



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

# Contribuição ao Estudo do Metabolismo Glicídico em Eritrócitos de Animais Domésticos

MAURÍCIO BACILA

Tese apresentada à Universidade Federal  
do Paraná para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Veterinárias.

CURITIBA  
1989

PARA KARIN, COM AFETO.

## AGRADECIMENTOS

À ilustre e distinta Orientadora, Prof. Dra Clotilde de Lourdes Branco Germiniani, pela dedicação mostrada em todas as etapas do meu Curso de Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr Metry Bacila, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, por sua diuturna e constante colaboração.

Ao Prof. Dr Rubens Rosa, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, por sua orientação nas etapas de estudos enzimológicos do presente trabalho.

Ao Prof. Dr Edson Rodrigues, da Universidade de São Francisco, Bragança Paulista, pelo auxílio prestado na fase inicial do presente trabalho.

Ao Prof. Dr Pedro Hélio Lucchiari e ao Prof. Dr Matheus Sugizaki, do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, pela orientação nos trabalhos de eletrofise.

Ao estudante Rodrigo de Almeida e à Farmacêutico-Bioquímico Thalma Krieger, pela inestimável colaboração e pelo auxílio técnico prestados durante a execução das pesquisas do presente trabalho.

Ao Prof. Dr Ivan Deconto e ao Prof. Dr Osvair Escorsin, desta Universidade, ao Prof. Fernando José Benesi e à Prof. Márcia Meri Kozika do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, à distinta colega do Curso de Pós-Graduação, Marise Eppinger e à Farmacêutico-Bioquímico Maria Alves dos Santos, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, bem como a alunos do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, pelo inestimável auxílio prestado em etapas diversas das pesquisas.

Um agradecimento muito especial à Sra Tânia Mara Schrank, Secretária do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela dedicação que sempre colocou em todas as etapas de nossas atividades, e para a Srta Marcia. Inês Claro dos Santos, pelos trabalhos de datilografia da presente Tese.

Às seguintes instituições, cujo apoio permitiu a condução e a conclusão de minhas atividades para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

À Vallée Nordeste S/A, na pessoa do Dr Luiz Norberto Borges Guimarães, pelo irrestrito apoio às minhas atividades de Pós-Graduação.

## ABREVIATURAS

ADP - Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

ENO - Enolase

GAPDH - Gliceraldeído-fosfato desidrogenase

G-6-PDH - Glicose-6-fosfato desidrogenase

FruP<sub>2</sub> - Frutose-1,6-bisfosfato

FruP<sub>2</sub>-ALD - Frutose-1,6-bisfosfato aldolase

GS-SG - Glutâtion oxidado

GSH - Glutâtion reduzido

Hb - Hemoglobina

HbA<sub>1c</sub> - Hemoglobina glicosilada

HbEL - Hemoglobina de eluição lenta

HbER - Hemoglobina de eluição rápida

HK - Hexoquinase

LDH - Desidrogenase do lactato

NAD<sup>+</sup> - Nicotina adenina dinucleotídeo

NADH + H<sup>+</sup> - Nicotina adenina dinucleotídeo, forma reduzida

NADP<sup>+</sup> - Nicotina adenina dinucleotídeo fosfato

PFK - Fosfofrutoquinase

6-PGDH - 6-Fosfogliconato desidrogenase

PGI - Fosfoglicose isomerase

PGK - Fosfogliceratoquinase

PK - Piruvatoquinase

## CONTEÚDO

I.	INTRODUÇÃO.....	1
II.	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
	2.1. Material Biológico.....	11
	2.2. Coleta de Sangue.....	12
	2.2.1. Manuseio das Amostras de Sangue.....	12
	2.2.2.1. Determinação da Taxa Glicêmica e da Com- partimentalização da Glicose.....	12
	2.2.2.2. Determinação da Hemoglobina Glicosilada (Hemoglobina de Eluição Rápida - HbER). 12	
	2.2.2.3. Obtenção de Suspensões Padronizadas de Eritrócitos para o Estudo de Células In- tactas.....	13
	2.2.2.4. Obtenção de Hemolisados de Papa Eritro- citária para a Determinação de Níveis de Enzimas.....	15
	2.3. Métodos Hematológicos.....	15
	2.4. Métodos Analíticos.....	15
	2.4.1. Glicose.....	15
	2.4.1.1. Reativo Cromogênico.....	16
	2.4.1.2. Curva Padrão da Glicose.....	16
	2.4.2. Proteína.....	17
	2.4.3. Hemoglobina.....	17
	2.4.4. Hemoglobina Glicosilada.....	17

2.5. Mobilidade Eletroforética de HbER e HbEL.....	18
2.6. Determinação do Acido Láctico.....	19
2.7. Determinação do Fluxo Glicolítico.....	19
2.8. Determinação da Atividade Metabólica de Hemolissados.....	20
2.9. Determinação dos Níveis de Enzimas Eritrocitárias.....	20
2.9.1. Hexoquinase (HK).....	20
2.9.2. Fosfoglicoisomerase (PGI).....	21
2.9.3. Fosfofrutoquinase (PFK).....	21
2.9.4. Fructose-1,6-bisfosfatoaldolase (FruP <sub>2</sub> -ALD).....	22
2.9.5. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).....	22
2.9.6. Fosfogliceratoquinase (PGK).....	23
2.9.7. Fosfopiruvato hidratase - Enolase (ENO). 23	
2.9.8. Piruvatoquinase (PK).....	23
2.9.9. Desidrogenase do Lactato (LDH).....	24
2.9.10. Glicose-6-fosfatodesidrogenase (G-6-PDH).....	24
2.9.11. 6-Fosfogliconato desidrogenase (6-PGDH). 25	
3. Equipamentos.....	25
4. Reagentes.....	26
III. RESULTADOS.....	27
3.1. Fluxo Glicolítico em Eritrócitos de Ovinos.....	27
3.2. Fluxo Glicolítico em Eritrócitos de Animais Domésticos e do Homem.....	28
3.3. Valores de Hemoglobina Glicosilada e da Glicemia em Animais Domésticos.....	29

3.4. Correlação entre níveis Glicêmicos e Taxas de Hemoglobina de Eluição Rápida.....	29
3.5. Mobilidade Eletroforética de Hemoglobinas de Eluição Rápida e de Eluição Lenta.....	31
3.6. Níveis Eritrocitários de Enzimas da Glicólise, da Lactodesidrogenase e das Enzimas da Região Proximal da Via das Pentose-fosfatos.....	31
3.7. Concentrações relativas de Enzimas Eritrocitárias.....	34
3.8. Atividade Metabólica de Hemolisados: Formação de Lactato.....	38
IV. DISCUSSÃO.....	39
V. SUMÁRIO E ABSTRACT.....	65
VI. CONCLUSÕES.....	69
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## I. INTRODUÇÃO

O objetivo inicial do presente trabalho foi o de estudar os efeitos metabólicos de fosfatos de rocha na nutrição de ovinos. Entretanto, tendo em vista o conteúdo de fluoretos naquele material (Tabela 1), os estudos iniciais foram centrados, na busca de um método conveniente e de fácil execução, que permitisse monitorizar a investigação dos níveis de fluoreto sanguíneo, antes de atingir manifestações de ordem patológica.

TABELA 1

DADOS COMPARATIVOS DOS TEORES DE FÓSFORO E DE FLÚOR  
EM VÁRIAS ROCHAS FOSFÁTICAS\*

ROCHA FOSFÁTICA	ORIGEM	FLUOR (%)	FOSFORO (%)
TUNISIA	SEDIMENTAR	3,35	12,58
CAROLINA DO NORTE	SEDIMENTAR	3,14	13,16
ISRAEL	SEDIMENTAR	3,99	14,18
MARROCOS	SEDIMENTAR	4,04	14,13
FLORIDA	SEDIMENTAR	3,65	14,15
PATOS	METAMORFICA	1,85	10,55
CATALAO	IGNEA	2,52	14,65
ARAXA	IGNEA	2,40	14,12
TAPIRA	IGNEA	1,34	14,80

\* FONTES: LOPES & PEREIRA (1986); AMMERMAN (1982); BALLIO (1983).

Considerando, então, que o mais adequado indicador do processo de intoxicação do animal pelo  $F^-$  seria a medida da

atividade da enolase (2-fosfo-D-glicerato hidrolíase; E.C. 4.2.1.11), enzima da via glicolítica que é por ele inibida, foi desenhado um modelo experimental, com base na determinação do fluxo glicolítico do eritrócito e a sua possível inibição pelo fluor.

Entretanto, como a pesquisa científica conduz sempre, a caminhos desconhecidos e inesperados, ocorreu que nos ensaios levados a efeito com eritrócitos de ovinos, o material biológico de experimentação escolhido para os testes nutricionais, essas células mostraram-se com aparente incapacidade de permear glicose, nas condições experimentais utilizadas para estudar o fluxo glicolítico.

Foram, então, no presente trabalho, levados a efeito experimentos de purificação de enolase de eritrócitos de ovinos bem como de fígado de rato, esta última para finalidades comparativas, além de experimentos de inibição respirométrica de leveduras frente a diferentes concentrações de fluor, tudo isso com o objetivo de estudar a cinética da inibição da enolase, purificada a partir de diferentes tecidos de ovinos, e, assim, estabelecer as bases experimentais para a análise desse processo.

Diversos trabalhos e comunicações referentes à essa etapa das pesquisas, que continuam em andamento, estão em elaboração para serem dados a público.

Porém, a constatação da aparente inabilidade do eritrócito de ovinos de permear glicose nas condições utilizadas para os experimentos de fluxo glicolítico, mostrou-se muito atraente e conduziu a pesquisa no sentido de esclarecer esse fenômeno e fez, então, com que se levasse a efeito um estudo

do comportamento do eritrócito de ovinos em comparação com o de eritrócitos de outras espécies, (bovinos, equinos e caninos), para fins comparativos.

Desse modo, o corpo central de pesquisas da presente Tese de Mestrado, diz respeito ao estudo do metabolismo glicídico do eritrócito de algumas espécies de animais domésticos, a fim de esclarecer o seu comportamento bioquímico e para dar o embasamento científico para outras pesquisas.

Para tanto, foram estudados o compartilhamento da glicose no sangue, a sua permeação pelo eritrócito, o relacionamento dos níveis glicêmicos com os da hemoglobina glicosilada, aqui denominada hemoglobina de eluição rápida. Por outro lado, foram determinados os níveis de enzimas da glicólise e da parte proximal da via das pentose-fosfatos em eritrócitos de todas as espécies de animais estudados bem como a formação de lactato a partir de glicose e de 2,3-bisfosfoglicerato em hemolisados.

A composição do eritrócito em enzimas e em componentes orgânicos e minerais, especialmente do humano, tem sido objeto de muitos estudos e de uma vasta literatura cuja revisão completa escapa aos limites deste trabalho.

O eritrócito maduro é uma célula de funções limitadas em razão da sua especialização em produzir  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  essencial para os processos de manutenção da integridade da membrana celular. Assim, além das enzimas da glicólise, da desidrogenase do lactato, e das enzimas da via das pentose-fosfatos, o eritrócito possui, entre outras, glutátion reductase, glutátion peroxidase, glioxalase I, glioxalase II adenilatoquinase, ribosefosfato piroquinase, adenina-fosforribosiltransferase, e

anidrase carbônica, esta última a proteína mais abundante do eritrócito, após a hemoglobina.

Interesse especial sobre a atividade metabólica do eritrócito e seus sistemas enzimáticos surgiu da descoberta de BENESCH & BENESCH (1967) e de CHANUTIN & CURNISH (1967) de que a adição de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-DPG) e de adenosinatri-fosfato (ATP) a soluções diluídas de hemoglobina diminuem drasticamente a afinidade desta última para o oxigênio, enquanto que AKERBLOM et al, (1968), ENGEL & DUC (1968), e LEN-FANT et al, (1968), encontraram uma estreita relação inversa entre a afinidade do oxigênio e a concentração desses fosfo-compostos em eritrócitos humanos intactos. De acordo com BENESCH & BENESCH, (1969), a ligação do 2,3-DPG se faz com a cadeia  $\beta$  da hemoglobina e não com as  $\alpha$ , provavelmente através do resíduo de histidina  $\beta$ -H21 (GARBY e De VERDIER, 1970), a hemoglobina desoxigenada tendo maior afinidade do que a oxigenada.

A deoxi-hemoglobina é capaz de ligar 1 mole de fosfato orgânico enquanto que a oxihemoglobina não o faz. No homem, os fosfatos orgânicos que realizam essa função são o 2,3-DPG e o ATP. Em aves (RODRIGUES, 1987), o inositol penta-fosfato (IP5) toma o lugar do 2,3-DPG que não existe no eritrócito desses animais, quando adultos.

As concentrações intraeritocitárias de 2,3-DPG podem ser alteradas por diversos fatores. A ligação do 2,3-DPG à hemoglobina diminui a quantidade de 2,3-DPG que pode participar do equilíbrio  $1,3\text{-DPG} \rightleftharpoons 2,3\text{-DPG}$  o que causa incremento da síntese de 2,3-DPG às expensas de 1,3-DPG. Por outro lado, o pH intraeritocitário parece exercer diversos efeitos sobre

suas concentrações. Assim, o 2,3-DPG aumenta sua taxa de ligação à hemoglobina quando o pH diminui. Por outro lado, há estímulo da glicólise quando o pH se eleva, aumentando assim, os níveis de intermediários eritrocitários da glicólise, inclusive do 2,3-DPG. O pH afeta, também a atividade da PGM (fosfogliceratomutase) bem como da PGMase (fosfogliceratofosfatase) enzimas responsáveis pela síntese e pela degradação do 2,3-DPG.

No que respeita ao metabolismo do eritrócito, devem ser mencionados, entre outros, o trabalho pioneiro de BARRON & HARROP (1928) que estudaram o efeito do azul de metileno e de outros corantes sobre a glicólise e a formação de ácido láctico em eritrócito de mamíferos e de aves e os de WARBURG CHRISTIAN (1931) quando descobriram, em eritrócitos de equinos, a glicose-6-fosfato desidrogenase e a sua coenzima, o NADP (coenzima 2; TPN) e, ainda, a descoberta da 6-fosfogliconato desidrogenase por WARBURG et al (1935). Nos seus estudos iniciais, WARBURG & CHRISTIAN (1931) analisaram o fato estabelecido anteriormente por BARRON & HARROP (1928) de que o azul de metileno induz respiração pelo eritrócito, em termos de consumo de oxigênio, estabelecendo, então, que esse fenômeno estava ligado ao  $\text{NADP}^+$  e envolvia a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato.

Importante contribuição ao estudo do comportamento metabólico do eritrócito, foi a de DISCHE (1964) que, entre outras contribuições, indicou a propriedade do 2,3-DPG de inibir diversas enzimas do metabolismo dos carboidratos, inclusive a HK.

Muito interesse foi despertado, então, no sentido de elucidar os mecanismos de controle no sistema multienzimático da glicólise no eritrócito, observado em distintas condições. Nesse particular WILLIAMSON (1970) determinou as concentrações relativas das diversas enzimas da glicólise do eritrócito humano medidas em termos de atividades como moles/ml de células/hora.

Analisando os desvios do equilíbrio das reações glicolíticas em sistema de registro gráfico do 10 Kapp/Keq por enzima considerada, WILLIAMSON (1970) verificou que as reações da HK, da PK estão deslocadas do equilíbrio dentro de uma ordem de magnitude de 3 a 7 enquanto que todas as outras enzimas estão em ordem de magnitude de 1,0 do equilíbrio.

O problema da distribuição de compostos de fósforo ácido-solúveis no eritrócito de vertebrados havia sido já cuidado por RAPOPORT E GUEST em 1941. Ao desenvolver técnica cromatográfica com resina de troca catiônica para separação e análise dessas substâncias, BARTLETT (1959, 1970) fez extenso estudo a respeito dos compostos de fósforo orgânico existentes no eritrócito de distintos animais. No eritrócito humano, o 2,3-DPG é o composto predominante (cerca de 10  $\mu$ M, como fósforo) seguido de ATP (2,5  $\mu$ M por ml de eritrócito). Além desses, foram identificados FDP, GDP, MDP (Manose 1,6-bisfosfato), ADP, UDPG, NADP, HMP, AMP, NAD.

De acordo com WILLIAMSON (1970) vários fatores afetam o fluxo glicolítico, dentre eles o pH do meio, já que o pH ótimo para a utilização da glicose e a produção de lactato é de 7,8 em eritrócitos oxigenados, mudando para pH mais ácido, em sangue desoxigenado. Quando se eleva o pH do meio de 7 para 7,4 e

7,8, sucessivamente, ocorre incremento da glicólise eritrocitária que é revelado em curva onde se registra, na ordenada, o percentual de pH 7,0 como controle, e a sequência dos intermediários da glicólise na abcissa. Nesse experimento, há ativação da PFK quando o pH passa de 7,0 para 7,4. A pH 7,8, os níveis de ATP são mais baixos, enquanto que os de ADP são mais altos do que o pH 7,0.

Além do pH, são importantes, no processo glicolítico do eritrócito, a natureza dos fosfocomponentes celulares e as concentrações do Mg livre e complexado da célula.

Eritrócitos de coelho possuem níveis de 2,3-DPG duas vezes mais elevados do que os do homem. Eritrócitos de suínos, por sua vez, possuem elevadas quantidades de 2,3-DPG bem como de ATP, apesar de terem dificuldade em metabolizar glicose. Em leitões neonatos, que podem utilizar glicose, os níveis eritrocitários de 2,3-DPG são bem inferiores aos daqueles dos eritrócitos dos animais adultos. Em equinos e em caninos, os níveis de 2,3-DPG são altos e comparáveis aos do homem, se bem que os equinos possuem bem menos ATP que o homem (2,5  $\mu$ M no homem para 0,5  $\mu$ M nos equinos) bovinos e ovinos (BARTLETT, 1970) possuem conteúdo eritrocitário de 2,3-DPG e de ATP bem menor dos que ocorrem em equinos e caninos.

BARTLETT & BORGESE (1976), em eritrócitos de embriões de pato; ISAACKS et al (1976) em embriões de pinto e em galinha adulta; BARTLETT (1970) em eritrócito de pombo; e BACILA et al (1989) em eritrócitos de embriões do pinguim Pygoscellis adeliae e de aves adultas, demonstraram que no eritrócito de embriões há níveis altos de 2,3-DPG que decrescem drasticamente tão logo ocorra a eclosão do ovo, sendo substituído, a partir daí, por IP5.

Em anfíbios e em répteis, a situação é menos clara já que BARTLETT (1976) encontrou altas concentrações de 2,3-DPG no eritrócito da tartaruga marinha Chelonia mydas durante o desenvolvimento embrionário, o 2,3-DPG desaparecendo durante o primeiro ano de vida e sendo gradualmente substituído por inositol pentafofato (IP5). Em crocodilos (Alligator mississippiensis) não foram encontrados 2,3-DPG e IP5 tanto em jovens, após a eclosão do ovo, bem como em animais de 3 anos de idade, enquanto que na salamandra, na rã e no sapo, há elevadas concentrações de 2,3-DPG mas não de IP5 em ambas as fases de respiração da vida desses animais.

A determinação dos níveis de enzimas eritrocitárias, particularmente daquelas ligadas ao metabolismo glicídico vem sendo objeto de muitos estudos, desde que BARRON & HARROP (1928) estudaram o efeito do azul de metileno no metabolismo do eritrócito de mamíferos e de aves e não conseguiram demonstrar a formação de lactato em eritrócitos de aves, estudos que foram seguidos pela descoberta da G-6-PGDH e do NADP<sup>+</sup> em eritrócitos de equinos por WARBURG & CHRISTIAN (1931) e da 6-PGDH por WARBURG et al (1935).

