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

**Estudo comparativo do metabolismo eritrocitário em
representantes da classe Mammalia**

Lorena Késsia de Figueiredo Silva Fonseca

Dissertação para a obtenção do grau de MESTRE

Orientador
Prof. Dr. Orlando César de Oliveira Barretto

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010692

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F676e Fonseca, Lorena Késsia de Figueiredo Silva
Estudo comparativo do metabolismo eritrocitário em
representantes da classe Mammalia / Lorena Késsia de
Figueiredo Silva Fonseca. -- São Paulo, 2005.
79p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Barretto, Orlando César de Oliveira

1. Glóbulo vermelho : Fisiologia animal 2. Bioquímica
animal I. T. II. Barretto, Orlando César de Oliveira, orientador.

636.0892111 CDD

**Agradeço a Deus imensamente por tudo que tem feito
em minha vida, guiando-me sempre pelo melhor
caminho.**

**À meus pais Gutemberg e Célia e minha irmã
Isabelle pelo incentivo, carinho e apoio.**

**Ào meu esposo George, pela compreensão, apoio
e companheirismo, incentivando-me nos
momentos mais difíceis.**

**A minhas tias, Conceição e Stella, sempre muito
atuantes em minha educação, apoiando-me em tudo,
principalmente no que se refere ao estudo.**

**À memória de minha querida avó Nila, que muito
contribuiu na minha educação.**

Ao Prof. Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto, meu orientador e amigo, por sua orientação e confiança em mim depositada.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Primavera Borelli e Prof. Dr. Antonio Altair M. Oliveira, pela acolhida, confiança, apoio e amizade, cujo convívio me serviu de estímulo e aprendizado, e por permitir utilizar o Laboratório de Hematologia Clínica para a execução deste trabalho.

Aos alunos de pós-graduação Ricardo Ambrosio Fock, Ana Cristina de Souza e a funcionária Mariana Cristina Ferreira Silva, entre outros, do laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela amizade e apoio.

As funcionárias Sheila Serra Vieira Pinto e Maria de Lourdes Moura Antonio, da Faculdade de Medicina pelo apoio e incentivo.

A Marilena Oshiro, pelo apoio técnico dado inicialmente no Instituto Adolfo Lutz.

A Prof. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros, alunos e funcionários da Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela atenção e oportunidade de utilizar também o seu laboratório em algumas situações.

Ao engenheiro eletrônico Fernando Fagnani, da Engenharia Eletrônica do Hospital das Clínicas, pelo extraordinário apoio técnico e manutenção do espectrofotômetro Gilford modelo 250.

Ao Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, Diretor Técnico-Científico da Fundação Zoológico de São Paulo, pela gentil permissão na obtenção das amostras de sangue de mamíferos.

Ao Dr. José Daniel Luza Fedullo, da Fundação do Zoológico de São Paulo, pela fidalguia, boa vontade e colaboração durante o trabalho.

A Dra. Maria Luiza Guzzo, do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela colaboração na obtenção das amostras.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, a instituição universitária que marcou a minha formação profissional.

Aos Prof. Dr. Raimundo Antonio Gomes Oliveira e Prof. Dra. Tereza Maria Dantas de Medeiros, pela amizade, incentivo e apoio.

Aos amigos que de forma direta ou indireta compartilharam comigo todos os momentos...

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Eritrócitos dos mamíferos	2
1.3. Eritrócito humano	3
1.4. Metabolismo energético dos eritrócitos	4
1.5. Enzimas do metabolismo eritrocitário	11
1.5.1. Enzimas da via glicolítica	12
1.5.2. Enzimas do ciclo das pentoses	17
1.5.3. Enzimas do ciclo de Rapaport-Luebering	18
1.6. Estudo do metabolismo eritrocitário dos mamíferos	19
2. OBJETIVO	23
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	24
3.1. Casuística	24
3.2. Métodos	25
3.2.1. Coleta e conservação das amostras	25
3.2.2. Preparo dos hemolisados	26
3.2.3. Determinação das atividades enzimáticas	26
3.2.3.1. Hexoquinase	27
3.2.3.2. Glicose fosfato isomerase	28
3.2.3.3. Fosfofruto quinase	29
3.2.3.4. Aldolase	31
3.2.3.5. Triose fosfato isomerase	32
3.2.3.6. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	33
3.2.3.7. Fosfoglicerato quinase	34
3.2.3.8. 2,3-Difosfoglicerato mutase	35
3.2.3.9. Monofosfoglicerato mutase	36

3.2.3.10. Enolase.....	38
3.2.3.11. Piruvato quinase.....	39
3.2.3.12. Lactato desidrogenase	40
3.2.3.13. Glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-Fosfogliconato desidrogenase.....	41
3.2.4. Determinação das concentrações dos compostos intermediários.....	43
3.2.4.1. Adenosina-5'-trifosfato	43
3.2.4.2. 2,3-Difosfoglicerato	45
3.3. Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS	49
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÕES.....	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Principais funções do metabolismo eritrocitário.....	8
Figura 2. Via glicolítica, ciclo das pentoses e ciclo de Rapaport-Luebering.....	9
Figura 3. Formação da oxihemoglobina e deoxihemoglobina: papel do 2,3-difosfoglicerato.....	10
Figura 4. Metabolismo da glutatona.....	10
Figura 5. Gráfico de dispersão com linha de tendência, entre as atividades da triose fosfato isomerase e as concentrações de adenosina-5'-trifosfato dos animais estudados.....	55
Figura 6. Gráfico de dispersão com linha de tendência, entre as atividades da 2,3-difosfoglicerato mutase e as concentrações de adenosina-5'-trifosfato dos animais estudados.....	55
Figura 7. Gráfico de dispersão com linha de tendência, entre as atividades da 2,3-difosfoglicerato mutase e as concentrações de 2,3-difosfoglicerato dos animais estudados.....	56

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Sistema reagente para determinação da atividade da hexoquinase.....	28
Tabela 2. Sistema reagente para determinação da atividade da glicose fosfato isomerase.....	29
Tabela 3. Sistema reagente para determinação da atividade da fosfofruto quinase.....	30
Tabela 4. Sistema reagente para determinação da atividade da aldolase.....	31
Tabela 5. Sistema reagente para determinação da atividade da triose fosfato isomerase.....	32
Tabela 6. Sistema reagente para determinação da atividade da gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase	33
Tabela 7. Sistema reagente para determinação da atividade da fosfoglicerato quinase.....	34
Tabela 8. Sistema reagente para determinação da atividade da 2.3-difosfoglicerato mutase.....	36
Tabela 9. Sistema reagente para determinação da atividade da monofosfoglicero mutase.....	37
Tabela 10. Sistema reagente para determinação da atividade da enolase.....	38
Tabela 11. Sistema reagente para determinação da atividade da piruvato quinase.....	39
Tabela 12. Sistema reagente determinação da atividade da lactato desidrogenase.....	40
Tabela 13. Sistema reagente para determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase.....	41

Tabela 14. Sistema reagente para determinação da concentração da adenosina-5'-trifosfato.....	44
Tabela 15. Solução mistura para determinação da concentração de 2,3-difosfoglicerato.....	46
Tabela 16. Taxonomia das espécies estudadas segundo as ordens e famílias a que pertencem.....	48
Tabela 17. Valores de hemoglobina obtidos nas espécies estudadas.....	49
Tabela 18. Atividade das enzimas glicolíticas e anexas do eritrócito encontradas nas espécies estudadas.....	50
Tabela 19. Atividade das enzimas glicolíticas e anexas do eritrócito encontradas nas ordens estudadas.....	51
Tabela 20. Concentração de adenosina-5'-trifosfato e 2,3-difosfoglicerato segundo as espécies estudadas.....	52
Tabela 21. Concentração de adenosina-5'-trifosfato e 2,3-difosfoglicerato segundo as ordens estudadas.....	53
Tabela 22. Correlação (r Pearson) das atividades enzimáticas dos animais estudados em relação as concentrações de adenosina-5'-trifosfato e 2,3-difosfoglicerato.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD	Ácido cítrico, citrato de sódio, e dextrose
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
°C	Graus Celcius
Ca ⁺	Íon Cálcio
2,3-DPG	2,3-Difosfoglicerato
2,3-DPGM	2,3-Difosfoglicerato mutase
DHAP	Dihidroxiacetona-fosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
F-1-6-P	Frutose-1-6-difosfato
F-6-P	Frutose-6-fosfato
fL	Fentolitro
G-6-P	Glicose-6-fosfato
G-6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
D-GAP	Gliceraldeído-3-fosfato
GAPD	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
α -GDH	α -Glicerofosfato desidrogenase
GPI	Glicose fosfato isomerase
HCl	Ácido clorídrico
Hx	Hexoquinase
K ⁺	Íon Potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potássio
L	Litro
LDH	Lactato desidrogenase
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
μ m	Micrômetro
M	Molar
Mg ⁺²	Íon magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPGM	Monofosfoglicero mutase
Na ⁺	Íon Sódio
NAD	Nicotina adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotina adenina dinucleotídeo reduzida
NADP	Nicotina adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	Nicotina adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônia
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
O ₂	Oxigênio
PEP	Fosfoenol piruvato
PFK	Fosfofruto quinase
2-PGA	2- Ácido- fosfoglicérico
3-PGA	3- Ácido- fosfoglicérico
6-PGA	6-Fosfogliconato
6-PGD	6-Fosfogliconato desidrogenase
PGK	Fosfoglicerato quinase
PK	Piruvato quinase
rpm	Rotação por minuto
TPI	Triose fosfato isomerase
TRIS	Tris-hidroximetil amino metano
UI	Unidade Internacional
UI. g Hb ⁻¹ . min ⁻¹	Unidade Internacional por grama de hemoglobina por minuto

RESUMO

Os eritrócitos dos mamíferos são anucleados e desprovidos de organelas citoplasmáticas, contando somente com o ciclo da glicólise, o ciclo das pentoses e algumas enzimas anexas, o que garante o fornecimento de energia calórica sob a forma de adenosina-5'-trifosfato (ATP) e de energia redutora sob a forma de nicotinamida adenosina dinucleotídeo reduzida (NADH), nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e glutathiona reduzida (GSH). A via glicolítica possui o desvio denominado de ciclo de Rapaport-Luebering, onde há a síntese de 2,3- difosfoglicerato (2,3-DPG), que é um importante metabólito e atua como modulador da afinidade da hemoglobina ao O₂. Havendo poucos estudos comparativos sobre o metabolismo eritrócitário dos mamíferos propôs-se investigar as atividades das enzimas glicolíticas, anexas (2,3-difosfogliceratomutase, glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase) e a concentração dos compostos intermediários adenosina-5'-trifosfato e 2,3-difosfoglicerato. Mamíferos das ordens Primates, Rodentia, Carnivora, Lagomorpha, Artiodactyla, Didelphimorphia e Xenarthra oriundos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP foram investigados. O sangue foi colhido em ACD, os eritrócitos foram lavados em solução fisiológica a 4°C e hemolisados em solução hemolisante 1:20 por congelamento e descongelamento e as atividades das seguintes enzimas foram determinadas de acordo com Beutler (Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods, Ed. Grune & Stratton, 3rd ed, 1984): hexoquinase, glicose fosfato isomerase, fosfofrutoquinase, aldolase, triose fosfato isomerase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, monofosfogliceromutase, enolase, piruvato quinase, lactato desidrogenase, bem como a 2,3-difosfoglicerato mutase, glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase, os metabólitos intermediários 2,3-difosfoglicerato e adenosina-5'-trifosfato. As enzimas e os compostos intermediários estudados apresentaram grande variabilidade entre as espécies de mamíferos estudadas. Foi observada correlação

positiva entre a atividade da triose fosfato isomerase e a 2,3-difosfoglicerato mutase e os teores de adenosina-5'-trifosfato das espécies, bem como correlação positiva entre a 2,3-difosfoglicerato mutase em relação ao 2,3-difosfoglicerato. Os teores de adenosina-5'-trifosfato mantiveram-se dentro de um patamar estável, ao redor de 4.000 a 6.000 nmoles / gHb, com as exceções das espécies das ordens Carnivora (*Panthera leo*, *Leopardus pardalis*, *Canis lupus* and *Chrysocyon brachyurus*) e Artiodactyla (*Cervus elaphus*), que exibiram teores ao redor de 2.000 a 3.000 nmoles / g Hb. Já os valores da concentração de 2,3-difosfoglicerato apresentaram variação considerável entre as espécies e ordens estudadas.

ABSTRACT

Mammalia red cells are non-nucleated and do not have cytoplasm organelles as well, and present the glycolytic pathway, the pentose shunt to attend the requirements in caloric energy as adenosine-5'-triphosphate (ATP) and reducing power as reduced nicotinamide adenosine dinucleotide (NADH) and reduced nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate (NADPH) and reduced glutathione (GSH). The glycolytic pathway exhibit besides the Luebering-Rappaport shunt, in which the 2,3-diphosphoglycerate is formed, which regulates the hemoglobin affinity to the molecular oxygen. As there are not so many studies on comparative about mammalian red cell metabolism, it was decided to study the glycolytic enzyme activities, the glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, 2,3-diphosphoglycerate mutase and the metabolites adenosine-5'-triphosphate and 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG). Mammalia representatives from Primates, Rodentia, Carnivora, Lagomorpha, Artyodactyla, Didelphimorphia and Xenarthra orders, obtained from Fundação Parque Zoológico de São Paulo and Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, were studied. The blood was collected in ACD, the red cells were washed in saline at 4° C, lysed 1:20 in hemolysing solution by freeze-and-thaw, and the following enzymes were assayed according to Beutler (Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods, Ed. Grune & Stratton, 3rd ed, 1984): hexokinase, glucose-6-phosphate isomerase, phosphofructo kinase, aldolase, triose phosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, monophosphoglycerate mutase, enolase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase activities, as well as 2,3-diphosphoglycerate mutase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase activities, and adenosine-5'-triphosphate, 2,3-diphosphoglycerate concentrations. A remarkable variation among the studied species was observed. However, it was detected a significant positive correlation between the adenosine-5'-triphosphate concentrations and triosephosphate

isomerase and 2,3-diphosphoglycerate mutase activities, as well as significant positive correlation between 2,3-diphosphoglycerate concentration and 2,3-diphosphoglycerate mutase activity in all studied species as a whole. Most of studied species exhibited a steady ATP concentration range between 4,000 and 6,000 nmoles.g Hb ⁻¹ but the Artiodactyla (*Cervus elaphus*) and Carnivora (*Panthera leo*, *Leopardus pardalis*, *Canis Lupus* and *Chrysocyon brachyurus*,) which presented values between 2,000 and 3,000 nmoles Hb ⁻¹. However, the 2,3-DPG concentration showed remarkable variation among the studied species and orders.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades

Mamíferos são animais que apresentam corpo usualmente coberto com pêlos, pele com várias glândulas, crânio com dois côndilos occipitais, maxilares geralmente com dentes diferenciados em alvéolos, membros adaptados para andar, trepar, cavar, nadar, ou voar, artelhos com garras, unhas ou cascos, coração com quatro câmaras e apenas o arco aórtico esquerdo, pulmões grandes e elásticos, diafragma entre as cavidades torácica e abdominal, macho com pênis, fecundação interna, ovos pequenos ou diminutos e geralmente retidos no útero para o desenvolvimento, fêmeas com glândulas mamárias que secretam leite para alimentar os filhotes, temperatura do corpo regulada (STORER et al.,1998).

Segundo Storer et al. (1998), a classe Mammalia é subdividida em duas subclasses. Na subclasse Protheria esta a ordem Monotremata, onde estão os mamíferos que põem ovos (*Ornithorhynchus anatinus*-ornitorrinco). Na subclasse Theria, fazem parte os marsupiais (infraclasse Metatheria) e mamíferos placentários (infraclasse Eutheria).

No Brasil existem as espécies pertencentes às ordens: Didelphimorphia, Chiroptera, Primates, Edentata (Xenarthra), Lagomorpha, Rodentia, Cetácea, Carnívora, Proboscidea, Sirenia, Perissodactyla, Pinnipedia e Artiodactyla (STORER et al.,1998).

Existem mais de 4.200 espécies de mamíferos vivas, a caracterização hematológica foi realizada adequadamente no homem, e em menor extensão, nos animais de laboratório e em algumas espécies de animais domésticos. Apesar da volumosa base de dados a respeito de algumas espécies de mamíferos, raramente são descritos na literatura a idade (jovem ou adulto), o estado prandial, os procedimentos de colheita do sangue, as condições de abrigo e ambientais ou a raça da espécie (RAGAN ,1999).

