

O GLÓBULO VERMELHO*

ESTRUTURA, METABOLISMO E FUNÇÕES

João A. Martins e Silva**

INTRODUÇÃO

As informações actualmente disponíveis a propósito do glóbulo vermelho, sobretudo as obtidas nas duas últimas décadas, são de tal forma vastas, importantes e, mesmo até, espectaculares, que não é sem grande admiração que se aprecia a intuição demonstrada por Eric Ponder, em 1948, numa época anterior aos grandes avanços bioquímicos e aos recursos técnicos hoje existentes:

«I have been told that I tend to speak of red cell as if it were a microcosm and as if understanding of its nature and properties would include an understanding of nearly everything else in the cellular world.»

Na realidade pode considerar-se o glóbulo vermelho como um pequeno mundo, perfeitamente organizado, dentro das paredes que o separam do plasma.

* Parte deste trabalho foi apresentado para provas de doutoramento (nos termos do disposto na alínea c) do n.º 3 do artigo 8º do Decreto-lei nº 388/70, de 18 de Agosto de 1970), realizado em Novembro de 1973.

** 2º Assistente, Laboratório de Química Fisiológica

Faculdade de Medicina da Universidade de Lourenço Marques

Estamos muito afastados, do ponto de vista dos conhecimentos adquiridos, da época em que se olhava as hemácias com uma sensação de segurança. Desta posição, sobretudo derivada dos exames morfológicos efectuados em lâmina com o microscópio óptico, afirmava-se convictamente que os eritrócitos eram corpúsculos celulares, não nucleares, bicôncavos e discóides, ricos em hemoglobina.

Calculou-se, de estudos cinéticos, que a vida média dos glóbulos vermelhos em circulação oscilava pelos 120 dias, enquanto percorrem no corpo humano o trajecto equivalente a quase 290 km. Neste intervalo a hemoglobina eritrocitária asseguraria a oxigenação de todos os tecidos corporais, por troca com o anidrido carbónico.

Esta panorâmica, ainda que correcta, pecará por ser ilusoriamente simples. Factos experimentais, colhidos nos últimos anos, encarregaram-se de dar ao eritrócito a sua verdadeira dimensão e importância, revelando a complexidade da ultra-estrutura globular e o dinamismo dos mecanismos que lhe preservam a unidade.

O glóbulo vermelho adulto deixou de ser apenas um «saco» cheio de hemoglobina em solução concentrada, com autonomia suficiente para o desempenho das trocas gasosas durante um certo período de tempo.

Sabe-se que esse transporte, para ser eficiente, exige que a membrana envolvente do eritrócito tenha determinada composição química, necessita constantemente de energia e varia ainda com o tipo e quantidade de hemoglobina presente. Ao perder a capacidade de sintetizar lípidos ou proteínas e carecendo de mitocôndrias que assegurem o metabolismo oxidativo, o eritrócito adulto socorre-se do meio exterior, onde vai buscar as substâncias que se destinam à manutenção da membrana ou que vão ser utilizadas como substratos metabólicos na maquinaria enzimática que dirige a glicólise globular.

Cabe à hemoglobina, devidamente incluída no meio celular que lhe garante, segundo parece, maior eficácia, motivar parte das actividades específicas do eritrócito. Variações quantitativas e/ou qualitativas da hemoglobina, alterações estruturais ou enzimáticas do ambiente em que funciona, acabarão por prejudicar, na generalidade dos casos, o fim a que se destinam os glóbulos vermelhos.

Essa tarefa fantástica, dá ocasião a que cerca de 250 ml do oxigénio, inspirado em cada minuto pelos pulmões de um indivíduo no estado basal, passe para as hemácias, seja transportado e posteriormente libertado para os te-

cidos, em espaços de tempo extremamente curtos. A turbulência circulatória existente nos vasos de pequeno calibre e a enorme superfície total representada pela massa eritrocitária circulante, calculada em cerca de 3000 metros quadrados, facilitam significativamente os resultados pretendidos.

A forma eritrocitária tem muito que ver com a eficácia das transferências gasosas, além de poder influir na vida média globular. A superfície é, normalmente, superior à área mínima necessária para conter o seu volume, a menos que as hemácias se tornem esféricas, o que é indesejável.

A elasticidade da membrana permite, ainda, que o glóbulo se acomode e, portanto, circule nos capilares. A membrana, ao concentrar num espaço limitado milhões de moléculas de hemoglobina, não só aumenta a vida média desta hemoproteína como também a põe em contacto com os sistemas enzimáticos globulares que a mantêm no estado químico óptimo para o transporte de oxigénio.

O invólucro que reveste o glóbulo vermelho surge-nos daqui como elemento essencial à manutenção da anatomia e funções eritrocitárias.

Longe de ser uma barreira inerte, a membrana destaca-se pelo seu dinamismo e selectividade, em parte condicionados pela capacidade de fornecimento energético da glicólise e vitalidade da hemoglobina que engloba.