Estudos ligados ao metabolismo de eritrócitos de animais domésticos são assinalados na literatura científica. ZINKL & KANEKO (1973), analisaram as enzimas eritrocitárias e os intermediários glicolíticos em bovinos normais e em bovinos com porfíria eritropoiética. MEDEIROS (1973), fez um estudo de eritroenzimologia em cavalo puro sangue inglês e de sua aplicabilidade ao diagnóstico da anemia infecciosa equina e MEDEIROS et al (1977) estudaram os níveis de intermediários glicolíticos e de glutâtion em cavalos puro sangue inglês, compa-

rando-os com os do eritrócito humano; HARVEY & KANEKO (1975) analisaram os níveis de enzimas eritrocitárias e de glutatíon do cavalo, do cão, do gato e do homem; AGAR & SMITH (1974) fizeram um estudo do metabolismo eritrocitário de caprinos; AGAR et al (1975) fizeram um estudo comparativo das atividades enzimáticas de eritrócitos de distintas raças de ovinos; LOVE et al (1974) estudaram o metabolismo da glicose e do "shunt" das hexose-monofosfatos em eritrócitos de bovinos. DRESDNER et al (1974) levaram a efeito um estudo sobre atividades enzimáticas e a membrana de eritrócitos de bovinos; MAGNANI et al (1978) fizeram um estudo comparativo das atividades de fosforilação da glicose em eritrócitos de mamíferos; além de muitos estudos com eritrócitos de suínos e outros, mais enzimológicos, que saem dos limites do presente trabalho.

Em aves, estudos do metabolismo eritrocitário e a determinação de níveis de enzimas da glicólise e da via das pentose-fosfatos foram objetos de pesquisas em Gallus gallus domesticus (ROSA et al; 1983<sub>a</sub>; 1983<sub>b</sub>) e em pinguins Pygoscellis antarctica e Pygocellis papua (ROSA et al, 1989). Foi verificado que em sangue de aves a glicose está praticamente toda compartimentalizada no plasma e que o eritrócito é ineficiente em relação ao metabolismo glicêmico, apesar de possuir todo o equipamento de enzimas glicolíticas.

À parte dos aspectos do metabolismo eritrocitário, a observação da existência de heterogeneidade na hemoglobina humana fetal e do adulto (ALLEN et al, 1958) despertou grande interesse, quando McDONALD et al (1978) verificaram que a fração de HbA<sub>1c</sub> é constituída de hemoglobina glicosilada (Fig.12), cuja estrutura foi esclarecida por HOLMQUIST

& SCHROEDER (1966), BOOKCHIN & GALLOP (1968) e por KOENIG et al (1977).

Maior interesse despertou ainda, a HbA<sub>1C</sub>, quando se verificou que, em diabéticos, em situação, portanto, em que há elevação das taxas glicêmicas, os teores de HbA<sub>1C</sub> duplicam ou triplicam (RAHBAR, 1968; TRIVELLI et al, 1971; KOENIG et al, 1976; GABBAY et al, 1977; GONEN et al, 1977).

Em outros animais, que não o homem, estudos de hemoglobina glicosilada foram apenas estudados em macaco rhesus, quanto à sua biossíntese (SOLWAY et al, 1979) e por KOENIG CERAMI (1975) em uma variedade de camundongo diabético destinado ao estudo da hemoglobina glicosilada.

Pela análise acima procedida, verifica-se que muitos aspectos de metabolismo glicídico do eritrócito de animais domésticos estão ainda para ser estudados. Desse modo, planejou-se, para o presente trabalho, determinar o grau de compartilhamento da glicose sanguínea entre o plasma e o eritrócito de ruminantes (ovinos e bovinos), equinos e caninos; o estudo do fluxo glicolítico; a determinação dos níveis de enzimas eritrocitárias ligadas ao metabolismo glicídico; a determinação da capacidade de hemolisados de produzirem lactato, e, finalmente, a determinação dos valores de hemoglobina glicosilada nos eritrócitos desses mesmos animais por técnica de cromatografia em resina de troca catiônica.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Foram coletadas 186 amostras de sangue venoso distribuídas da maneira seguinte: ovinos, 64; equinos, 56; bovinos, 35; caninos, 23; homem, 8.

Para tanto, foram utilizados ovinos das raças Suffolk, Ideal e Corrie dale e bovinos da raça holandesa vermelho-e-branco e preto-e-branco, do Centro de Estações Experimentais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade do Paraná; bovinos mestiços de holandês preto-e-branco, do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná; equinos P.S.I. do Jôquei Clube do Paraná e da Sociedade Hípica Paranaense; equinos Percheron sem raça definida, do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná; caninos sem raça definida, do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná; caninos das raças Dálmata, Beagle, Dog Alemão, Basset Hound e Doberman, animais sadios da Clínica Veterinária São Francisco de Assis, Curitiba; equinos P.S.I., bovinos da raça holandesa vermelho-e-branco e preto-e-branco, ovinos sem raça definida e cães da raça Pastor Alemão, todos animais sadios do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

## 2.2. COLETAS DE SANGUE

As coletas foram procedidas em tubos "vacuntainer" contendo heparina (para estudos de fluxo glicolítico e para as determinações de níveis de enzimas eritrocitárias, de atividades metabólica e de formação de lactato, bem como para a obtenção de dados hematimétricos); EDTA (para determinação de hemoglobina glicosilada e para eletroforese de HbER e de Hb<sub>el</sub>); fluoreto de sódio (para determinação de níveis glicêmicos e para estudos de compartimentalização de glicose no sangue).

### 2.2.1. Manuseio das Amostras de Sangue

O manuseio das amostras de sangue coletadas do modo indicativo, foi procedido do modo a seguir descrito.

#### 2.2.1.1. Determinação da Taxa Glicêmica e da Compartimentalização da Glicose

O sangue, coletado na presença de F<sup>-</sup>, foi suavemente agitado para uniformizar a suspensão e a glicemia do sangue total estabelecida em alíquotas de 0,2 ml. Para as medidas da taxa glicêmica do plasma, este último foi obtido como sobrenadantes do sangue total centrifugado a 2.000 rpm, por 10 min, em centrífuga refrigerada K70D.

#### 2.2.1.2. Determinação da Hemoglobina Glicosilada (hemoglobina de eluição rápida HbER)

Para a determinação de HbER, 0,20 ml de sangue total coletado em EDTA como anticoagulante, foram transferidos para tubo de ensaio contendo 0,4 ml de solução de cianeto de potássio (50 mg/dL), o sistema sendo agitado fortemente até a hemólise total.

### 2.2.1.3. Obtenção de Suspensões Padronizadas de Eritrócitos para o Estudo de Células Intactas

As suspensões padronizadas de eritrócitos para o estudo de fluxo glicolítico e de níveis de enzimas foram obtidas de acordo com o fluxograma da Fig. 1, obedecendo aos seguintes detalhes:

I. A um tubo de ensaio (14X140), contendo 4 ml de solução de NaCl 0,154 M, transferir 10 ml de sangue total, coletado em heparina;

II. Vedar com "parafilm" e inverter, suavemente, por 10 a 15 vezes;

III. Deixar em repouso, na posição vertical;

IV. Iniciada a separação, remover, cautelosamente, o sobrenadante (plasma, leucócitos, plaquetas). Essa operação é feita à temperatura ambiente e demora cerca de 45 minutos;

V. Após a remoção do sobrenadante, adicionar 3 volumes de solução fisiológica, agitar suavemente, evitando hemólise e formação de espuma, e centrifugar em centrífuga refrigerada, a 5°C, a 2.000 rpm. Essa operação é realizada, sucessivamente, nos tempos de 15, 10 e 5 minutos, respectivamente, após cada lavagem o sobrenadante sendo aspirado com bomba à vácuo, buscando-se aspirar toda a "papa" leucocitária, mesmo que, para isso, ocorra perda de um pouco de eritrócitos;

VI. Após a última centrifugação e sucessiva aspiração do sobrenadante, o volume de eritrócitos é anotado;

VII. Para estudos de fluxo glicolítico, uma alíquota de 1 ml de eritrócitos sedimentados é transferido para erlenmeyer de 25 ml com rolha esmerilhada.

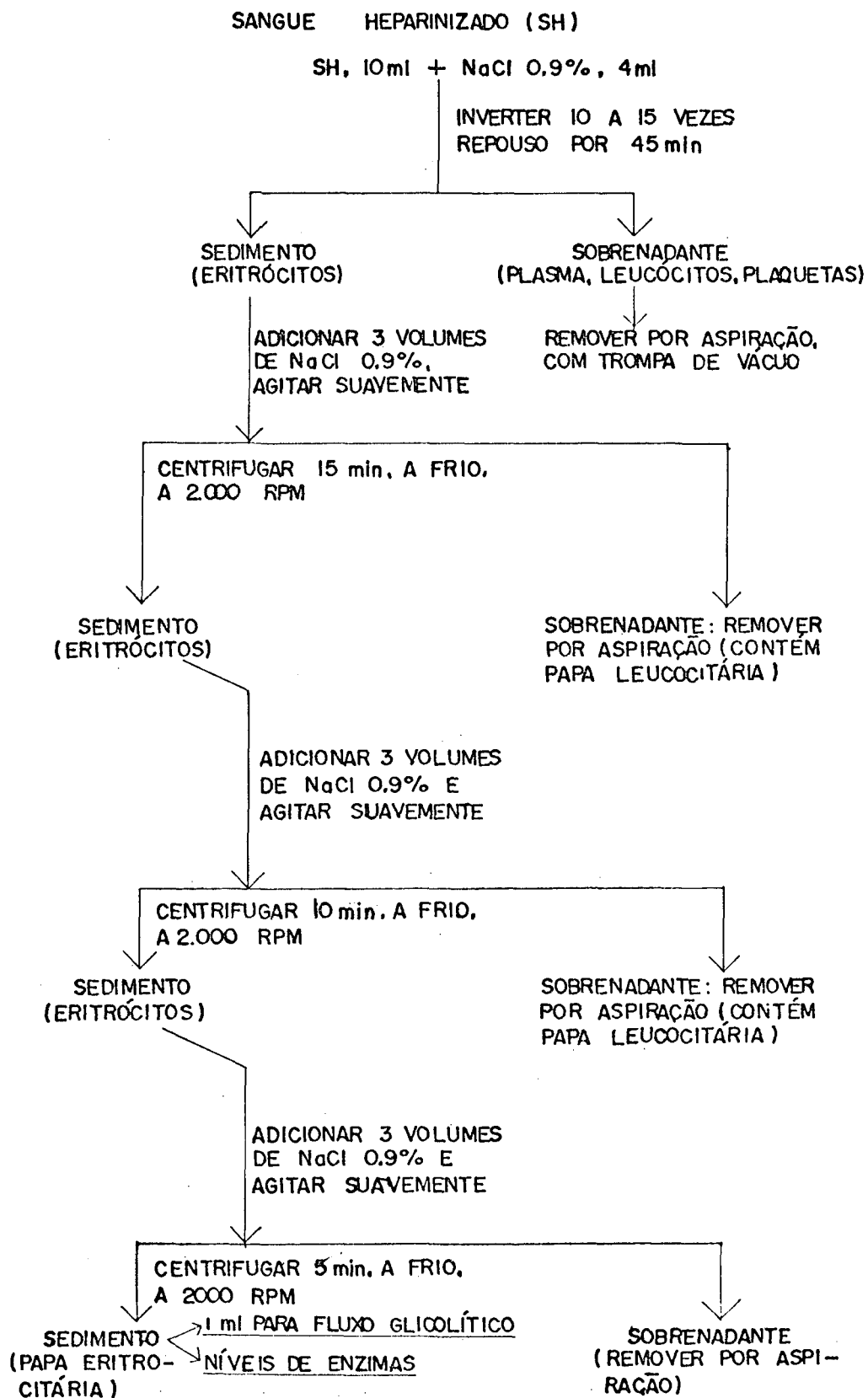


Fig. 1 - Fluxograma para a obtenção de suspensões padronizadas de eritrócitos.

VIII. À restante papa eritrocitária são adicionados 3 volumes de solução 0,154 M de NaCl e a suspensão é utilizada para proceder-se à contagem de eritrócitos e de leucócitos, estes últimos toleráveis até valores de 800 células/mm<sup>3</sup>.

#### 2.2.1.4. Obtenção de Hemolisados de Papa Eritrocitária para a Determinação de Enzimas.

Para a determinação de níveis eritrocitários de enzimas, hemolisados de papas eritrocitárias foram obtidos adicionando-se 2 volumes de água bidestilada livre de metais pesados a 1 ml de suspensão eritrocitária contendo cerca de  $3 \cdot 10^6$  células por mm<sup>3</sup>, agitando-se suavemente até a hemólise total. A seguir, 1 ml do hemolisado é diluído com 9 ml de água bidestilada, centrifugando-se a preparação em centrífuga refrigerada Sorval RCB2, X 10 min a 10.000 rpm, o sobrenadante sendo utilizado para a determinação de enzimas.

### 2.3. MÉTODOS HEMATOLÓGICOS

A contagem de eritrócitos, a contagem de leucócitos e o hematrócito foram levados a efeito de acordo com as técnicas recomendadas pela Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (1975).

### 2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 2.4.1. Glicose

Foi determinada pelo método da o-tuluidina de NIKKILA HYWARIVEN (1962), cujo princípio é o da produção de soluções coloridas que resultam da reação entre açúcares redutores e a

o-toluidina, a sua intensidade sendo proporcional à concentração dos glicídios presentes. No caso da glicose, este açúcar, através de seu grupo redutor, condensa-se com a o-toluidina formando mistura em equilíbrio de glicosil-o-toluidina e a correspondente base de Schiff, de coloração azul-esverdeada, cuja absorbância é medida a 630 nm.

#### 2.4.1.1. Reativo Cromogênico

Ácido acético glacial	940 ml
o-Toluidina	640 ml
Tiouréia	1,5 g

#### 2.4.1.2. Curva Padrão de Glicose

É estabelecida entre os limites de 10 a 70 $\mu$ g de glicose a partir de uma solução padrão contendo:

Glicose anidra	100 mg
Ácido benzóico	100 mg
Água destilada q.s.p.	100 mL

A curva padrão é, então, estabelecida em misturas contendo de 0,1 a 0,7 ml de solução padrão (2.4.1.2.), de água destilada até 0,1 ml e 6,0 ml de reativo cromogênico de o-toluidina (2.4.1.1.). Após incubação em banho-maria fervente, por 8 minutos, seguida de resfriamento, a intensidade da cor desenvolvida é medida a 630 nm.

Para a dosagem de glicose sanguínea, tratar 0,1 ml de sangue total ou de plasma com 1 ml de ácido tricloroacético a 3%, e centrifugar 10 min a 10.000 rpm. Transferir para tubo de ensaio 0,4 ml de sobrenadante, adicionar 6,0 ml do reativo cromogênico (2.4.1.1.) de o-toluidina, colocar em banho-maria

fervente por 8 minutos, resfriar rapidamente e ler a absorbância da cor desenvolvida em 630 nm.

#### 2.4.2. Proteína

O conteúdo em proteína de todas as preparações utilizadas, inclusive daquelas nas quais foram determinados os níveis de enzimas eritrocitárias, foi medido pelo método de LOWRY et al. (1951). A cor desenvolvida pela reação entre os resíduos fenólicos da tirosina e o reagente de Folin-Ciocalteu é medida em espectrofotômetro Beckman DU, adaptado com leitura digital, a 660 nm. ou em Beckman DU adaptado a verificação Gil Fasce. A curva padrão de proteína foi estabelecida com albumina sérica bovina (Sigma Chemical Co.).

#### 2.4.3. Hemoglobina

A hemoglobina das suspensões eritrocitárias foi determinada pela reação de Drabkin de conversão da Hb pelo ferricianeto de potássio em cianometahemoglobina e a cor desenvolvida medida em espectrofotômetro Beckman, modelo DU, adaptado com leitura digital a 540 X nm. A metodologia seguida foi a recomendada pela Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (1975).

#### 2.4.4. Hemoglobina Glicosilada

A hemoglobina glicosilada (HBA<sub>IC</sub>) foi determinada por cromatografia em resina de troca iônica Bio-Rad 70 - 200 - 400 meshes (SCHNEK & SCHROEDER, 1961; TRIVELLI et al, 1971; KYNOCH & LEHMANN, 1977; CHOU et al, 1978) carregada negativamente e possuindo afinidade para moléculas com carga positiva. Depen-

dendo da força iônica e do pH, a hemoglobina glicosilada tem carga positiva menor do que a da HbA (normal de adulto), ligando-se à resina mais labilmente do que esta última.

Para eluição da HbA<sub>1C</sub> - hemoglobina de eluição rápida - usa-se tampão fosfato-cianeto, pH 6,7 contendo 4,59 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . H<sub>2</sub>O; 1,18 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; e 0,65 g de cianeto de potássio em 1 litro de água destilada. Para a eluição de HbA hemoglobina - de eluição lenta, usa-se tampão fosfato, pH 6,4 contendo 6,52 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 14,35 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . H<sub>2</sub>O, em litro de água destilada.

Como no sangue humano normal, a HbA<sub>1C</sub> ou Hb glicosilada é um componente menor, o que, aparentemente, não acontece no sangue dos animais domésticos, dar-se-á às formas de Hb aqui estudadas a designação de hemoglobina de eluição rápida (HbER) para a forma que se comporta com Hb glicosilada e de hemoglobina de eluição lenta (HbEL), para forma que se comporta como a HbA normal do sangue humano.

## 2.5. MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DE HbER E DE HbEL

As hemoglobinas de eluição rápida e de eluição lenta, presentes nos eritrócitos de ovinos, bovinos, equinos e caninos e, ainda, em eritrócitos humanos, estes utilizados para fins comparativos e de controle, foram analisadas, quanto à sua mobilidade eletroforética, por eletroforese em gel de poli-acrilamida do tipo "DISC" (DAVIS, 1964).

Uma vez obtidos os eluatos com o tampão fosfato-cianeto, pH 6,7, para HbER, e com o tampão apropriado para HbEL, foram eles utilizados para a determinação dos seus respectivos eluatos. Para tanto, foram os eluatos diluídos v/v em

solução de sacarose a 40g/dl e, assim, aplicadas com seringa de 10 ml de capacidade, diretamente sobre o "gel" espaçador" de poliacrilamida e a eletroforese levada a efeito com tampão TRIS (0,6g) - glicina (2,88g) em água q.s.p. 1l, pH 8,3. A solução corante é constituída por negro-de-amido (amidoschwartz) 1 g, em 200 ml de ácido acético 7% em água destilada.

## 2.6. DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO

O ácido láctico produzido em experimentos destinados a estudar o metabolismo da glicose e de 2,3-bisfosfoglicerato por hemolisados de papas eritrocitárias, foi determinado pelo método de GUTMANN & WAHLEFELD (1974), em desproteinizados obtidos com ácido perclórico 1N. A medida do ácido láctico nos extratos assim obtidos, foi procedida na presença de LDH, acompanhando-se a redução do  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , a 340 nm, em espectrofotômetro Beckmann DU acoplado a um sistema registrador Gilford, com trocador automático de cubetas e com banho de circulação para manter a temperatura constante.

## 2.7. DETERMINAÇÃO DO FLUXO GLICOLÍTICO

O fluxo glicolítico de suspensões eritrocitárias foi determinado em termos de consumo de glicose em sistemas incubados a 37°C, durante o período variando de 60 a 180 min. (BACILA, et al, 1988) Para efetuar essa medida, suspende-se 1 ml de papa eritrocitária (ver Fig. 1) em 8,8 ml de solução tampão contendo NaCl, 0,154 M;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,025 M, imidazol, 0,05 M, pH 7.8 adicionando-se 0,2 ml de solução de glicose 0,1 M. Ainda, para verificar o possível efeito inibitório do  $\text{F}^-$ , variadas concentrações de NaF foram, também, adiciona-

das ao sistema em questão. Durante o período de incubação a 37°C, com suave agitação em banho Doubnof, alíquotas foram retiradas em tempos variados para determinar o consumo de glicose, medindo-se essa substância pelo método de NIKKILA & HYWARIVEN (1962).

## 2.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DE HEMOLISADOS

A capacidade dos hemolisados de utilizarem glicose e 2,3-bisfosfoglicerato metabolicamente, foi medida em sistemas contendo 0,2 ml de hemolisado, obtido pela adição de água destilada livre de sais na proporção de 1 volume da suspensão eritrocitária e 2 volumes de água, diluídos 10 vezes em tampão fosfato-glicilglicina 0,25 M-0,025M, pH 7,8: 2,0 ml de tampão fosfato-glicilglicina e 1,0 ml de solução  $10^{-3}$ M de substrato - glicose ou 2,3-bisfosfoglicerato. O sistema é incubado a 37°C por 90 min e, no final, desproteinizado com 1 ml de HClO<sub>4</sub> 1 N, o pH sendo ajustado a 4,5 com solução de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M.