1.2. Eritrócitos dos mamíferos

Nos mamíferos, os eritrócitos diferem entre si em relação ao seu número, tamanho e forma e apresentam-se no sangue circulante como célula desprovida de núcleo, com citoplasma rico em hemoglobina e membrana celular lipoprotéica, diferindo assim dos répteis, aves e peixes que apresentam eritrócitos nucleados. O eritrócito dos mamíferos, antes de ser lançado na corrente circulatória, passa por drásticas transformações celulares, com profundas alterações no comportamento metabólico, como consequência da perda do núcleo, mitocôndrias, ribossomos, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático. A perda destas organelas faz com que a célula deixe de contar com o metabolismo aeróbico, que utiliza o oxigênio ao fim da cadeia respiratória na mitocôndria, e passe somente a utilizar o metabolismo anaeróbico, sem consumir oxigênio. Estas alterações a tornam uma célula adequada ao transporte de oxigênio para os tecidos, pois o transporta sem consumí-lo (JAIN, 1993).

Os eritrócitos dos mamíferos podem variar com relação ao tamanho, em torno de 4 a 9 μm , e ao número por unidade de volume de acordo com a espécie estudada (JAIN, 1993).

Os cachorros, gatos, cavalos, bois e carneiros apresentam o eritrócito em forma de disco bicôncavo, o grau de biconcavidade é mais pronunciado em cães e menos em gatos e cavalos. Sabe-se a que forma bicôncava fornece ao eritrócito uma maior área de superfície e facilita as deformações na circulação sanguínea (HARVEY, 1997).

Algumas características podem estar presentes nas espécies de mamíferos, como os “corpos refráteis” observados como inclusões nos eritrócitos dos gatos e policromasia dos eritrócitos em ratos e camudongos (RAGAN, 1999).

Os eritrócitos de camelos são tipicamente elípticos e desprovidos de depressão central, assim como outros membros da família Camilidae (JAIN, 1993). Os cervos e veados (família Cervidae) apresentam alguns eritrócitos com forma falciforme a temperatura ambiente ou a 4°C sendo

reversíveis, estas formas são induzidas “in vitro” pela oxigenação e pH entre 7,6 e 7,8, ao contrário do que ocorre nos eritrócitos de humanos com anemia falciforme em que há formação dos cristais tactóides devido a desoxigenação. Estas formas nos veados não são rígidas e não causam doença (HARVEY, 1997; JAIN, 1993; SIMPSOM & TAYLOR, 1974; WHITTEN, 1967).

1.3. Eritrócito humano

O glóbulo vermelho dos mamíferos, desde o sexto mês da fase embrionária até a idade adulta é produzido pelo sistema hematopoiético localizado na medula óssea. A partir da estimulação pela eritropoietina, a célula hematopoiética primitiva se diferencia para a série vermelha, passando pelas etapas celulares do pró-eritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático, eritroblasto ortocromático e, finalmente, reticulócito, que é resultante da expulsão do núcleo e das organelas citoplasmáticas, há um período ao redor de 14 dias. O reticulócito perfaz cerca de 0,5% a 1,5% dos glóbulos vermelhos, em condições normais de produção. Este reticulócito fica como tal durante cerca de 48 a 72 horas, na medula óssea e no sangue periférico, e daí em diante adquire a configuração definitiva do eritrócito, vivendo ao redor de 120 dias na circulação, ao fim dos quais é seqüestrado pelo baço (BEUTLER, 2001).

O eritrócito é uma célula anucleada, tem diâmetro de 7,5 a 8,7 μm , área de superfície de aproximadamente 136 μm^2 , volume de 90 fL, e forma de disco bicôncavo. No citoplasma ocorrem uma série de mecanismos metabólicos responsáveis pela manutenção da função da hemoglobina. A membrana é composta de lipídios e proteínas integrais e periféricas, conferindo aos eritrócitos a capacidade de se deformarem passivamente durante as várias passagens pela microcirculação do baço, sem que sejam destruídos (BULL, 2001; BEUTLER, 2001).

A hemoglobina é uma proteína de estrutura quaternária globular. Quimicamente é composta por quatro cadeias polipeptídicas, cada uma

delas associada a uma molécula de heme. O grupamento heme é constituído por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por um átomo de ferro no estado ferroso, que dá a cor vermelha característica da hemoglobina. É sintetizada nos eritroblastos, principalmente nos eritroblastos policromatófilos e nos ortocromáticos, na medula óssea, embora cerca de 25% do total de hemoglobina final seja feita ainda no estágio de célula correspondente ao reticulócito circulante. A concentração de hemoglobina no glóbulo vermelho de uma pessoa normal é de cerca de 34% de seu volume total e esta proteína tem a vital tarefa de se ligar ao oxigênio nos pulmões, transportá-lo e liberá-lo aos tecidos (BEUTLER, 2001; TELEN & KAUFMAN, 1999).

1.4. Metabolismo energético dos eritrócitos

A membrana celular, as enzimas necessárias ao metabolismo energético e a hemoglobina constituem um conjunto harmônico em perfeito equilíbrio (figura 1). A energia é utilizada para manter: o ferro da hemoglobina na forma bivalente; os níveis intracelulares altos de potássio e reduzidos de sódio e cálcio, contra elevados gradientes de concentração; os grupos sulfidrilas das enzimas, da hemoglobina e membrana ativa na forma reduzida, que irão preservar as proteínas eritrocitárias contra processos oxidativos; e finalmente conservar a forma bicôncava da hemácia (BEUTLER, 2001).

A glicose penetra facilmente através da membrana dos eritrócitos, por um mecanismo de transporte facilitado, quase independentemente da sua concentração extracelular, pois na superfície da membrana há um carreador que pode se combinar de forma reversível com a glicose. Aproximadamente 90% é metabolizada a lactato pela via glicolítica ou via de Embden-Meyerhof (figura 2), onde é produzida energia armazenada sob a forma de adenosina trifosfato (ATP), utilizado na bomba sódio e potássio e na fosforilação das proteínas da membrana, e nicotinamida adenina dinucleotídio reduzido (NADH) que é um importante agente redutor da metahemoglobina a

hemoglobina, do piruvato a lactato e na proteção de radicais sulfidrilas. A metahemoglobina é a forma oxidada de hemoglobina, onde o ferro está no estado férrico, impróprio para transportar oxigênio e por intermédio da enzima NADH-metahemoglobina redutase (citocromo b5 redutase) é transformada em hemoglobina (BEUTLER, 2001; TELEN & KAUFMAN, 1999).

A via glicolítica possui dois desvios: o ciclo de Rapaport-Luebering (figura 2), onde há a síntese de 2,3- difosfoglicerato (2,3-DPG), que é um importante metabólito e atua como modulador da afinidade de O₂ pela hemoglobina, influenciando de maneira decisiva a curva de dissociação da mesma, acomoda-se entre as cadeias β (sítios de ligação) desta e desloca o oxigênio para os tecidos (figura 3); e o ciclo das pentoses (figura 2) é responsável pela metabolização de aproximadamente 10% do total da glicose e tem como maior função a produção de nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida (NADPH) necessária à proteção da célula de agentes oxidantes. A glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD) e a 6-fosfogliconato desidrogenase (6-PGD) reduzem a coenzima de nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADP) a nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida (NADPH). Esta possui grande importância na manutenção da glutathione em sua forma reduzida (GSH), através da glutathione redutase (figura 4). A glutathione reduzida desempenha importante papel na proteção do glóbulo vermelho frente a radicais livres de agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio gerados em processo infecciosos e ingestão de alguns medicamentos oxidantes como, por exemplo: pentaquina (antimalárico), sulfacetamida (antibiótico) e acetanilida (analgésico) (BEUTLER, 2001; GLADER & LUKENS, 1999; TELEN & KAUFMAN, 1999).

O metabólito adenosina 5'-trifosfato (ATP) é o principal intermediário de ligação entre as reações químicas celulares que liberam e requerem energia. O ATP através de sua hidrólise, com formação de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi), doa energia química e funciona como um transportador da mesma para a realização das atividades celulares básicas (LEHNINGER et al., 2000).

O 2,3-DPG é um metabólito glicolítico, vital para a liberação do O_2 pela hemoglobina tetramérica. Durante as trocas gasosas de O_2 e CO_2 , a molécula da hemoglobina sofre modificações na sua conformação. Quando a molécula está saturada de O_2 , forma-se a oxihemoglobina (estrutura relaxada), com configuração diferente da deoxihemoglobina (estrutura tensa), que se forma quando a saturação de O_2 é baixa (figura 3). O 2,3-DPG se liga e desliga da molécula da hemoglobina, modificando sua função. A ligação do 2,3-DPG reduz a afinidade do O_2 a hemoglobina e leva à liberação deste para os tecidos, forma-se a deoxihemoglobina ou forma desoxigenada. A expulsão do 2,3-DPG da molécula da deoxihemoglobina aumenta a afinidade do O_2 à hemoglobina, formando a oxihemoglobina ou forma oxigenada (TELEN & KAUFMAN, 1999).

Os níveis de 2,3-DPG sofre variações ao longo de várias situações como:

- a) Altitudes elevadas em que ocorre aumento de 2,3-DPG devido à baixa tensão de oxigênio há uma adaptação a hipóxia (GLADER & LUKENS, 1999, VALENTINE et al., 1985).
- b) Anemias em geral devido a baixa concentração de hemoglobina a 2,3-DPG está aumentada (GLADER & LUKENS, 1999, VALENTINE et al., 1985).
- c) Doença cardio-pulmonar (2,3-DPG aumentada) (GLADER & LUKENS, 1999; VALENTINE et al., 1985).
- d) Nas deficiências de enzimas eritrocitárias como: piruvatoquinase e fosfogliceratoquinase, ocorre aumento de 2,3-DPG; nas de 2,3-difosfogliceratomutase, ocorre redução de 2,3-DPG (GLADER & LUKENS, 1999, VALENTINE et al., 1985).

Havendo uma mutação no gene que codifique qualquer enzima de um dos ciclos do metabolismo intermediário do glóbulo vermelho, este ciclo terá seu rendimento diminuído e a célula terá sua vida média diminuída configurando uma anemia hemolítica (BEUTLER, 2001).

FIGURA 1 – Principais funções do metabolismo eritrocitário.

FONTE: OLIVEIRA & POLY NETO, 2004.

FIGURA 2 – Via glicolítica, ciclo das pentoses e ciclo de Rapaport-Luebering.

FONTE: BEUTLER, 1984.

FIGURA 3 – Formação da oxihemoglobina e deoxihemoglobina: papel do 2,3-DPG

FONTE: LORENZI, 1999.

FIGURA 4 – Metabolismo da glutathiona.

FONTE: BEUTLER, 1984.

1.5. Enzimas do metabolismo eritrocitário

A vida depende de catalizadores poderosos e específicos, as enzimas. As reações bioquímicas são catalizadas por elas, e algumas para serem ativas requerem um cofator químico, que pode estar fraca ou firmemente ligada à enzima. As reações catalizadas pelas enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo da enzima com o substrato. A função das enzimas, bem como a de outros catalizadores, é diminuir a energia de ativação para que a reação se realize e, dessa forma, aumentar a velocidade da reação. O equilíbrio de uma reação não é afetado por uma enzima. Cada enzima tem um pH ótimo (ou intervalo de pH) no qual apresenta atividade máxima (LEHNINGER et al., 2000).

As reações enzimáticas que ocorrem nos organismos vivos, processam-se em condições de pH e temperatura tais que a enzima funciona com atividade ótima para o organismo. Nas experiências “in vitro”, que tentam reproduzir as condições “in vivo”, o cuidado em relação ao pH do meio em que se trabalha, a temperatura e ao tempo de reação é de grande importância, tendo em vista o caráter protéico da enzima. Por isto as reações são efetuadas em um meio tamponado para evitar variações de pH, e a uma temperatura constante de 37°C que é a temperatura média humana, fixando-se o tempo de reação de acordo com a enzima usada. Muitos fatores podem influir na velocidade da reação enzimática: a concentração da enzima, do substrato e do cofator; o pH do meio de reação; a temperatura da reação e o tempo da reação (WANNMACHER & DIAS, 1992).

No eritrócito, as enzimas glicolíticas apresentam um mecanismo de herança autossômico, com exceção da fosfogliceratoquinase e da glicose-6-fosfato-desidrogenase (ciclo das pentoses), que estão ligadas ao cromossomo X (BEUTLER, 2001).

1.5.1. Enzimas da via glicolítica

1.5.1.1. Hexoquinase

A hexoquinase cataliza a fosforilação da glicose na posição 6 pelo ATP, essa reação é irreversível. Atua na primeira etapa da via glicolítica desempenhando um papel estratégico na regulação do consumo da glicose e apresenta no homem atividade de $1,27 \pm 0,18$ UI / g Hb a 37°C (BEUTLER et al., 1977). Como muitas outras quinases, a hexoquinase necessita do íon magnésio (Mg^{+2}) para ser ativa. Ela é fortemente inibida pelo seu produto, a glicose-6-fosfato, mas esta inibição deixa de ocorrer pela presença de fosfato inorgânico e de alta concentração de glicose. A glutatona no estado oxidado (GSSG) e o 2,3-DPG também inibem a hexoquinase. Na eletroforese a enzima separa-se em duas bandas, correspondendo à enzima hepática tipo I desdobrada em duas frações tipo I_A e I_F. A isoenzima da hexoquinase predominante das hemácias (tipo I) está presente também nos linfócitos e plaquetas. A deficiência desta enzima é uma causa rara de anemia hemolítica não esferocítica (BEUTLER, 2001; GLADER & LUKENS, 1999; VALENTINE et al., 1985). No camudongo (dea) foi descrita uma anemia hemolítica severa relacionada com uma mutação desta enzima, resultando em sua deficiência (PETERS et al., 2001).

1.5.1.2. Glicose-fosfato-Isomerase

A glicose-fosfato-isomerase (GPI) catalisa a conversão de glicose-6-fosfato a frutose-6-fosfato e sua atividade no homem é de $60,8$ UI / g Hb ± 11 a 37°C (BEUTLER et al., 1977). Verificou-se pela eletroforese que a enzima separa-se em três bandas, cujas posições são determinadas pelo mesmo gene. Foram identificadas mutações que afetam a mobilidade eletroforética. O gene humano da glicose-fosfato-isomerase foi clonado e o seu sequenciamento determinado (BEUTLER, 2001). O decréscimo desta atividade pode ser observado em leucócitos, plaquetas, fígado e músculo

(VALENTINE et al., 1985). A deficiência de glicose-fosfato-isomerase é uma das causas de anemia hemolítica não esferocítica hereditária (BEUTLER, 2001).

1.5.1.3. Fosfofrutoquinase

A fosfofrutoquinase é uma enzima extremamente importante na regulação da taxa de consumo da glicose pelos eritrócitos, apresentando no homem uma atividade de $9,05 \text{ UI / g Hb} \pm 1,89$ a 37°C (BEUTLER et al., 1977). Os glóbulos vermelhos contêm dois tipos de fosfofrutoquinase: a forma clássica (tipo I), que cataliza a fosforilação na posição 1 da frutose-6-fosfato pelo ATP e a enzima tipo II, frutose-6-fosfato-2-quinase, que fosforila o segundo carbono da frutose-6-fosfato. O produto desta reação, a frutose 2,6-difosfato, é um potente ativador alostérico da fosfofrutoquinase tipo I. O tipo I requer magnésio para exercer sua atividade e é estimulada por ADP, fosfato inorgânico, amônia, e frutose 2,6-difosfato. A fosfofrutoquinase existe como isoenzimas tetraméricas compostas de variadas combinações de subunidades de músculo (M), fígado (L), e plaquetas (P). As subunidades são variavelmente expressas em diferentes tecidos; a do músculo e fígado é composta exclusivamente dos tetrâmeros M_4 e L_4 , respectivamente. As hemácias contêm quantidades iguais das subunidades M e L hibridizadas ao acaso para formar cinco isoenzimas: M_4 , M_3L , M_2L_2 , ML_3 , L_4 . As subunidades (M e L) da fosfofrutoquinase I e II foram clonadas e seqüenciadas. A deficiência do tipo I pode estar associada a uma ligeira anemia hemolítica e a miopatia (BEUTLER, 2001; GLADER & LUKENS, 1999; VALENTINE et al., 1985). Foi relatada deficiência em cães (Springer Spaniel) com clínica semelhante ao do homem (KANEKO, 1987).

1.5.1.4. Aldolase

A aldolase converte, reversivelmente, a frutose-1,6-difosfato em duas trioses. Uma metade da molécula de frutose-1,6-difosfato transforma-se em diidroxiacetona-fosfato (DHAP), e a outra em gliceraldeído-3-fosfato (GAP). O homem apresenta atividade de $3,19 \text{ UI / g Hb} \pm 0,86$ a 37°C (BEUTLER et al., 1977). Os eritrócitos contêm aldolase A, encontrada também no músculo; a aldolase B é encontrada no fígado. A aldolase A foi clonada e sequenciada. A deficiência de aldolase é uma causa rara de anemia hemolítica não esferocítica (BEUTLER, 2001; GLADER & LUKENS, 1999).

