10 bases in the erythroid band 3 gene in a kindred with hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. (abstract). *Blood*, **80** (suppl1): 277a, 1992.
- KERR, 1792. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - *Walkers's Mammals of the World*. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- KHODADAD, J. K. & WEINSTEIN, R. S. - The band 3-rich membrane of Llama erythrocytes: studies on cell shape and the organization of membrane proteins. *J. Membr. Biol.*, **72**: 161-171, 1983.
- KITAO, T.; HATTORI, K.; TAKESHITA, M. - Species difference in the effects of proteolytic enzymes on red cell membrane. *Experimentia*, **33** (7): 675-677, 1977.
- KLIMAN, H. J. & STECK, T. L. - Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with the human red cell membrane. *J. Biol. Chem.*, **255** (13): 6314-6321, 1980.
- KNOWLES, W.; MARCHESI, S. L.; MARCHESI, V. T. - Spectrin: structure, function, and abnormalities. *Semin. Hematol.*, **20** (3): 159-174, 1983a.
- KNOWLES, W. J.; MORROW, J. S.; SPEICHER, D. W.; ZARKOWSKY, H. S.; MOHANDAS, N.; MENTZER, W. C.; SHOHET, S. B.; MARCHESI, V. T. - Molecular and functional changes in spectrin from patients with hereditary pyropoikilocytosis. *J. Clin. Invest.*, **71**: 1867-1877, 1983b.
- KORSGREN, C. & COHEN, C. M. - Associations of human erythrocyte band. 4.2: Binding to ankyrin and to the cytoplasmic domain of band 3. *J. Biol. Chem.*, **263** (21): 10212-10218, 1988.
- LACÉPÈDE, 1799. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - *Walkers's Mammals of the World*. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, **227**: 680-685, 1970.

- LAMBERT, S. & ZAIL, S. - Partial deficiency of protein 4.1 in hereditary elliptocytosis. *Am. J. Hematol.*, **26**: 263-272, 1987.
- LEE, J. C.; KUEHL, T. J.; ROODMAN, G. D. - Developmental changes in membrane proteins from baboon erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **88 B** (1): 233-236, 1987.
- LENARD, J. - Protein components of erythrocyte membranes from different animal species. *Biochemistry*, **9** (25): 5037-5040, 1970.
- LILLJEBORG, 1874. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - *Walkers's Mammals of the World*. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- LINNAEUS, 1758. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - *Walkers's Mammals of the World*. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- LIU, S. C.; PALEK, J.; PRCHAL, J.; CASTLEBERRY, R. P. - Altered spectrin dimer-dimer association and instability of erythrocyte membrane skeletons in hereditary pyropoikilocytosis. *J. Clin. Invest.*, **68**: 597-605, 1981.
- LIU, S. C.; PALEK, J.; PRCHAL, J. T. - Defective spectrin dimer-dimer association in hereditary elliptocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 2072-2076, 1982.
- LIU, S. C.; DERICK, L. H.; PALEK, J. - Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J. Cell Biol.*, **104**: 527-536, 1987.
- LIU, S.-C. & DERICK, L. H. - Molecular anatomy of the red blood cell membrane skeleton: structure-function relationships. *Semin. Hematol.*, **29** (4): 231-243, 1992.
- LIVNE, A. & KUIPER, P. J. C. - Unique properties of the camel erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **318**: 41-49, 1973.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.
- LUX, S. E.; JOHN, K. M.; BENNETT, V. Structure of human erythrocyte ankyrin: homology to protein involved in differentiation in cell-cycle regulation. *Clin. Res.*, **37**: 547 A, 1989.
- LUX, S. E.; TSE, W. T.; MENNINGER, J. C.; JOHN, K. M.; HARRIS, P.; SHALEV, O.; CHILCOTE, R. R.; MARCHESI, S. L.; WATKINS, P. C.; BENNETT, V.; MCLINTOSH, S.; COLLINS, F. S.; FRANCKE, U.; WARD, D. C.; FORGET, B.G. - Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8. *Nature*, **345**: 736-739, 1990.
- MAHLER, H. R. & CORDES, E.H. - *Biological Chemistry*. 2. ed. New York, Harper & Row Publishers, 1971. p.342 1009p.
- MARCHESI, V. T.; STEERS, E. Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane. *Science* (Wash. D. C.), **159**: 203-204, 1968.
- MARCHESI, V. T. - The red cell membrane skeleton: Recent progress. *Blood*, **61** (1): 1-11, 1983.
- MARCHESI, S. L.; KNOWLES, W. J.; MORROW, J. S.; BOLOGNA, M.; MARCHESI, V. T. - Abnormal spectrin in hereditary elliptocytosis. *Blood*, **67** (1): 141-151, 1986.
- MARCHESI, S.L.; AGRE, P.; SPEICHER, D.W - Mutant spectrin all domain in recessively inherited spherocytosis (abstract). *Blood*, **74**(suppl 1): 182a, 1989.
- MARCHESI, S.L.; BENOIT, L.; BEARDSLEY, D. - Two families with spherocytosis and unstable β -spectrin (abstract). *Blood*, **80** (suppl 1): 276a, 1992.
- MISCHE, S. M.; MOOSEKER, M. S.; MORROW, J. S. - Erythrocyte adducin: A calmodulin-regulated actin-bundling protein that stimulates spectrin-actin binding. *J. Cell. Biol.*, **105** (6): 2837-2845, 1987.