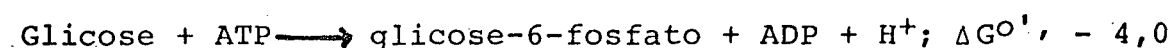
Após a centrifugação por 10 min a 10.000 rpm. o lactato formado é determinado no sobrenadante na presença de LDH, acompanhando-se a redução do NAD<sup>+</sup> a NADH + H<sup>+</sup>, a 340 nm, em espectrofotômetro Beckman DU acoplado a sistema registrador Gilford, com trocador automático de cubetas e banho de circulação para manter a temperatura constante.

## 2.9. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ENZIMAS ERITROCITÁRIAS

### 2.9.1. HEXOQUINASE (HK)

ATP: D-HEXOSE-6-FOSFOTRANSFERASE. E.C. 2.7.1.1

A HK catalisa a seguinte reação:

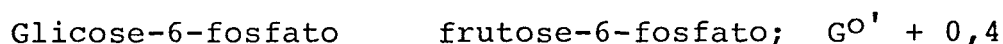


Hexoquinase foi determinada pelo método de UYEDA RACKER (1965), por espectrofotometria, em cubetas de 1 ml contendo glicose 25 mM, NADP 0,55 mM, ATP 3,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 7,4 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM, 0,3 unidades internacionais de G-6-PDH em solução tampão Tris-HCl 74 mM, pH final 7,4. A reação foi iniciada pela adição do hemolisado e seguida a 340 nm pela redução do NADP a NADPH + H<sup>+</sup>.

### 2.9.2. FOSFOGLICOSE ISOMERASE (PGI)

D-Glicose-6-fosfato: cetol isomerase. E.C. 5.3.1.9

A PGI catalisa a seguinte reação:



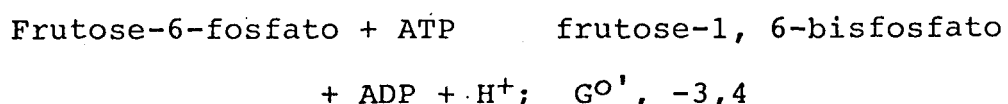
PGI foi determinada de acordo com o método de NOLTMAN (1966), em cubetas de 1 ml contendo frutose-6-fosfato 2 mM, NADP 0,55 mM, acetato de magnésio 2 mM, 0,3 UI de G-6-PDH em solução tampão de Tris-HCl 100 mM, pH 7,5. A reação foi iniciada pela adição de hemolisado e seguida pela redução do NADP a 340 nm, a NADPH + H<sup>+</sup>.

### 2.9.3. FOSFOFRUTOQUINASE (PFK)

ATP: D-Frutose-6-fosfato-1 fosfotransferase

E.C. 2.7.1.11

A PFK catalisa a seguinte reação:



PFK foi determinada por espectrofotometria pelo método de LAYZER et al (1969) em cubetas de 1 ml contendo F-6-P 1 mM, ATP 1 mM, MgCl 5 mM, NADH + H<sup>+</sup> 0,1 M, cisteína 7 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 mM, 10 mg da mistura de gliceroldesidrogenase-triosefosfato isomerase, 40 mg de FruP<sub>2</sub>-ALD em Tris-HCl

50 mM, pH final 8,2. A reação foi seguida a 340 nm, pela oxidação do NADH + H<sup>+</sup> a 30°C.

#### 2.9.4. FRUTOSE -1,6- BISFOSFATO ALDOLASE (FruP<sub>2</sub> ALD)

Frutose 1,6-bisfosfato: D-gliceraldeído-3-fosfato liase  
E.C. 4.1.2b

A FruP<sub>2</sub>-ALD catalisa a seguinte reação:

Frutose-1,6-bisfosfato      dihidroxiacetona fosfato + gliceraldeído-3-fosfato; G<sup>0</sup>', + 5,7

FruP<sub>2</sub>-ALD foi determinada pelo método espectrofométrico de BLOSTEIN RUTTER (1963), em cubeta de 1 ml contendo FruP<sub>2</sub> 1mM, NADH + H<sup>+</sup> 0,1 mM, 10 mg/ml de mistura de gliceroldesidrogenase-triosefosfato isomerase em tampão Tris-HCl 100 mM, pH final 7,5. A reação foi iniciada pela adição do hemolisado, e seguida a 340 nm pela oxidação do NADH + H<sup>+</sup>.

#### 2.9.5. GLICERALDEIDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE (GAPDH)

D-Gliceraldeído-3-fosfato: NAD oxidorredutase (fosforilante)

E.C. 1.2.1.12

A GAPDH catalisa a seguinte reação:

Gliceraldeído-3-fosfato + Pi + NAD<sup>+</sup>      glicerato-1,3 bisfosfato + NADH + H<sup>+</sup>; G<sup>0</sup>', +1,5

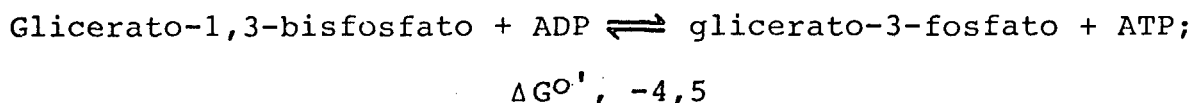
A GAPDH foi medida pela técnica de BERGMEYER (1974), em cubetas de 1 ml contendo ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) 6 mM, ATP 1,1 mM, EDTA 0,9 mM, NADH + H<sup>+</sup> 0,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,7 mM, PGK 14,8 unidades/ml, tampão Tris-HCl 100 mM, pH final 7,6. A reação foi iniciada pela adição de hemolisado e seguida a 340 nm pela formação de NAD<sup>+</sup>.

### 2.9.6. FOSFOGLICERATOQUINASE (PGK)

ATP: 3-fosfo-D-glicerato 1-fosfotransferase

E.C. 2.7.2.3

A PGK catalisa a seguinte reação:



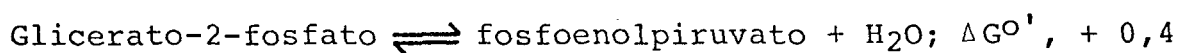
A atividade da PGK foi medida de acordo com o método de BUCHER (1955) em cubetas de 1 ml contendo 3-PGA 5 mM, ATP 3mM, MgSO<sub>4</sub> 5 mM, NADH + H<sub>+</sub> 0,1 mM, cisteína 20mM, glicina 8 mg, GAPDH 2 UI/ml pH final, 6,9. A reação foi iniciada pela adição do hemolisado e seguida pela oxidação do NADH + H<sup>+</sup> a 340 nm, a 30°C.

### 2.9.7. FOSFOPIRUVATO HIDRATASE OU ENOLASE (ENO)

2-fosfo-D-glicerato hidrolase

E.C. 4.2.1.11

A ENO catalisa a seguinte reação:



A ENO foi determinada pela técnica de WESTHEAD (1966) em cubetas de 1 ml contendo 2-PGA (ácido 2-fosfoglicérico) 1mM, MgSO<sub>4</sub> mM, KCl 50 mM, EDTA 10<sup>-5</sup>M, em tampão imidazol-HCl 50 mM, pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição do hemolisado e seguida em espectrofotômetro, a 240 nm pela formação do fosfoenol piruvato (PEP).

### 2.9.8. PIRUVATOQUINASE (PK)

ATP: piruvato fosfotransferase

E.C. 1.11.1.7

A PK catalisa a seguinte reação:



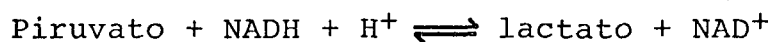
A PK foi medida de acordo com o método de BUCHER E PFLEIDERER (1955) em cubetas de 1 ml contendo PEP 1 mM, NAD + H<sup>+</sup> 0,1 mM, KCl 70 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, ADP 1 mM, LDH 3 UI, em tampão Tris-HCl 40 mM, pH final 7,4. A reação foi iniciada pela adição do hemolisado e seguida, em espectrofotômetro, a 340 nm, pela oxidação do NADH + H<sup>+</sup>.

#### 2.9.9. DESIDROGENASE DO LACTATO (LDH)

L-Lactato: NAD oxidoreductase

E.C. 1.1.1.27

A LDH catalisa a seguinte reação:



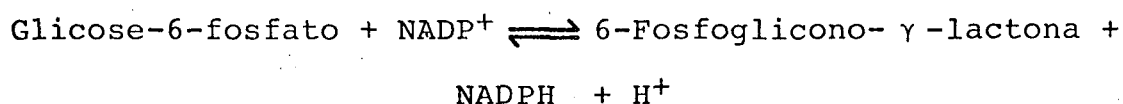
A LDH foi medida de acordo com o método de BERGEMEYER (1974) em cubetas de 1 ml contendo piruvato de sódio 1 mM, NADH + H<sup>+</sup> 0,1 mM, tampão fosfato de potássio 100 mM, pH final 7,4 e a marcha de reação iniciada pela adição do hemolisado e seguida, em espectrofotômetro pela formação de NAD<sup>+</sup>.

#### 2.9.10. GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G-6PDH)

D-Glicose-6-fosfato: NADP 1-oxidoreductase

E.C. 1.1.1.49

A G-6-PDH catalisa a seguinte reação:



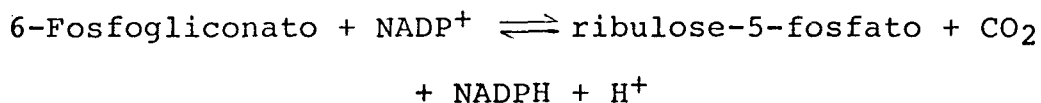
A G-6-PDH foi medida de acordo com a técnica de BERGEMEYER (1974) em cubetas de 1 ml contendo MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NADP 0,39 mM, G-6-P 5 mM, tampão glicilglicina 80 mM, pH final 7,6. A reação é iniciada pela adição do hemolisado e seguida a 340 nm pela redução do NADP a NADPH + H<sup>+</sup>.

### 2.9.11. 6-FOSFOGLICONATO DESIDROGENASE (6-PGDH)

D-6-Fosfogliconato: NADP-oxidoreductase

E.C. 1.1.1.50

A 6-PGDH catalisa a seguinte reação:



A 6-PGDH foi medida de acordo com a técnica de GLOCK & McLEAN (1953) em cubetas de 1 ml contendo Tris-HCl 1M, pH 8,0 0,1 ml, MgCl<sub>2</sub> 0,1 M, NADP 2 mM, 0,1 ml, hemolisado 0,02 ml, água bidestilada 0,58 ml, incubação a 37°C por 10 minutos e adição de 6-fosfogliconato 6 mM, 0,1 ml. A reação é seguida a 340 nm pela redução do NADP.

### 3. EQUIPAMENTOS

Os seguintes equipamentos foram utilizados na execução das pesquisas do presente trabalho.

- 3.1. Centrífuga refrigerada KS 70, com multiplicador de velocidade;
- 3.2. Espectrofotômetro Beckman mod. DU adaptado com leitura digital; espectrofotômetro Gilford mod. 240, com registrador e trocador automático de cubetas;
- 3.3. Coletor de Frações LKB;
- 3.4. Potenciômetro Micronal; potenciômetro Metler;
- 3.5. Respirômetro de Warburg, modelo circular, Braun;
- 3.6. Balança analítica eletrônica Sartorius;
- 3.7. Cuba de eletroforese tipo "DISC" com fonte de poder construída no Departamento de Biofísica da UNESP, Botucatu;
- 3.8. Banho termostaticado, com agitação, modelo Doubnof;
- 3.9. Centrífuga de micro-hematócrito mod. Fanem;
- 3.10. Centrífuga de mesa, Janetzki.

#### 4. REAGENTES

TRIS (hidroximetilamino metano), hidrazina, imidazol, DEAE-Sephadex, fosfocelulose, acrilamida, negro de amido, fructose-1, 6-bisfosfato, sal tetrassódico, fructose-6-fosfato, sal dissódico, glicose-6-fosfato, sal dissódico, nicotinamida adenina dinucleotídeo nas formas oxidada e reduzida, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, na forma oxidada, adenosina difosfato, adenosina trifosfato, gliceradeido-3-fosfato, 2-fosfoglicerato, 2,3-difosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, glicerolfosfato desidrogenase, triosefosfato isomerase, glicose-6-fosfato desidrogenase, desidrogenase do lactato, piruvatoquinase, enolase, fosfogliceratoquinase, gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase, trietanolamina, EDTA-etilenodiaminotetra acetato, beta-mercaptoetanol, sulfato de hidrazina, glicilglicina, cisteína, glicose (Sigma Chemical Co), ácido acético, ácido tricloroacético, (E. Merck, Darmstadt), o-toluidina, reagente de Folin-Ciocalteu, resina de troca iônica para HbA<sub>1c</sub> (Labtest), além de produtos inorgânicos todos de boa qualidade.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. FLUXO GLICOLÍTICO EM ERITRÓCITOS DE OVINOS

A capacidade de eritrócitos de ovinos da raça Ideal de consumirem glicose em processo de fluxo glicolítico é mostrada nos dados da Tabela 2. Verifica-se, pelos dados obtidos, que não houve diferença nos valores de glicose residual entre o sistema constituído pela papa eritrocitária incubada com glicose e o seu respectivo controle.

TABELA 2

FLUXO GLICOLÍTICO EM ERITRÓCITOS DE OVINOS DA RAÇA IDEAL

TUBO	TAMPÃO FOSFATO- IMIDAZOL (mL)	GLICOSE 0,1 M (mL)	NaF 0,1M (mL)	SUSPENSÃO ERITROCI- TÁRIA (mL)	ABSORBÂNCIA a 630 nm PELA REAÇÃO DA o-TO- LUIDINA	
					INCUBAÇÃO 60 min	150 min
1	9,8	0,2	-	-	0,191	0,184
2	8,8	0,2	-	1,0	0,193	0,189
3	8,75	0,2	0,05	1,0	0,182	0,173
4	8,7	0,2	0,1	1,0	0,188	0,178
5	8,6	0,2	0,2	1,0	0,175	0,165

Sistema. Eritrócitos obtidos de amostras de sangue coletadas em heparina, de 5 ovinos Ideal, foram liberados do plasma e da camada de leucócitos, lavados em soro fisiológico 3 vezes, por centrifugação a 2.000 rpm por 15, 10 e 5 minutos respectivamente, em centrífuga refrigerada. Da papa eritrocitária de cada amostra de sangue, 1 ml foi utilizado para formar um "pool" de eritrócitos. Para o estudo do fluxo glicolítico, os eritrócitos foram suspensos em tampão contendo NaCl 0,154 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,025 M, imidazol 0,05 M, pH 7,8 e adicionados de glicose e de fluoreto de sódio nas proporções mostradas. A suspensão foi incubada em banho de Doubnoff, a 37°C e alíquotas para a determinação da glicose residual tomadas aos 60 e aos 150 min de incubação.

### 3.2. FLUXO GLICOLÍTICO EM ERITRÓCITOS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS E DO HOMEM

O estudo comparativo do fluxo glicolítico de eritrócitos de ovinos, bovinos, equinos, caninos e do homem, é mostrado na Tabela 3. Verifica-se que somente no caso do eritrócito humano é que se obteve resultado claro de eritrócito metabolicamente operante, fato que não ocorreu com os eritrócitos dos demais animais estudados.

TABELA 3

#### ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O FLUXO GLICOLÍTICO DO ERITRÓCITO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS E DO HOMEM

ERITRÓCITOS DE	ABSORBÂNCIA A 630 nm DA REAÇÃO DA o-TOLUIDINA COM A GLICOSE RESIDUAL		PERCENTUAL RELATIVO DE UTILIZAÇÃO DA GLICOSE (%)
	CONTROLE	TESTE	
Ovino	0,045	0,055	-
Bovino		0,050	-
Equino		0,067	-
Canino		0,063	-
Homem	0,070	0,057	18,6

Sistema. Eritrócitos obtidos de amostras de sangue coletadas em heparina, de 5 ovinos Ideal, foram liberados do plasma e da camada de leucócitos, lavados em soro fisiológico 3 vezes, por centrifugação a 2.000 rpm por 15, 10 e 5 minutos respectivamente, em centrífuga refrigerada. Da papa eritrocitária de cada amostra de sangue 1 ml foi utilizado para formar um "pool" de eritrócitos. Para o estudo do fluxo glicolítico, os eritrócitos foram suspensos em tampão contendo NaCl 0,154 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,025 M, imidazol 0,05 M, pH 7,8 e adicionados de glicose e de fluoreto de sódio nas proporções mostradas. A suspensão foi incubada em banho de Doubnof, a 37°C e alíquotas para a determinação da glicose residual tomadas aos 150 min de incubação.

### 3.3. VALORES DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA E DE GLICEMIA EM ANIMAIS DOMÉSTICOS

Os valores de hemoglobina glicosilada - hemoglobina de eluição rápida, HbER - foram determinados em ovinos, bovinos, caninos, e no homem, e relacionados com suas respectivas taxas glicêmicas. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos, as taxas glicêmicas tendo sido determinadas em sangue total.

TABELA 4  
VALORES DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA OU DE ELUIÇÃO RÁPIDA E DE GLICEMIA DE ANIMAIS DOMÉSTICOS

ANIMAIS	GLICEMIA (SANGUE TOTAL) (mg/dl)	HEMOGLOBINA DE ELUIÇÃO RÁPIDA - HbER (%)
Ovinos	32,46 (a) (variação: 17,85-51)	97,64 (1)
Bovinos	35 - 55 (b)	95,66 (2)
Equinos	46,32 (c) (variação: 30,46 - 77,48)	61,60 (3)
Caninos	55-90 (d)	25,26 (4)
Homem*	75-110 (e)	7,03 (5)

\* Para fins comparativos

(1) Média de 10 determinações; (2) Média de 9 determinações;  
(3) Média de 20 determinações; (4) Média de 5 determinações;  
(5) Média de 3 determinações (valores já determinados:  
5,3 - 8,0%).

(a) média de 20 determinações; (b) média de 14 determinações  
(c, d, e) dados da literatura.

### 3.4. CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEIS GLICÊMICOS E TAXAS DE HEMOGLOBINA DE ELUIÇÃO RÁPIDA

A Fig. 2 mostra a correlação encontrada entre os níveis glicêmicos, medidos em sangue total, e as taxas de hemoglobina de eluição rápida encontradas em ovinos, bovinos, equinos, caninos e no homem. Verifica-se que os valores de HbEr decrescem à medida em que sobem os valores das taxas glicêmicas.