1.5.1.5. Triose-fosfato-isomerase

A triose-fosfato-isomerase (TPI) é uma enzima dimérica composta de subunidades idênticas e é a mais ativa da via glicolítica anaeróbica, sendo a sua atividade no humano de $2.111 \text{ UI / g Hb} \pm 397$ a 37°C (BEUTLER et al., 1977). Sua participação é na catálise da interconversão das duas trioses diidroxiacetona-fosfato (DHAP) e o gliceraldeído-3-fosfato (G3P), formadas por ação da aldolase. Embora o equilíbrio favoreça a formação do diidroxiacetona-fosfato, o gliceraldeído-3-fosfato é continuamente oxidado por ação da gliceraldeído-fosfato-desidrogenase e é assim removido do equilíbrio. A deficiência da atividade dessa enzima apresenta acúmulo de diidroxiacetona-fosfato no eritrócito e tem sido associada à anemia hemolítica não esferocítica congênita e com grave doença neuro-muscular (BEUTLER, 2001; GLADER & LUKENS, 1999; VALENTINE et al., 1985).

1.5.1.6. Gliceraldeído-fosfato-desidrogenase

Gliceraldeído-fosfato-desidrogenase tem a função de oxidar e fosforilar o gliceraldeído-3-fosfato, dando origem ao 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG). No processo dessa reação o NAD é reduzido a NADH. Apresenta no humano uma atividade de $226 \pm 41,9 \text{ UI / g Hb}$ a 37°C (BEUTLER et

al.,1977) e está estreitamente associada à membrana dos glóbulos vermelhos, aparece na posição 6 das proteínas da membrana à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (BALLAS, 1987). A natureza limitada das investigações relatadas impede o esclarecimento da relação entre deficiência desta enzima e a hemólise (BEUTLER, 2001; GLADER & LUKENS, 1999).

1.5.1.7. Fosfoglicerato quinase

Fosfoglicerato quinase (PGK) catalisa a remoção do fosfato de alta energia do carbono 1 do 1,3-DPG, formando 3-fosfoglicerato, e a sua transferência para o ADP gerando a ATP. A reação é reversível e pode ser desviada pela ação da difosfoglicerato mutase, da via de Luebering Rappaport, gerando o 2,3-DPG. A sua atividade no homem é de $320 \pm 36,1$ UI / g Hb a 37°C (BEUTLER et al.,1977). O gene estrutural desta enzima está ligado ao cromossomo X. A deficiência é uma causa de anemia hemolítica não esferocítica, freqüentemente associada a anormalidades neuro-musculares (BEUTLER, 2001; GLADER & LUKENS, 1999; VALENTINE et al., 1985).

1.5.1.8. Enolase

A enolase estabelece um equilíbrio entre 2-fosfoglicerato e fosfoenolpiruvato e sua atividade no homem é de $5,39 \pm 0,83$ UI / g Hb a 37°C (BEUTLER et al., 1977). Na eletroforese apresenta três bandas, sugerindo que é composta de duas diferentes subunidades associadas ocasionalmente entre os dímeros. Sua deficiência provoca o aparecimento de anemia hemolítica crônica (BEUTLER, 2001).

1.5.1.9. Piruvato quinase

A piruvato quinase é constituída de um tetrâmero que catalisa uma das etapas da glicólise, produzindo energia pela transferência do fosfato do fosfoenol piruvato, que se transforma em piruvato, para a ADP, resultando em sua fosforilação e em formação de um composto de energia de ligação mais alta, o ATP. Apresenta no homem atividade de $15 \pm 1,99$ UI / g Hb a 37°C (BEUTLER et al., 1977). As propriedades cinéticas são muito influenciadas por quantidades diminutas de frutose-1,6-difosfato (BEUTLER, 2001).

Foram identificadas quatro isoenzimas eletroforeticamente distintas em diferentes tecidos: A piruvato quinase do tipo M₁ presente no músculo, coração e cérebro; a M₂ em leucócitos e plaquetas; L no fígado e R nas hemácias. Os genes das enzimas do tipo L e M foram clonadas. (GLADER & LUKENS, 1999).

A deficiência desta enzima autossômica é a causa mais comum de anemia hemolítica congênita não esferocítica (BEUTLER, 2001; GLADER & LUKENS, 1999; VALENTINE et al., 1985). Esta deficiência foi encontrada em cães (Basengi e Beagle) com doença semelhante nos humanos (KANEKO, 1987).

1.5.1.10. Lactato desidrogenase

A lactato-desidrogenase (LDH) catalisa reversivelmente a redução de piruvato a lactato por NADH e sua atividade nos humanos é de $200 \pm 26,5$ UI / g Hb a 37°C (BEUTLER et al., 1977). A enzima é constituída por subunidades H (coração) e M (músculo), nos glóbulos vermelhos predominam a subunidade H, a ausência da subunidade H parece ser uma condição inicial, geralmente sem manifestações clínicas, embora um caso com hemólise tenha sido descrito (BEUTLER, 2001).

1.5.2. Enzimas do ciclo das pentoses

1.5.2.1.. Glicose-6-fosfato-desidrogenase

A glicose-6-fosfato-desidrogenase é uma enzima cujo locus está localizado no cromossomo X, e catalisa o primeiro passo no ciclo das pentoses, a qual produz NADPH. Este nucleotídeo redutor é essencial em muitas vias biossintéticas e também protege as células de danos provocados por oxidações, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais livres, superóxidos, todos oxidantes muito reativos gerados como produtos metabólicos ou, então pela ação de medicamentos como a primaquina e produtos naturais como a divicina, substância tóxica presente nos feijões fava. Durante os processos normais de detoxificação, a H_2O_2 é convertida em H_2O pela glutathiona reduzida sob ação da glutathiona peroxidase; a glutathiona oxidada resultante é reciclada na forma reduzida pela glutathiona redutase e NADPH. A H_2O_2 também pode originar H_2O e O_2 pela ação da enzima catalase. Nos indivíduos com deficiência de G-6PD, a produção de NADPH fica diminuída e a detoxificação de H_2O_2 inibida, resultando em dano celular, como oxidação do DNA, de proteínas e peroxidação de lipídios, com conseqüente dano da membrana do eritrócito (LEHNIGER et al, 2000).

A glicose-6-fosfato-desidrogenase é a enzima mais estudada do eritrócito e cataliza a oxidação de glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconolactona, que rapidamente se transforma em 6-fosfogliconato: nesta reação o NADP é reduzido a NADPH. Apresenta no homem atividade de $12,1 \pm 2,09$ UI / g Hb a 37°C (BEUTLER et al., 1977). Esta enzima foi cristalizada e o gene e DNA complemento clonado e seqüenciado. Há muita informação disponível sobre as propriedades físico-químicas da G-6PD, como especificidade ao substrato, constante de Michaelis-Menten (K_m) para os substratos glicose-6-fosfato e NADP, curvas de pH ótimo, termoestabilidade e eletroforese. O peso molecular da enzima altamente purificada foi relatado como 240 Kd, mas no seu estado natural é provavelmente cerca de 105 Kd. Muitas mutações eletroforéticas e mutação envolvendo a atividade, estabilidade e

propriedades cinéticas da enzima foram descritas (BEUTLER, 2001, GLADER & LUKENS, 1999).

A deficiência da enzima encontra a expressão completa nos homens, transportando um gene variante, ao passo que as mulheres heterozigotas são clinicamente normais, devido a inativação do cromossomo X ao acaso, de acordo com a hipótese de Lyon. A sua deficiência causa anemia hemolítica não esferocítica (BEUTLER, 2001; GLADER & LUKENS, 1999; VALENTINE et al., 1985) e foi descrita deficiência em cães e carneiros (KANEKO, 1987).

1.5.2.2. Fosfogliconato- desidrogenase

A fosfogliconato-desidrogenase catalisa a oxidação de fosfogliconato para ribulose-5-fosfato e CO_2 e redução de NADP^+ a NADPH. No homem, a sua atividade é de $8,78 \pm 0,78$ UI / g Hb a 37°C (BEUTLER et al., 1977). A variabilidade eletroforética da enzima é comum no homem e em varias espécies de animais. A deficiência da enzima tem sido raramente observada e parece ter pouco ou nenhum significado para a viabilidade das hemácias (BEUTLER, 2001; GLADER & LUKENS, 1999).

1.5.3. Enzimas do ciclo de Rapaport Luebering

1.5.3.1. Difosfogliceromutase

A difosfogliceratomutase compete com a fosfoglicerato quinase pelo 1,3-difosfoglicerato como substrato. Transforma o 1,3-difosfoglicerato em 2,3-difosfoglicerato, removendo assim a ligação de alta energia da molécula. É inibida por seu produto, 2,3-DPG e por fosfato inorgânico, e é ativada por 2-fosfoglicerato e aumento dos níveis de pH. Esta requer para sua atividade a presença de 3-fosfoglicerato. Apresenta no homem atividade de $4,78 \pm 0,65$ UI / g Hb a 37°C (BEUTLER et al., 1977) e sua deficiência resulta em redução dos níveis de 2,3-DPG nos eritrócito, não foi observado evidencia

de hemólise e a patogênese ainda não esta bem esclarecida (BEUTLER, 2001; VALENTINE et al., 1985).

A reação de 2,3-DPGM é de interesse especial, pois seu produto 2,3-DPG reduz a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, desviando a curva de dissociação de oxigênio-hemoglobina para a direita (BEUTLER, 2001; TELEN & KAUFMAN, 1999).

1.5.3.2. Difosfoglicerato fosfatase

A difosfoglicerato-fosfatase (DPGP) catalisa a remoção do radical fosfato do carbono-2 do 2,3-difosfoglicerato. É inibida por seu produto, 3-fosfoglicerato, e por reagentes sulfidrilas, e é mais ativa em pH ligeiramente ácido. É fortemente estimulada por bissulfito e fosfoglicolato (BEUTLER, 2001).

1.5.3.3. Monofosfogliceromutase

A fosfoglicero mutase estabelece o equilíbrio entre 3-fosfoglicerato e 2-fosfoglicerato (BEUTLER, 2001). O 2,3-difosfoglicerato é um composto auxiliar nesta reação (BEUTLER, 1984; ROSE, 1980) sua atividade no homem é de $24,9 \pm 2,52$ UI / g Hb a 37°C (BEUTLER et al., 1977).

1.6. Estudo do metabolismo eritrocitário dos mamíferos

Têm sido realizados trabalhos sobre o metabolismo do eritrócito em mamíferos, alguns estudos comparativos com enzimas selecionadas como glutathione-s-transferase, NADH-metahemoglobina reductase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione redutase, catalase, glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase (AGAR & SUZUKI, 1982; PARKINSON et al., 1995; SUZUKI et al., 1984; WHITTINGTON et al., 1995); outros com algumas enzimas glicolíticas como hexoquinase, glicose fosfato isomerase, fosfofruto quinase, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase, fosfoglicerato quinase, piruvato quinase, lactato desidrogenase (AGAR & SUZUKI, 1982; ARAI et al., 1995; PARKINSON et al., 1995), e compostos intermediários como glutathiona reduzida (GSH), adenosina-5'-trifosfato e 2,3-difosfoglicerato (ISAACKS et al., 1984; PARKINSON et al., 1995; SUZUKI et al., 1984; WHITTINGTON et al., 1995).

Whittington et al. (1995) fizeram um estudo comparativo do metabólito antioxidante glutathiona (GSH) e 5 enzimas (glutathiona-s-transferase, NADH-metahemoglobina redutase, superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase) nos eritrócitos de 11 espécies de marsupiais e monotremes australianos adultos saudáveis, sendo 8 da ordem marsupiais (*Isoodon macrourus*, *Vombatus ursinus*, *Lasiorninus latifrons*, *Macropus dorsalis*, *Macropus eugenii*, *Petrogali persephone*, *Petrogale assimilis*, *Onychogalea fraenala* e *Wallabia bicolor*) e 2 da ordem monotremes (*Ornithorhynchus anatinus* e *Tachyglossus aculeatus*). Os valores obtidos de GSH e das enzimas variaram significativamente ($P < 0,05$) entre as espécies estudadas, e concluíram que há uma ampla variação na atividade das enzimas associada com o sistema de defesa antioxidante observados nos marsupiais e monotremes, e que mais estudos seriam necessários para esclarecer as diferenças, na susceptibilidade dos eritrócitos a agentes oxidantes, encontradas neste trabalho.

Parkinson et al. (1995) fizeram um estudo comparativo do metabolismo eritrocitário de marsupiais e monotremes. Foram determinadas as concentrações de ATP e 2,3-DPG e atividade de 10 enzimas, sendo 8 da via glicolítica (hexoquinase, glicose fosfato isomerase, fosfofruto quinase, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, piruvato quinase, lactato desidrogenase) e 2 do ciclo das pentoses (glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase) no eritrócito de 11 espécies de marsupiais (*Isoodon macrourus*, *Vombatus ursinus*, *Lasiorninus latifrons*, *Macropus dorsalis*, *Macropus eugenii*, *Macropus giganteus*, *Macropus rufus*, *Petrogali persephone*, *Petrogale assimilis*, *Onychogalea fraenala* e *Wallabia bicolor*) e 2 de monotremes (*Ornithorhynchus anatinus* e *Tachyglossus aculeatus*). Foi verificada ampla

variação das atividades das 10 enzimas, e das concentrações de ATP e 2,3-DPG nas 13 espécies de animais australianos estudadas. As concentrações de 2,3-DPG foram mais elevadas nos marsupiais que nos mamíferos da classe Eutheria, e o contrário ocorreu com relação às concentrações de ATP, que apresentaram valores mais baixos. Não se sabe a razão dos níveis mais elevados de 2,3-DPG em marsupiais. As comparações entre espécies de metabolismo energético dos eritrócitos podem ser não apenas de difícil interpretação como também ter pouco significado fisiológico, porém cada dado obtido fornece uma informação dentro da evolução ou impacto na vida média dos eritrócitos. Estes autores ainda especulam que possa haver algum significado evolutivo ou adaptativo ainda não conhecido e que requeira maiores investigações.

Arai et al. (1995) estudaram as enzimas glicolíticas, hexoquinase e piruvato quinase nos eritrócitos de cães de raça indefinida, gatos de raça indefinida, porcos, bois, carneiros e cavalos. A atividade da hexoquinase nos cachorros foi de 2 a 3 vezes maior que as outras espécies e significativamente maior que a dos gatos, bois e carneiros. A atividade de piruvato quinase nos cachorros foram de 4 ou 6 vezes mais alta que a dos herbívoros. Os eritrócitos dos cachorros apresentaram a atividade da piruvato quinase e da hexoquinase significativamente mais alta que as atividades nos eritrócitos dos herbívoros.

Suzuki et al. (1984) fizeram um estudo comparativo do metabolismo do glóbulo vermelho de 8 espécies de mamíferos (*Oryctolagus cuniculus*, *Cavia procellus*, *Mesocricetus auratus*, *Rattus norvegicus*, *Ovis áries*, *Capra hircus*, *Bos taurus* e *Homo sapiens*), foram determinadas as atividades de 6 enzimas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase, glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase) e concentração de glutathione reduzida. Os resultados mostraram que enquanto as atividades de glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase e glutathione reductase apresentaram variação entre as espécies estudadas, não houve variação da superóxido dismutase. Esta variação pode certamente refletir a ampla variação nas necessidades

metabólicas e capacidade frente ao stress oxidativo no qual o eritrócito se submete continuamente em condições fisiológicas. A concentração e a proporção de NADP e NADPH deve ter uma importante participação na regulação do metabolismo do glóbulo vermelho em geral e na atividade enzimática em particular, porém os níveis dessas coenzimas nos eritrócitos da maioria das espécies de mamíferos não são muito conhecidas.

Isaacks et al. (1984) estudaram a relação entre fosfato orgânico e função da hemoglobina nas espécies de monotremes (*Ornithorhynchus anatinus*, *Tachyglossus aculeatus*), e marsupiais (*Sarcophilus harrisii*, *Thylomys billardieri* e *Trichosurus vulpecula*). Eles encontraram que os níveis de 2,3-DPG no eritrócito de 2 espécies (*Ornithorhynchus anatinus* e *Tachyglossus aculeatus*) são semelhantes às concentrações encontradas em humanos e outros mamíferos sugerindo que os substratos metabólicos são fosforilados através da via glicolítica, resultados em outros estudos revelam que a glicose é o substrato preferido por eritrócitos em ambas as espécies. Foi também encontrada neste trabalho, uma baixa concentração de ATP nos monotremes estudados em relação a aos valores de humanos e de outros mamíferos, o que leva a um interessante questionamento sobre a bioenergética dessas células, sendo necessários mais estudos para melhor compreensão desse resultado.