Equacionando os problemas próprios do eritrócito em dois grandes planos, poder-se-á considerar de um lado a membrana e, do outro, o conteúdo que ela limita. Ambos colhem benefícios desta associação mas, também, sofrem o impacto de qualquer anomalia, intrínseca ou extrínseca, incidente num daqueles sectores.

A análise que se segue fundamenta-se nesta perspectiva, para equacionar os problemas gerais que o glóbulo vermelho enfrenta, de modo a desempenhar cabalmente as suas funções.

ESTRUTURA DO GLÓBULO VERMELHO

Dimensões, forma e conteúdo

A análise de qualquer aspecto morfológico ou funcional próprio dos eritrócitos é complicada pela heterogeneidade da população globular.

Com efeito, e como se verá adiante em mais pormenor, a vida média dos eritrócitos depende da composição e actividade de todos os componentes globulares, sendo ainda sujeita às influências impostas pelo meio em que circula. Durante este processo normal de envelhecimento, a forma e as dimensões dos eritrócitos variam em paralelo com as suas funções: os glóbulos tendem a aumentar de volume e a diminuir em superfície, tornando-se esféricos e, portanto, menos resistentes às influências, osmóticas ou mecânicas, adversas do meio; a composição da membrana globular altera-se, reduzindo-se a carga eléctrica superficial que garante o estabelecimento das forças de repulsão intercelulares, evitando que os glóbulos se toquem e, portanto, se aglutinem; diminui a actividade da ATPase- Na^+ e K^+ dependente, desorganizando as trocas iónicas entre o plasma e o interior do glóbulo e, conseqüentemente, a sua composição, forma, resistência, etc.

Por outro lado, ao considerarem-se situações patológicas originadas por anormalidades genéticas, verifica-se que é frequente existirem duas populações celulares distintas. Em indivíduos com talassémia ou drepanocitose, em heterozigotos com deficiência da desidrogenase da glicose-6-fosfato ou, mesmo, em recém-nascidos normais, detecta-se mais de um tipo eritrocitário diferente.

Apesar de todas as limitações citadas, conhece-se bastante bem, actualmente, a anatomia dos glóbulos vermelhos adultos. De acordo com Bolis e Gomperts (1972), o volume de eritrócitos humanos corresponderia a metade de uma esfera com a mesma superfície. Inúmeras observações (Lessin e Bessis, 1972) permitiram que se comparasse o eritrócito normal circulante a um disco uni- ou bicôncavo (Fig. 1), mantido nesta forma por forças pouco conhecidas.

As variações dimensionais dos glóbulos vermelhos são utilizadas no diagnóstico diferencial das anemias. Hemácias normais apresentam as dimen-

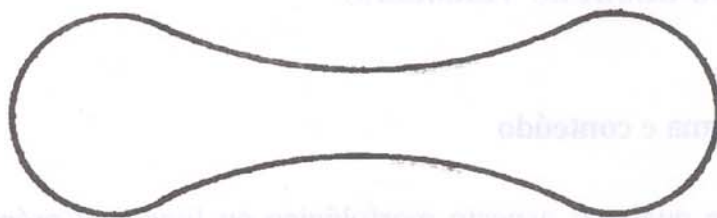


Fig. 1 - Diagrama de um eritrócito normal, observado em corte transversal.

TABELA I

Dimensões aproximadas dos glóbulos vermelhos normais de adultos

Diâmetro	7,5-8,5 μ
Espessura à periferia	2,4 μ
Espessura central	1,0 μ
Volume	83-87 μ^3
Área superficial	145 μ^2

sões médias indicadas na Tabela I, de acordo com Ponder (1948), Wintrobe (1967), Harris e Kellermeyer (1970) e Lessin e Bessis (1972).

O diâmetro e a área superficial tendem a diminuir ligeiramente com a idade. Por outras palavras, os glóbulos vermelhos aproximam-se da forma esférica.

Quando observados em esfregaços, corados de castanho-avermelhado pela solução de Wright ou de cor rosada pela solução de Giemsa, os eritrócitos apresentam-se com o centro mais pálido, deslocando-se para a periferia o máximo da coloração. Este aspecto microscópico reflecte a forma em disco bicôncavo atrás descrita, ainda que sejam notáveis os artefactos que podem surgir da preparação dos esfregaços. Examinados em contraste-fase, os eritrócitos normais surgem como pequenos discos bicôncavos, de cor amarela ou levemente castanho-avermelhada, com área central mais clara, evidenciando, ainda, uma cintilação interna característica. Pensa-se que este aspecto representa os movimentos das moléculas hemoglobínicas, associados à actividade metabólica das hemácias (Burton e col., 1968). A falciformação, a cristalização ou a fixação dos glóbulos vermelhos interrompem a cintilação mencionada.