- MOHANDAS, N. & CHASIS, J.A. - Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. **Semin. Hematol.**, **30** (3): 171-192, 1993.
- NAKASHIMA, H. & MAKINO, S. - State of association of band 3 protein from bovine erythrocyte membrane in nonionic detergent. **J. Biochem.**, **88**: 933-947, 1980.
- NEHRING, 1894. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - **Walkers's Mammals of the World**. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: _____ BEYNON, R.J.; BOND, J.S. eds. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Oxford, IRL Press at Oxford University Press, 1989. p.1-13. 259 p.
- NIRMALAN, G.; NAIR, S.G.; SIMON, K.J. - Hematology of the indian elephant (*Elephas maximus*). **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **45**: 985-991, 1967.
- NORTH, M. J. - Prevention of unwanted proteolysis. In: _____ BEYNON, R.J.; BOND, J.S. eds. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Oxford, IRL Press at Oxford University Press, 1989. p.105-124. 259 p.
- NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - **Walkers's Mammals of the World**. 4 th ed. Baltimore and London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- OKEN, 1816. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - **Walkers's Mammals of the World**. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- OMORPHOS, S. A.; HAWKEY, C. M.; RICE-EVANS, C. - The elliptocyte: a study of the relationship between cell shape and membrane structure using the camelid erythrocyte as a model. **Comp. Biochem. Physiol.**, **94 B** (4): 789-795, 1989.

- PALATNIK, M.; SIMÕES, M. L. M. S.; ALVES, Z. M. S.; LARANJEIRA, N. S. M. - The 60 and 63 kDa proteolytic peptides of the red cell membrane band-3 protein: their prevalence in human and non-human primates. *Hum. Genet.*, **86**: 126-130, 1990.
- PALEK, J.; LIU, S.-C.; LIU, P.-Y.; PRCHAL, J.; CASTLEBERRY, R. P. - Altered assembly of spectrin in red cell membranes in hereditary pyropoikilocytosis. *Blood*, **57** (1): 130-139, 1981.
- PALEK, J. The red cell membrane. In: _____ BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLER, B. S. et al eds. *Williams Hematology*. 5 th ed. New York, McGraw-Hill, 1995. p.406-416. 1668p.
- PALEK, J.; JAROLIM, P. - Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and related disorders. In: _____ BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLER, B. S. et al eds. *Williams Hematology*. 5 th ed. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 536-563. 1668p.
- PALLAS, 1766. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - *Walkers's Mammals of the World*. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- PERK, K. - The camel's erythrocyte. *Nature*, **19**: 272-273, 1963.
- PERK, K.; FREI, Y. F.; HERZ, A. - Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. *Am. J. Vet. Res.*, **25**: 1241-1248, 1964.
- RAFINESQUE, 1817. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - *Walkers's Mammals of the World*. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- RALSTON, G. B. - Proteins of the camel erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **401**: 83-94, 1975.
- RALSTON, G. B. & CRISP, E. A. - The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **649**: 98-104, 1981.