2. OBJETIVO

Diante da paucidade dos estudos comparativos sobre o metabolismo do glóbulo vermelho dos mamíferos propôs-se investigar as atividades de todas as enzimas glicolíticas, anexas (2,3-difosfoglicerato mutase, glicose-6-fosfato-desidrogenase, 6-fosfogliconato desidrogenase) e a concentração dos compostos intermediários adenosina-5'-trifosfato e 2,3-difosfoglicerato.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram estudadas as enzimas glicolíticas do eritrócito (hexoquinase, glicose fosfato isomerase, fosfofruto quinase, aldolase, triose fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, monofosfoglicerato mutase, enolase, piruvato quinase, lactato desidrogenase), anexas (glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogliconato desidrogenase, 2,3-difosfoglicerato mutase), os compostos intermediários (2,3-difosfoglicerato e adenosina-5'-trifosfato) de animais adultos, de ambos os sexos, da classe Mammalia pertencentes a ordens: Primates, Carnívora, Artiodactyla, Didelphimorphia, Xenarthra, Lagomorpha, Rodentia.

Os animais estudados foram provenientes: da Fundação Zoológico de São Paulo e do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram estudadas duas espécies da ordem Primates (*Homo sapiens*, *Mandrillus sphinx*), cinco da ordem Carnívora (*Chrysocyon brachyurus*, *Canis lupus*, *Panthera leo*, *Leopardus pardalis*, *Canis familiaris*), uma da ordem Artiodactyla (*Cervus elaphus*), uma da ordem Didelphimorphia (*Didelphis marsupialis*), uma da ordem Xenarthra (*Myrmecophaga tridactyla*), uma da ordem Lagomorpha (*Oryctolagus cuniculus*) e três da ordem Rodentia (*Rattus norvegicus*, *Cavia porcellus*, *Mus musculus*).

Para cada animal foi preenchido um protocolo com as seguintes informações: nome científico e popular da espécie e sexo. Estes eram saudáveis de acordo com os veterinários.

Foram colhidas amostras de sangue para a determinação das concentrações de hemoglobina sendo excluídos deste estudo os animais com anemia.

Foram estudados oito humanos voluntários adultos, de ambos os sexos que se disseram saudáveis, alunos e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Faculdade de Medicina, foram colhidas amostras de sangue para a determinação das concentrações de hemoglobina, estes serviram como padrão controle das enzimas e metabólitos intermediários do eritrócito.

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta e conservação das amostras

Foram colhidas amostras de sangue, por via endovenosa nas espécies *Mandrillus sphinx*, *Chrysocyon brachyurus*, *Canis lupus*, *Panthera leo*, *Leopardus pardalis*, *Cervus elaphus*, *Didelphis marsupialis*, *Myrmecophaga tridactyla*, arterial em *Canis familiaris*, *Oryctolagus cuniculus* e por punção cardíaca em *Rattus norvegicus*, *Cavia porcellus*, *Mus musculus* utilizando o anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) e ACD (ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose). O sangue colhido em EDTA foi utilizado para determinação da dosagem de hemoglobina e aquele colhido em ACD foi utilizado para o estudo das enzimas e metabólitos intermediários do eritrócito. As amostras foram conservadas sob refrigeração a 4°C, por um período máximo de duas semanas enquanto eram feitas as determinações das atividades enzimáticas, embora pudessem ser utilizadas até 20 dias sem sofrer alterações, com exceção de duas enzimas a triose fosfato isomerase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase que foram determinadas até seis dias, tomando-se sempre o cuidado de homogeneizá-las por inversão pelo menos uma vez por dia para favorecer a manutenção da integridade do eritrócito por mais tempo, uma vez que a glicose contida no ACD é utilizada para a manutenção do seu metabolismo energético (BEUTLER, 1984).

3.2.2. Preparo dos hemolisados

As amostras foram submetidas a três lavagens sucessivas com solução salina fisiológica 0,9% a 4°C, 3.000 rpm por três minutos, em centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5810R, tomando-se o cuidado de retirar em cada lavagem, o máximo possível da camada de leucócitos (o “buffy coat”) e em seguida procedeu-se ao preparo dos hemolisados a 1:20 para a determinação das atividades enzimáticas, utilizando-se solução hemolizante a 4° C, descrita abaixo (BEUTLER, 1984):

Solução hemolisante:

2-mercaptoetanol 7mM.....	0,5mL
NADP 2mM.....	5mL
EDTA 0,27 M (neutralizada).....	10mL
Água deionizada q.s.p.	1000mL

Os eritrócitos foram lisados na proporção de 1:20 em solução hemolisante e os tubos de vidro contendo o hemolisado foram submetidos a congelamento em banho de acetona em freezer a – 40°C por aproximadamente 5 minutos e degelo em temperatura ambiente (“freeze-and-thaw”), sendo logo após mantidos sob refrigeração a 4 °C (BEUTLER, 1984), a determinação da hemoglobina foi feita pelo método da cianometahemoglobina (DACIE & LEWIS, 1995).

3.2.3. Determinação das atividades enzimáticas

As determinações das atividades enzimáticas de cada animal foram realizadas a 37°, pH 8,0 e comprimento de onda de 340nm, pelos métodos descritos por BEUTLER (1984) utilizando-se espectrofotômetro Gilford modelo 250 com registrador gráfico Recorder 6051 e banho maria circulante acoplado.

Utilizaram-se reagentes, cofatores e substratos da marca Sigma, os quais foram adicionados em cubetas de quartzo, juntamente com as amostras (hemolisados), até completar o volume de 1ml. As determinações para cada amostra foram feitas em duplicata.

3.2.3.1. Determinação da atividade da hexoquinase

A. Princípio:

O aumento da densidade óptica é medido após incubação por 15 minutos a 37°C, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da redução 1 mol de NADP⁺ em NADPH, sendo o coeficiente de extinção molar da coenzima ($\epsilon = 6,22$) (BEUTLER, 1984).

B. TABELA 1. Sistema reagente para determinação da atividade da hexoquinase:

	Branco	Sistema
	μL	μL
Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1M	100	100
Glicose 0,02 M	100	100
ATP (neutralizado) 0,02M	—	500
NADP 2mM	100	100
Hemolisado 1:20	50	50
G-6PD 10U/mL	10	10
Água deionizada	540	40

Incubou-se a 37°C por 15 minutos.

FONTE: BEUTLER, 1984.

3.2.3.2. Determinação da atividade da glicose fosfato isomerase

A. Princípio:

O aumento da densidade óptica é medido após incubação por 10 minutos a 37°C e adição do hemolisado, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da redução de 1 mol NADP⁺ em NADPH (BEUTLER, 1984).

B. TABELA 2. Sistema reagente para determinação da atividade da glicose fosfato isomerase:

	Branco	Sistema
	μL	μL
Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1M	100	100
NADP 2mM	100	100
G-6PD 10U/mL	10	10
Frutose-6-P 0,02M	—	100
Água deionizada	685	585
Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:		
Hemolisado 1:20	5	5

FONTE: BEUTLER, 1984.

3.2.3.3. Determinação da atividade da fosfofruto quinase

A. Princípio:

O decréscimo da densidade óptica é medido após incubação por 10 minutos a 37°C e acréscimo de ATP, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 2 moles de NADH em NAD⁺; sendo o coeficiente de extinção molar da coenzima ($\epsilon = 12,44$) (BEUTLER, 1984).

B. TABELA 3. Sistema reagente para determinação da atividade da fosfofruto quinase:

	Branco	Sistema
	μl	μl
Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1M	200	200
Frutose 1-6-diP 0,02M	—	100
NADH 2mM	100	100
Solução auxiliar de enzima*	10	10
Hemolisado 1:20	10	10
Água deionizada	390	290
Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:		
ATP (neutralizado) 0,02M	100	100

FONTE: BEUTLER, 1984.

*Solução auxiliar: 50 U/mL de cada enzima (aldolase, triose fosfato isomerase, α -glicerofosfato desidrogenase) dissolvida em solução de (NH₄)₂SO₄ saturada. Esta é diluída 1:15 em solução estabilizante de β -mercaptoetanol-EDTA, descrita logo abaixo:

β -mercaptoetanol 7mM.....0,05mL
 EDTA 0,27M (neutralizado).....10mL
 Água deionizada qsp.1000mL

3.2.3.4. Determinação da atividade da aldolase

A. Princípio:

O decréscimo da densidade óptica é medido após incubação por 10 minutos a 37°C e acréscimo de frutose-1-6-fosfato, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 2 moles de NADH em NAD⁺ (BEUTLER, 1984).

B. TABELA 4. Sistema reagente para determinação da atividade da aldolase:

	Branco	Sistema
	μL	μL
Tris HCl 1 M, EDTA 5Mm, pH 8,0	100	100
NADH 2mM	100	100
Solução auxiliar de enzima*	100	100
Hemolisado 1:20	10	10
Água deionizada	690	590
Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:		
Frutose-1-6-P 0,01M	—	100

FONTE: BEUTLER, 1984.

*Solução auxiliar: 50 U/ml de cada enzima (triose fosfato isomerase, α-glicerofosfato desidrogenase) dissolvida em solução de (NH₄)₂SO₄ saturada. Esta é diluída 1:15 em solução estabilizante de β-mercaptoetanol-EDTA.

3.2.3.5. Determinação da atividade da triose fosfato isomerase

A. Princípio:

O decréscimo da densidade óptica é medido após incubação por 10 minutos a 37°C e acréscimo de D-gliceraldeído-3-fosfato, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da redução de 1 mol de NADH em NAD⁺(BEUTLER, 1984).

B. TABELA 5. Sistema reagente para determinação da atividade da triose fosfato isomerase:

	Branco	Sistema
	μL	μL
Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
NADH 2mM	100	100
Hemolisado 1:2000	10	10
α-GDH 2 U/mL	50	50
Água deionizada	740	640
Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:		
D-GAP 30mM	—	100

FONTE: BEUTLER, 1984.

3.2.3.6. Determinação da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

A. Princípio:

O decréscimo da densidade óptica é medido após incubação por 10 minutos a 37°C e acréscimo de 3- ácido-fosfoglicérico, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺(BEUTLER, 1984).

B. TABELA 6. Sistema reagente para determinação da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase:

	Branco	Sistema
	μL	μL
Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1M	100	100
NADH 2mM	100	100
ATP (neutralizado)	400	400
PGK 50 U/mL	100	100
Hemolisado 1:200	10	10
Água deionizada	190	90
Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:		
3-PGA 100mM	—	100

FONTE: BEUTLER, 1984.

3.2.3.7. Determinação da atividade da fosfoglicerato quinase

A. Princípio:

O decréscimo da densidade óptica é medido após incubação por 10 minutos a 37°C e acréscimo de 3-ácido-fosfoglicérico, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺ (BEUTLER, 1984).

B. TABELA 7. Sistema reagente para determinação da atividade da fosfoglicerato quinase:

	Branco	Sistema
	μL	μL
Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1M	100	100
ATP (neutralizado)	400	400
GAPD 40 U/mL	100	100
NADH 2mM	100	100
Hemolisado 1:200	10	10
Água deionizada	190	90
Incuba-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:		
3-PGA 100mM	—	100

FONTE: BEUTLER, 1984.

3.2.3.8. Determinação da atividade da 2,3-difosfoglicerato mutase

A. Princípio:

O aumento da densidade óptica é medido após incubação por 10 minutos a 37° C e adição do hemolisado, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da redução de 1 mol de NAD⁺ em NADH (BEUTLER, 1984).

B. TABELA 8. Sistema reagente para determinação da atividade da 2.3-difosfoglicerato mutase:

	Branco	Sistema
	µL	µL
Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
NAD 10mM	100	100
F-1,6-P 100mM	—	50
3-PGA 10mM	100	100
KH ₂ PO ₄ 100mM	20	20
GAPD 50 U/mL	20	20
Aldolase 5 U/mL	20	20
TPI 60U/mL	20	20
Água deionizada	600	550
Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:		
Hemolisado 1:20	20	20

FONTE: BEUTLER, 1984.

3.2.3.9. Determinação da atividade da monofosfoglicerato mutase

A. Princípio:

A diminuição da densidade óptica é medida após incubação por 10 minutos a 37°C e adição do 3-ácido-fosfoglicérico, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺(BEUTLER, 1984).

B. TABELA 9. Sistema reagente para determinação da atividade da monofosfoglicero mutase:

	Branco	Sistema
	µL	µL
Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1M	20	20
KCl 1,0M	100	100
NADH 2mM	100	100
ADP (neutralizado) 30mM	50	50
2,3-DPG 1mM	10	10
LDH 60 U/mL	10	10
PK 50 U/mL	10	10
Enolase 10 U/mL	10	10
Hemolisado 1:20	20	20
Água deionizada	570	470
Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:		
3-PGA 10mM	—	100

FONTE: BEUTLER, 1984.

3.2.3.10. Determinação da atividade da enolase

A. Princípio:

A diminuição da densidade óptica é medida após incubação por 10 minutos a 37°C e adição do 2-ácido-fosfoglicérico, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺ (BEUTLER, 1984).

B. TABELA 10. Sistema reagente para determinação da atividade da enolase:

	Branco	Sistema
	μL	μL
Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1M	100	100
KCl 1,0M	100	100
NADH 2mM	100	100
ADP (neutralizado) 30mM	50	50
LDH 60 U/mL	10	10
PK 50 U/mL	10	10
Hemolisado 1:20	20	20
Água deionizada	510	410
Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:		
2-PGA 10mM	—	100

FONTE: BEUTLER, 1984.

3.2.3.11. Determinação da atividade da piruvato quinase

A. Princípio:

A diminuição da densidade óptica é medida após incubação por 10 minutos a 37°C e adição do fosfoenol piruvato, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺ (BEUTLER, 1984).

B. TABELA 11. Sistema reagente para determinação da atividade da piruvato quinase:

	Branco	Sistema
	μL	μL
Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
KCl 1,0M	100	100
MgCl ₂ 0,1M	100	100
NADH 2mM	100	100
ADP (neutralizado) 30mM	—	50
LDH 60 U/mL	100	100
Hemolisado 1:20	20	20
Água deionizada	380	330
Incuba-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:		
PEP 50mM	100	100

FONTE: BEUTLER, 1984.

3.2.3.12. Determinação da atividade da lactato desidrogenase

A. Princípio

A diminuição da densidade óptica é medida após incubação por 10 minutos a 37°C e adição do ácido pirúvico, no comprimento de onda de 340 nm, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da oxidação de 1 mol de NADH em NAD⁺ (BEUTLER, 1984).

B. TABELA 12. Sistema reagente determinação da atividade da lactato desidrogenase:

	Branco	Sistema
	μL	μL
Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
NADH 2mM	100	100
Hemolisado 1:200	20	20
Água deionizada	780	680
Incubou-se a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:		
Ácido pirúvico 10mM	—	100

FONTE: BEUTLER, 1984.

3.2.3.13. Determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase.

A. Princípio:

Desencadeia-se a reação pela adição de 100µl do substrato glicose-6-fosfato e 6- fosfogliconato, para a determinação de glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase respectivamente. Obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da redução de 1 mol de NADP^+ em NADPH (BEUTLER, 1984).

B. TABELA 13. Sistema reagente para determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase:

	Branco	G-6PD	6-PGD
	µL	µL	µL
Tris 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100	100
MgCl ₂ 0,1M	100	100	100
NADP 2mM	100	100	100
Hemolisado 1:20	20	20	20
Água deionizada	680	580	580
Incubou-se a mistura a 37°C por 10 minutos e adicionou-se:			
G-6-P 6mM	—	100	—
6-PGA 6mM	—	—	100

FONTE: BEUTLER, 1984.

C. Fórmula para determinação da atividade enzimática

Utiliza-se para a determinação da atividade de todas as enzimas citadas anteriormente a fórmula a seguir (BEUTLER, 1984):

$$AE = \frac{\Delta DO/\text{min} \times 10^5}{\epsilon \times V_H \times Hb} = \text{Ul. g Hb}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \text{ a } 37^\circ \text{ C.}$$

A E = atividade enzimática em Unidades Internacionais por grama de hemoglobina por minuto a 37°C em pH 8,0.

$\Delta DO/\text{min}$ = variação de densidade óptica por minuto a 37°C obtida em 340nm.

ϵ = coeficiente de extinção molar das co-enzimas (NADP ou NAD ou NADPH ou NADH, sendo 6,22 na reação em que 1 mol é reduzido ou oxidado e 12,44 na reação em que 2 moles são reduzidos ou oxidados).

V_H = volume do hemolisado em μL utilizado no sistema de reação de 1mL.

Hb = concentração da hemoglobina no hemolisado em gramas por 100mL de sangue.

10^5 = correção de hemoglobina em g/100mL e correção do volume em microlitros do hemolisado adicionado.

3.2.4. Determinação das concentrações dos compostos intermediários

3.2.4.1. Determinação da concentração da adenosina-5'-trifosfato

A. Princípio

O método baseia-se no esgotamento do substrato, no caso a adenosina-5'-trifosfato encontrada na amostra. A variação da densidade óptica é determinada após a adição da hexoquinase, no comprimento de onda de 340 nm a 37°C, até se verificar a ausência de variação de densidade óptica, obtendo-se a variação de absorbância por minuto decorrente da redução de 1 mol de NADP⁺ em NADPH (BEUTLER, 1984).