Cada eritrócito normal e adulto não é mais que uma solução de hemoglobina contida pela membrana, formando um conjunto funcional assegurado por equipamento metabólico suficiente para 120 dias de sobrevivência média. A forma característica com que se apresenta, e que não se observa nos reticulócitos, sugere a existência de um arranjo estrutural próprio, em que determinados componentes são forçados a localizar-se em sectores específicos. Se assim não fosse as células apresentar-se-iam permanentemente esféricas, já que a superfície é, por si, muito superior à área mínima requerida para englobar o volume total eritrocitário.

Foi sobretudo a partir destes factos que surgiu a necessidade de definir a ultra-estrutura das hemácias em pormenor. Ainda que sejam conhecidos alguns dados favoráveis ao conceito de que a ordem da estrutura interna condiciona a forma globular, por meio de factores controladores especiais (Shrivastav e Burton, 1969), diversas experiências motivaram que se considerasse a membrana como o seu principal determinante (LaCelle e Weed, 1971).

Desprovido de núcleo (expulso já no decorrer da diapese do normoblasto ortocromático para os capilares medulares), e tendo ejectado, na fase de maturação reticulocitária, as mitocôndrias, ribossomas e outros organitos citoplásmicos tornados supérfluos (Lessin e Bessis, 1972), o eritrócito é, apesar de toda a sua aparente simplicidade, uma célula (ou, mais correctamente, um elemento celular) bastante complexa.

Beutler e Srivastava (1972) resumiram, em algumas páginas, as principais conclusões a que chegaram diversos investigadores quanto à composição do eritrócito. Além da água, em que é naturalmente rico, destaca-se, a seguir, a quantidade de hemoglobina transportada por cada eritrócito (cerca de 33 g em 100 ml de glóbulos vermelhos ou 5 mM por unidade globular). Em posições inferiores surgem os lípidos, proteínas, sais, nucleótidos, entre outros constituintes. Todos variam com a idade globular mas garantem, quando existem e estão mantidos nas proporções equilibradas normais, a macroestrutura essencial para que os eritrócitos possam desempenhar as funções que lhes estão atribuídas.

Uma das questões mais interessantes, a propósito do glóbulo vermelho, incide sobre a sua forma típica, em disco. Em que medida poderá este aspecto favorecer as funções eritrocitárias ou a adaptação aos canais vasculares em que transita? Há que lembrar que aquele disco, aparentemente rígido, com um diâmetro médio de 8,0 μ , atravessa capilares que podem ser bastante mais estreitos que as dimensões globulares. É nessas etapas que o oxigénio se liberta da hemoglobina, em troca com o anidrido carbónico. Logo, a capacidade de deformação eritrocitária tem algo que a relaciona com as funções dos seus constituintes, sobretudo da hemoglobina ou, em alternativa, permite que os glóbulos sobrevivam, incólumes, aos impactos sucessivos ao nível dos capilares.

Sabe-se hoje (LaCelle e Weed, 1971) que a forma dos glóbulos vermelhos, juntamente com as propriedades mecânicas da membrana que os reveste e o estado físico do conteúdo que englobam, determinam as características

do fluxo eritrocitário na microcirculação. Basta que qualquer daqueles factores, interdependentes, se altere para que as hemácias se tornem mais rígidas e, conseqüentemente, causem perturbações locais na corrente circulatória.

Antes do mais, interessa conhecer as origens ou motivações da forma discoidal dos eritrócitos. Esta forma ou, melhor, o excesso da área superficial em relação ao volume, confere ao glóbulo a possibilidade de se adaptar às dimensões vasculares, desde que a membrana seja deformável e os componentes eritrocitários sejam líquidos, como sucede (Wells e Schmid-Schönbein, 1969).

Hemácias completamente distendidas, com o máximo volume por área, tornam-se corpos rígidos, pouco maleáveis nas travessias capilares. Observa-se esta situação com os glóbulos de doentes com esferocitose hereditária, pouco viáveis em circulação até se remover o baço (Jacob, 1968; Cooper e Jandl, 1972).

Observações várias (Weed e col., 1969) sugeriram que o disco bicôncavo representava a forma energeticamente mais apropriada, em face das proporções existentes entre a superfície e o volume globular. Esta energia não se referia à produzida na glicólise, exprimindo, unicamente, cálculos mecânicos.

Fung e Tong (1968) consideraram que o conceito do «mínimo de energia» não bastava para explicar a forma eritrocitária. Esta dever-se-ia à existência de uma área equatorial mais rígida, envolvendo em anel todo o glóbulo. Pinder (1972) apresentou, a propósito, uma explicação física muito simples, usando bolas com os pólos reforçados como modelo experimental: exercendo pressão sobre a superfície da bola, de modo a deformar a zona de acção, aquele autor verificou que, a certa altura, surgia segunda deformação no sector oposto, crescendo rapidamente até ser limitado pela região equatorial reforçada. Concluiu-se daqui que a forma apresentada pelos eritrócitos normais, semelhante, estaria dependente da composição heterogénea das membranas limitantes e respectivas diferenças de elasticidade. Estas hipóteses concordariam aparentemente com os resultados de Murphy (1965), que propôs ser a forma bicôncava resultante da disposição equatorial do colesterol na membrana globular. Para Fung e Tong (1968) esta localização do colesterol, quando depositado em excesso, teria efeitos contrários, prejudiciais à estabilidade do eritrócito.