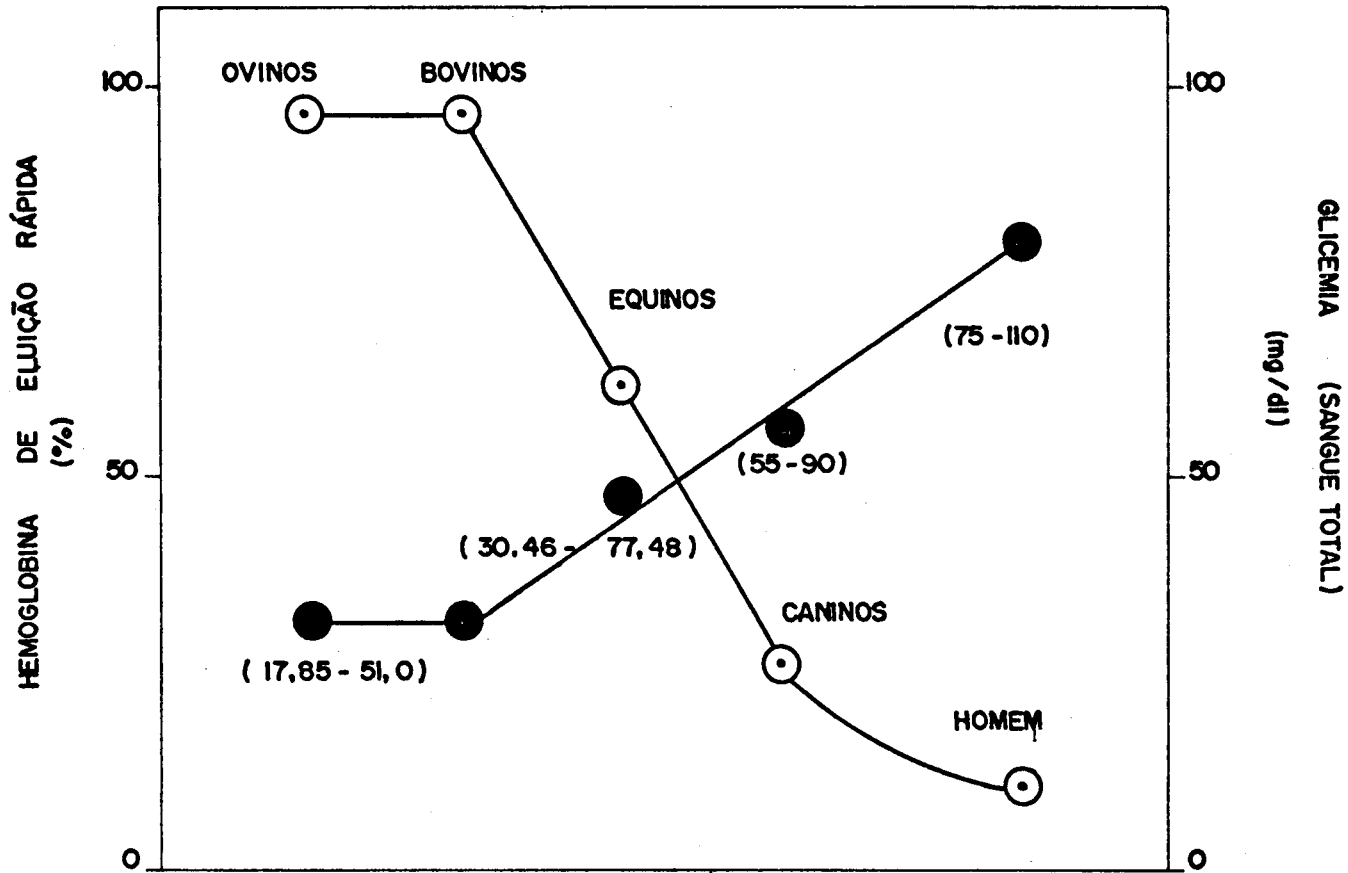


Fig. 2 - Correlação entre níveis glicêmicos e taxas de hemoglobina de eluição rápida (HbER; hemoglobina glicosilada) em animais domésticos e no homem. Os valores mostrados na figura, indicam faixas de variação das taxas glicêmicas.

Ovinos e bovinos, que possuem as taxas glicêmicas mais baixas entre os animais estudados, mostram os valores mais altos de hemoglobina de eluição rápida.

### 3.5. MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DE HEMOGLOBINA DE ELUIÇÃO RÁPIDA E DE ELUIÇÃO LENTA

A fim de caracterizar, do ponto de vista da sua mobilidade eletroforética, as hemoglobinas que se comportavam, quanto às suas propriedades de eluição em tampão cianeto-fosfato (hemoglobina glicosilada ou de eluição rápida) ou em tampão para hemoglobina normal do adulto ou de eluição lenta, foi realizado o experimento da Fig. 3 cujos dados permitiram estabelecer a mobilidade eletroforética das hemoglobinas obtidas em eluatos da cromatografia de coluna em resina de troca iônica. O não aparecimento de mancha eletroforética de hemoglobina de eluição lenta nos preparados eritrocitários de ovinos e de bovinos está de acordo com os altos valores de HbER neles obtidos. Por outro lado, um contaminante de HbA, separado da HbA<sub>1c</sub> do sangue humano, foi encontrado e se deve ao alto conteúdo de HbA nesse material.

### 3.6. NÍVEIS ERITROCITÁRIOS DE ENZIMAS DA GLICÓLISE, DA LACTO-DESIDROGENASE E DAS ENZIMAS DA REGIÃO PROXIMAL DA VIA DAS PENTOSE-FOSFATOS

A fim de introduzir dados que permitissem elucidar aspectos do metabolismo eritrocitário de glicídios em ovinos, bovinos, equinos e caninos, em razão dos resultados obtidos com os estudos de fluxo glicolítico, de compartimentalização sanguínea de glicose e dos valores determinados de HbER e de

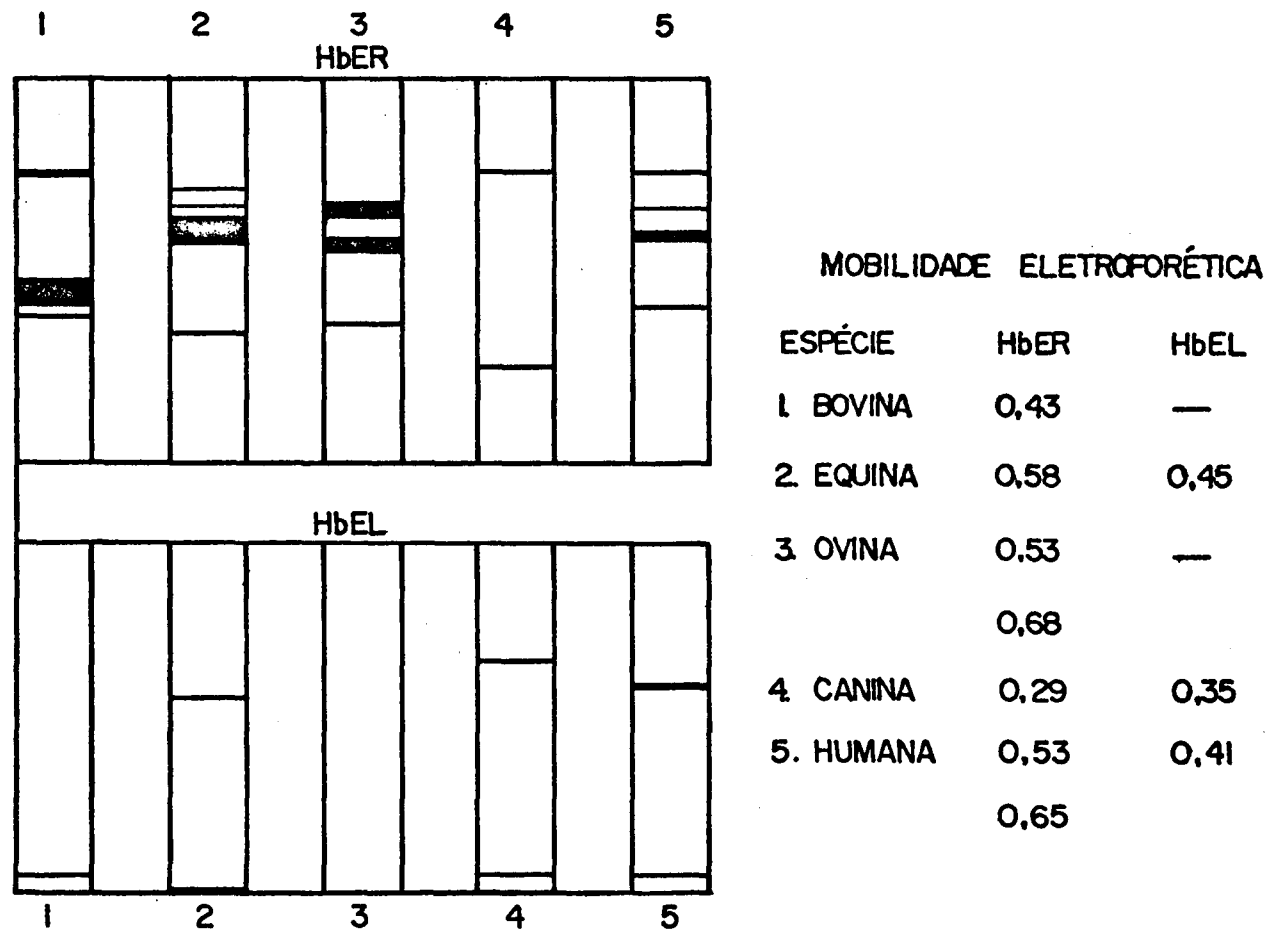


Fig. 3 - Mobilidade eletroforética da hemoglobina de eluição rápida - HbER - (em cima) e da hemoglobina de eluição lenta - HbEL - (em baixo), respectivamente, hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) e hemoglobina normal (HbA) em animais domésticos e no homem.

HbEL, foi levado a efeito o estudo dos níveis de enzimas da glicólise, dos níveis de lactodesidrogenase e dos níveis das enzimas da região proximal da via das pentose-fosfatos, responsáveis pela produção celular de NADPH + H<sup>+</sup>. As tabelas de 5 a 8 dão os resultados obtidos.

TABELA 5  
NÍVEIS DE ENZIMAS DA GLICÓLISE E DA REGIÃO PROXIMAL  
DA VIA DAS PENTOSE-FOSFATOS EM ERITRÓCITOS DE OVINOS\*

ENZIMA	VELOCIDADE (v) (Δ min)	VELOCIDADE (v) (Δmin/mL)	ATIVIDADE ESPECÍ- FICA (Q)
HK	0,0012	0,024	0,0025
PGI	0,023	0,047	0,052
PFK	0,0014	0,028	0,0029
FruP <sub>2</sub> ALD	0,004	0,08	0,0083
GAPDH	0,0141	0,28	0,033
PGK	0,0053	0,106	0,012
ENO	0,0054	0,108	0,011
PK	0,0162	0,324	0,041
LDH	0,012	0,240	0,025
G-6-PDH	0,0054	0,108	0,014
6-PGDH	0,0036	0,072	0,0092

\*\* "Pool" de sangues de 5 animais  
conteúdo em proteína: 8,65 mg/mL

TABELA 6  
NÍVEIS DE ENZIMAS DA GLICÓLISE E DA REGIÃO PROXIMAL  
DA VIA DAS PENTOSE-FOSFATOS EM ERITRÓCITOS DE BOVINOS\*

ENZIMA	VELOCIDADE (v) (Δmin)	VELOCIDADE (v) (Δmin/mL)	ATIVIDADE ESPECÍ- FICA (Q)
HK	0,00121	0,0292	0,0023
PGI	0,0199	0,0398	0,0445
PFK	0,0028	0,056	0,006
FruP <sub>2</sub> ALD	0,0036	0,072	0,0078
GAPDH	0,017	0,034	0,0505
PGK	0,013	0,169	0,0195
ENO	0,0022	0,044	0,0048
PK	0,0195	0,390	0,046
LDH	0,010	0,20	0,021
G-6-PDH	0,026	0,052	0,067
6-PGDH	0,0028	0,056	0,0072

\* "pool" de sangues de 5 animais  
conteúdo em proteína: 8,9 mg/ml

TABELA 7  
NÍVEIS DE ENZIMAS DA GLICÓLISE E DA REGIÃO PROXIMAL  
DA VIA DAS PENTOSE-FOSFATOS EM ERITRÓCITOS DE EQUINOS\*

ENZIMA	VELOCIDADE (V) ( $\Delta$ min)	VELOCIDADE (V) ( $\Delta$ min/mL)	ATIVIDADE ESPECÍ- FICA (Q)
HK	0,0086	0,0172	0,0019
PGI	0,0271	0,0542	0,058
PFK	0,0028	0,056	0,0059
FruP <sub>2</sub> -ALD	0,0066	0,132	0,014
GAPDH	0,0256	0,512	0,054
PGK	0,0124	0,248	0,023
ENO	0,005	0,10	0,0105
PK	0,04	0,08	0,0088
LDH	0,02	0,40	0,42
G-6-PDH	0,030	0,60	0,069
6-PGDH	0,0028	0,056	0,0065

\* "Pool" de sangues de 5 animais  
conteúdo em proteína: 9,04 mg/ml

TABELA 8  
NÍVEIS DE ENZIMAS DA GLICÓLISE E DA REGIÃO PROXIMAL  
DA VIA DAS PENTOSSES-FOSFATOS EM ERITRÓCITOS DE CANINOS\*

ENZIMA	VELOCIDADE (V) ( $\Delta$ min)	VELOCIDADE (V) ( $\Delta$ min/mL)	ATIVIDADE ESPECÍ- FICA (Q)
HK	0,0001	0,020	0,0018
PGI	0,11	0,220	0,02
PFK	0,003	0,060	0,0054
FruP <sub>2</sub> -ALD	0,010	0,200	0,018
GAPDH	0,062	1,24	0,112
PGK	0,020	0,400	0,036
ENO	0,0032	0,064	0,0058
PK	0,0137	0,274	0,025
LDH	0,014	0,280	0,025
G-6-PDH	0,0182	0,364	0,036
6-PGDH	0,0094	0,188	0,018

\* "Pool" de sangues de 5 animais  
conteúdo em proteína: 10,5 mg/ml

### 3.7. CONCENTRAÇÕES RELATIVAS DE ENZIMAS ERITRÓCITÁRIAS

Análise comparativa das concentrações relativas de enzimas eritrocitárias ligadas ao metabolismo glicídico em ovinos, bovinos, equinos e caninos é mostrada na Fig. 4.

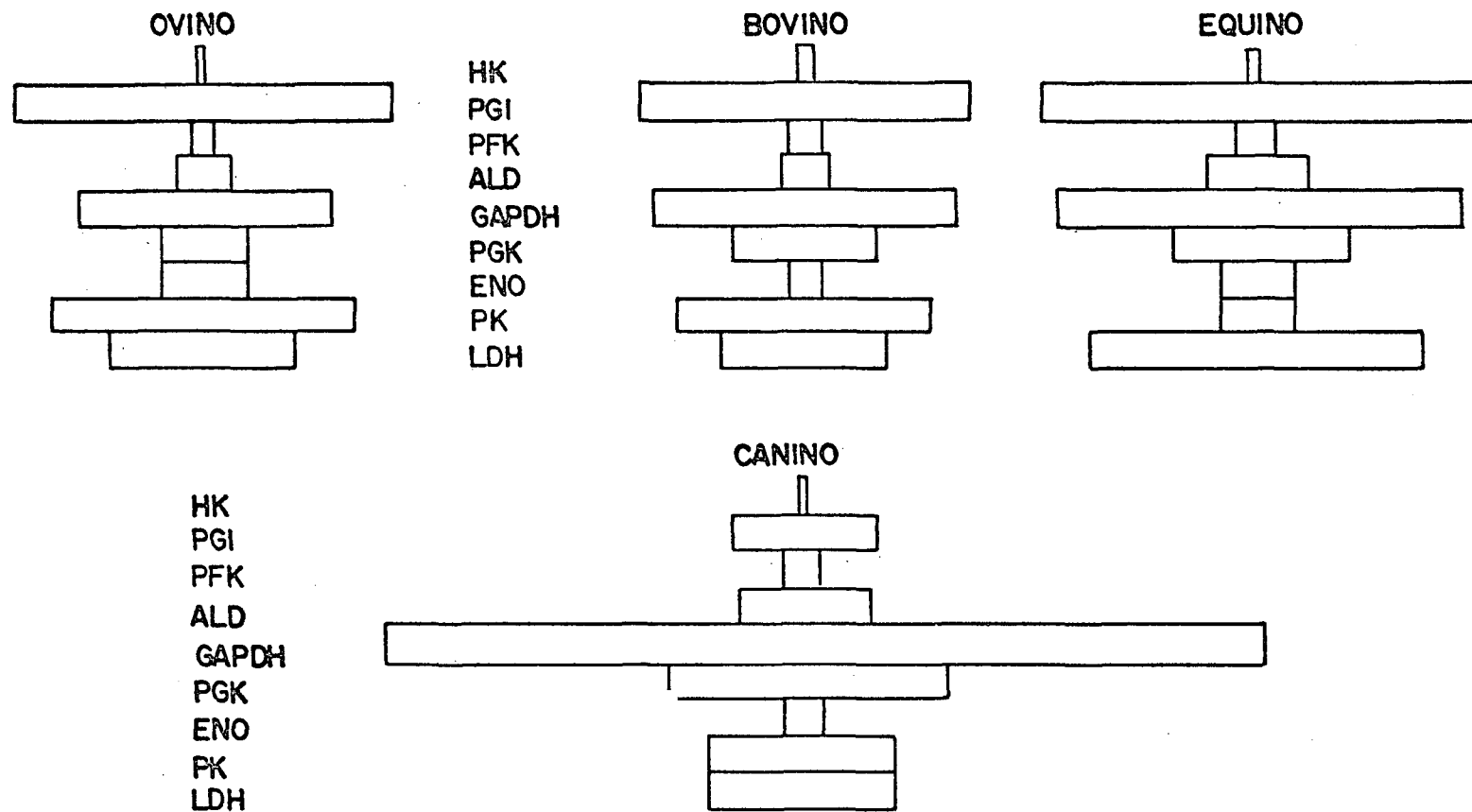


Fig. 4 - Concentrações relativas, em atividade específica, de enzimas da glicolise do eritrócito de ovinos, bovinos, eqüinos e caninos. Os sistemas de reação para a determinação dos níveis de enzimas estão descritos em 2.8.1 a 2.8.9.

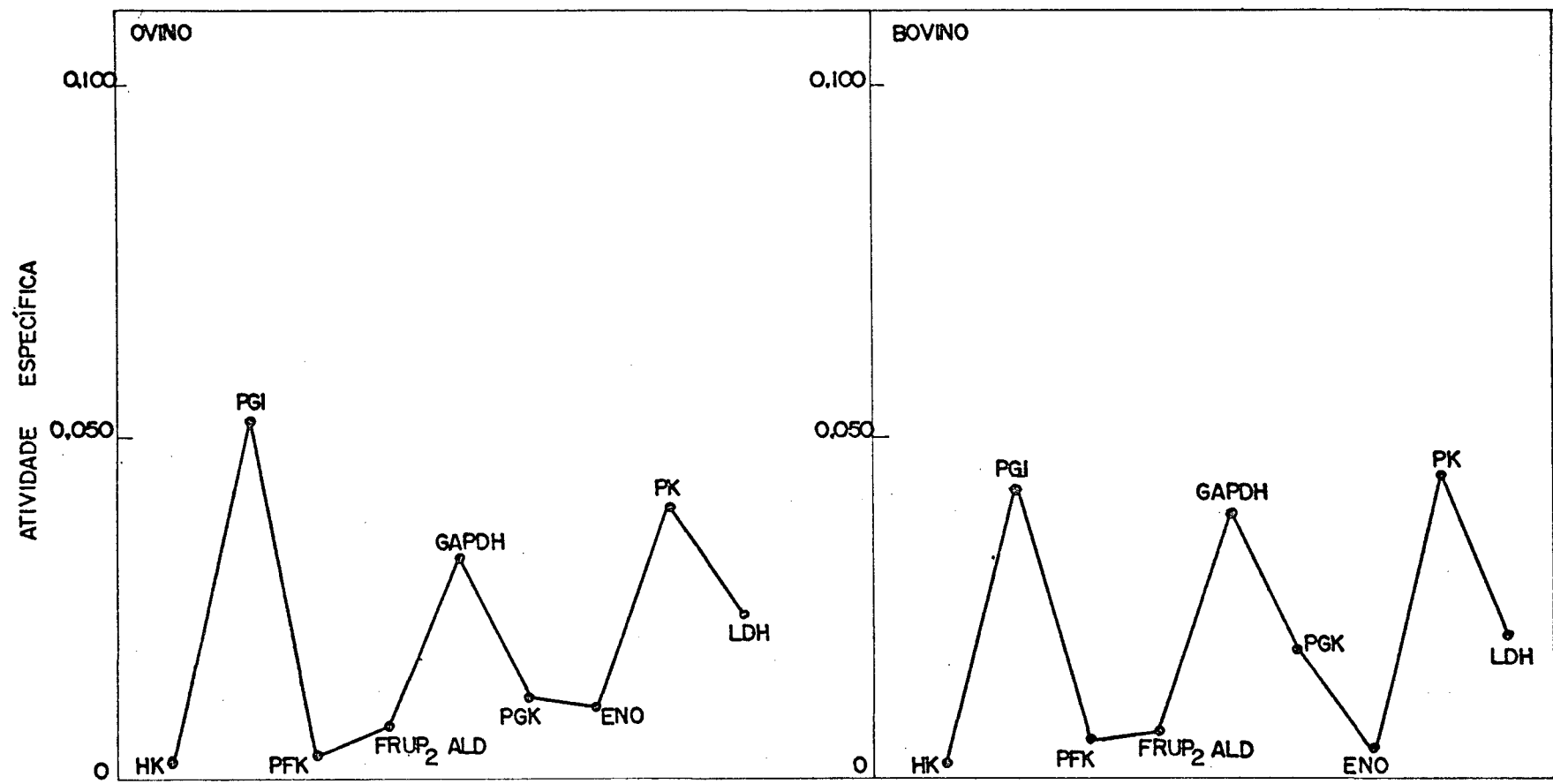


Fig. 5 - Perfil das concentrações relativas de enzimas glicolíticas de eritrócitos de ovinos e de bovinos. Os valores registrados correspondem à atividade específica  $Q$  de cada enzima ( $\Delta \text{ min. mL}^{-1}/\text{mg proteina.mL}^{-1}$ ).