B. Preparo do extrato de ácido perclórico:

Adicionou-se 1ml de ácido perclórico 20% em 2mL de sangue total (ou proporcional volume/volume) contido em tubo ependorff, em seguida centrifugou-se a 9.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Adicionou-se 1ml do sobrenadante em tubo graduado e uma gota do indicador metil orange 0,05%, o qual, foi neutralizado com carbonato de potássio 3 M, e o volume completado para 1,5mL. Após a sedimentação espontânea a 4°C, o sobrenadante foi armazenado no freezer a -20°C até o momento da determinação (BEUTLER, 1984).

A concentração de hemoglobina do sangue total foi verificada pelo método cianometahemoglobina (DACIE & LEWIS, 1995).

C. TABELA 14. Sistema reagente para determinação da concentração da adenosina-5'-trifosfato:

	Branco	Sistema
	μL	μL
Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8,0	100	100
MgCl ₂ 0,1M	20	20
NADP 2mM	200	200
Glicose 20mM	50	50
Extrato de ácido perclórico	—	200
Água deionizada	615	415
G-6PD 60 U/mL	5	5
Fez-se a leitura a 340nm a 37°C e adicionou-se:		
Hx 400 U/mL	10	10

FONTE: BEUTLER, 1984.

D. Fórmula para determinação de ATP

Utiliza-se para esta determinação a seguinte fórmula (BEUTLER, 1984):

$$C = \frac{\Delta DO \times 0,313}{Hb}$$

Onde:

C = concentração de ATP em micromoles por grama de hemoglobina.

ΔDO = variação de densidade óptica por minuto a 37°C obtida em 340nm.

Hb = concentração de hemoglobina no sangue total (g/100mL)

0,313 = fator combinado obtido do coeficiente de extinção de NADPH, a diluição do extrato na cubeta, a conversão de hemoglobina g% para g/mL e a diluição do sangue total.

3.2.4.2. Determinação da concentração de 2,3-difosfoglicerato

A. Princípio:

O princípio do método baseia-se na utilização do 2,3-DPG, como composto auxiliar, na reação do 2-PGA a 3-PGA catalizada pela MPGM. O 2-PGA é o produto da ação catalítica da enolase sobre a fosfoenol piruvato (PEP). A transformação do PEP é acompanhada espectrofotometricamente a utilização do 2,3-DPG.

Em 980µL da solução mistura (tabela 15) foi adicionado 20µL do extrato de 2,3-difosfoglicerato e a variação da densidade óptica foi medida após 10 minutos a 25° C em 240nm (BEUTLER, 1984).

B. Preparo do extrato de 2,3-DPG:

Foi preparado um hemolisado 1:10 (0,2mL de sangue total em 1,8 mL de água deionizada e submetido a congelamento e descongelamento. A concentração de hemoglobina foi verificada

neste hemolisado a 540nm pelo método de cianometahemoglobina. O hemolisado foi diluído na proporção de 1:100 em solução tampão de tris HCl 2M pH 7,4 (diluída a 1:100) e esta solução foi aquecida, por aproximadamente 10 minutos, e retirada antes de iniciar a fervura. Após resfriamento o sobrenadante foi retirado e armazenado a -20°C , para posterior determinação da concentração (BEUTLER, 1984).

C. TABELA 15. Solução mistura para determinação da concentração de 2,3-DPG preparada no dia:

Tris HCl 2M pH 7,0	0,4 mL
MgCl ₂ 0,5M	0,2 mL
PEP 0,025 M	0,6 mL
EDTA (neutralizado) 0,27 M	0,2 mL
MPGM 1600 U/mL	0,2 mL
Enolase 32 U/mL	0,2 mL
Albumina bovina 5 mg/mL	1,8 mL
Água deionizada	14,4 mL

FONTE: BEUTLER, 1984.

D. Fórmula para determinação da concentração de 2,3-DPG.

Para se fazer o cálculo foi necessário basear-se em uma curva padrão, construída diariamente, com as concentrações de 25, 50, 75 e 100nM.

A fórmula utilizada para esta determinação (BEUTLER,1984):

$$C = \frac{D \times R}{V_H \times Hb \times 10.000}$$

Onde:

C = concentração em micromoles de 2,3-DPG por grama de Hb

D = diluição do hemolisado.

R = concentração de 2,3-DPG em nM obtida da curva de calibração.

V_H = volume em mililitro do extrato adicionado a cubeta.

Hb = concentração da hemoglobina no hemolisado em gramas por 100mL de sangue.

3. 3. Análise estatística

Os valores das atividades das enzimas dos eritrócitos (hexoquinase, glicose fosfato isomerase, fosfofruto quinase, aldolase, triose fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, monofosfoglicerato mutase, enolase, piruvato quinase, lactato desidrogenase, 2,3-difosfoglicerato mutase, glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogliconato desidrogenase), e das concentrações dos compostos intermediários (adenosina-5'-trifosfato e 2,3-difosfoglicerato) de cada animal estudado, foram comparados entre as espécies e entre as ordens de mamíferos (com exceção daquela que apresentava apenas 1 animal da espécie) utilizando-se a análise de variância (ANOVA). Foi feito também a correlação de Pearson (r) entre os valores das atividades de cada enzima dos animais e das concentrações de ATP e 2,3-DPG destes (MORETTIN & BUSSAB, 2004; NETER, J. et al. 1996).

TABELA 16 -Taxonomia das espécies estudadas segundo as ordens e famílias a que pertencem (WILSON & REEDER, 1993).

ORDEM	FAMÍLIA	ESPÉCIE	NOME POPULAR	NÚMERO DE ANIMAIS AVALIADOS(n)	SEXO(n)
Primates	Hominidae	<i>Homo sapiens</i>	Humano	8	Macho (n=4) Fêmea (n=4)
Primates	Cercopithecidae	<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandril	2	Macho (n=1) Fêmea (n=1)
Carnívora	Canidae	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo guará	6	Macho (n=5) Fêmea (n=1)
Carnívora	Canidae	<i>Canis lupus</i>	Lobo europeu	2	Macho (n=1) Indeterminado (n=1)
Carnívora	Felidae	<i>Panthera leo</i>	Leão	4	Macho (n=2) Fêmea (n=2)
Carnívora	Felidae	<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguar	1	Macho (n=1)
Carnívora	Canidae	<i>Canis familiaris</i>	Cachorro	6	Macho (n=5) Indeterminado (n=1)
Artiodactyla	Cervidae	<i>Cervus elaphus</i>	Cervo nobre	2	Macho (n=1) Fêmea (n=1)
Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis marsupialis</i>	Gambá	2	Macho (n=2)
Xenarthra	Myrmecophagidae	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá bandeira	2	Macho (n=2)
Lagomorpha	Leporidae	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Coelho	6	Macho (n=6)
Rodentia	Muridae	<i>Rattus norvegicus</i>	Rato Wistar	6	Macho (n=6)
Rodentia	Caviidae	<i>Cavia porcellus</i>	Cobaia inglesa	2	Macho (n=2)
Rodentia	Muridae	<i>Mus musculus</i>	Camundongo Balb/c	6	Macho (n=6)

4. RESULTADOS

TABELA 17 - Valores de hemoglobina obtidos nas espécies estudadas (média $\pm$ desvio padrão).

ORDEM FAMÍLIA	NOME CIENTÍFICO NOME POPULAR (n)	SEXO(n)	HEMOGLOBINA (g%)	VALORES DE REFERÊNCIA MÍNIMO E MÁXIMO (Hb = g%)
Primates	<i>Homo sapiens</i>	Macho (n=4)	15,5 $\pm$ 0,7	14 – 18
Cercopithecidae	(Humano n=8)	Fêmea (n=4)	13,5 $\pm$ 0,4	12 – 16
Primates	<i>Mandrillus sphinx</i>	Macho (n=1)	12,1	*8,3 – 14,8
Cercopithecidae	(Mandril n=2)	Fêmea (n=1)	10,9	*8,0 – 16,1
Carnívora	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Macho (n=5)	13,3 $\pm$ 0,6	*10,3 – 19,3
Canidae	(Lobo guará n=6)	Fêmea (n=1)	12,2	*10,5 – 18,8
Carnívora	<i>Canis lupus</i>	Macho (n=1)	14,6 $\pm$ 0,2	*12,2 – 25,2
Canidae	(Lobo europeu n=2)	Indeterminado (n=1)		
Carnívora	<i>Panthera leo</i>	Macho (n=2)	13,8 $\pm$ 0,3	*8,6 – 23
Felidae	(Leão n=4)	Fêmea (n=2)	12,2 $\pm$ 0,2	*7,3 – 18
Carnívora	<i>Leopardus pardalis</i>	Macho (n=1)	12,5	*9,5 – 15,4
Felidae	(Jaguar n=1)			
Carnívora	<i>Canis familiares</i>	Macho (n=5)	15,3 $\pm$ 0,6	***10 – 19,9
Canidae	(Cachorro-raça indefinida n=6)	Indeterminado (n=1)		(ambos os sexos)
Artiodactyla	<i>Cervus elaphus</i>	Macho (n=1)	11,4	*11 – 20,4
Cervidae	(Cervo nobre n=2)	Fêmea (n=1)	11	*4,92 – 13,4
Didelphimorphia	<i>Didelphis marsupialis</i>	Macho (n=2)	13,1 $\pm$ 0,6	*10,3 – 19,1
Didelphidae	Gambá(n=2)			
Xenarthra	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Macho (n=2)	12,5 $\pm$ 0,3	*9 – 18
Myrmecophagidae	(Tamanduá bandeira n=2)			(ambos os sexos)
Lagomorpha	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Macho (n=6)	13,6 $\pm$ 0,4	**10 – 14
Leporidae	(Coelho n=6)			
Rodentia	<i>Rattus norvegicus</i>	Macho (n=6)	14,2 $\pm$ 0,7	**7,2 – 16
Muridae	(Rato Wistar n=6)			
Rodentia	<i>Cavia porcellus</i>	Macho (n=2)	14,7 $\pm$ 0,4	**8 – 16
Muridae	(Cobaia inglesa n=2)			
Rodentia	<i>Mus musculus</i>	Macho (n=6)	12,4 $\pm$ 0,9	**10 – 19
Muridae	(Camudongo n=6)			

PERKINS, 1999.

* INTERNATIONAL SPECIES INFORMATION SYSTEM, 2002.

** UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2005.

*** MITRUKA, 1977.

TABELA 18 - Atividade das enzimas glicolíticas e anexas do eritrócito encontradas nas espécies estudadas (média $\pm$ desvio padrão).

Atividade enzimática (U/g Hb ¹ , min ⁻¹ a 37°C)	<i>Homo sapiens</i> (Humano) n=8	<i>Mandrillus sphinx</i> (Mandril) n=2	<i>Chrysocyon brachyurus</i> (Lobo guará) n=6	<i>Panthera leo</i> (Leão) n=4	<i>Leopardus pardalis</i> (Jaguaritica) n=1	<i>Canis lupus</i> (Lobo europeu) n=2	<i>Canis familiaris</i> (Cachorro) n=6	<i>Cervus elaphus</i> (Cervo nobre) n=2	<i>Didelphis marsupialis</i> (Gambá) n=2	<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (Tamanduá bandeira) n=2	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Coelho Nova Zelândia) n=6	<i>Rattus norvegicus</i> (Rato Wistar) n=6	<i>Cavia porcellus</i> (Cobaia inglesa) n=2	<i>Mus musculus</i> (Camundongo BALB/c) n=6
Hx	1,21 $\pm$ 0,26	0,88 $\pm$ 0,1	0,87 $\pm$ 0,12	0,93 $\pm$ 0,25	0,79	0,68 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,11	0,75 $\pm$ 0,21	1,10 $\pm$ 0,14	1,05 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,18	1,15 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,07	1,57 $\pm$ 0,10
GPI	61,13 $\pm$ 6,29	88,5 $\pm$ 9,2	79,67 $\pm$ 16,19	72,0 $\pm$ 10,46	72,5	36,50 $\pm$ 4,95	55,33 $\pm$ 4,72	36 $\pm$ 5,66	178 $\pm$ 11,31	65,5 $\pm$ 0,71	64,5 $\pm$ 5,75	94,5 $\pm$ 7,66	94,5 $\pm$ 20,51	125,67 $\pm$ 25,55
PFK	11,63 $\pm$ 1,33	7,8 $\pm$ 1	12,53 $\pm$ 3,81	12,23 $\pm$ 1,87	8,03	5,10 $\pm$ 0,28	10,98 $\pm$ 0,39	3,65 $\pm$ 0,64	12,05 $\pm$ 0,78	10,25 $\pm$ 0,35	13,28 $\pm$ 2,09	11,02 $\pm$ 0,27	11,05 $\pm$ 2,05	4,12 $\pm$ 0,21
Aldolase	3,29 $\pm$ 0,27	2,8 $\pm$ 0,42	3,1 $\pm$ 0,57	4,35 $\pm$ 0,30	2,29	1,2 $\pm$ 0,14	4,03 $\pm$ 0,19	1,4 $\pm$ 0,28	4,35 $\pm$ 0,07	3,15 $\pm$ 0,07	4,4 $\pm$ 0,38	4,27 $\pm$ 0,37	4,85 $\pm$ 0,07	3,9 $\pm$ 0,24
TP1	1.843 $\pm$ 343	1.250 $\pm$ 212	1.516 $\pm$ 239	887 $\pm$ 68	2.044	1.085 $\pm$ 162	2.112 $\pm$ 20	610 $\pm$ 70	2.350 $\pm$ 71	2.315 $\pm$ 21	1.930 $\pm$ 119	1.949 $\pm$ 39	2.490 $\pm$ 14	2.843 $\pm$ 129
GAPD	207 $\pm$ 18,6	161 $\pm$ 12	186 $\pm$ 33,2	231 $\pm$ 35,5	183	100 $\pm$ 2,83	172 $\pm$ 18,2	126 $\pm$ 19,8	212 $\pm$ 10,61	181 $\pm$ 15,56	141 $\pm$ 13,4	82 $\pm$ 12	44 $\pm$ 5,66	20,8 $\pm$ 2,7
PGK	311 $\pm$ 21,8	310 $\pm$ 29	282 $\pm$ 17,6	320 $\pm$ 29,9	401	123 $\pm$ 9,2	193 $\pm$ 10,2	123 $\pm$ 24	270 $\pm$ 14,1	346 $\pm$ 9,2	236 $\pm$ 21,3	288 $\pm$ 26	230 $\pm$ 14,14	130 $\pm$ 15,08
DPGM	4,85 $\pm$ 0,27	10,4 $\pm$ 3,4	4,97 $\pm$ 0,41	4,48 $\pm$ 0,5	4,61	1,6 $\pm$ 0,28	5,07 $\pm$ 0,94	3,2 $\pm$ 1,13	5,95 $\pm$ 0,21	8,9 $\pm$ 0,57	6 $\pm$ 0,6	5,42 $\pm$ 0,55	4,85 $\pm$ 0,92	5,3 $\pm$ 0,83
MPGM	21,5 $\pm$ 5,42	8,8 $\pm$ 0,28	16,78 $\pm$ 1,66	17,75 $\pm$ 2,75	11,86	5,85 $\pm$ 0,21	12,68 $\pm$ 2,39	7,55 $\pm$ 0,64	15 $\pm$ 1,41	22,5 $\pm$ 3,54	16,55 $\pm$ 2,97	16,65 $\pm$ 1,06	18,35 $\pm$ 2,05	25,75 $\pm$ 2,78
Enolase	4,96 $\pm$ 0,47	4,55 $\pm$ 1,34	3,88 $\pm$ 0,93	5,3 $\pm$ 0,41	2,24	2,0 $\pm$ 0,42	4,0 $\pm$ 0,18	2,95 $\pm$ 0,21	4,85 $\pm$ 0,07	3,7 $\pm$ 0,42	5,28 $\pm$ 0,43	3,87 $\pm$ 0,12	5,15 $\pm$ 0,49	4,42 $\pm$ 0,36
PK	14,03 $\pm$ 1,72	16,25 $\pm$ 3,89	12,88 $\pm$ 2,22	15,2 $\pm$ 1,28	26,3	4,0 $\pm$ 0,14	9,47 $\pm$ 0,54	4,95 $\pm$ 1,34	24 $\pm$ 2,83	28 $\pm$ 1,4	10,93 $\pm$ 1,70	12,33 $\pm$ 0,69	14,1 $\pm$ 0,56	12,03 $\pm$ 0,58
LDH	196 $\pm$ 14	161 $\pm$ 26,8	191 $\pm$ 36,7	207 $\pm$ 19	164	56 $\pm$ 5,6	159 $\pm$ 13,7	79 $\pm$ 12,7	185 $\pm$ 7	137 $\pm$ 3,5	163 $\pm$ 32,2	194 $\pm$ 19,6	182 $\pm$ 31,8	159 $\pm$ 15,7
G-6PD	12,01 $\pm$ 1,05	8,1 $\pm$ 1,56	15,9 $\pm$ 0,9	16,8 $\pm$ 1,96	16,6	13,9 $\pm$ 1,56	13,08 $\pm$ 1,87	8,2 $\pm$ 1,98	200 $\pm$ 14,14	10,85 $\pm$ 0,35	12,97 $\pm$ 1,55	16,9 $\pm$ 2,97	14,4 $\pm$ 4,24	25,33 $\pm$ 3,2
6-PGD	8,18 $\pm$ 0,83	2,75 $\pm$ 0,64	6,77 $\pm$ 0,46	8,35 $\pm$ 0,93	3,8	3,05 $\pm$ 0,21	7,53 $\pm$ 0,78	2,7 $\pm$ 0,57	8,5 $\pm$ 0,14	7,9 $\pm$ 0,14	5,58 $\pm$ 1,31	10,13 $\pm$ 1,68	10,55 $\pm$ 1,48	10,8 $\pm$ 0,32

A análise de variância (ANOVA) revelou que há variabilidade significativa ($p < 0,05$) de resultados entre as espécies estudadas.