Qualquer que seja a explicação encontrada no futuro, não se pode desprezar a participação de um certo número de condicionantes (tensão superficial,

relação entre o raio do glóbulo e a espessura da membrana, diferenças de pressão entre ambas as suas faces, etc.), em equilíbrio mútuo, desde que a membrana possua características deformantes, aliás demonstradas (Blais e Geil, 1969). Forças deformantes exercidas no exterior dessa membrana transmitem-se então, com grande facilidade, ao conteúdo globular (Dintenfass, 1968).

Estes resultados justificam as características próprias, aparentemente anómalas, da viscosidade sanguínea, que declina quando aumentam as forças deformantes aplicadas às membranas globulares. Só assim se explica a possibilidade de os eritrócitos normais escaparem à microcirculação periférica sem lesões restritivas.

Grande parte do conhecimento actual sobre este assunto assenta em estudos da viscosidade do sangue total ou de suspensões eritrocitárias, da observação dos glóbulos no trânsito capilar ou, sobretudo, em tubos de vidro com diâmetros muito finos, além da filtração de eritrócitos normais e anormais através de poros com dimensões conhecidas (La Celle, 1970). Foi daqui que se considerou a interdependência funcional da forma, das propriedades físicas da membrana e da fluidez do conteúdo globular, contribuindo para a flexibilidade dos eritrócitos em circulação.

A membrana das hemácias normais suporta, bastante bem, forças que tendam a dobrá-las, oferecendo grande resistência à distensão. No entanto, as forças de aplicação tangencial, ao aumentarem a tensão superficial, podem conduzir à rotura do glóbulo quando ultrapassam 10 a 15% da sua área normal, qualquer que seja a orientação em que se encontrem. Os eritrócitos são, normalmente, deformáveis em circulação, sem que a área ou o volume sofram modificações, desde que os capilares tenham o diâmetro requerido, Canham e Burton (1968) sugeriram que o «diâmetro mínimo», *in vivo*, existiria na microcirculação esplénica, oscilando pelos 3 μ . Os eritrócitos dispõem-se em discos achatados, com o eixo maior orientado no sentido do fluxo capilar (Skalak e Branemark, 1969). Ao entrar na microcirculação, sobretudo nas zonas mais apertadas, os glóbulos deformam-se de modo a conter no bolbo final a hemoglobina e restante conteúdo, enquanto a extremidade inicial fica praticamente livre. A deformação visualizada representaria apenas a distribuição da hemoglobina e nunca alterações da área superficial. Weiss e Tavassoli (1970) referiram que, além do diâmetro, o comprimento do capilar influi na passagem dos glóbulos vermelhos. Estes, quando normais, conse-

guem atravessar os canais com menos de 3 μ de diâmetro e até 14 μ de extensão, existentes no baço.

O facto de o conteúdo globular ter características próprias dos líquidos torna-se, assim, imprescindível para que o trânsito eritrocitário pelos capilares seja bem sucedido. A flexibilidade da forma e o comportamento do interior globular reflecte-se na viscosidade do sangue, baixando-a quando actuam forças acentuadamente deformadoras, a que o eritrócito se adapta. A agregação dos eritrócitos aumenta, em contrapartida, a viscosidade, quando são mínimas as deslocações de umas camadas sobre as outras, ou seja, quando o diâmetro capilar não atinge o valor crítico característico da microcirculação. Aqui deixa de ter influência a concentração globular, ao contrário do que sucede nos vasos mais largos (LaCelle e Weed, 1971). Pode afirmar-se, portanto, que a capacidade de deformação é correlacionável, inversamente, com a viscosidade do sangue, nas hiperconcentrações globulares.

A forma globular pode ser o reflexo do seu conteúdo ou também das propriedades da membrana, ainda que seja muito difícil diferenciar as respectivas interrelações, sobretudo, no que respeita à capacidade de deformação dos eritrócitos. Enquanto este atributo se mantiver, existem grandes perspectivas de vida activa para os glóbulos vermelhos. A alteração verificada (Gross e Hathaway, 1972) na deformação dos glóbulos fetais de recém-nascidos, mais rígidos e, por conseguinte, menos filtráveis, representará o seu processo final de eliminação prematura. As diferenças metabólicas e estruturais, observadas em relação com eritrócitos de adultos, explicaria a remoção esplénica acelerada dos glóbulos fetais, menos deformáveis.