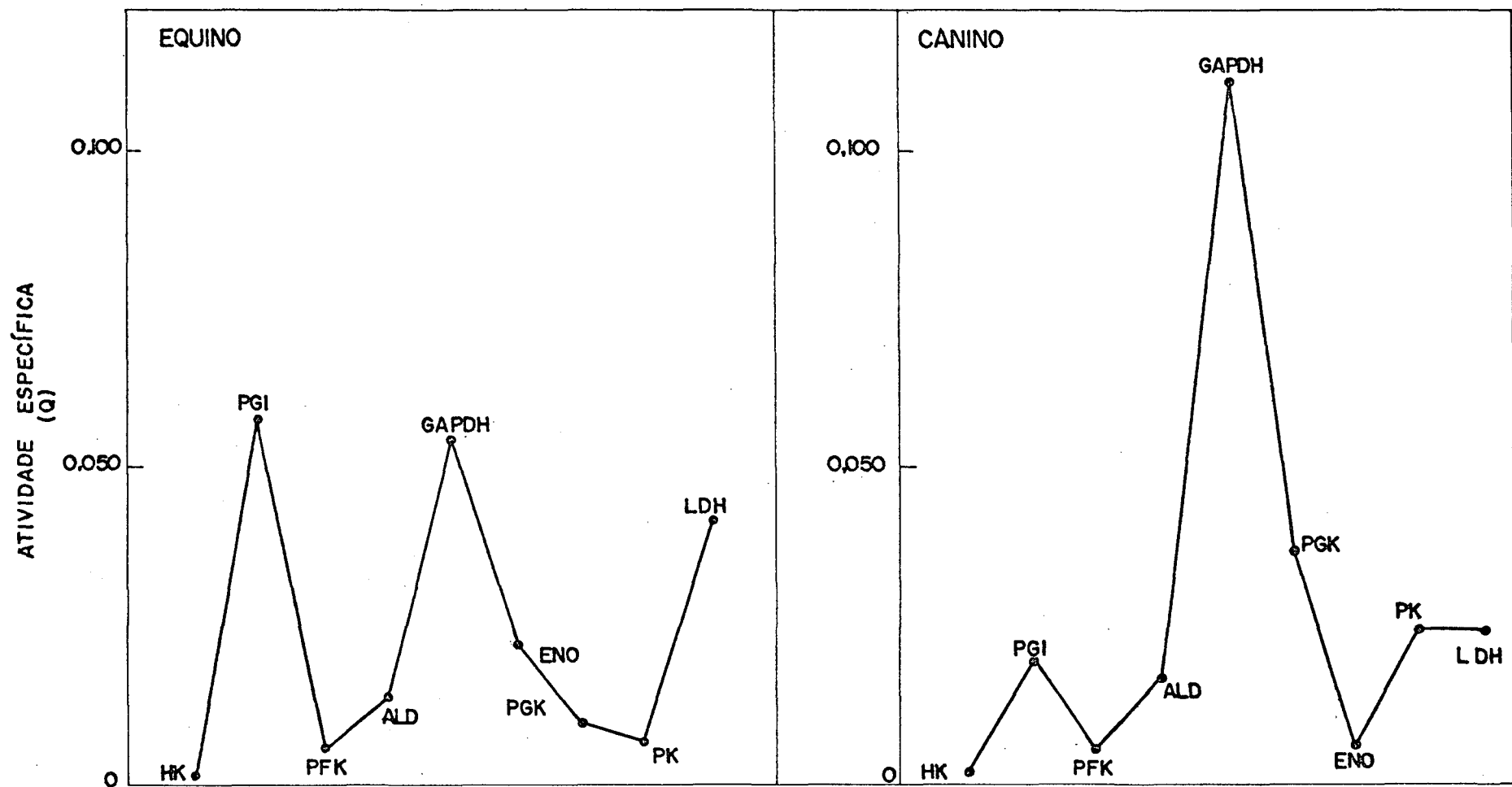


Fig. 6 - Perfil das concentrações relativas de enzimas glicolíticas de eritrócitos de eqüinos e de caninos. Os valores registrados correspondem à atividade específica Q de cada enzima ( $\Delta \text{ min. mL}^{-1}/\text{mg proteina. mL}^{-1}$ )

Considerados em termos de atividade específica  $Q$  ( $\Delta_{\min} \cdot \text{mL}^{-1}/\text{mg prote\u00edna} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), os perfis das concentra\u00e7\u00f5es relativas de enzimas do metabolismo glic\u00eddico eritrocit\u00e1rio s\u00e3o mostrados na Fig. 5 (ovinos e bovinos) e na Fig. 6 (equinos e caninos).

### 3.8. ATIVIDADE METAB\u00d3LICA DE HEMOLISADOS

Experimentos preliminares foram conduzidos para estudar a capacidade metab\u00d3lica de hemolisados de papas eritrocit\u00e1rias de ovinos, bovinos, equinos e caninos, em termos de produ\u00e7\u00e3o de \u00e1cido l\u00e1ctico a partir de glicose ou de 2,3-bisfosfoglicerato. Os dados preliminares obtidos revelam que esses hemolisados possuem certa dificuldade em metabolizar glicose. Quanto ao efeito do 2,3-DPG, os resultados ainda n\u00e3o s\u00e3o conclusivos, considerando que essa subst\u00e2ncia se encontra em n\u00edveis elevados no eritr\u00f3cito de equinos e de caninos e em n\u00edveis menores no eritr\u00f3cito de bovinos e ovinos (BARTLET, 1970) e que, de acordo com DISCHE (1964), ele inibe diversas enzimas da via glicol\u00edtica, inclusive a HK.

#### IV. DISCUSSÃO

Constituindo-se em célula especializada no transporte de oxigênio, o eritrócito possui algumas características bioquímicas que o distinguem de células de tecidos somáticos.

Os eritrócitos circulantes são células em forma de discos bicôncavos anucleados com diâmetro variando de 4,1 micra (caprinos) a 7,3 micra (caninos). De acordo com PAECHTNER, (1925), os valores médios dos diâmetros dos eritrócitos em animais domésticos são os seguintes; caprinos, 4,1; ovinos, 5,0; bovinos, 5,6; equinos, 5,6; suínos, 6,2; gato, 6,5; caninos, 7,3; o número de eritrócitos circulantes diferindo de espécie para espécie com variações intraespécies ou intraindividuais.

Produzidos na medula óssea, o principal órgão eripoiético dos mamíferos no período pós-natal, os eritrócitos possuem vida média, isto é, o período de tempo que medeia entre sua formação e a hemocaterese que sofrem nas células do sistema retrículoendotelial. O tempo de vida média do eritrócito vem sendo estudado por técnicas especiais, principalmente pelo uso de radiosótopos ( $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{55}\text{Fe}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ). Dentre os dados coletados por SCHALM et al (1975), estão os seguintes: ovinos adultos, 70 - 153 dias ( $^{59}\text{Fe}$ ); bovinos adultos, 157 - 162 dias ( $^{14}\text{C}$ ); caninos, 119 - 122 dias ( $^{55}\text{Fe}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ); equinos,  $147 \pm 8$  dias ( $^{32}\text{P}$ ).

Pesquisas sobre a membrana plásmica (MARCHESI, 1985a, 1985b), a única que o eritrócito possui, demonstraram que ela é constituída de várias proteínas, correspondendo às seis faixas (1; 2; 3; 4,1; 4,2; 5 e 6) que aparecem em eletroforese de gel de poliacrilamida de preparações tratadas com sódio dodecil sulfato, SDS (Fig. 7). Além das proteínas periféricas reveladas pelas faixas 1; 2; 4,1; 4,2; 5 e 6 (Fig. 7), a membrana contém a proteína da faixa 3-canal de ânions, e mais 4 faixas de proteínas que reagem com o reagente de ácido periódico - Schiff (PAS), e que são as glicoforinas, glicoproteínas transmembrana, ricas em carboidratos (Fig. 8).

Uma vista de conjunto da membrana plásmica do eritrócito é mostrada na Fig.9 de STRYER (1988), reproduzida de SHOHET LUX (1984).

Durante o seu período de desenvolvimento, os eritrócitos adquirem características bioquímicas próprias. Assim, na fase de proeritroblasto e de normoblasto, as células são nucleadas e contêm DNA, RNA e sistemas sintetizadores de proteínas; as enzimas de via glicolítica, do ciclo do ácido cítrico e do sistema de transporte de electrons; a via das pentose-fosfatos; o sistema sintetizador do heme; e o sistema da síntese de lipídios. Na fase de reticulócito, as células são anucleadas e possuem RNA, sistemas sintetizadores de proteínas, enzimas da glicólise, do ciclo do ácido cítrico e do sistema de transporte de electrons; enzimas da síntese do heme, da síntese de lipídios e da via das pentose-fosfatos. Na fase de eritrócito, as células contêm as enzimas de glicólise, desidrogenase do lactato, e as enzimas da via das pentose-fosfatos. Eritrócitos não possuem mitocôndria e nem ribossomos.

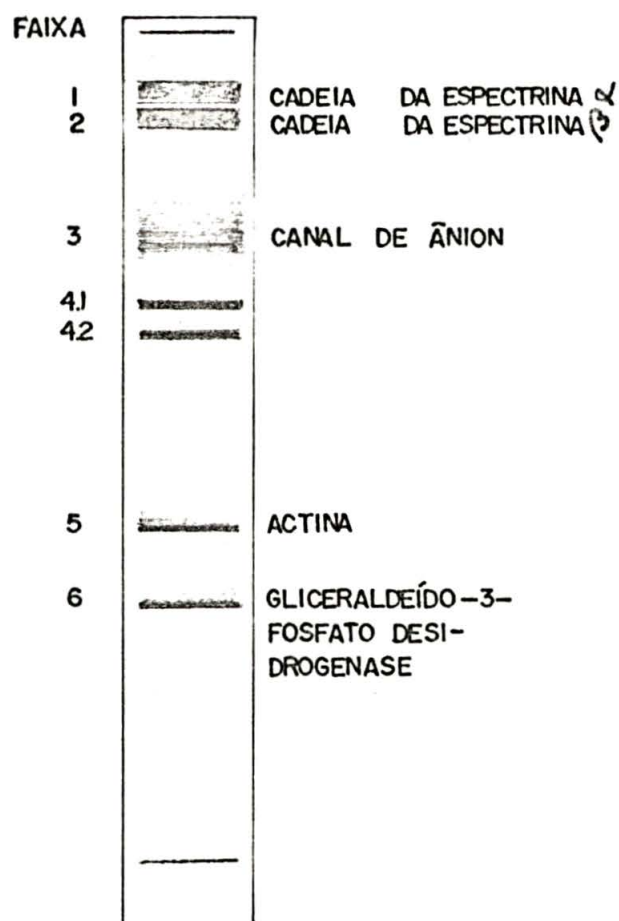


Fig. 7 - Perfil eletroforético, em SDS-gel de poliacrilamida, de preparado de membrana plasmica do eritrócito. Faixas 1 e 2,  $\alpha$  e  $\beta$ -espectrinas que reagem com outras proteínas para regular e estabilizar a forma da membrana; faixa 3, proteína do canal de íons que capacita a troca entre íons bicarbonato e cloreto na manutenção do tampão do eritrócito; faixa 4.1, proteína que auxilia a fixação da espectrina à membrana; faixa 5, actina, importante para a motilidade celular; faixa 6, gliceraldeído-3-P-desidrogenase, enzima da glicolise (MARCHESI).



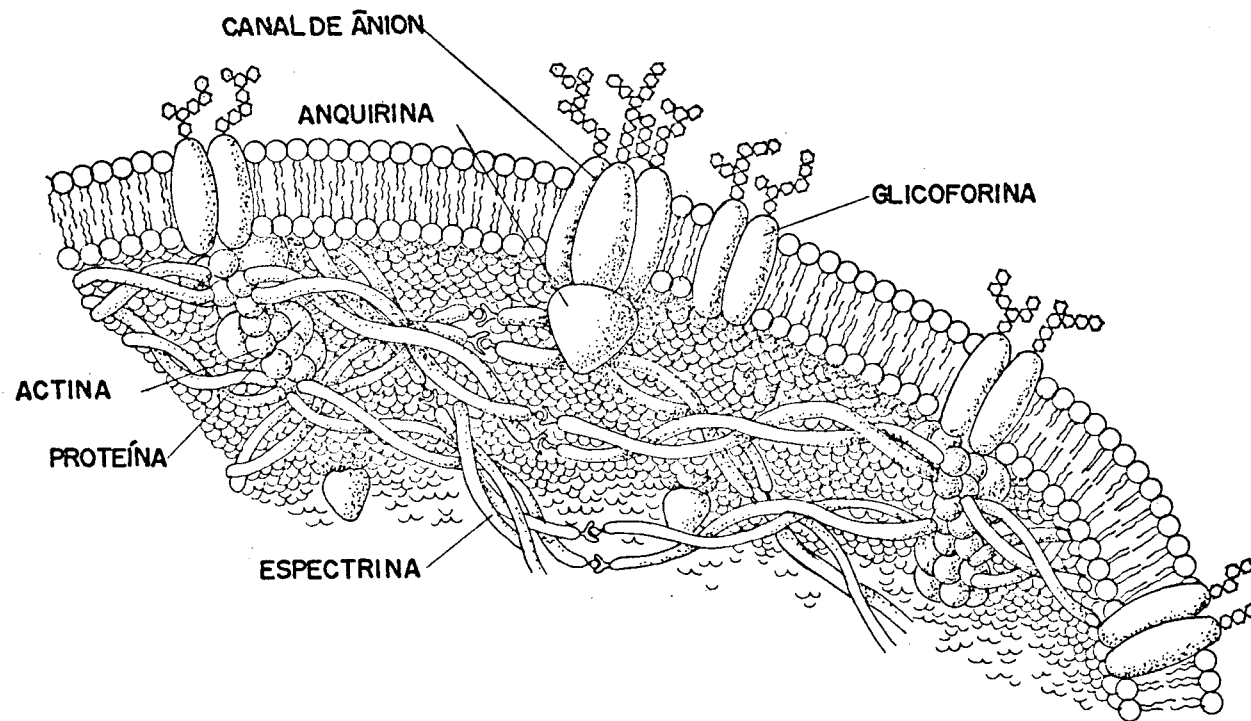
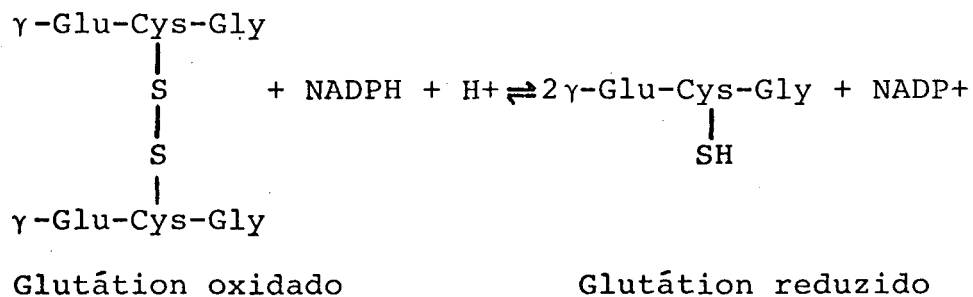


Fig. 9 - Diagrama da citoestrutura esquelética da membrana do eritrócito. A espectrina é ligada ao canal de ânions pela anquirina e à glicoforina pela proteína 4.1. Esta, também liga um filamento de actina (SHOHET & LUX, 1984) segundo STRYER (1988).

Em comparação com células somáticas, o eritrócito realiza número limitado de funções, em razão de sua especialização fisiológica. Assim, o eritrócito de mamíferos possui; a) a via glicolítica (Fig. 10), para prover energia química e 2,3-bisfosfoglicerato, modulador da molécula da hemoglobina; b) a via das pentose-fosfatos, fonte celular de NADPH, essencial para operar o sistema glutâtion-oxidado  $\rightleftharpoons$  glutâtion reduzido e para manter grupos -SH de proteínas eritrocitárias no estado reduzido.

Na atividade metabólica do eritrócito, a via glicolítica (Fig. 10) assume papel fundamental já que é através dela que a glicose do plasma, que permeia a membrana plásmica, é metabolizada dando origem ao ester de ROBINSON (G-6-P). Como em outras células, a (G-6-P) tem papel central no metabolismo do eritrócito. Em primeiro lugar, por ser o substrato alimentador das etapas da região proximal da via das pentose-fosfatos, catalisadas pela G-6-PDH e pela 6-P-GDH, ambas dependentes de NADP e produtoras de NADPH + H<sup>+</sup>, coenzima da glutâtion reductase na reação:



Na forma de glutâtion reduzido, essa substância serve como um "tampão sulfidrílico" que mantém os resíduos de cisteína da hemoglobina e de outras proteínas do eritrócito, no es-

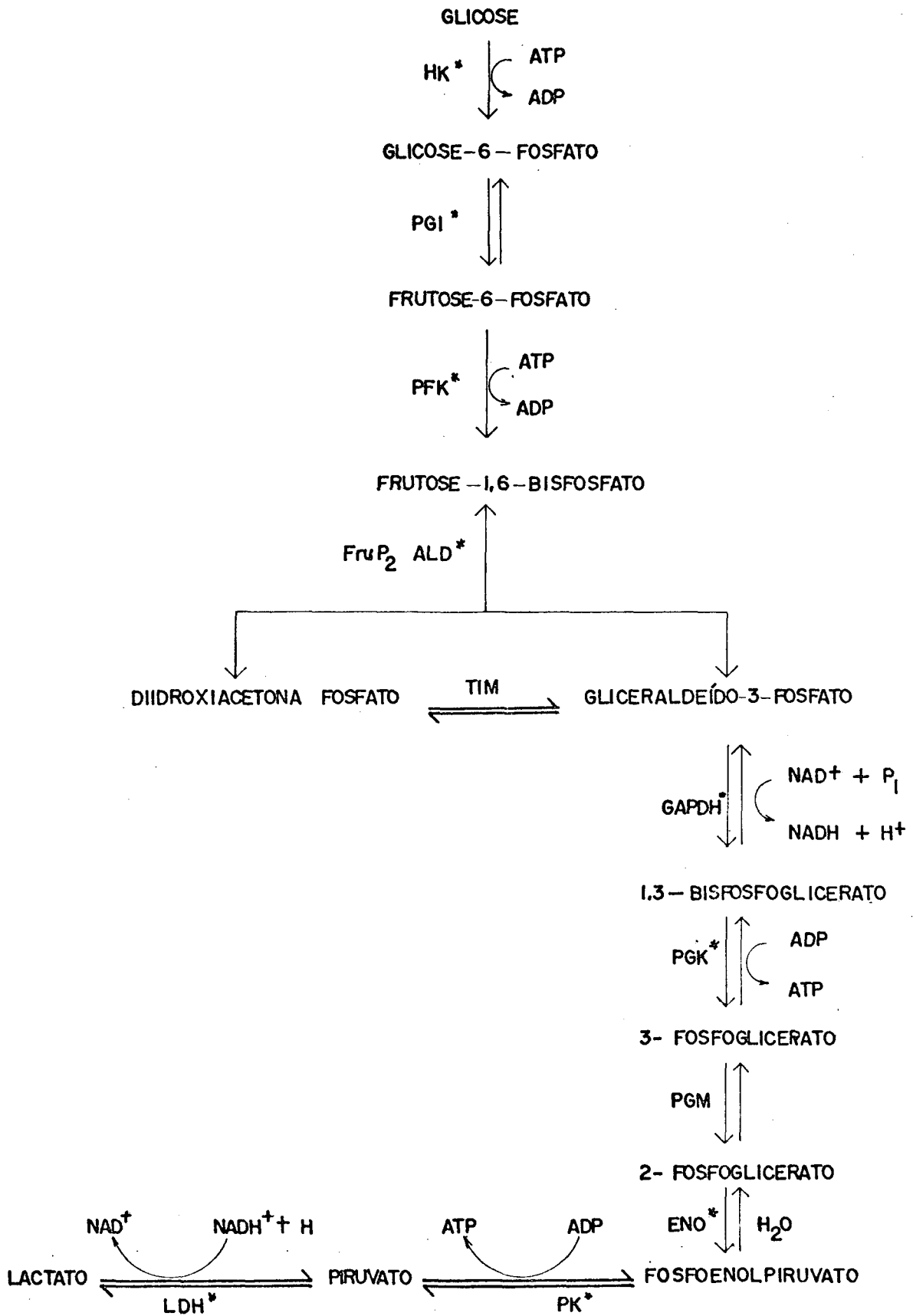


Fig. 10 - Via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas. (\*) Enzimas cujos níveis eritrocitários foram determinados.

tado reduzido. Sabe-se que a relação entre a forma reduzida do glutâtion (GSH) e a oxidada (GSSG) é de cerca de 500. O GSH ainda opera na detoxificação, reagindo com o peróxido de hidrogênio e com peróxidos orgânicos:



A glutâtion redutase, por sua vez, é uma enzima dimérica (Fig. 11) constituída por um domínio do NADP<sup>+</sup> e um do FAD, além de um de interface.