TABELA 19 - Atividade das enzimas glicolíticas e anexas do eritrócito encontrada nas ordens estudadas (média $\pm$ desvio padrão).

Atividade enzimática (UI . g Hb ⁻¹ . min ⁻¹ a 37°C)	Primates (n=10)	Carnívora (n=19)	Artiodactyla (n=2)	Didelphomorphia (n=2)	Xenarthra (n=2)	Lagomorfa (n=6)	Rodentia (n=14)
Hx	1,15 $\pm$ 0,27	0,86 $\pm$ 0,15	0,75 $\pm$ 0,21	1,10 $\pm$ 0,14	1,05 $\pm$ 0,07	1,05 $\pm$ 0,18	1,33 $\pm$ 0,23
GPI	66,6 $\pm$ 13,17	65,45 $\pm$ 17,48	36 $\pm$ 5,66	178 $\pm$ 11,31	65,5 $\pm$ 0,71	64,5 $\pm$ 5,75	107 $\pm$ 23,71
PFK	10,86 $\pm$ 2,02	10,96 $\pm$ 2,95	3,65 $\pm$ 0,64	12,05 $\pm$ 0,78	10,25 $\pm$ 0,35	13,28 $\pm$ 2,09	8,06 $\pm$ 3,6
Aldolase	3,19 $\pm$ 0,34	3,42 $\pm$ 1,04	1,4 $\pm$ 0,28	4,35 $\pm$ 0,07	3,15 $\pm$ 0,07	4,4 $\pm$ 0,38	4,19 $\pm$ 0,43
TPI	1.725 $\pm$ 399,48	1.554 $\pm$ 509	610 $\pm$ 70	2.350 $\pm$ 71	2.315 $\pm$ 21	1.930 $\pm$ 119	2.409 $\pm$ 439,15
GAPD	198 $\pm$ 25,87	182 $\pm$ 44,13	126 $\pm$ 19,8	212 $\pm$ 10,61	181 $\pm$ 15,56	141 $\pm$ 5,49	50,73 $\pm$ 30,91
PGK	311 $\pm$ 21,55	252 $\pm$ 76,52	123 $\pm$ 24	270 $\pm$ 14,1	346 $\pm$ 9,2	237 $\pm$ 21,31	212 $\pm$ 78,76
DPGM	5,96 $\pm$ 2,61	4,52 $\pm$ 1,21	3,2 $\pm$ 1,13	5,95 $\pm$ 0,21	8,9 $\pm$ 0,57	6 $\pm$ 0,6	5,3 $\pm$ 0,7
MPGM	18,96 $\pm$ 7,18	14,28 $\pm$ 4,18	7,55 $\pm$ 0,64	15 $\pm$ 1,41	22,5 $\pm$ 3,54	16,55 $\pm$ 2,97	20,8 $\pm$ 4,9
Enolase	4,88 $\pm$ 0,64	3,93 $\pm$ 1,13	2,95 $\pm$ 0,21	4,85 $\pm$ 0,07	3,7 $\pm$ 0,42	2,97 $\pm$ 0,18	4,3 $\pm$ 0,53
PK	14,47 $\pm$ 2,21	12,06 $\pm$ 4,99	4,95 $\pm$ 1,34	24 $\pm$ 2,83	28 $\pm$ 1,4	10,93 $\pm$ 1,7	12,46 $\pm$ 0,92
LDH	189 $\pm$ 21,46	169 $\pm$ 49,35	79 $\pm$ 12,73	185 $\pm$ 7,07	137 $\pm$ 3,54	163 $\pm$ 32,27	198 $\pm$ 17,92
G-6PD	11,23 $\pm$ 1,96	15,03 $\pm$ 2,11	8,2 $\pm$ 1,98	200 $\pm$ 14,14	10,85 $\pm$ 0,35	12,97 $\pm$ 1,55	21 $\pm$ 5,11
6-PGD	7,09 $\pm$ 2,41	6,8 $\pm$ 1,77	2,7 $\pm$ 0,57	8,5 $\pm$ 0,14	7,9 $\pm$ 0,14	5,58 $\pm$ 1,31	10,48 $\pm$ 1,18

A análise de variância (ANOVA) revelou que há variabilidade significativa ($p < 0,05$) de resultados entre as ordens estudadas.

TABELA 20 – Concentração de adenosina-5'-trifosfato e 2,3-difosfoglicerato segundo as espécies estudadas (média $\pm$ desvio padrão).

ESPÉCIES	ATP (nM.g ⁻¹ Hb)	2,3-DPG (nM.g ⁻¹ Hb)
<i>Homo sapiens</i> (Humano n=8)	4.043 $\pm$ 148	12.169 $\pm$ 473
<i>Mandrillus sphinx</i> (Mandrill n=2)	5.071 $\pm$ 182	25.903 $\pm$ 1.390
<i>Chrysocyon brachyurus</i> (Lobo guará n=6)	1.706 $\pm$ 274	19.776 $\pm$ 1.030
<i>Canis lupus</i> (Lobo europeu n=2)	2.839 $\pm$ 196	12.172 $\pm$ 605
<i>Panthera leo</i> (Leão n=4)	1.921 $\pm$ 171	3.896 $\pm$ 611
<i>Leopardus pardalis</i> (Jaguar n=1)	2.024	4.187
<i>Canis familiaris</i> (Cachorro n=6)	4.331 $\pm$ 142,59	14.246 $\pm$ 662
<i>Cervus elaphus</i> (Cervo nobre n=2)	2.330 $\pm$ 57	8.055 $\pm$ 78
<i>Didelphis Marsupialis</i> (Gambá n=2)	5.158 $\pm$ 82	5.900 $\pm$ 141
<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (Tamanduá bandeira n=2)	5.970 $\pm$ 113	28.207 $\pm$ 307
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Coelho Nova Zelândia n=6)	6.670 $\pm$ 207	13.281 $\pm$ 545
<i>Rattus norvegicus</i> (Rato Wistar (n=6)	4.326 $\pm$ 80	14.902 $\pm$ 199
<i>Cavia porcellus</i> (Cobaia inglesa n=2)	4.529 $\pm$ 347	13.950 $\pm$ 212
<i>Mus musculus</i> (Camundongo BALB/c n=6)	4.161 $\pm$ 219	15.812 $\pm$ 568

A análise de variância (ANOVA) revelou que há variabilidade significativa ($p < 0,05$) de resultados entre as espécies estudadas.

TABELA 21 – Concentração de adenosina-5'-trifosfato e 2,3-difosfoglicerato segundo as ordens estudadas (média $\pm$ desvio padrão).

ORDENS	ATP (nM.g ⁻¹ Hb)	2,3-DPG (nM.g ⁻¹ Hb)
Primates (n=10)	4.249 $\pm$ 456	14.915 $\pm$ 5.824
Carnivora (n=19)	2.716 $\pm$ 1.188	13.065 $\pm$ 6.255
Artiodactyla (n=2)	2.330 $\pm$ 57	8.055 $\pm$ 78
Didelphomorphia (n=2)	5.158 $\pm$ 82	5.899 $\pm$ 140
Xenarthra (n=2)	5.970 $\pm$ 113	28.207 $\pm$ 307
Lagomorfa (n=6)	6.670 $\pm$ 206	13.280 $\pm$ 545
Rodentia (n=14)	4.285 $\pm$ 217	15.156 $\pm$ 771

A Análise estatística de variância (ANOVA) revelou que há variabilidade significativa ($p < 0,05$) de resultados entre as ordens estudadas.

TABELA 22 – Correlação (r de Pearson) das atividades enzimáticas dos animais estudados em relação às concentrações de adenosina-5'-trifosfato e 2,3-difosfoglicerato.

Atividade enzimática (UI . g Hb ⁻¹ . min ⁻¹ a 37°C)	ATP (Coeficiente de correlação r)	2,3-DPG (Coeficiente de correlação r)
Hx	r = 0,3	r = 0,06
GPI	r = 0,1	r = 0,01
PFK	r = 0,1	r = - 0,1
Aldolase	r = 0,4	r = - 0,1
TPI	r = 0,5*	r = 0,2
GAPD	r = - 0,2	r = - 0,2
PGK	r = - 0,1	r = 0,03
DPGM	r = 0,5*	r = 0,6*
MPGM	r = 0,1	r = 0,1
Enolase	r = 0,3	r = - 0,2
PK	r = 0,1	r = 0,1
LDH	r = - 0,05	r = - 0,05
G-6PD	r = 0,1	r = - 0,3
6-PGD	r = 0,05	r = - 0,03

* P < 0,001

Figura 5 – Gráfico de dispersão com linha de tendência, entre as atividades da triose fosfato isomerase e as concentrações de adenosina-5'-trifosfato dos animais estudados.

Figura 6 – Gráfico de dispersão com linha de tendência, entre as atividades da 2,3-difosfoglicerato mutase e as concentrações de adenosina-5'-trifosfato dos animais estudados.

Figura 7 – Gráfico de dispersão com linha de tendência, entre as atividades da 2,3-difosfoglicerato mutase e as concentrações de 2,3-difosfoglicerato dos animais estudados.

4.1. Resultados das atividades das enzimas e concentração de compostos intermediários dos eritrócitos comparados entre as espécies e entre as ordens:

4.1.1. Atividade da hexoquinase

Neste estudo foram observados valores mais elevados nas espécies *Mus musculus* (camudongo) e *Rattus norvegicus* (rato) e menores nas espécies *Canis lupus* (lobo europeu) e *Cervus elaphus* (cervo nobre).

A ordem Rodentia apresentou valores mais elevados em relação às demais (Primates, Carnívora, Artiodactyla, Didelphimorphia, Xenarthra e Lagomorpha), tendo diferença significativa quando comparados às ordens Artiodactyla e Carnívora, que apresentaram valores menores.

4.1.2. Atividade da glicose fosfato isomerase

As espécies *Didelphis marsupialis* (gambá) e *Mus musculus* apresentaram valores maiores de atividade desta enzima, a espécie *Cervus elaphus* e *Canis lupus* apresentaram valores menores entre os mamíferos.

A ordem Didelphimorphia mostrou valores maiores, com diferença significativa em relação às outras ordens estudadas. A ordem Artiodactyla apresentou valores menores em relação às demais.

4.1.3. Atividade da fosfofruto quinase

Apresentaram valores maiores as espécies *Oryctolagus cuniculus* (coelho) e *Chrysocyon brachyurus* (lobo guará) e menores as espécies *Cervus elaphus* e *Mus musculus*.

Na ordem Lagomorpha os valores foram mais elevados. Na ordem Artiodactyla os valores foram menores, apresentando diferença significativa em relação às demais ordens, exceto a ordem Xenarthra e Rodentia.

4.1.4. Atividade da aldolase

As espécies *Cavia porcellus* (cobaia inglesa) e *Didelphis marsupialis* apresentaram valores maiores e as espécies *Canis lupus* e *Cervus elaphus* valores menores.

A ordem Lagomorpha apresentou valores mais altos, tendo uma diferença significativa em relação à ordem Artiodactyla, que apresentou valores menores.

4.1.5. Atividade da triose fosfato isomerase

As espécies *Mus musculus* e *Cavia porcellus* apresentaram valores maiores e *Cervus elaphus* e *Panthera leo* (leão) valores menores.

A ordem Rodentia apresentou valores maiores, com diferença significativa em relação à ordem Artiodactyla, que mostrou valores menores.

4.1.6. Atividade da gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase

As espécies *Panthera leo* e *Didelphis marsupialis* apresentaram valores maiores e *Mus musculus* e *Cavia porcellus*, menores.

Valores mais elevados foram encontrados na ordem Didelphomorpha e valores menores na ordem Rodentia, que apresentou diferença significativa em relação às demais.

4.1.7. Atividade da fosfoglicerato quinase

Apresentaram valores maiores às espécies *Myrmecophaga tridactyla* e *Panthera leo*, e menores as espécies *Cervus elaphus* e *Canis lupus*.

A ordem Xenarthra apresentou valores maiores e Artiodactyla menores, com diferença significativa entre eles.

4.1.8. Atividade da 2,3-difosfoglicerato mutase

As espécies *Mandrillus sphinx* e *Myrmecophaga tridactyla* apresentaram valores mais elevados e *Canis lupus* e *Cervus elaphus* mais baixos

A ordem Xenarthra apresentou valores mais altos e significativamente diferentes da ordem Artiodactyla que apresentou valores mais baixos.

4.1.9. Atividade da monofosfoglicero mutase

As espécies *Mus musculus* e *Myrmecophaga tridactyla* apresentaram valores maiores, *Canis lupus* e *Cervus elaphus* menores.

A ordem Xenarthra apresentou valores maiores e significativamente diferentes em relação a Artiodactyla que apresentou valores menores.

4.1.10. Atividade da enolase

A espécie *Panthera leo* e *Oryctolagus cuniculus* apresentaram valores maiores, *Canis lupus* e *Cervus elaphus* menores.

A ordem Lagomorpha apresentou valores maiores, tendo uma diferença significativa em relação à ordem Artiodactyla, que apresentou valores menores.

4.1.11. Atividade da piruvato quinase

As espécies *Myrmecophaga tridactyla* e *Didelphis marsupialis* apresentaram valores maiores, *Canis lupus* e *Cervus elaphus* menores.

A ordem Xenarthra apresentou valores maiores, e Artiodactyla menores com diferença significativa entre eles.

4.1.12. Atividade da lactato desidrogenase

As espécies *Pantera leo* e *Mus musculus* apresentaram valores maiores, *Canis lupus* e *Cervus elaphus* menores.

A ordem Rodentia apresentou valores mais elevados, e a Artiodactyla menores, com diferença significativa entre eles.

4.1.13. Atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase

As espécies *Didelphis marsupialis* e *Mus musculus* apresentaram valores maiores, *Mandrillus sphinx* e *Cervus elaphus* menores.

A ordem Didelphimorphia apresentou valores maiores, se destacando por apresentar uma diferença bastante significativa em relação às demais ordens estudadas. A ordem Artiodactyla apresentou valores menores.

4.1.14. Atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase

As espécies *Mus musculus* e *Cavia porcellus* apresentaram valores maiores, *Cervus elaphus* e *Mandrillus sphinx* menores.

A ordem Xenarthra apresentou valores maiores, e Artiodactyla menores com diferença significativa entre eles.

4.1.15. Concentração de adenosina-5'-trifosfato

As espécies *Oryctolagus cuniculus* e *Myrmecophaga tridactyla* apresentaram valores maiores, *Chrysocyon brachyurus* e *Panthera leo* menores.

A ordem Lagomorpha apresentou valores maiores, com diferença significativa em relação à ordem Artiodactyla, que mostrou valores menores.

4.1.16. Concentração de 2,3-difosfoglicerato

As espécies *Myrmecophaga tridactyla* e *Mandrillus sphinx* apresentaram os maiores valores, *Panthera leo* e *Didelphis marsupialis* apresentaram os menores valores.

A ordem Xenarthra apresentou valores maiores e a ordem Didelphimorphia menores, com diferença significativa entre eles.

5. DISCUSSÃO

5.1. Generalidades

Foram estudadas as enzimas glicolíticas, anexas e os metabólitos intermediários adenosina-5'-trifosfato e 2,3-difosfoglicerato dos eritrócitos de mamíferos de sete ordens da classe Mammalia. O número de amostras analisadas dependeu da disponibilidade de acesso aos animais. As amostras de animais provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo foram obtidas sob anestesia previa, uma vez que os animais são sensíveis à contenção, evitando riscos para o animal e para os funcionários.

Na literatura há certa escassez de estudos comparativos de enzimas do eritrócito entre mamíferos. Segundo Agar et al. (1982), estudos comparativos do metabolismo do eritrócito podem fornecer informações valiosas no campo da genética, na biologia molecular, e na química das proteínas, e Parkinson et al. (1995) ressaltam que as enzimas dos eritrócitos são úteis como marcadores genéticos e no diagnóstico de anemias hemolíticas hereditárias.