Membrana-composição, estrutura e funções

Generalidades

A origem da membrana eritrocitária confunde-se, no tempo, com a de todos os invólucros celulares. Estes terão sido motivados pela necessidade de conter num espaço mínimo determinados componentes que, actuando em conjunto, asseguram à célula funções próprias, executadas a nível energético diferente do ambiente exterior (Rutten, 1971). Para que este objectivo fosse

viável as membranas precisariam de seleccionar moléculas, deixando passar para dentro das células apenas as utilizáveis nas suas vias metabólicas. As características das membranas eritrocitárias não devem ser distintas, certamente, das previstas e observadas para os restantes tipos celulares, em geral.

As membranas plasmáticas deixaram de ser consideradas como simples envelopes estáticos, separando o conteúdo celular do exterior. Sabe-se hoje que muitas das actividades bioquímicas tomam lugar naquele revestimento, bem visualizado com microscópios electrónicos. A linha densa, muito fina, que se consegue distinguir com os sistemas ópticos representa uma estrutura complexa, englobando várias camadas de densidades distintas, que se verificou estarem relacionadas, com as funções dinâmicas essenciais à protecção do meio interior (Dewey e Barr, 1970). De qualquer modo, entende-se que a actividade fundamental das membranas biológicas consiste em definir barreiras, activas, entre dois espaços. Todas as restantes funções são, para Guidotti (1972), consequentes daquele atributo. É o que sucede com a permeabilidade relativa das membranas plasmáticas, que permite à célula manter a sua composição química, escolhendo as substâncias mais adequadas ao seu metabolismo. Esta semipermeabilidade sujeita-se todavia, à modificação e controlo por factores externos e internos. As respostas a estímulos hormonais (Shlutz e Marinetti, 1972; Pelletier e col., 1972) ou as variações de permeabilidade iónicas próprias dos potenciais de acção das células nervosas ou musculares (Huxley, 1969; Ohki, 1972; Hille, 1972) são exemplos característicos.

A estrutura exterior da célula contém grupos químicos que lhe permitem relações com células iguais ou diferentes. A individualidade celular está relacionada, p. ex., com os fenómenos de histocompatibilidade (Nicolson e Singer, 1972).

As membranas plasmáticas fornecem também o suporte a diversos enzimas ou proteínas de transporte (Brown e Chattopadhyay, 1971).

Surgiram a certa altura dois problemas: um relacionava-se com a definição da membrana, logo que foi possível dispor de microscópios capazes de diferenciar películas monomoleculares; o outro procurava estabelecer relações entre as funções específicas de cada tipo celular, ou as dos seus corpúsculos, e a estrutura dos respectivos revestimentos.

Desta necessidade nasceram várias hipóteses, traduzidas em modelos teóricos de membranas, tentando correlacionar o tipo estrutural com as actividades desempenhadas pelo meio incluso.

Será uma estrutura com a espessura de uma molécula capaz de executar as funções próprias das biomembranas? Do ponto de vista fisiológico parece ser impossível (Dewey e Barr, 1970; Guidotti, 1972).

Por outro lado, ainda não se obteve a resposta formulada quanto à espessura das membranas, apesar dos estudos efectuados com axónios terem aberto o caminho à sua solução (Robertson, 1972).

Uma fracção bastante considerável das membranas celulares é removível por solventes orgânicos. O material lipídico isolado, quando disposto de modo a constituir uma camada simples na superfície de qualquer solução aquosa, atinge uma área superficial quase dupla da calculada para as células de que foi extraído. Sugeriu-se daqui que as membranas celulares deveriam conter moléculas organizadas em camadas duplas. Estes estudos iniciais realizados com eritrócitos humanos (ver revisão recente por van Bruggen, 1971; Robertson, 1972; Johnston e Roots, 1972) tiveram o mérito de considerar, ainda, a disposição dessas moléculas lipídicas em relação com a água envolvente: as extremidades polares, hidrofílicas contactariam com a água, enquanto o centro da camada dupla albergaria as cadeias de átomos de carbono, apolares.

Observações posteriores, em outros tipos de células, salientaram a discrepância entre a baixa tensão superficial das membranas celulares e a das camadas simples lipídicas, situadas entre ar e água, superior: Concluiu-se que aqueles valores, mais baixos, seriam devidos à absorção de proteínas na superfície das gotas lipídicas. A membrana teria uma espessura aproximadamente igual a 100-200 Å, sendo 50-100 Å atribuíveis aos lípidos. Tomando estes dados em consideração, Danielli e Davson conceberam o primeiro modelo da estrutura geral das membranas (Davson, 1962), muito popular e inalterado até ao início dos anos 60. A proposta considerava as membranas celulares como uma camada dupla lipídica, central, com as extremidades polares das moléculas orientadas para a fase aquosa, coberta em ambas as faces por camadas simples de proteínas, observando perfeita simetria. Não se aludia ao problema de espessura da membrana, aliás mantido em suspenso até ao advento dos estudos com o microscópio electrónico. Entretanto, propusera-se já a disposição radial das moléculas lipídicas, orientadas perpendicularmente em relação com as camadas proteicas, superficiais.