Além do seu envolvimento na produção de NADPH + H<sup>+</sup>, a G-6-P é catabolisada a lactato, através das enzimas da glicólise e da desidrogenase do lactato que catalisa a redução final do ácido purúvico a ácido láctico. Nesse processo, concentram-se as duas únicas etapas de formação de ATP do eritrócito, destituído que é de mitocôndria e, assim, da produção de ATP por fosforilação oxidativa.

Para essas considerações, conclui-se que o eritrócito tem o seu metabolismo dependente da glicose plasmática. Uma vez no plasma, a glicose é compartilhada com os eritrócitos para as quais se difunde em processo independente da ação da insulina. No homem, a taxa glicêmica, tomada tanto no plasma como no sangue total, proporciona valores comparáveis, já que a glicose se difunde uniformemente entre o plasma e o eritrócito.

Em aves (ROSA et al, 1983<sub>a,b</sub>; 1989) e em peixes (RODRIGUES et al, 1985), verificou-se que a compartimentalização da glicose no sangue assume características distintas daquelas que ocorrem no homem, a glicose estando quase toda localizada

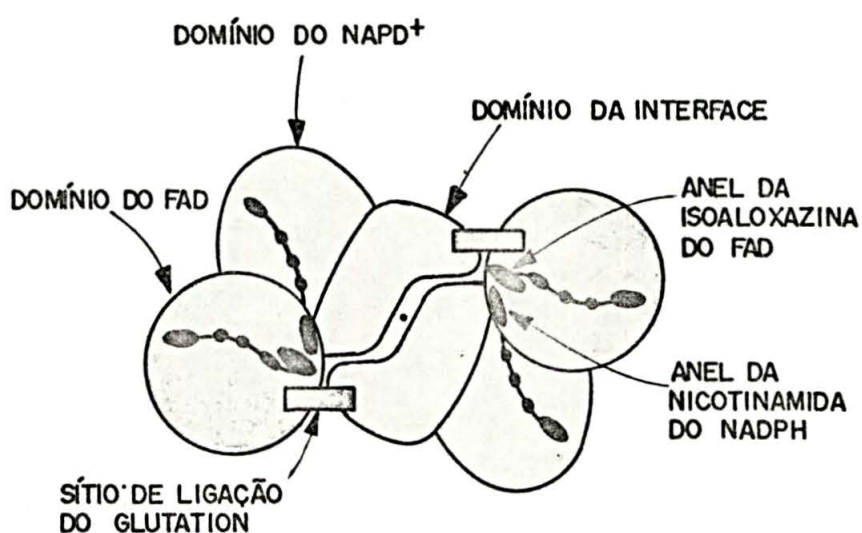


Fig. 11 - Domínios do NADP e do FAD na molécula da glutatíon reductase. Na redução da GS-SG para GSH, os elétrons do  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  não são diretamente transferidos para a ligação dissulfeto do glutatíon passando, inicialmente, para a FAD e, deste, para a ligação dissulfeto do GSSH (STRYER, 1988).

no plasma. Em pinguins, por exemplo, ROSA et al (1989), encontraram taxas de 327,18 mg/dL em plasma e 173,45 mg/dL no sangue total de Pygoscelis antarctica e de 327,18 e 150,95 em Pygoscelis papua. Em peixes Notothenidae, dos mares antárticos, RODRIGUES et al (1985) encontraram valores plasmáticos da glicose variando entre 330 a 450 mg/dL em contraposição a valores de 3 a 23 mg/dL em eritrócitos.

Para que a glicose seja metabolizada pelo eritrócito, um fluxo glicolítico se estabelece, a glicose sendo permeada para o interior da célula e o ácido láctico produzido excretado para o meio.

Medidas de fluxo glicolítico são correntemente efetuadas com eritrócitos humanos para indentificação de possíveis lesões bioquímicas no metabolismo glicolítico dessas células (BACILA et al, 1988).

Entretanto, ao estudar o metabolismo glicídico de eritrócitos de ruminantes (ovinos e bovinos) e de equinos e de caninos, objetos do presente trabalho, vários fatos vieram à luz e mereceram análise especial. Assim, determinações de compartimentalização de glicose no plasma e no eritrócito de ovinos mostraram sempre consistentes valores de taxas glicêmicas mais elevadas no plasma do que no sangue total. Em ovinos da raça Ideal, a média das relações entre a taxa glicêmica plasmática e a de sangue total foi de 1,44, e para ovinos Corridale de 1,43.

ROSA et al (1983<sub>a,b</sub>, 1989) haviam demonstrado já que eritrócitos de Gallus gallus domésticus e de pinguins Pygoscellidae, possuem metabolismo glicídico defeituoso, sendo incapazes de permear glicose e de produzir ácido láctico quando

incubados, na forma de células intactas, com glicose, um fato que havia sido divisado por RÚTER e por BARRON & HARROP já em 1923 e 1928 respectivamente, em sangue de aves, enquanto que BELL & CULBERT (1968) e SHIELDS et al (1964) não conseguiram demonstrar utilização de glicose e conseqüentemente produção glicolítica de lactato, por eritrócitos intactos de galinha. Porém, uma de suas mais notáveis características reside no fato de possuírem glicose compartimentalizada, principalmente no plasma, atingindo níveis altos quando comparados com os níveis glicêmicos de mamíferos.

Eritrócitos de ovinos, analisados quanto ao fluxo glicolítico mostraram impedimento no consumo de glicose, nas condições do experimento da Tab. 2, entre o sistema 1 (controle) e o 2, no qual a suspensão eritrocitária foi incubada com glicose, não tendo havido diferença nos valores de açúcar redutor residual após 150 min. de incubação. Aliás, em estudo comparativo (Tab. 3) efetuado entre eritrócitos de ovinos, bovinos, equinos e caninos e de eritrócito humano, verificou-se claro processo de fluxo glicolítico apenas com eritrócito humano.

Em razão dos resultados do fluxo glicolítico analisados nas Tab 2 e 3 e da aparente inoperância metabólica dos eritrócitos de ruminantes de equinos e de caninos foi feito estudo relativo às taxas de hemoglobina glicosilada nesses eritrócitos (Tab. 4).

Desde que ALLEN et al. (1958) encontraram componentes menores na hemoglobina de humano adulto, a sua purificação, o estudo de sua estrutura e da sua biossíntese vêm recebendo grande aporte experimental. Técnicas experimentais permitiram (McDONALD et al), 1978) o isolamento e a separação de quatro

componentes menores da hemoglobina humana, designadas como HbA<sub>1a1</sub>, HbA<sub>1a2</sub>, HbA<sub>1b</sub> e HbA<sub>1c</sub>, o componente principal sendo a HbA.

Desses quatro componentes o que maior interesse despertou foi a HbA<sub>1c</sub> - hemoglobina glicosilada - (HOLMQUIST & SCHROEDER, 1966; BOOKCHIN & GALLOP, 1968; BUNN et al, 1975; KOENIG et al, 1977) que é formada (Fig. 2) por condensação de uma base de SCHIFF do  $\alpha$ -aminogruppo de  $\beta$ -cadeias com glicose, seguida de um rearranjo para cetimina mais estável e praticamente irreversível (HOLMQUIST & SCHROEDER, 1966; GALLOP, 1968; BUNN et al, 1976; KOENIG et al, 1977).

Grande interesse em torno da HbA<sub>1c</sub>, ou hemoglobina glicosilada, ocorreu quando se observou (RAHBAR, 1968; TRIVELLI et al, 1971; KOENIG et al, 1976) que ela duplica ou triplica de concentração no eritrócito humano de pacientes com diabetes mellitus, estabelecendo-se então (KOENIG et al, 1976; GABBAY et al, 1977) uma correlação direta entre o controle da glicose sanguínea e os níveis de HbA<sub>1c</sub>. Além disso, foi determinado por BUNN et al (1976) que a HbA<sub>1c</sub> humana é formada de modo lento e contínuo e quase que irreversivelmente, durante os 120 dias do tempo de vida do eritrócito, essa lenta conversão de HbA<sub>1c</sub> sugerindo que o processo é não enzimático, participando dele glicose, glicose-6-fosfato e outros açúcares.

Conclusão de que a síntese de HbA<sub>1c</sub> é proporcional à concentração de glicose sanguínea foi resultado de experiência com uma variedade de camundongo diabético desenvolvido por KOENIG & CERAMI (1975).

Estudando a biossíntese de HbA<sub>1c</sub> em macaco rhesus (Macaca mulata), SOLWAY et al (1979), após administração por via

parenteral, de  $^{55}\text{Fe}$  - ligado à transferrina autóloga, mostrou síntese de  $\text{HbA}_{1\text{C}}$  cuja atividade específica se acumulava quase que linearmente ao longo do período de vida do eritrócito, indicativo de uma conversão lenta e contínua de  $\text{HbA}_{1\text{C}}$ . Por outro lado, foi verificado, ainda, que o conteúdo em carboidrato da  $\text{HbA}_{1\text{C}}$  é idêntico ao da  $\text{HbA}_{1\text{C}}$  humana, assim como, também o perfil de eluição em resina de troca catiônica BioRex 70.

A partir dessas observações foram desenvolvidos métodos clínicos (TRIVELLI et al, 1971; SCHNEK & SCHROEDER, 1961; KYNOCH & LEHMANN, 1977; CHOU et al, 1978) baseados na separação cromatográfica da  $\text{HbA}_0$  e da  $\text{HbA}_{1\text{C}}$  em resina de troca catiônica BioRex 70, 200-400 meshes forma sódica, e a eluição diferenciada de ambas as hemoglobinas com um tampão, pH 7,66 de fosfato-cianeto e outro de pH 7,76 de fosfato-cianeto de força iônica superior.

Dos dois tampões utilizados, o primeiro promove a eluição rápida da hemoglobina glicosilada e o segundo promove a eluição lenta da hemoglobina normal. É pois, muito conveniente que as frações estudadas em eritrócitos de animais domésticos sejam respectivamente denominadas de hemoglobina de eluição rápida ( $\text{HbER}$ ) a que corresponderia à hemoglobina glicosilada ( $\text{HbA}_{1\text{C}}$ ), e de hemoglobina de eluição lenta ( $\text{HbEL}$ ) - a que corresponderia à hemoglobina normal de adulto ( $\text{HbA}_0$ ).

A  $\text{HbA}_{1\text{C}}$  pode ser considerada como um modelo para estudos de lesões que podem ser causadas às proteínas na presença de níveis altos de açúcar redutor. GUTHROW et al (1979), por exemplo, estudaram o processo de glicosilação não enzimática que ocorre na albumina sérica humana no diabetes mellitus, os níveis de albumina glicosilada podendo ser considerado como

indicadores sensíveis de hiperglicemia moderada e de intolerância precoce à glicose.

Esses fatos levantaram a possibilidade de que as complicações tardias do diabete tenham origem na ligação covalente da glicose a proteínas vulneráveis.

A HbA<sub>1c</sub> é, pois, um componente menor do eritrócito humano, compreendendo ali valores percentuais normais de 5 a 8% do total da hemoglobina presente.

Alguns fatos que merecem cuidadosa reflexão foram derivados da determinação dos valores percentuais da hemoglobina glicosilada contida em eritrócitos de ovinos, bovinos, equinos e caninos.

Assim, pelos dados da Tabela 4, verifica-se que a comparação entre os valores de HbER encontrados no eritrócito humano e os achados nos diferentes animais domésticos estudados dão, para estes últimos, valores muito superiores: 25,26% para caninos, 61,60% para equinos 95,66% para bovinos e 97,64% para ovinos, enquanto que para o eritrócito humano o valor encontrado foi de 7,03%.

Quando se analisam os níveis glicêmicos dos animais estudados e as respectivas taxas de hemoglobina de eluição rápida (Fig. 2), verifica-se que a sua relação é inversamente proporcional, no sentido do que quanto menores os níveis glicêmicos, como nos ovinos e bovinos, mais elevados são os valores da HbER (>90%). No homem, cuja taxa glicêmica é a mais elevada de todas, a hemoglobina glicosilada é de 7,03%. Equinos e caninos dão, por sua vez, valores intermediários, de HbER, as suas respectivas taxas glicêmicas, situando-se também entre as dos ruminantes e a do homem.

A possível identidade das hemoglobinas de eluição rápida determinadas em ovinos, bovinos, equinos e caninos com a fração de HbA<sub>1C</sub> do homem é um fato a ser considerado. Assim, todas as HbER foram obtidas em resina de troca catiônica utilizando-se os mesmos eluentes de fosfato-cianeto empregados na separação cromatográfica da HbA<sub>0</sub> e da HbA<sub>1C</sub> humanas. No sistema empregado, não há linearidade para valores de HbA<sub>1C</sub> superiores a 30%, mas o problema da linearidade do método nada tem a ver com a natureza da fração hemoglobínica em separação.

Por outro lado, o estudo da mobilidade eletroforética (Fig. 3) das HbER demonstra que as frações de hemoglobina de todos os animais estudados possuem mobilidade eletroforética compatível com a da HbA<sub>1C</sub> do homem, se bem que com valores próprios para cada espécie. No caso dos ovinos, foram obtidas duas frações bem características de HbER de mobilidade eletroforética de 0,53 e outra de 0,68 e nenhuma faixa de HbEL. Assim, com HbER da ordem de 97,64%, praticamente toda a Hb do eritrócito de ovinos deve ter saído na forma de HbER da coluna cromatográfica.

SOLWAY et al (1979) analisaram frações de Hb verificando que a eluição em resina de troca catiônica BioRex 70, dos hemolisados do macaco rhesus e do homem, proporcionou perfis análogos, com a diferença de que a primeira porção de HbA<sub>0</sub> do rhesus, eluída em BioRex 70, continha significativa quantidade de carboidratos.

Um fato que ainda merece considerações maiores diz respeito às determinações das concentrações de 2,3-bisfosfoglicerato e de ATP em eritrócito de mamíferos (BARTLETT, 1970), fosfatos orgânicos moduladores da Hb. De acordo com os dados de

BARTLETT (1970), as concentrações de 2,3-bisfosfoglicerato ocorrem na seguinte ordem decrescente: homem > cão > cavalo > vaca > ovelha, exatamente na ordem inversa dos valores percentuais de HbER da Fig. 2, como também ocorre com as taxas glicêmicas.

Com respeito ao ATP, a ordem decrescente é a seguinte:  
homem > cão > ovelha > vaca > cavalo (BARTLETT, 1970).

A constatação, pois, de valores altos de HbER e a sua possível identificação com a HbA<sub>1C</sub> - hemoglobina glicosilada - em eritrócito de caninos, de equinos e de ruminantes merece ainda algumas considerações.

O tampão de fosfato-cianeto (SCHNECK & SCHROEDER, 1961; TRIVELLI et al, 1971; CHOU et al, 1978) elui, à temperatura ambiente, a partir de hemolisados aplicados à coluna de BioRex 70, forma sódica, a fração denominada de hemoglobina de eluição rápida (HbER) que deve conter uma mistura de HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub> e HbA<sub>1c</sub> e possivelmente, ainda HbA<sub>1d</sub> e HbA<sub>1c</sub>, coletadas juntamente. Essa mistura constitui a fração de eluição rápida, da forma como foi obtida por TRIVELLI et al (1971) em eritrócitos de pacientes diabéticos.

Assim, é muito provável que a fração de HbER obtida nas preparações de eritrócitos de ovinos, bovinos, equinos e caninos contenha, além de HbA<sub>1c</sub> hemoglobina glicosilada, outros componentes hemoglobínicos como a HbA<sub>1a</sub> e HbA<sub>1b</sub>. Como a medida de hemoglobina no eluato é espectrofotométrica, e procedida na faixa de Soret, não há como distinguir entre as frações que compõem a HbER.

É importante notar que os eluatos de HbER de bovinos, de ovinos e de equinos, bem como o do homem, quando submetidos

à eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig. 3), revelaram mais de uma faixa (bovinos, 2; ovinos, 3; equinos, 2; homem, 3) de proteínas. Apenas o de cão mostrou faixa singular.

Ainda, de acordo com TRIVELLI et al (1971), HbA<sub>Ia</sub> e HbA<sub>Ib</sub> compreendem de 1 a 2 por cento da hemoglobina total em indivíduos normais e 2 a 3 por cento em diabéticos, enquanto que a HbA<sub>IC</sub> estava presente em 3,3 a 3,5 por cento em indivíduos normais e de 6,0 a 10,0 por cento em diabéticos.

A possibilidade de que a fração de eluição rápida obtida de bovinos, ovinos, equinos e caninos não conteria glicohemoglobina, a existência desse componente sendo limitada aos símios e ao homem, é discutível.

Dois fatos devem contrapor-se a isso. Um é o da obtenção de HbA<sub>IC</sub> em camundongos diabéticos (KOENIG & CERAMI, 1975), achado que amplia o leque de animais que possuem essa característica, e o outro, é a constatação de que a hemoglobina glicosilada é formada por reação não enzimática que ocorre, cumulativamente, ao longo de todo o período de vida do eritrócito, envolvendo glicose, glicose-6-fosfato e outros açúcares redutores, o que por si só, generaliza o fenômeno.

Como no diabete mellitus - quando as taxas glicêmicas são superiores às encontradas em situação normal, os valores de HbA<sub>IC</sub> se elevam no homem (RAHBAR, 1968; TRIVELLI et al, 1971; KOENIG et al, 1976), ocorreu aparente contrasenso no que foi constatado nos dados da Tabela 3 e da Fig. 2, de que valores mais altos de HbER aparecem na medida em que as taxas glicêmicas normais diminuem.

Algumas hipóteses podem ser, contudo, formuladas, à guisa de explicação para esse fenômeno. Uma delas, é a de que a reação de glicosilação das diferentes hemoglobinas pode ocorrer em distintas velocidades, na dependência das condições físico-químicas dos eritrócitos de cada espécie animal, e ainda, na dependência de detalhes estruturais e conformacionais das hemoglobinas envolvidas.

Resta ainda explicar até que ponto a presença de valores percentuais elevados de Hb<sub>ER</sub> pode incidir sobre a capacidade do eritrócito de utilizar glicose em medidas de fluxo glicolítico. (Tabelas 2 e 3).

Ao formar aldimina (Fig. 12), a molécula glicídica envolve o seu grupo redutor nesse processo. A aldimina, depois, pelo rearranjo de Amadori, transforma-se em cetimina, na forma mais estável, que acaba por comprometer a molécula glicídica no sentido do seu catabolismo. Por outro lado, a formação de conjugados glicídicos com Hb é contínua e prossegue durante todo o tempo de vida do eritrócito. Assim, parte da glicose que permeia a membrana plásmica do eritrócito não é catabolizada podendo-se esperar que, na dependência da concentração de HbA<sub>1c</sub>, o metabolismo eritrocitário seja limitado.