De acordo com Kaneko (1974), os eritrócitos dos mamíferos são as células apropriadas para o estudo de biologia comparada, devido à facilidade de obtenção do sangue e da separação de seus componentes, permitindo a obtenção de informações a respeito da biologia, fisiologia e bioquímica destas células nas diversas espécies.

5.2. Atividade enzimática eritrocitária

Neste trabalho observou-se variabilidade significativa entre as atividades das enzimas eritrocitárias (hexoquinase, glicose fosfato isomerase, fosfofruto quinase, aldolase, triose fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, monofosfoglicero mutase, enolase, piruvato quinase, lactato desidrogenase, 2,3-difosfoglicerato mutase, glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-

fosfogliconato desidrogenase) das espécies *Homo sapiens*, *Mandrillus sphinx*, *Chrysocyon brachyurus*, *Canis lupus*, *Panthera leo*, *Leopardus pardalis*, *Canis familiaris*, *Cervus elaphus*, *Didelphis marsupialis*, *Myrmecophaga tridactyla*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus*, *Cavia porcellus*, *Mus musculus* (tabela 18) e das ordens Primates, Carnívora, Artiodactyla, Didelphimorphia, Xenarthra, Lagomorpha, Rodentia (tabela 19) quando comparados entre elas. Wightman et al (1986) observaram também amplas variações nas atividades enzimáticas na mesma espécie e entre espécies de mamíferos. Turner et al (1984) também detectaram diferenças significativas das atividades enzimáticas da ordem de 50 – 400% no estudo de 10 enzimas (adenilato quinase, difosfoglicerato mutase, glicose-6-fosfatodesidrogenase, glicose fosfato isomerase, glutathione redutase, lactato desidrogenase, malato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, piruvato quinase e triose-fosfato isomerase) entre as espécies dos primatas.

Shimizu et al. (1991) estudaram a relação entre a idade dos eritrócitos e as atividades das enzimas em coelho, cobaia, hamster, ratos e camudongos. As atividades de 6 enzimas (glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogliconato desidrogenase, hexoquinase, glutamato oxalacetato transaminase, lactato desidrogenase e acetilcolinesterase), foram medidas em eritrócitos de diferentes idades. As atividades da hexoquinase, acetilcolinesterase e glutamato oxalacetato transaminase foram mais altas nos eritrócitos mais jovens destes animais, de modo que a atividade dessas enzimas podem ser usadas como indicadores da idade dos eritrócitos. Já a lactato desidrogenase não perdeu atividade com relação à idade, com exceção dos ratos, que acompanharam o padrão citado.

5.3. Comparação das atividades enzimáticas encontradas neste trabalho com outros descritos na literatura.

Neste trabalho a atividade média de hexoquinase em camudongo Balb/c foi de $1,57 \pm 0,1$ UI / g Hb, o rato Wistar $1,15 \pm 0,1$ UI / g Hb, cobaia $1,15 \pm 0,07$ UI / g Hb e coelho $1,05 \pm 0,18$ UI / g Hb conforme mostrado na

tabela 18 , enquanto que no estudo feito por Shimizu et al. (1991) foi cerca de 1,5 UI / g Hb, 1,3 UI / g Hb, 0,8 UI / g Hb, 0,5 UI / g Hb respectivamente, mostrando que houve semelhança entre os valores encontrados, com exceção do coelho que apresentou atividade mais alta neste presente trabalho. A atividade média da hexoquinase encontrada em cervo nobre foi de $0,75 \pm 0,21$ UI / g Hb, muito semelhante à encontrada em cervo nobre por Agar et al.(1992), $0,75 \pm 0,05$ UI / g Hb.

A atividade média da glicose fosfato isomerase em cervo nobre neste trabalho foi de $36 \pm 5,66$ UI / g Hb (tabela 18), enquanto no estudo realizado por Agar et al. (1992), foi $72,6 \pm 5,87$ UI / g Hb, apresentando neste caso um valor menor, o que poderá talvez indicar que podem existir sub-espécies de cervos nobres.

Neste presente trabalho a atividade média da fosfofrutoquinase encontrada em cães foi de $10,98 \pm 0,4$ UI / g Hb (tabela 18). Giger et al. (1985) encontraram atividade média da fosfofrutoquinase de cães (raça indefinida) de $11 \pm 2,7$ UI / g Hb; Giger et al. (1987) encontraram em cães Springer Spaniels $9,1 - 13,5$ UI / g Hb; Giger et al. (1991) encontraram em cães Basenjis $10,1 \pm 1,4$ UI / gHb; Mccully et al. (1999) encontraram em cães Springer Spaniels $10,0 \pm 0,8$ UI / g Hb. Todos estes achados mostraram valores aproximados aos determinados neste trabalho.

A atividade média da gliceraldeído fosfato desidrogenase encontrada em cervo nobre neste trabalho foi de $126 \pm 19,8$ UI / g Hb (tabela 18), mas Agar et al. (1992) encontraram atividade média mais baixa de $70 \pm 10,7$ UI / g Hb. A atividade média da fosfogliceratoquinase em cervo nobre foi de 123 ± 24 UI / g Hb (tabela 18), enquanto em estudo realizado por Agar et al. (1992), foi de $356 \pm 56,7$ UI / g Hb, sendo portanto mais baixo o valor encontrado neste presente estudo. A atividade média da piruvato quinase em cervo nobre neste trabalho foi de $4,95 \pm 1,34$ UI / g Hb (tabela 18), enquanto Agar et al.(1992), encontraram um valor mais alto de $12,9 \pm 1,64$ UI/g Hb. Estes valores discrepantes encontrados no cervo nobre sugerem

que os cervos nobres do Parque Zoológico de São Paulo talvez possam pertencer a sub-espécie diferente da estudada por Agar.

A atividade média de piruvato quinase em cães neste presente trabalho foi de $9,47 \pm 0,54$ UI / g Hb. Giger et al. (1985) obtiveram atividade média $4,7 \pm 0,9$ UI / g Hb em cães de raça indefinida, cães ingleses Springer Spaniel foi de $4,5 - 7,8$ UI / g Hb (GIGER et al.,1987) , em cães Basenji foi $8,4 \pm 0,6$ UI / g Hb (GIGER et al,1991) e em cães Beagle foi de $8,2 - 11,4$ UI / g Hb (GIGER et al.,1991), sendo este último o valor que mais se aproxima do presente estudo.

Neste presente trabalho a atividade média de lactato desidrogenase em camudongo Balb/c foi de 159 ± 16 UI / g Hb, o rato Wistar $194 \pm 19,6$ UI / g Hb, cobaia $192 \pm 31,8$ UI / g Hb e coelho $163 \pm 32,2$ UI / g Hb conforme mostrado na tabela 18, enquanto que no estudo feito por Shimizu et al.(1991), foi cerca de 150 UI / g Hb, 125 UI / g Hb, 100 UI / g Hb, 145 UI / g Hb respectivamente, mostrando que houve semelhança entre os valores encontrados com o presente trabalho, com exceção do rato Wistar e cobaia que apresentaram atividades mais baixas. A atividade média da lactato desidrogenase em cervo nobre foi de $79 \pm 12,73$ UI / g Hb (tabela 18), enquanto que Agar et al.(1992), encontrou um valor mais baixo $18,4 \pm 3,4$ UI / g Hb, o que reforça a hipótese aventada de existência de sub-espécies de cervo nobre.

A atividade média de glicose-6-fosfato dehidrogenase encontrada neste trabalho em camudongo Balb/c foi de $25,33 \pm 3,2$ UI / g Hb, em rato Wistar $18,9 \pm 2,97$ UI / g Hb, em cobaia $14,4 \pm 4,24$ UI / g Hb e em coelho $12,97 \pm 1,55$ UI / g Hb (tabela 18), enquanto que Shimizu et al.(1991) encontraram valores em torno de 14 UI / g Hb, 18 UI / g Hb, 6 UI / g Hb e 9 UI / g Hb, respectivamente ou seja mais baixos com exceção do rato que foi semelhante. A atividade média da glicose-6-fosfato dehidrogenase em cervo nobre foi de $8,2 \pm 1,98$ UI / g Hb (tabela 18), enquanto Agar et al. (1992), encontraram um valor mais baixo de $5,84 \pm 0,65$ UI / g Hb.

De acordo com Suzuki et al. (1984), há uma grande variação na atividade de algumas enzimas dos eritrócitos entre espécies. Com relação à

glicose-6-fosfato dehidrogenase, eles encontraram valores mais elevados em ratos (*Rattus norvegicus*) 19,36 UI / g Hb, em relação a outras espécies de mamíferos como coelho, cerca de 12 UI / g Hb e cobaia, cerca de 10 UI / g Hb. Neste presente estudo o rato Wistar também apresentou valor elevado de 18,9 UI / gHb, o coelho apresentou atividade de $12,97 \pm 1,55$ UI / gHb e a cobaia $14,4 \pm 4,24$ UI / gHb.

É interessante observar-se que a glicose-6-fosfato dehidrogenase no *Didelphis marsupialis* apresentou diferença significativa em relação às demais espécies estudadas, com valores cerca de 20 vezes maiores que os encontrados no humano, o que foi motivo de dissertação de mestrado apresentada nesta Faculdade (Nonoyama, 1992) .

Neste estudo, a atividade média de 6-fosfogliconato desidrogenase em camudongo Balb/c foi de $10,8 \pm 0,32$ UI / g Hb, rato Wistar $10,13 \pm 1,68$ UI / g Hb, cobaia $10,55 \pm 1,48$ UI / g Hb e coelho $5,58 \pm 1,31$ UI / g Hb (tabela 18). Shimizu et al. (1991) encontraram cerca de 5,5 UI / g Hb, 7 UI / g Hb, 6 UI / g Hb e 4,5 UI / g Hb, sendo portando mais altos os valores encontrados neste presente trabalho. A atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase em cervo nobre foi de $2,7 \pm 0,57$ UI / g Hb (tabela 18), segundo Agar et al.(1992), foi de $2,38 \pm 0,27$ UI / g Hb, apresentando valores aproximados aos encontrados no presente trabalho.

De acordo com Suzuki et al. (1984) o rato (*Rattus norvegicus*) apresentou 6-fosfogliconato desidrogenase em torno de 8,01 UI / g Hb, a cobaia 8 UI / g Hb e o coelho 5,5 UI / g Hb, sendo os valores encontrados neste presente estudo de 10,13 UI / g Hb, $10,55 \pm 1,48$ UI / g Hb, $5,58 \pm 1,31$ UI / g Hb respectivamente, mostrando semelhança com os valores encontrados por Suzuki et al. (1984).

Os dados encontrados neste trabalho mostram variabilidade significativa entre as espécies de mamíferos estudadas, concordantes com os trabalhos descritos na literatura. Neste trabalho as espécies foram também agrupadas segundo as ordens, mas como não foram encontrados trabalhos que tivessem assim procedido, não foi possível compará-los com outros.

5.4. Metabólitos eritrocitários (adenosina-5'-trifosfato e 2,3-difosfoglicerato)

Existe pequena variação das concentrações de ATP encontrada entre as espécies (tabela 18) e entre as ordens estudadas (tabela 19), o que demonstra a importância deste sal de fosfato rico em ligações de alta energia para a biologia do eritrócito, não obstante a grande variabilidade das atividades das enzimas do ciclo da glicólise (tabela 18). A variabilidade das atividades das enzimas glicolíticas sugeriria o encontro de variação maior de ATP, mas isto não ocorre, e a explicação para isso poderia ser a necessidade da célula munir-se de energia calórica do ATP para manter uma vida média adequada às necessidades biológicas específicas do eritrócito de cada espécie, permitindo-lhe transportar o oxigênio com eficiência.

De acordo com Jain et al. (1993) o eritrócito de cada espécie tem singularidades em relação ao tempo de vida média intravascular, como por exemplo humanos (120 dias), primatas (98 dias), bois (160 dias), cavalos (140 – 150 dias), bodes (125 dias), cachorros (110 dias), carneiros (70 – 153), porcos (63 dias), gatos (68 dias), cobaias (83 dias), hamsters (60 – 70 dias), ratos (45 – 50 dias), camudongos (20 – 30 dias), coelhos (68 dias). Neste presente trabalho as concentrações de ATP no humano, mandril, cachorro, cobaia, rato, camudongo, e coelho apresentaram pouca variabilidade entre eles, mostrando que, apesar das variações na vida média dos eritrócitos, a concentração de ATP não varia muito, sugerindo assim que os eritrócitos de mamíferos apresentam um nível ideal de ATP, sendo importante no fornecimento de energia necessária à realização de sua função adequada, independente das variações das atividades enzimáticas da via glicolítica encontradas em cada uma das espécies estudadas.

Neste trabalho as concentrações de 2,3-difosfoglicerato apresentaram grande variação entre as espécies (tabela 20) e ordens estudadas (tabela 21). Segundo Isaacks et al. (1984) os dados de vários estudos nos últimos

anos indicam que a concentração dos compostos de fosfato orgânico dos eritrócitos de diferentes classes de vertebrados é muito diverso. A interação de 2,3-DPG intracelular com a hemoglobina é um importante fator na maioria das espécies na regulação do transporte de oxigênio e sua liberação para os tecidos. Esta variação pode ser imputada à possível presença de hemoglobinas diferentes com diferentes afinidades ao 2,3-DPG e ou ao oxigênio molecular (JAIN, 1993).

Estudos comparativos no metabolismo eritrocitário de marsupiais e monotremes australianos desenvolvidos por Whittington et al.(1995), revelam também grande variedade nas necessidades metabólicas e características dos glóbulos vermelhos das espécies estudadas.

Neste trabalho investigamos a existência de alguma correlação entre as atividades das enzimas estudadas de cada animal e as concentrações do ATP e do 2,3-DPG destes. Os dados obtidos (tabela 22) indicam que a maior parte das enzimas não exibe qualquer correlação com estes dois compostos intermediários. No entanto, as atividades da triose fosfato isomerase e da 2,3-difosfoglicerato mutase mostraram coeficientes de correlação de Pearson de valores iguais a 0,5 com o ATP ($p < 0,001$), mostrando alguma tendência de correlação entre as atividades destas enzimas e o rendimento energético em ATP. Este achado mostra que provavelmente os valores das atividades enzimáticas da via glicolítica e anexas não tenham tanta influência nas concentrações de ATP obtidas, com exceção talvez da triose fosfato isomerase e da 2,3-difosfglicero mutase. Embora a 2,3-difosfoglicerato mutase não pertença ao ciclo da glicólise, o produto de sua ação, o 2,3-DPG, é um importante composto intermediário auxiliar na transformação do 2-PGA em 3-PGA catalisada pela monofosfoglicero mutase, esta sim pertencente ao ciclo de Embden Meyerhoff, facilitando o rendimento da glicólise. A importância da triose fosfato isomerase, a enzima mais ativa da via glicolítica, seria explicada pela constante transformação da dihidroxi-acetona fosfato no seu isômero aldeídico gliceraldeído-3-fosfato que é metabolizado imediatamente pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, proporcionando o rendimento máximo em ATP através da

quebra da molécula de 6 carbonos da glicose em duas moléculas e o seu destino para a triose gliceraldeído-3-fosfato, permitindo o seu metabolismo até o ácido láctico. Interessante notar-se que nenhuma das quinases, nem mesmo a piruvato quinase, mostrou correlação com a produção de ATP. Já a enzima 2,3-difosfoglicerato mutase mostrou uma correlação positiva de r igual a 0,6 ($p < 0,001$) com a produção de 2,3-DPG, o que seria esperado, pois é um produto de reação direta da ação catalítica de 2,3-difosfoglicerato mutase sobre o substrato 1,3-difosfoglicerato.

É interessante observar que na literatura foi encontrado apenas um trabalho de Goto et al. (1992) em que foi investigada a correlação entre as atividades enzimáticas e os metabólitos eritrocitários em espécies de mamíferos. Estes autores estudaram no eritrócito de carneiros e cães a relação existente entre a atividade da glutathione-S-transferase (GST) e o nível de glutathione reduzida (GSH), havendo uma correlação positiva ($r = 0,529$, $p < 0,001$) entre eles. Estes resultados mostraram que a atividade de glutathione-S-transferase no eritrócito destes está diretamente correlacionado com o nível intracelular de GSH.

Alguns trabalhos descrevem valores de 2,3-DPG e de ATP (PARKINSON et al. 1994) por número de glóbulos vermelhos, o que talvez não forneça parâmetros confiáveis na comparação de seus resultados, pois o número de eritrócitos por unidade de volume de sangue pode variar muito entre as espécies, em virtude da grande variação do volume corpuscular médio eritrocitário, embora normais para cada espécie. Melhor seria utilizar os valores, como os utilizados neste trabalho, de atividade enzimática e concentração de compostos intermediários por grama de hemoglobina.