As dificuldades técnicas encontradas no isolamento das membranas dos restantes componentes celulares, aliadas às limitações introduzidas pelos co-

rantes ou fixadores que se usam na microscopia electrónica, originando talvez artefactos excessivos, têm sido obstáculos muito importantes nos estudos realizados. Se as membranas forem as entidades lábeis, variando entre diferentes estados físicos, que as teorias modernas vêm sugerindo, então talvez não se consiga isolar ou ver a verdadeira estrutura das membranas nos tempos mais próximos. Felizmente, para esta revisão, que o revestimento eritrocitário é a excepção à regra, provavelmente por os glóbulos vermelhos não conterem os sistemas membranosos internos comuns aos outros tipos celulares.

Qualquer que seja o modelo estrutural da membrana eritrocitária, muito discutível, consideram-se as proteínas, os lípidos e, acessoriamente, alguns sacáridos, como seus constituintes fundamentais. Este conceito integra-se perfeitamente no da universalidade da estrutura lipoproteica de todas as membranas celulares (van Bruggen, 1971; Finkelstein, 1972). No conjunto, a membrana representa apenas 3,4% do peso seco globular (Ponder, 1954). Os hidratos de carbono representam menos de 10% de toda a membrana, combinando-se geralmente com as suas proteínas e lípidos (Guidotti, 1972).

Estes compostos existem em proporções quase equilibradas, ainda que as proteínas, mais abundantes, totalizem cerca de 50% do peso da membrana (Maddy e Malcolm, 1965). Os revestimentos eritrocitários são, por via desta composição, englobados na classe das membranas plasmáticas, caracterizada pelo equilíbrio quantitativo lipoproteico. Guidotti (1972), ao rever o assunto, sugeriu que a concentração proteica é tanto mais elevada quanto maior é o número de actividades enzimáticas ou de transporte em que estão envolvidas as membranas. Assim, enquanto nos revestimentos com funções puramente restritivas, como sucede na mielina, é enorme a percentagem de lípidos (cerca de 75%), nas mitocôndrias sucede o inverso (75% de proteínas), o que, à luz desta ideia, é perfeitamente justificado, conhecendo-se a importância das funções de fosforilação oxidativa e o local de fixação dos seus participantes na membrana interna do organito. As membranas eritrocitárias, além de servirem de barreiras semipermeáveis, contêm enzimas e sistemas de transporte específicos, sucessivamente identificadas entre os constituintes proteicos superficiais (Wallach, 1972; Razin, 1972).

Lípidos e proteínas

Todos os lípidos dos glóbulos vermelhos adultos estão localizados nas respectivas membranas, de que perfazem $\frac{1}{4}$ do peso (Dodge e col., 1963). Cerca de 95% do total lipídico é preenchido pelos fosfolípidos (aproximadamente 70%) e colesterol. Em bases molares, existem em proporções quase equilibradas (0,8), com predomínio ligeiro dos fosfolípidos, se bem que a concentração do colesterol seja bastante variável. Os glicolípidos apresentam-se em menor quantidade, sendo insignificante o contributo dos ácidos gordos livres. Estes são, na maioria, do tipo não saturado e de cadeia média (Dodge e Phillips, 1967; Turner e Rouser, 1970; Cooper, 1970; Guidotti, 1972) variando em composição com a idade globular (Phillips e col., 1969).

Os fosfolípidos mais frequentes nas membranas eritrocitárias são a fosfatidilcolina (30%), fosfatidiletanolamina (28%), fosfatidilserina e fosfatidilinositol (14%), e a esfingomiéline (25%). Escasseiam os lisofosfátidos, potencialmente perigosos para a integridade globular. Como sugere a designação, estes compostos facilitam a lise eritrocitária, existindo pelo menos três mecanismos para os manter aos níveis baixos verificados nas membranas (Shohet, 1972).

Além da fase reticulocitária deixa de haver síntese de ácidos gordos, por eliminação da acetil-CoA-carboxilase, mantendo-se o alongamento das suas cadeias (Pittman e Martin, 1966).

A composição lipídica da membrana globular passa a depender, portanto, de trocas passivas e rápidas entre os ácidos gordos livres no plasma e os daquele revestimento (Phillips e col., 1969). Pensa-se que o grau de equilíbrio atingido depende do tipo de ácidos gordos considerados. A passagem destes compostos para a membrana é facilitada pela presença de ATP e, talvez, do coenzima A (Shohet e col., 1967). Os ácidos gordos incorporados aparecem usualmente fixados à posição 2 do glicerol.