Em razão dos dados obtidos, experimentos foram realizados com a finalidade de determinar os níveis de enzimas do metabolismo glicídico dessas células, bem como verificar a sua capacidade de produzir lactato.

As Tabelas 5 a 8 mostra os dados obtidos na determinação das enzimas da glicólise e da região proximal da via das pentose-fosfatos, respectivamente em eritrócitos de ovinos (Tab. 5), bovinos (Tab. 6), equinos (Tab. 7), e caninos (Tab. 8).

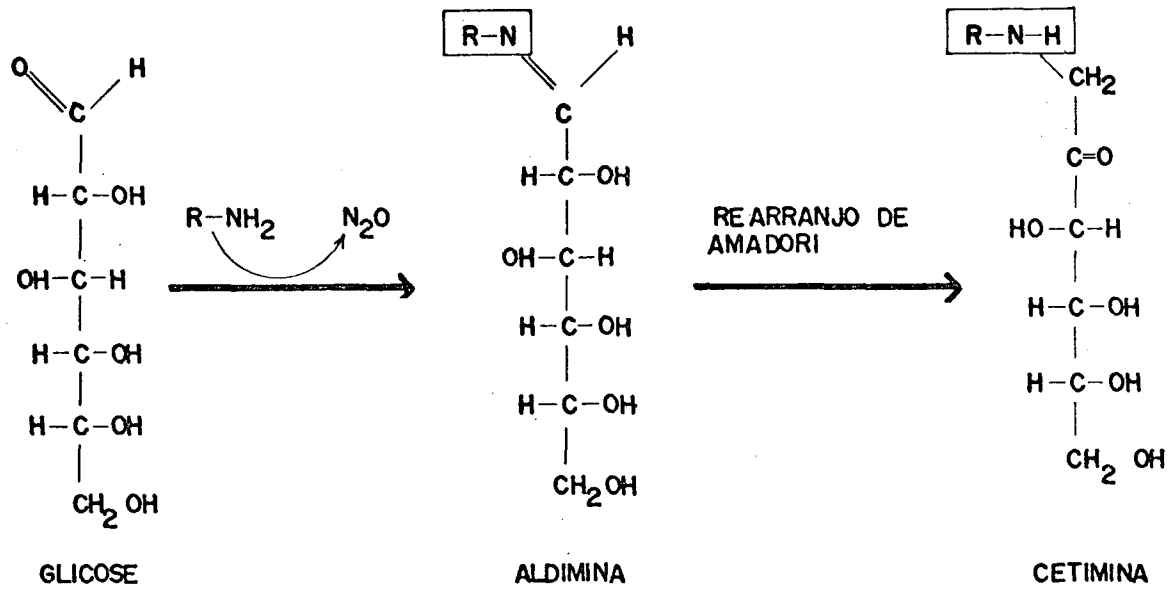


Fig. 12 - Formação da hemoglobina glicosilada ( $HbA_{1c}$ ) como consequência da adição não enzimática da glicose ou da glicose-6-fosfato a um  $\alpha$ -aminogruppo. Em razão do rearranjo de Amadori, forma-se, a partir da aldimina, uma cetimina estável.

A Fig. 4 mostra, então, as concentrações relativas, em atividade específica, das enzimas da glicólise, alguns fatos podendo ser apreciados.

Assim, verifica-se que a HK possui os menores valores dentre todas as enzimas estudadas mas, de acordo com WILLIAMSON (1970), a capacidade dessas enzimas é muitas vezes maior do que o fluxo glicolítico observado, indicando que ela se encontra em estrito controle na célula intacta.

A razão teleológica pela qual determinadas enzimas como a PGI por exemplo, aparecem com atividades altas, deve-se, provavelmente, ao fato delas assegurarem situação de equilíbrio, naquelas etapas com baixa troca de energia livre, mantendo, assim, controlada a veiculação de metabólitos entre sítios de controle. É o que ocorre, por exemplo, com a PGI, entre duas enzimas regulatórias - HK e PFK, esta última também aparecendo com níveis baixos, porém superiores aos da HK.

Analisando os níveis de enzimas ligadas aos mecanismos de utilização e de síntese de ligações fosfóricas de elevado potencial químico, (Tab. 9), algumas considerações podem ser feitas. No que concerne à relação PFK/HK, os menores valores são encontrados em eritrócitos de ovinos (1,16) e de bovinos (2,72) seguidos de 3,5 para equinos e 3,0 para caninos, todas medidas como atividade específica ( $\Delta \text{min} \cdot \text{mL}^{-1} / \text{mg proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Em eritrócito humano (WILLIAMSON, 1970) encontrou relação PFK/HK de 18, expressando a atividade enzimática em  $\mu \text{moles} \cdot \text{mL de células}^{-1} \cdot \text{hora}$ , mostrando assim que os níveis de PFK dos eritrócitos dos animais estudados são muito baixos ou pelo menos inferiores aos encontrados no eritrócito humano.

TABELA 9  
ENZIMAS LIGADAS AOS MECANISMOS DE UTILIZAÇÃO E DE SÍNTESE  
DE LIGAÇÕES FOSFÓRICAS DE ELEVADO POTENCIAL QUÍMICO NO  
ERITRÓCITO DE OVINOS, BOVINOS, EQUINOS e CANINOS\*

ERITRÓCITOS DE				
ENZIMAS	OVINOS	BOVINOS	EQUINOS	CANINOS
HK**	0,0025	0,0022	0,00168	0,0012
PFK**	0,0029	0,006	0,0059	0,0054
Relação				
PFK/HK	1,16	2,72	3,5	3,0
PGK	0,012	0,0195	0,023	0,036
PK**	0,041	0,046	0,0088	0,025
Relação				
PK/PFK	14,13	7,66	1,49	4,62

\*Os valores indicados representam atividade específica expressa em unidades de absorvância/mg de proteína por mL.

\*\* Enzimas regulatórias da via glicolítica.

Quanto à relação PK/PFK, foram encontrados valores de 14,13 para ovinos, 7,66 para bovinos, 1,49 para equinos e 4,62 para caninos, enquanto que para o homem os dados de WILLIAMSON, (1970) dão relação de 1,33.

Da análise dos perfis eritrocitários das concentrações relativas das enzimas da glicólise (Fig. 5 e 6), alguns fatos peculiares podem ser assinalados. Dentre eles estão os altos níveis de GAPDH encontrados em eritrócitos de caninos, os baixos níveis de LDH de ovinos, bovinos e caninos e os baixos níveis de PK de equinos, quando comparados com os de ovinos, bovinos e caninos.

Em relação ao perfil de enzimas glicolíticas do eritrócito humano verificam-se algumas diferenças como no caso dos

níveis de PFK que são sempre inferiores ao da FruP2-ALD nos eritrócitos de todos os animais estudados; os de PGK, sempre inferiores aos da GAPDH; e os de LDH que, com exceção do caso dos equinos, são sempre inferiores aos da PK. No caso dos caninos, a relação LDH/PK é igual a 1,0.

Quando se obtém os valores das enzimas da glicólise em concentrações relativas à HK (Fig.13), verifica-se que há quase uma exata correspondência nos perfis encontrados para ovinos e bovinos, com pontos de confluência próximos dos valores de HK para PFK e ENO, esta última podendo representar um ponto de estrangulamento na sequência metabólica, e ainda mostrando níveis de LDH inferiores aos da PK. Nos caninos, é notável o nível da GAPDH e ainda o fato da LDH, que usualmente se encontra em níveis superiores aos da PK, aparecer com níveis similares aos da referida enzima. Nos equinos, além da PFK e da ENO, também a PK se encontra em níveis reduzidos e, no caso, bem inferiores aos constatados para os demais animais.

A análise das relações numéricas entre níveis de enzimas que constituem pares que mantêm dependência do tipo produto-substrato leva aos valores da Tab. 10 mostrados, comparativamente, com os do eritrócito humano. Ressaltam entre esses dados, os valores baixos da relação LDH/PK, para ovinos, bovinos e caninos; o baixo valor da relação PK/ENO para equinos; o alto valor da relação GAPDH/ALD para caninos.

Entre os mamíferos, foi já verificado que a eritrócito de suínos possui dificuldade em operar a via glicolítica (KIM & McMANUS, 1971), no que se assemelha ao eritrócito de aves (ROSA et al, 1983<sub>a,b</sub>; 1989) cuja capacidade de metabolizar glicose é muito reduzida ou praticamente inexistente. No

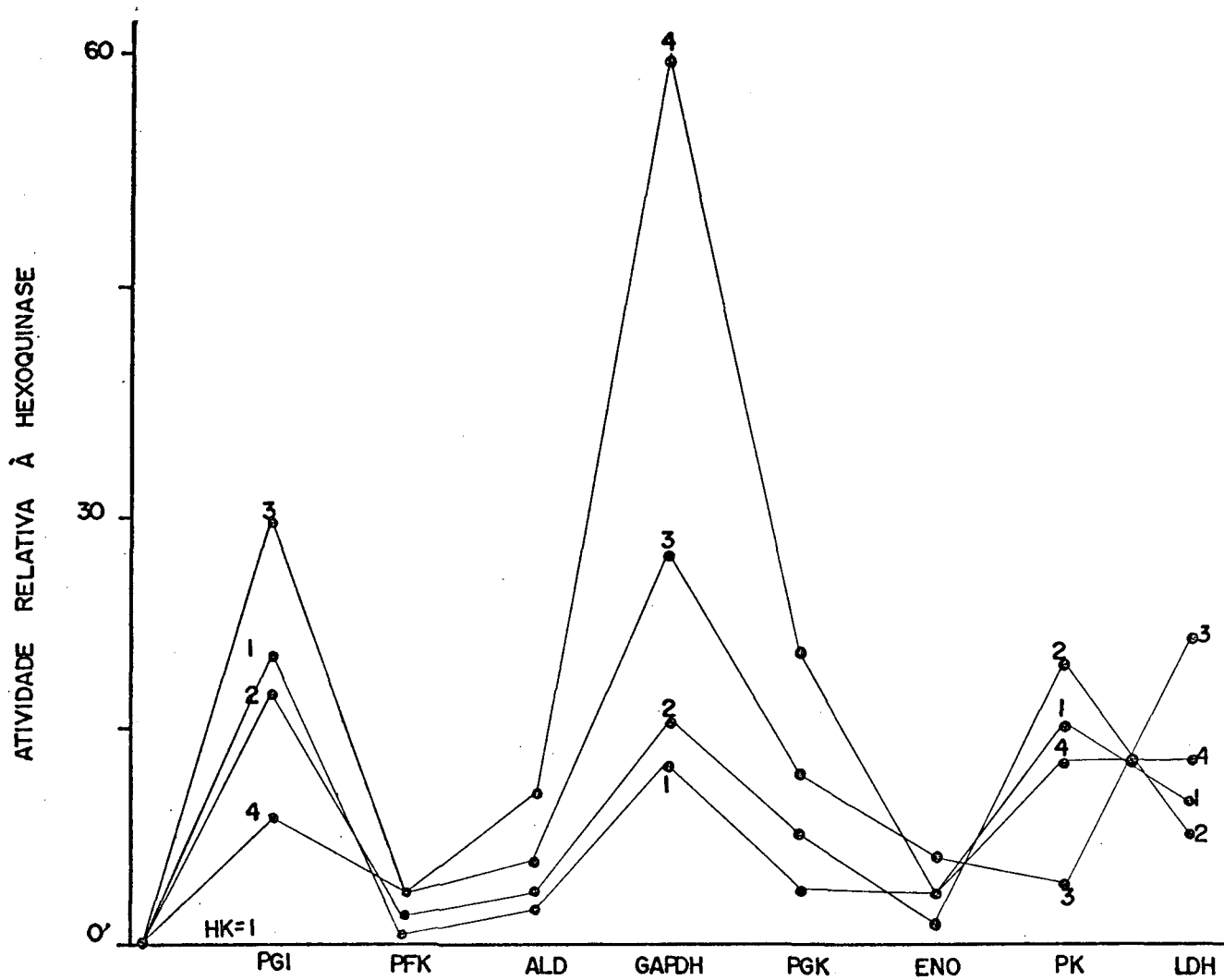


Fig. 13 - Concentrações relativas à hexoquinase de enzimas da via glicolítica do eritrócito de ovinos (1), bovinos (2), equinos (3) e caninos (4). Os valores mostrados foram calculados com base nas atividades específicas obtidas como unidades ativas do mL por mg de proteína por mL.

eritrócito de suínos, a forma predominante de HK, do tipo III, representa cerca de 98% da atividade fosforilante da glicose, mas é inibida pela presença de altas concentrações de glicose. No caso do eritrócito de galinha, o tipo predominante não se coaduna com o tipo I humano por possuir perfil eletroforético totalmente distinto (RODRIGUES, 1987).

TABELA 10  
 RELAÇÕES ENTRE PARES DE ENZIMAS DA GLICÓLISE  
 RELACIONADAS POR DEPENDÊNCIA PRODUTO-SUBSTRATO, NO  
 ERITRÓCITO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS 1

PARES DE ENZIMAS	OVINOS	BOVINOS	EQUINOS	CANINOS	HOMEM 2
PGI/HK	20,8	19,34	30,5	11,1	24,2
PFK/PGI	0,055	0,13	0,10	0,27	0,75
ALD/PFK	2,8	1,3	2,37	3,33	0,5
GAPDH/ALD	0,39	0,48	0,42	6,2	1,18
ENO/PGK	0,91	0,24	0,45	0,16	0,44
PK/ENO	3,72	9,58	0,83	4,3	1,2
LDH/PK	0,60	0,45	4,7	1,0	1,75

(1) valores em atividade específica ( $\Delta$ min . mL<sup>-1</sup>/mg proteína . mL<sup>-1</sup>)  
 (2) valores de WILLIAMSON (1970) em atividade enzimática em moles/ml células/hora.

A inoperabilidade do eritrócito de aves para metabolizar glicose pode ser explicada de diversos modos, em razão de fatos experimentais estabelecidos. ROSA et al (1983a) haviam verificado que hemolisados de eritrócitos de aves, quando incubados com 2,3-bisfosfoglicerato, geram ácido láctico, o que não ocorre com hexoses, um fato que parece implicar num impedimento bioquímico da etapa do metabolismo das hexoses.

De acordo com RODRIGUES (1987), o eritrócito adulto possui um "pool" de Mg<sup>2+</sup> disponível que nas aves pode ser com-

partilhado por diversos compostos do metabolismo dentre os quais, o ATP e o IP5, este último presente em níveis apreciáveis no eritrócito de aves adultas, em lugar do 2,3-DPG.

Nos mamíferos adultos, vários fosfocompostos estão presentes no eritrócito. De acordo com BARTLETT (1970), o composto orgânico predominante no eritrócito dos caninos e dos equinos é o 2,3-DPG (cerca de 10  $\mu$ M - como fósforo - por ml de eritrócitos) com valores semelhantes aos do homem. Contudo, a concentração em ATP é bem menor do que a do homem (cerca de 0,5  $\mu$ M de P de ATP por ml de células).

Os eritrócitos dos ruminantes, bovinos e ovinos, possuem contudo, baixa concentração de 2,3-DPG e de ATP, o eritrócito de bovinos contendo, porém, elevadas concentrações de um ribosídeo e de um ribotídeo de ácido úrico, não presentes em outras espécies.

Analisando a capacidade de hemolisados de eritrócitos de ovinos, bovinos, equinos e caninos de gerar ácido láctico quando incubados com glicose e com 2,3-DPG (Tabela 9), foi verificado, em experimentos preliminares, que apenas o eritrócito de caninos mostrou formação mensurável de lactato, quando incubado com 2,3-bisfosfoglicerato, todos os experimentos feitos com glicose dando resultado negativo.

Uma das razões pelas quais o eritrócito desses animais pode ser menos operante, apesar de dotado de equipamento enzimático em níveis cinéticos apreciáveis, se bem que distintos do eritrócito humano, pode residir no "pool" de  $Mg^{2+}$  dessas células. Os eritrócitos de mamíferos adultos não possuem inositol pentafofato (IP5), que é inibidor competitivo da HK pelo  $Mg^{2+}$  não complexado do "pool" metálico, enquanto que o

2,3-DPG possui papel saliente no controle da atividade da HK do eritrócito de mamífero por inibir, competitivamente, essa enzima em relação ao complexo  $Mg\ ATP^{2-}$ .

Em eritrócito de galinha, RODRIGUES (1987) estimou em  $2,76\ \mu\text{ moles/ml}$  de eritrócito os níveis de Mg total. Comparados com os níveis totais de ATP ( $1,56\ \mu\text{ moles/ml}$ ) e de IP5 ( $3,30\ \mu\text{ moles/ml}$ ) e de IP5 ( $3,30\ \mu\text{ moles/ml}$ ), verifica-se que o Mg total da célula está em concentrações inferiores à soma das concentrações daqueles compostos fosfatados que são seus ligantes intracelulares.

Resta ainda, pois, pesquisar nos eritrócitos de ruminantes, de equinos e de caninos os seus níveis de Mg total a fim de relacionar com os compostos orgânicos neles existentes, principalmente o 2,3-DPG e o ATP e, assim, melhor entender o seu comportamento metabólico. Em eritrócitos humanos, RODRIGUES (1987), por exemplo, não encontrou efeitos ativadores e inibidores do  $Mg^{2+}$ , em faixa de concentração de 0 a 7,6 mM, sobre a velocidade de ação da HK, enquanto que GERBER et al (1974) encontram etapas de ativação e de inibição da mesma enzima sob a ação de  $Mg^{2+}$  não complexado, nas concentrações de 0,05 a 10 mM, se bem que RODRIGUES, por análise de distribuição das formas iônicas, procedida a partir dos dados dos autores, verificou a ocorrência de elevação do verdadeiro substrato que é o  $Mg\ ATP_2^-$ . RIJKSEN & STAAL (1977) por sua vez, encontraram efeito inibitório de  $Mg^{2+}$  em altas concentrações ( $k_i = 16$  a 18 mM) sobre HK do eritrócito humano.

## V. SUMÁRIO

Foi procedido um estudo do metabolismo glicídico do eritrócito de ovinos (Ideal, Suffolk e Corriedale), de bovinos (Schleswig-Holstein vermelho-e-branco e preto-e-branco), de equinos (P.S.I. e Percheron) e de caninos (Dálmata, Beagle, Dog Alemão, Basset Hound, Doberman e Pastor Alemão). Foram estudados o compartilhamento da glicose sanguínea e a sua distribuição entre o plasma e o eritrócito; o fluxo glicolítico, medido em suspensões eritrócitárias incubadas a 37°C com glicose; e os níveis de enzimas do metabolismo glicolítico (Hexoquinase, H.K.; Fosfoglicose isomerase, PGI; Fosfofructoquinase, PFK; Frutose-1, 6-bisfosfato aldolase, FruP<sub>2</sub>-ALD; Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, GAPDH; Fosfogliceratoquinase, PGK; Fosfopiruvato-hidratase (Enolase) ENO; Piruvatoquinase, PK; Desidrogenase do lactato, LDH; Glicose-6-fosfato desidrogenase, G-6-PDH; Fosfogliconato desidrogenase, 6-PGDH). Em base à determinação dos níveis eritrocitários de enzimas, foram estabelecidos os perfis de enzimas da glicólise para os eritrócitos de cada espécie, com um estudo comparativo das suas concentrações e também em relação aos níveis de HK, neste último caso, com a finalidade de analisar os possíveis pontos de cruzamento sobre o eixo das abcissas.

Ainda, com base nos dados de níveis de enzimas eritrocitárias, foram calculados os valores das relações entre pares

de enzimas que mantêm, entre si, relação do tipo produto da reação-substrato. A atividade metabólica do eritrócito foi medida quanto à sua capacidade de produzir lactato, a partir da incubação de hemolisados com glicose ou com 2,3-Bisfosfoglicerato. Foram estabelecidos, também, os valores de hemoglobina glicosilada dos diferentes animais estudados, denominando-se a fração obtida por eluição com fosfato-cianeto, de hemoglobina de eluição rápida (HbER) e a eluída por fosfato-cianeto com força iônica maior, de hemoglobina de eluição lenta (HbEL). As frações obtidas, a partir da cromatografia em resina catiônica BioRex 70, foram submetidas à eletroforese do tipo "DISC" em gel de poliacrilamida e as mobilidades eletroforéticas das diferentes frações obtidas, determinadas. Foi ainda estabelecida correlação entre os valores de HbER e os níveis glicêmicos encontrados, medidos em sangue total.