Agar et al. (1973), estudaram em coelhos a hexoquinase, glicose fosfato isomerase, fosfofruto quinase, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, enolase, piruvato quinase, lactato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase, porém eles não podem ser comparados com os resultados deste presente trabalho por causa de diferentes técnicas utilizadas. No entanto, pode-se comparar os valores dos metabólitos, feitos com a mesma

técnica utilizada neste trabalho. Assim, o ATP apresentou valores de 6.110 nmol / g Hb, e o 2,3-DPG 23.600 nmol/gHb, sendo os valores de ATP semelhantes aos encontrados neste presente trabalho, que foram 6.670 ± 207 nmol / g Hb, e mais altos que os valores de 13.281 ± 545 nmol / g Hb para o 2,3-DPG .

Vários fatores podem influenciar na concentração de 2,3-DPG como:

a) Mudanças ontogenéticas: os mamíferos porcos, cachorros e coelhos aumentam bastante a concentração de 2,3-DPG desde a fase fetal, neonatal, até a fase adulta, sendo ligeiramente aumentada em cavalo, decresce no boi, bode e carneiro e não muda significativamente no gato. A baixa concentração de 2,3-DPG em fetos da ordem rodentia foi imputada à alta atividade da piruvato quinase fetal, e após o nascimento esta é gradualmente substituída pela enzima do adulto, e a concentração de 2,3-DPG aumenta (Nikimaa,1990).

b) Ambiente: as pessoas que moram em altas altitudes apresentam concentração deste mais elevada do que aquelas que as que moram ao nível do mar. Desta mesma forma, mamíferos normais quando submetidos a um ambiente em condições de hipoxia moderada, tem os níveis de 2,3-DPG aumentado, sendo provavelmente devido à hiperventilação induzido por aumento de pH no plasma e no eritrócito, e este por sua vez ativa a fosfofrutoquinase que tem como produto de reação o metabólito 1-3-difosfoglicerato, tendendo deste modo a aumentar os níveis de 2,3-DPG. Ocorre um contraste em algumas espécies de mamíferos, como *Manis pendactyla* (Pangolin chinês), pois estes são adaptados à condições de hipóxia em que vivem (buracos), tem a concentração de 2,3-DPG mais baixa que no eritrócito de mamíferos não adaptados a esta condição (Nikimaa,1990).

c) Exercício: no homem o treinamento físico aumenta a concentração de 2,3-DPG, isto devido a uma alta proporção de eritrócitos jovens na circulação e elevação da concentração de 2,3-DPG intracelular para facilitar a oxigenação tecidual (Nikimaa,1990).

d) Fatores hormonais: foi observado que as catecolaminas causam aumento de AMP cíclico em eritrócitos de ratos, havendo posterior inibição da piruvato quinase e ativação da fosfofruto quinase, tendo como resultado dessas mudanças, o aumento da concentração de 2,3-DPG e redução da concentração de ATP (Nikimaa,1990).

e) Temperatura e reações metabólicas: a concentração de 2,3-DPG decresce em mamíferos hibernando com temperatura corpórea de 30°C (Harvey et al. 1997), e isto foi observado em esquilo (*Citellus tridecemlineatus*), em hamster (*Mesocricetus auratus*), ouriço - cacheiro (*Erinaceus europeus*) e a marmota (*Marmota monax*); o decréscimo de 2,3-DPG pode ser devido à relativa acidificação do sangue durante a hibernação, que pode inibir a fosfofrutoquinase e decrescer a produção de 2,3-DPG (Nikimaa,1990). De acordo com Chauhan *et al.*, 2002, durante a hibernação, animais sofrem mudanças metabólicas que resultam na redução da utilização de glicose e oxigênio. Sabe-se que a gordura é a fonte preferencial de energia para animais que estão hibernando. Em um estudo com ursos, durante a hibernação, foi observado um aumento da peroxidação de lipídios na membrana dos eritrócitos destes animais. Os resultados desse trabalho sugerem que, nesse período, eles apresentam um aumento do stress oxidativo e redução da atividade das enzimas que se ligam à membrana, tais como: $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+3}$ -ATPase e $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase, havendo uma alteração no transporte ativo de íons através da membrana. A manutenção do gradiente de cátions por estas enzimas é de fundamental importância para o controle de hidratação, volume, utilização de nutrientes e fluidez da célula.

f) Alcalose e acidose metabólica: Mudanças na concentração de 2,3-DPG podem ocorrer em resposta à alcalose e à acidose, que promove alterações na afinidade da hemoglobina induzidas por mudanças de pH. O aumento de da concentração de H^{+} reduz a afinidade da hemoglobina ao oxigênio, e facilita a distribuição de oxigênio para os tecidos enquanto que a redução de H^{+} aumenta a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (Harvey et al.1997).

Os dados encontrados neste trabalho mostram a variabilidade do metabolismo entre as espécies da classe Mammalia estudadas, que desafiam as previsões, mostrando que há muito o que investigar neste fascinante campo de estudo.

6. CONCLUSÕES

1. As enzimas e compostos intermediários estudados apresentaram grande variabilidade entre as espécies dos mamíferos estudadas.
2. Foi observada correlação positiva entre a atividade da triose fosfato isomerase e 2,3-difosfoglicerato mutase e os teores de adenosina-5'-trifosfato das espécies como um todo, bem como correlação positiva entre a 2,3-difosfoglicerato mutase em relação ao 2,3-difosfoglicerato.
3. Os teores de adenosina-5'-trifosfato mantiveram-se dentro de um patamar estável, ao redor de 4.000 a 6.000 nmoles / gHb, com as exceções das ordens Carnívora (leão, jaguatirica, lobo europeu e lobo guará) e Artiodactyla (cervo nobre), que exibiram teores ao redor de 2.000 a 3.000 nmoles / gHb.
4. As concentrações de 2,3-difosfoglicerato apresentaram grande variação entre as espécies e ordens estudadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAR, N.S.; SMITH, J.E. Enzymes and glycolytic intermediates in the rabbit erythrocyte. *Enzyme, Basel*, v.17, p.205-209, 1973.
- AGAR, N.S.; SUZUKI, T. Red cell metabolism in buffaloes and camels. *J. Exp. Zool.*, New York, v.223, p.25-28, 1982.
- AGAR, N.S.; GODWIN, I.R. Studies on the blood of fallow deer (*Dama dama*) e red deer (*Cervus elaphus*): haematology, red cell enzymes, metabolic intermediates and glycolytic rates. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.103B, n.4, p.909-911, 1992.
- ARAI, T.; WASHIZU, T.; SAGARA, M.; SAKO, T.; NIGI, H.; MATSUMOTO, H.; SASAKI, M.; TOMODA, I. D-glucose transport and glycolytic enzyme activities in erythrocytes of dogs, pigs, cats, horses, cattle and sheep. *Res. Vet. Sci.*, Amsterdam, v.58, p.195-196, 1995.
- BALLAS, S.K. Comparative distribution of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase activity in human, guinea-pig, rabbit and mouse erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.87B, p.837-842, 1987.
- BEUTLER, E.; BLUME, K.G.; KAPLAN, J.C.; LOHR, G.W.; RAMOT, B.; VALENTINE, W.N. International committee for standardization in haematology:recommended methods for red-cell enzyme analysis. *Br. J. Haematol.*, Oxford, v.35, p.331-340, 1977.
- BEUTLER, E. *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. 3.ed. Orlando: Grune & Stratton, 1984. 188p.
- BEUTLER, E. Composition of the erythrocyte. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPIS, T.J.; SELIGSOHN, U. *Williams hematology*. 6.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap.23, p.289-293.
- BEUTLER, E. Energy metabolism and maintenance of erythrocytes. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPIS, T.J.; SELIGSOHN, U. *Williams hematology*. 6.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap.26, p.319-332.

- BULL, B.S. Morphology of the erythron. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLER, B.S.; KIPPIS, T.J.; SELIGSOHN, U., eds. *Williams hematology*. 6.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap.22, p.271-288.
- CHAUHAN, V.P.S., TSIOURISABH, J.A., CHAUHAN, A., SHEIKH, A.M., BROWN, W.T., VAUGHAN, M. Increased oxidative stress and decreased activities of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase and $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase in the red blood cells of the hibernating black bear. *Life Sci.*, Amsterdam, n.71, p.153-161, 2002.
- DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. *Practical hematology*. 8.ed. Endinburgh: Churchill Livingstone, 1996. 609p.
- GIGER, U.; HARVEY, J.W. Hemolysis caused by phosphofructokinase deficiency in English Springer Spaniels: seven cases(1983-1986). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, v.191, n.4, p.453-459, 1987.
- GIGER, U.; HARVEY, J.W.; YAMAGUCHI, R.A.; MCNULTY, P.K.; CHIAPELLA, A.; BEUTLER, E. Inherited phosphofructokinase deficiency in dogs with hyperventilation-induced hemolyses: increased in vitro and in vivo alkaline fragility of erythrocytes. *Blood*, Birmingham, v.65, n.2, p.345-351, 1985.
- GIGER, U.; MASON, G.D.; WANG, P. Inherited erythrocyte pyruvate kinase deficiency in a Beagle dog. *Vet. Clin. Pathol.*, Santa Barbara, v.20, p.83-86, 1991.
- GIGER, U.; NOBLE, N.A. Determination of erythrocyte pyruvate kinase deficiency in Basenjis with chronic hemolytic anemia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, v.198, n.10, p.1755-1761, 1991.
- GLADER, B.E.; LUKENS, J.N. Hereditary hemolytic anemias associated with abnormalities of erythrocyte glycolysis and nucleotide metabolism. In: LEE, G.R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.P.; RODGERS, G.M., eds. *Wintrobe's clinical hematology*. 10.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. v.1, cap.42, p.1160-1175.
- GLADER, B.E.; LUKENS, J.N. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related disorder of hexose monophosphate shunt and

- glutathione metabolism. In: *Wintrobe's clinical hematology*. 10.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. v.1, cap.42, p.1160-1175. v.1, cap.43, p. 1176-1190.
- GOTO, I.; AGAR, N.S.; MAEDE, Y. The relationship between reduced glutathione level and glutathione-s-transferase activity in sheep erythrocytes. *Jpn. J. Vet. Res.*, Sapporo, v.40, p.99-104, 1992.
- HARVEY, J.W. The erythrocyte: physiology, metabolism, and biochemical disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.I., eds. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. cap.7, p.157-203.
- INTERNATIONAL SPECIES INFORMATION SYSTEM. Reference ranges for physiological data values. Eagan: ISIS, 2002. 2 CD-ROM.
- ISAACKS, R.; NICOL, S.; SALLIS, J.; ZEIDLER, R.; KIM, H.D. Erythrocyte phosphates and hemoglobin function in monotremes and some marsupials. *Am. J. Phys.*, College Park, v.246, p.R236-R241, 1984.
- JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. 6.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.
- KANEKO, J.J. Comparative erythrocyte metabolism. *Advance veterinary science*, New York, v. 165, p. 117-153, 1974.
- KANEKO, J.J. Animal models of inherited hematologic disease. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 165, p. 1-19, 1987.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M., eds. Carbohydrates and glycobiology. In: _____. *Lehninger principles of biochemistry*. 3.ed. New York: Wohth, 2000. cap.9, p.293-324.
- LORENZI, T.F. *Manual de hematologia propedéutica e clínica*. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. p.72.
- MCCULLY, K.; CHANCE, B.; GIGER, U. In vivo determination of altered hemoglobin saturation in dogs with M-type phosphofructokinase deficiency. *Muscle Nerve*, Hoboken, v.22, n.5, p.621-627, 1999.
- MITRUKA, B.M.; RAWNSLEY, H.M.; VADEHARA, B.V. *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animal*. New York: Masson, 1977. 272p.

- MORETTIN, P.A., BUSSAB, W.O. *Estatística básica*. 5.ed. São Paulo: Saraiva, 2004. 526p.
- NETER, J.; KUTNER, M.H.; NACHTSHEIN, C.J.; WASSERMAN, W. *Applied linear statistical models*. 4.ed. Chicago: Irwin, 1996. 1408p. (The Irwin Series in statistics).
- NIKINMAA, M. *Vertebrate red blood cells: adaptations of function to respiratory requirements*. Berlin, New York: Springer-Verlag, 1990. 262p. (Zoophysiology, v.28).
- NOYOYAMA, K. *Estudo da hiperatividade da glicose-6-fosfato desidrogenase da Didelphus marsupialis*. São Paulo, 1996. 71p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- OLIVEIRA, R.A.G.; POLI NETO, A. *Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnostico por técnicas laboratoriais*. São Paulo: Roca, 2004. p.34.
- PARKINSON, A.L.; WHITTINGTON, A.T.; SPENCER, P.B.S.; GRIGG, G.; HINDS, L.; GALLAGHER, C.; KUCHEL, P.; AGAR, N.S. Comparative erythrocyte metabolism in marsupials and monotremes. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, Oxford, v.110C, n.3, p.261-265, 1995.
- PERKINS, S. L. In: LEE, G.R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.P.; RODGERS, G.M., eds. *Wintrobe's clinical hematology*. 10.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. v.2, appendix A, p.2738-2748.
- PETERS, L. L.; LANE, P. W.; ANDERSEN, S. G.; GWYNN, B.; BARKER, J. E. & BEUTLER E. Downeast anemia(dea), a new mouse model of severe nonspherocytic hemolytic anemia caused by hexokinase(HK_I) deficiency. *Blood Cells Mol. Dis.*, La Jolla, 27(5):850-860,2001.
- RAGAN, H.A. Comparative hematology. In: LEE, G.R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.P.; RODGERS, G.M., eds. *Wintrobe's clinical hematology*. 10.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. v.2, appendix B, p.2749-2763.

- ROSE, Z.B. The enzymology of 2,3-bisphosphoglycerate. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, Hoboken, v.51, p.211-253, 1980.
- SHIMIZU, Y.; KAWARADA S.Y.; SUZUKI, M.; TANAKA, T. Interstrain differences in red cell enzyme activities in mice and rats. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.100B, n.4, p.687-690, 1991.
- SHIMIZU, Y.; SUZUKI, M. The relationship between red cell aging and enzyme activities in experimental animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.99B, n.2, p.313-316, 1991.
- SIMPSON, C.F.; TAYLOR, W.J. Ultrastructure of sickle deer erythrocytes. I. The typical crescent and holly leaf forms. *Blood*, Birmingham, v.43, n.6, p.899-915, 1974.
- STORER, T.I.; USINGER, R.L.; STEBBINS, R.C.; NYBAKKEN, J.W. Classe mammalian: mamíferos. In: _____. *Zoologia geral*. 6.ed. São Paulo: Nacional, 1998. cap.34, p.697-728. (Biblioteca Universitária. Série 3. Ciências Puras, v.8).
- SUZUKI, T.; AGAR, N.S.; SUZUKI, M. Red cell metabolism: a comparative study of some mammalian species. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.79B, n.4, p.515-520, 1984.
- TELEN, M.J.; KAUFMAN, R.E. The mature erythrocyte. In: LEE, G.R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.P.; RODGERS, G.M., eds. *Wintrobe's clinical hematology*. 10.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. v.1, cap.10, p.193-227.
- TURNER, T.R.; WADE, P.T.; MOHRENWEISER, H.W. Variation in erythrocyte enzyme activity among primate species. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.77B, n.3, p.541-545, 1984.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina. Centro de Bioterismo. *Valores hematológicos de referência obtidas pelo centro de criação de animais de laboratório*. Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.biot.fm.usp.br/site1/index-2.html>. Acesso em: 21 mar. 2005.

- VALENTINE, N. W.; TANAKA, K. R.; PAGLIA, D. E. Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies. *Annals of internal medicine*, v.103, p.245-257, 1985.
- WANNMACHER, C.M.D.; DIAS, R.D. *Bioquímica fundamental*. 6.ed. Porto Alegre: Guanabara, 1992. p.107-120.
- WHITTEN, C.F. Innocuous nature of sickling (pseudosickling): phenomenon in deer. *Br. J. Haematol.*, Oxford, v.13, p.650-655, 1967.
- WHITTINGTON, A.T.; PARKINSON, A.L.; SPENCER, P.B.S.; GRIGG, G.; HINDS, L.; GALLAGHER, C.H.; KUCHEL, P.W.; AGAR, N.S. Comparative study of the antioxidant defence systems in the erythrocytes of Australian marsupials and monotremes. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, Oxford, v.110C, n.3, p.267-272, 1995.
- WIGHTMAN, J.; ROBERTS, J.; CHAFFEY, G.; AGAR, N.S. Erythrocyte biochemistry of the grey-headed fruit bat (*Pteropus poliocephalus*). *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, Amsterdam, v.88B, n.1, p.305-307, 1987.
- WILSON, D.E.; REEDER, D.A.M., eds. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 2.ed. Washington: Smithsonian Institution Press, 1993. 1206p.