Alguns dos fosfátidos globulares, sobretudo a fosfatidilcolina, equilibram-se também com os do plasma. (Shohet, 1970). Passa-se o mesmo com os lisofosfolípidos que, provindo do plasma, são acilados na membrana, participando na renovação dos seus fosfolípidos (di-acil). O fosfatidil produzido nesta reacção dirige-se para sectores da membrana diferentes dos que o recebem directamente do plasma, por troca passiva. Outro processo de síntese requer duas moléculas de lisofosfatidilcolina, originando-se uma de fosfati-

dilcolina e outra de glicerilfosfatidilcolina. Os restantes lisofosfolípidos são degradados pela fosfolipase-B (Shohet, 1972).

A fosfatidiletanolamina poderá derivar, também, por acilação do respectivo lisofosfolípido. As fosfolipases, que se pensa existirem na membrana globular ou no plasma, serão responsáveis pelo retorno de ácidos gordos livres para o meio em que circulam os eritrócitos. Considera-se que a maior parte da renovação lipídica ocorre por trocas das respectivas moléculas ou pela incorporação dos ácidos gordos livres, plasmáticos, na membrana.

É notável a quantidade de colesterol não esterificado existente nas membranas dos eritrócitos humanos, em equilíbrio com o plasmático (Murphy, 1965). Pensa-se que esta característica é regulada pela actividade de uma transferase específica do plasma. É discutível o sector em que se deposita o colesterol na membrana globular, havendo dados a favor de uma distribuição uniforme e outros restringindo-o às zonas convexas dos eritrócitos (Cooper, 1970).

As variações notadas nas quantidades de colesterol das membranas, assim como os níveis atingidos, levam a que se lhe atribua funções controladoras da fluidez das cadeias de carbono dos fosfolípidos (Chapman e Wallach, 1968). As membranas dos glóbulos vermelhos estariam em estado mais próximo do líquido que do sólido.

Entre os glicolípidos da membrana do eritrócito humano não se encontram gangliósidos ou sulfátidos, enquanto os existentes, além da esfingosina e de um ácido gordo de cadeia comprida, contêm glicose, galactose e N-acetil-galactosamina ou N-acetilglicosamina, num total de quatro hexoses, em geral (Sweeley e Dawson, 1969). Várias destas moléculas constituem os grupos sanguíneos, com funções próprias dos antigénios teciduais ou de reconhecimento intercelular, aliás repartidas com as glicoproteínas (Marcus, 1969; Bird, 1972a).

Em que medida poderá a composição lipídica das membranas influenciar as suas características ou, também, a própria resistência e vida dos eritrócitos? Tudo leva a crer que o tipo e variações quantitativas dos lípidos são factores importantes para a estabilidade e funções do revestimento globular. Ainda que os ácidos gordos aqui localizados possam reflectir as características da dieta, as modificações da composição da membrana nos restantes lípidos evidenciam-se, *in vivo*, apenas em condições patológicas (Cooper, 1970).

Chen e col. (1971) consideraram que o aumento de ácidos gordos não satu-

rados no conteúdo lipídico das membranas favorecia a permeabilidade não iónica, talvez por os fosfátidos resultantes se unirem menos eficazmente às proteínas e moléculas de colesterol aí existentes (Fox, 1972). A conformação *cis* entre ácidos gordos não saturados de série homóloga incrementa a permeabilidade e flexibilidade da membrana (Chapman e Wallach, 1968). Entretanto, a permeabilidade iónica é usualmente relacionada com as extremidades polares dos fosfolípidos, Shohet (1972) duvida que a fracção lipídica das membranas seja a única a participar na permeabilidade ou flexibilidade celular. As características dos ácidos gordos influenciavam realmente, mas de modo indirecto, aquelas propriedades ao afectarem as interacções dos lípidos com as proteínas e, portanto, as respectivas conformações.

O cálcio parece exercer um efeito notório na permeabilidade e flexibilidade das membranas, ao reagir com as seus lípidos (Burt e Green, 1971). A fixação do cálcio à membrana eritrocitária é mediada pela produção glicolítica de ATP (Weed e col., 1969).

Quando os níveis baixam, tal como acontece nos glóbulos sequestrados no baço ou envelhecidos, diminui a capacidade do mecanismo de expulsão activa do cálcio para o exterior, ocasionando a união deste catião aos lípidos da membrana. LaCelle (1970) constatou que nestas situações os eritrócitos são menos deformáveis. Do conjunto, concluiu-se que o cálcio participa activamente na regulação da flexibilidade e permeabilidade dos eritrócitos, ao modificar as características dos lípidos que os compõem.

Enquanto os ácidos gordos livres dos eritrócitos variam em qualidade com a dieta, o colesterol e os fosfolípidos permanecem imutáveis (Cooper, 1970). Desconhece-se em que medida poderão aquelas alterações influir na sobrevivência dos glóbulos vermelhos humanos, apesar de ratos submetidos a dietas sem lípidos evidenciarem, maior fragilidade osmótica e decréscimo de vida média. Por outro lado, não existem dados concretos que confirmem a hipótese de que eritrócitos adultos, ultrapassando a fase de maturação *in vivo*, continuam a perder constantemente os lípidos das respectivas membranas.