## ABSTRACT

A study has been carried out on the glucose metabolism in erythrocytes from the following domestic and farm animals: Ideal, Suffolk and Corriedale sheeps; red-and-white and black-and-white Schleswig-Holstein cows; thoroughbred and Percheron horses; Dalmatian, Beagle, Great Dane, Basset Hound, Doberman and German shepherd dogs. The compartmentalization of blood glucose between plasma and erythrocytes; the glycolytic flux in red cells suspensions incubated at 37°C with a known amount of glucose; the levels of enzymes from the carbohydrate metabolism (Hexokinase, HK; Phosphoglucose isomerase, PGI; Phosphofructokinase, PFK; Fructose-1,6-bisphosphate aldolase, FruP<sub>2</sub>-ALD; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH; Phosphoglyceratekinase, PGK; Phosphopyruvate hydratase-Enolase (ENO); Pyruvatekinase, PK; Lactate dehydrogenase, LDH; Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PDH; 6-Phosphogluconate dehydrogenase, 6-P-GDH) in erythrocytes were studied.

Profiles of the glycolytic enzymes in the red blood cells of the different animals studied were established as specific activities. Furthermore, a study on the activity related to hexokinase of the glycolytic enzymes of the different erythrocytes was carried out, besides a study of the ratios between enzymes related to each other on a product of

reaction-substrate basis. The metabolic activity of the erythrocytes was assayed in terms of lactate formation after the incubation of the hemolysates either with glucose or with 2,3-Bisphosphoglycerate. Values for glycosylated hemoglobin were also established. For this, the phosphocyanide eluate from the BioRex 70 cation exchange resin was called fast-eluting hemoglobin while the NaCl-phosphate-cyanide eluate fraction was called slow-eluting hemoglobin. Both fractions were analysed by "DISC" polyacrilamide gel electrophoresis and the electrophoretic mobility of the different fractions established. Moreover, a correlation has been established between the percentual values of the fast-eluting hemoglobin fraction and the whole blood sugar levels of the different animals.

## VI. CONCLUSÕES

6.1. Nas condições utilizadas, eritrócitos de ovinos, bovinos, equinos e caninos mostraram capacidade diminuída de metabolizar glicose em experimentos de fluxo glicolítico.

6.2. Eritrócitos de caninos, equinos, bovinos e ovinos possuem níveis crescentes de hemoglobina de eluição rápida (HbER), que estão na razão inversa das taxas glicêmicas computadas em termos de sangue total.

6.3. Hemoglobina de eluição rápida, determinada em ovinos, bovinos, equinos e caninos assemelha-se à hemoglobina glicosilada (HbA1c) humana, em razão do seu comportamento eletroforético.

6.4. Em eritrócitos de ovinos e bovinos, as taxas de hemoglobina de eluição rápida mostram valores máximos, não tendo sido possível identificar nos estudos de mobilidade eletroforética a presença de outro tipo de hemoglobina.

6.5. Em equinos e em caninos, a hemoglobina de eluição rápida existe em taxas de 61,60 e 25,26%, respectivamente, tendo sido possível identificar, por eletroforese, a presença de hemoglobina normal.

6.6. Uma possibilidade a ser aventada é a de que a presença de altos níveis de hemoglobina de eluição rápida (Hb glicosilada) possa explicar a aparente dificuldade demonstrada pelos eritrócitos de ovinos e de bovinos e, provavelmente, de equinos de transformarem glicose metabolicamente.

6.7. Eritrócitos de ovinos e de bovinos possuem perfis de enzimas glicolíticas similares, com provável ponto de estrangulamento a nível de enzimas regulatórias, com exceção da piruvatoquinase.

6.8. Em eritrócitos de equinos, os níveis de piruvatoquinase são inferiores aos dos demais animais, dando relação PK/PFK igual a 1,49, cerca de 10 vezes mais baixa do que a de ovinos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAR, N.S.; GRUCA, M.A.; HARLEY, J.D. & ROBERTS, J. (1975) Red cell enzymes. III. Enzyme activity in the red blood cells of different breeds of sheep. Comp. Biochem. Physiol. 51B: (4), 467-469, 471-473.
- AGAR, N.S. & SMITH, J.E. (1974) Erythrocyte metabolism in the goat. Int. J. Biochem. 5: (1) 49-52.
- AKERBLOM, O.; De VERDIER; C.H., GARBY; L. & HOGMAN, C. (1968) Restoration of defective oxygen-transport function of stored red blood cells b addition of inosine, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21: (3) 245-248.
- ALLEN, D.W.; SCHROEDER, W.A. & BALOG, J. (1958) Observations of the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin: a study of the effect of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. J. Am. Chem. Soc. 80: 1628-1634.
- AMMERMAN, G.B. (1982) Effects of fluorides on animals: dietary and mineral suplement considerations. In: International Fluorine Symposium. Iogan, Utah, p. 281-289.
- BACILA, M.; ROSA, R. & BACILA, M. (1988) Técnicas para a determinação de níveis eritrocitários de enzimas. Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- BACILA, M; RODRIGUES, E.; ROSA, R. & LUCCHIARI, P.H. (1989) Biochemical development of penguins in regard to organic phosphate compounds from erythrocytes. 11th Symposium of NPRI on Polar Biology. Tóquio.
- BALLIO, L.A.C. (1983) Considerações sobre a reatividade relativa das rochas fosfáticas. Ultrafértil, São Paulo, 9 p.
- BARRON, E.S.G. & HARROP; G.A. (1928) Blood cell metabolism. II. The effect of methylene blue and other dyes upon the glycolysis and lactic acid formation of mammalian and avian erythrocytes. J. Biol. Chem. 79:65-87.
- BARTLETT, G.R. (1959) Methods for the isolation of glycolytic intermediates by column chromatography with ion-exchange resins. J. Biol. Chem. 234:459-465.

- BARTLETT, G.R. (1970) Patterns of phosphate compounds in red blood cells of man and animals. In G.J. BREWER (Ed) Red cell metabolism and function. Adv. Exp. Med. 6:245-256, Plenum Press, New York.
- BARTLETT, G.R. (1976) Phosphate compounds in red cell of reptiles, amphibians and fish. Comp. Biochem Physiol. 55A: 211-214.
- BARTLETT, G.R. & BORGESE, T.A. (1976) Phosphate compounds in red cells of the chicken and duck embryos and hatchling. Comp. Biochem. Physiol. 55A: 207-210.
- BELL, D.J. & CULBERT, J. (1968) Plasma lactate in the hen. Problems of its origin. Comp. Biochem. Physiol. 25: 627-637.
- BENESCH, R. & BENESCH, R.E. (1967) The effect of organic phosphates from human erythrocytes on the properties of hemoglobin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 26: (2) 162-167.
- BENESCH, R., & BENESCH, R.E. (1969) Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by hemoglobin. Nature 221: 618-622.
- BERGMEYER, H.V. (1974) Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemic, 3a. Ed.
- BLOSTEIN, R. & RUTTER, W.J. (1963) Comparative studies of liver and muscle aldolase. II. Immunochemical and chromatographic differentiation. J. Biol. Chem. 238: 3280-3285.
- BOOCKCHIN, R.M. & GALLOP, P.M. (1968) Structure of hemoglobin A<sub>1C</sub>: nature of the N-terminal -chain blocking group. Biochem. Biophys. Res. Comm. 32:86-93.
- BUCHER, T. (1955) Phosphoglycerate kinase from brewer's yeast. Meth. Enzymol. 1:415-422.
- BUCHER, T. & PFLEIDERER, G. (1955) Pyruvatekinase from muscle. Meth. Enzymol. 1: 435-440.
- BUNN, H.F.; HANEY, D.N.; GABBAY, K.H. & GALLOP, P.M. (1975) Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A<sub>1C</sub>. Biochem. Biophys. Res. Comm. 67:(1) 103-109.
- BUNN, H.F.; HANEY, D.N.; KANEN, S.; GABBAY, K.H. & GALLOP, P. M. (1976) The biosynthesis of human hemoglobin A<sub>1C</sub> slow glycosylation of hemoglobin in vivo. J. Clin. Invest. 57: (6) 1652-1659).
- CHANUTIN, A. & CURNISH, R.R. (1967) Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 121: 96-102.

- CHOU, J.; ROBINSON Jr.; A.A. & SIEGEL, A.L. (1978) Simple method for estimating glycosylated hemoglobins and its application to evaluation of diabetic patients. Clin. Chem. 24: (10) 1708-1710.
- DAVIS, B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. New York Acad. Sc. 121:404-
- DRESDNER, G.W.; HEIN, S. & SIGMUND-MONTEFUSCO, I. (1974) Study of bovine erythrocyte. Enzymatic activities of the cell and its membrane. Arch. Biochem. Biophys. 165: (1) 9-20.
- DISHE, Z. (1964) In: The Red Blood Cell (C. BISHOP D.M. SURGENER, Ed.) New York, Academic Press. pg 208.
- ENGEL, K. & DUC, G. (1968) Effects of iodoacetate and fluoride on the position of the hemoglobin dissociation curve of human whole blood. Nature, 219: 936-938.
- GABBAY, K.H.; HASTY, K.; BRESLOW, J.L.; ELLISON, R.C.; BUNN, H.F. & GALLOP, P.M. (1977) Glycosylated hemoglobins and long term blood glucose control in diabetes mellitus. J. Clin. Endocrin. Metab. 44: 859-864.
- GARBY, L. & De VERDIER, C.H. (1970) in (G.J. BREWER, Ed.) Red cell metabolism and function, Adv. Exp. Med. Biol. Plenum Press, New York, vol. 6. pp 3-7.
- GERBER, G.; PREISLER, H.; HEINRICH, R. & RAPOPORT, S.M. (1974) Hexokinase of human erythrocytes: purification, kinetic model and its applications to the condition in the cell. Eur. J. Biochem. 45: 39-52.
- GLOCK, G.E. & McLEAN, P. (1953) Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. Biochem. J. 55: 400-408.
- GONEN, B.; ROACHMAN, H.; RUBENSTEIN, A.H.; TANEGA, S.P. HOROWITZ, D.L. (1977) Hemoglobin A1c: an indication of the metabolic control of diabetic patients. Lancet 2: 734-736.
- GUTHROW, C.E.; MORRIS, M.A.; DAY, J.F.; THORPE, S.R. & BAYNES, J.W. (1979) Enhanced nonenzymatic glucosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 9:4258-4261
- GUTMANN, I. & WAHLEFELD, A.W. (1974) L(+) lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. In BERGMAYER, H.V. (Ed) Methods of Enzymatic Analysis, Verlag Chemie, 3a. Ed. p. 1464.
- HARVEY, J.W. & KANEKO, J.J. (1975) Erythrocyte enzyme activities and glutathione levels of the horse, cat, dog and man. Comp. Biochem. Physiol. 52B: (4) 507-510.

- HOLMQUIST, W.R. & SCHROEDER, W.A. (1966) A new N-terminal A new-terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A<sub>1c</sub>. Biochemistry 5: 2489-2503.
- ISAACKS, R.E.; HARKNESS, D.R.; ADLER, J.L.; KIM, C.Y.; GOLDMAN, P.H. & ROTH, S. (1976) Studies on avian erythrocyte metabolism Relationship between the major phosphorylated metabolic intermediates and whole blood oxygen affinity in embryos and poultrys of the domestic turkey. Poultry Science 55: (5) 1788-1794.
- KIM, H.D. & McMANUS, T.J. (1971) Studies on the energy metabolism in pig red cells. I. The limiting roll of membrane permeability in glycolysis. Biochem. Biophys. Acta 230:1-11.
- KOENIG, R.J.; BLOSTEIN, S.H. & CERAMI, A. (1977) Structure of carbohydrates of hemoglobin A<sub>1c</sub>. J. Biol. Chem. 252: (9) 2992-2997.
- KOENIG, R.J. & CERAMI, A. (1975) Synthesis of hemoblobin A<sub>1c</sub> normal and diabetic mice: potential model of basement membrane thickening. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3687-3691.
- KOENIG, R.J.; PETERSON, C.M.; JONES, R.L.; SAUDECK, C.; LHERMAN, N. & CERAMI, A. (1976) The correlation of glucose regulation and hemoglobin A<sub>1c</sub> in diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 295: 417-420.
- KYNOCH, P.A.M. & LEHRMANN, H. (1977) Rapid estimation (2 1/2 hours) of glycosylated hemoglobine for routine purpose. Lancet ii, 16.
- LAYZER, R.B.; ROWLAND, L.P. & BANK, W.J. (1969) Physical and kinetic properties of human phosphofructokinase from skeletal muscle and erythrocytes. J. Biol. Chem. 244: 3823-3831.
- LENFANT, C.; TORRANCE, J.; ENGLISH, G.; FINCH, C.A.; REYNFARGE C.; RAMOS, J.; FAURA, J. (1968) Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobine and on organic phosphate levels. J. Clin. Invest. 47: (12) 2652-2656.
- LOVE, J.N.; WIYGUL, G.; McEWEN, E.G. (1974) Glucose metabolism and the hexose monophosphate shunt in bovine erythrocytes. Int. J. Biochem. 5: (3) 271-274.
- LOPES, H.O.S. & PEREIRA, E.A. (1986) Fontes alternativas de fosfatos na suplementação alimentar de animais. III Encontro Nacional de Rocha Fosfática, pp 435-456.
- LOWRY, O.H.; ROSENBOUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, J.R. (1951) Protein measurement with the Folion phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-276.
- MAGNANI, M.; DACHA, M.; BOSSU, M. & FORNAINI, G. (1978) Comparative study on red blood cell glucose phosphorylation activity of mammals. Comp. Biochem Physiol. 60: (3) 323-327.
- MARCHESI, V.T. (1985a) The cytoskeletal system of red blood cells. Hosp. Pract. 20: (11) 113-131.

- MARCHESI, V.T. (1985b) Stabilizing infrastructure of cell membranes. Ann. Rev. Cell Biol. 1: 531-561.
- MCDONALD, M.J.; SHAPIRO, R.; BLEICHMANN, M.; SOLWAY, J. & BUNN, H. F. (1978) Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. Purification, identification and partial structural analysis. J. Biol. Chem. 253: (7) 2327-2332.
- MEDEIROS, L.O. (1973) Contribuição à eritroenzimologia de cavalos puro sangue inglês e sua aplicabilidade ao diagnóstico da anemia infecciosa equina. São Paulo, 1973. Tese de Livre-Docência, Universidade de São Paulo.
- MEDEIROS, L.F.; MEDEIROS, L.O.; BARCELOS, S.R. & FERRI, S. (1977) Glycolytic intermediates and glutathion levels of erythrocyte: comparison between erythrocytes of human and thoroughbred horses. Comp. Biochem. Physiol. 58A: (1) 47-48.
- NIKKILA, A. & HYVARIWEN, H. (1962) Specific determination of blood sugar with o-toluidine. Clin. Chim. Acta 7: 140-143.
- NOLTMANN, E.A. (1966) Phosphoglucose isomerase. Meth. Enzymol. 9, 557-
- PAECHTNER, J. (1925) Das Blut und die Lymphe. In ELLENBREGER SCHEUNERT Vergleichende Physiologie der Hanssavgetiére, 3a. Ed. Berlin (cf. DUKES, H.H. The physiology of domestic animals, 7a Ed., Ithaca, Comstock Publishing Associates, (1955).
- RAHBAR, S. (1968) An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. Clin. Chim. Acta 22: 296-298.
- RAPOPORT, S. & GUEST, G.M. (1941) Distribution of acid soluble phosphorus in the blood cells of various vertebrates. J. Biol. Chem. 138: 269-282.
- RIJKSEN, G. & STAAL, G.E.J. (1977) Regulation of human erythrocyte hexokinase: the influence of glycolytic intermediates and inorganic phosphate. Biochem. Biophys. Acta 485: 75-86.
- RODRIGUES, E. (1987) Hexoquinase purificada de eritrócito de galinha (Gallus gallus domesticus): propriedades cinéticas e físicoquímicas relacionadas ao metabolismo glicídico. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- RODRIGUES, E.; ROSA, R.; LUCCHIARI, P.H. & BACILA, M. (1985) Blood glucose partition in Antarctic Notothenidae fish Notothenia (corriiceps) neglecta and Notothenia rossi marmorata. Intern. Symp. on Antarctic Aquatic Biology. Rio de Janeiro. Brazil.
- ROSA, R.; RODRIGUES, E. & BACILA, M. (1989) Blood glucose partition and levels of glycolytic enzymes in erythrocytes and somatic tissues of penguins. Comp. Biochem. Physiol. 92B: (2) 307-311.

- ROSA, R.; ROSA, C.D.; OCAMPOS, D. & BACILA, M. (1983a) The profile of the glycolytic system and the metabolic activity of chicken erythrocytes. Comp. Biochem. Physiol. 75B: 141-145.
- ROSA, R.; ROSA, C.D.; OCAMPOS, D.; FERNANDES, L.R.V. & BACILA, M. (1983b) Comparative levels between enzymes of the glycolytic pathway from erythrocytes and somatic tissues of the chicken Gallus gallus domesticus. Comp. Biochem. Physiol. 75c: 267-273.
- RUTER, E.Z. (1923) Ges. exp. Med. 37, 151. Apud BELL, D.J. Plasma glucose. in BELL, D.J. FREEMAN, B.M. (Ed) Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl, Londres, Academic Press, 1971, vol.2, p. 913.
- SCHALM, O.W.; JAIN, N.C. & CARROL, E.J. (1975) Veterinary Hematology, Lea Febiger, Philadelphia, 3a. Ed., pp 388-391.
- SCHNECK, A.G. & SCHROEDER, W.A. (1961) The relation between the minor components of whole normal human adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophoresis. J. Am. Chem. Soc. 83: 1472-1478.
- SHIELDS, C.E.; HERMAN, Y.F. & HERMAN, R.H. (1964) 1-14C-Glucose utilization of intact nucleated blood cells of selected species. Nature 203: 935-936.
- SHOHET, S.B. & LUX, S.E. (1984) The erythrocyte membrane skeleton. Biochemistry and Pathophysiology, 19: (10) 77-83; 19: (11) 89-108.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA (1975) Manual de técnicas e recomendações em hematologia. São Paulo.
- SOLWAY, J.; McDONALD, M.; BUNN, H.F.; AUN, F.; COLE, R. & SOELDNER, J.S. (1979) Biosynthesis of glycosylated hemoglobins in the monkey. J. Lab. Clin. Med. 93: 962-972.
- STRYER, L. (1988) Biochemistry. W.H. Freeman and Company, New York, 3a. Ed., pg 307.
- TRIVELLI, L.A.; RANNEY, H.M. & LAI, H.T. (1971) Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 284: 353-357.
- UYEDA, K. & RACKER, E. (1965) Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VII. Hexokinase and phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 240: 4682-4688.
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. (1931) Biochem. Z. 242:206. Apud SUMNER, J.B SOMERS, G.F. Chemistry and Methods of Enzymes, New York, Academic Press Inc. 1943, pg. 223.
- WARBURG, O., CHRISTIAN, W. & GRIESE, A. (1975) Biochem. Z. 282:157. Apud SUND, H. The pyridine nucleotide coenzymes. In: (T.P.SINGER, Ed.) Biological Oxidations. New York, Interscience Publishers, 1968, pg 603-609.

- WESTHEAD, E.W. (1966) Enolase from yeast and rabbit muscle. Meth. Enzymol. 9: 670-679.
- WILLIAMSON, J. (1970) General features of metabolic control as applied to the erythrocyte. In (G.J. BREWER, Ed.) Red Cell Metabolism and Function. Adv. Exp. Med. Biol. Plenum Press, New York, pp 117-136.
- ZINKL, J.; KANEKO, J.J. (1973) Erythrocytic enzymes and glycolytic intermediates in the normal bovine and in bovine with erythropoietic porphyria. Comp Biochem. Physiol. 45A: (2) 467-476.