- RALSTON, G.B. - Proteins of marsupial erythrocyte membranes. *Aust. J. Biol. Sci.*, **38**: 121-129, 1985.
- REINHART, W. H.; SUNG, A. L. P.; SUNG, P. K. L.; BERNSTEIN, S. E.; CHIEN, S. - Impaired echinocytic transformation of ankyrin and spectrin-deficient erythrocytes in mice. *Am. J. Hematol.*, **29**: 195-200, 1988.
- SCHRIER, S. L. - Red cell membrane biology. *Clin. Haematol.*, **14**: 1-12, 1985.
- SHOEHT, S. B. & BEUTLER, E. The red cell membrane. In: WILLIAMS, W. J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A. J.; LICHTMAN, M. *Hematology*. 4 ed., New York, N. Y., Mc Graw Hill, 1990, pp 368-378.
- SIEGEL, D. L. & BRANTON, D. - Human erythrocyte band 4.9, an actin bundling protein. *J. Cell. Biol.*, **97**: 279 A, 1983.
- SIMPSON, C.F. & TAYLOR, W.J. - Ultrastructure of sickled deer erythrocytes. I- The typical crescent and holly leaf forms. *Blood*, **43** (6): 899-915, 1974.
- SMITH, H., 1839. In: _____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - *Walkers's Mammals of the World*. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- SINGER, S. J. & NICOLSON, G. L. - The fluid mosaic model of membrane structure. *Science*, **175**: 720-731, 1972.
- SNYDER, L. M.; LIU, S. C.; PALEK, J.; SRIVASTAVA, S.K.; FORTIER, N. L.; BULAT, P.; EDELSTEIN, S.K. - Partitation of catalase and its peroxidase activities in human red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **470**: 290-302, 1977.
- SPEICHER, D. W & MARCHESI, V. T. - Spectrin domains: proteolytic susceptibility as a probe of protein structure. *J. Cell. Biochem.*, **18** (4): 479-492, 1982.

- SPEICHER, D. W.; MORROW, J. S.; KNOWLLES, W.J.; MARCHESI, V.T. - A structural model of human erythrocyte spectrin. Alignment of chemical and functional domains. *J. Biol. Chem.*, **257** (15): 9093-9101, 1982.
- SPEICHER, D. W. & SPEICHER, K. D. - Analysis of spectrin conformation using multiples approaches. *J. Cell Biochem.*, **13B** (suppl.): 220, 1989.
- STECK, T. L. -The band 3 protein of the human red cell membrane: a review. *J. Supramol. Struct.*, **8**: 311-324, 1978.
- STORER, T. I. & USINGER, R. L. Classe mammalia In:_____ *Zoologia Geral*. 6 ed. Companhia Editora Nacional, 1991. pp. 697-743. 816p.
- STORR, 1780. In:_____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - *Walkers's Mammals of the World*. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- TCHERNIA, G.; MOHANDAS, N.; SHOHET, S. B. Deficiency of skeletal protein band 4.1 in homozygous elliptocytosis: implications for erythrocyte membrane stability. *J. Clin. Invest.*, **68**: 554-460, 1981.
- TROVESSART, 1897. In:_____ NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. - *Walkers's Mammals of the World*. 4 th ed. Baltimore/London, The Hopkins University Press, 1983. 1362 p.
- TSAI, I. H.; MURTHY, S. N. P.; STECK, T. L. Effect of red cell membrane binding on the catalytic activity of gliceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **257** (3): 1.438-1.442, 1982.
- WEBER, K. & OSBORN, M. - The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel-electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244** (16): 4406-4412, 1969.
- WHITFIELD, C. F.; MYLIN, L. M.; GOODMAN, S. R. - Species-dependent variations in erythrocyte membrane skeletal proteins. *Blood*, **61** (3): 500-506, 1983.

WHITTEN, C.F. - Innocuous nature of the sickling (pseudosickling) phenomenon in deer. **Br. J. Haematol.**, **13**: 650-655, 1967.

WILSON, D.E. & REEDER, D.A.M. - **Mammal species of the world**. - A taxonomic and geographic reference. 2. ed. Washington, Smithsonian Institution Press, 1993.

YAGIL, R.; SOD-MORIAH, U. A.; MEYERSTEIN, N. - Dehydration and camel blood. II. - Shape, size, and concentration of red blood cells. **Am. J. Physiol.**, **226** (2): 301-304, 1974.

YU J.; FISCHMAN, D.; STECK, T. - Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood membranes by non-ionic detergents. **J. Supramol. Struct.**, **1**: 233-248, 1973.