Os trabalhos de Murphy (1965) chamaram a atenção, todavia, para algumas variações de composição lipídica das membranas de glóbulos incubados na presença ou ausência de glicose: em condições homeostáticas diminuía a quantidade de colesterol, enquanto sem glicose eram removidos, além do colesterol, os fosfolípidos. A perda do colesterol ocasionava aumento da fragilidade osmótica, ao fim de 24 horas de incubação, a 37° C.

O colesterol seria desviado das membranas para o soro, onde se esterificava por acção da lecitina-colesterol-aciltransferase deixando de poder incorporar-se na fracção lipídica do revestimento globular. Eritrócitos osmoticamente frágeis, após a saída do colesterol, regressavam à normalidade se a transferase sérica fosse inactivada ou depois de reintroduzidos na circulação, *in vivo* (Cooper e Jandl, 1969a). A perda associada do colesterol e fosfolípidos de glóbulos metabolicamente debilitados conduzia, posteriormente, à depleção das proteínas da membrana, proporcional à diminuição da área superficial eritrocitária. Estas condições eram, contudo, irreversíveis, contrastando com a remoção específica do colesterol (Weed e col., 1969).

Praticamente todas estas alterações são passíveis de induzir hemólise *in vivo*, em situações patológicas. Estas incidem em dois pontos: ou afectam o meio extracelular e reflectem-se secundariamente na membrana, ou têm o seu local de acção no próprio revestimento globular.

Entre as da primeira categoria sobressaem, pela maior frequência com que aparecem, as hemólises congénitas ou subsequentes a algumas doenças hepáticas, em particular quando associadas a icterícias obstrutivas (Cooper e Jandl, 1969a). Os glóbulos tomam um aspecto característico, «em ouriço», devido à presença de numerosas projecções na superfície exterior, aparentemente ocasionadas pela elevação da quantidade de colesterol depositado na membrana. Em outras ocasiões surgem «células» em alvo, sendo notório o incremento não só do colesterol como, também, da lecitina (Cooper e Jandl, 1969b). Se bem que osmoticamente mais resistentes por vezes, os glóbulos vermelhos passam com maior dificuldade pela microcirculação esplénica, onde perdem fragmentos da membrana e, portanto, diminui a sua área superficial. Ambos estes factores predispõem à destruição eritrocitária pelo baço e restante sistema retículo-endotelial.

Estas situações resultariam, ou do declínio da actividade da lecitina-colesterol-aciltransferase, independentemente de qualquer factor ou por inibição pelos ácidos biliares (aumentados nas obstruções das vias biliares), ou, em alternativa, o equilíbrio de partilha do colesterol livre entre as lipoproteínas séricas e a membrana eritrocitária seria modificado pelos ácidos biliares. Em qualquer das hipóteses haveria maior quantidade de colesterol e, acessoriamente, lecitina, disponíveis no soro e aptos a ingressar nas membranas dos glóbulos vermelhos.

Cooper e col. (1972) verificaram que, na realidade, a actividade daquela

transferase era inferior ao normal em indivíduos com células «em alvo» ou em «ouriço», apesar da escassa relação notada com as anomalias lipídicas. Os níveis de ácidos biliares séricos correlacionavam-se muito pouco, também, com os lípidos eritrocitários ou séricos.

O problema mantém-se, assim, bastante confuso e aguarda novas observações esclarecedoras.

Cooper (1970) e Shohet (1972) focaram um cedo número de outras anomalias do metabolismo lipídico, com reflexo nos níveis plasmáticos e relacionados com a composição da membrana eritrocitária. Na generalidade dos casos tem sido difícil obter conclusões exactas sobre a hemólise verificada e aquelas alterações.

A esferocitose hereditária é usualmente tida como resultante provável da interação lípido-proteica na membrana dos glóbulos, com reflexo na resistência destes em circulação.

Inicialmente (Jandl e col., 1961), atribuiu-se a forma esferocítica à escassez de lípidos na membrana, limitando a capacidade de deformação globular. Verificou-se, posteriormente, que os esferócitos incubados bastante tempo perdiam muito mais lípidos que glóbulos normais, notando-se a saída isolada do colesterol nas incubações rápidas (Cooper e Jandl, 1969b). Estas observações lançaram as bases da hipótese que considera os esferócitos como consequentes a modificações da afinidade entre as proteínas e os lípidos das membranas (Nathan e Shohet, 1970). A aceleração das perdas de lípidos eritrocitários, durante a depleção metabólica, expressaria a necessidade de energia para que a união lípido-proteica se concretizasse, talvez por ajustamentos conformacionais. Por outro lado, mesmo depois da remoção do baço, os esferócitos mantêm os lípidos em concentrações idênticas às anteriores à esplenectomia, além de conservarem a forma e continuarem osmoticamente frágeis. Os lípidos, ainda que existindo em menor concentração, não seriam os únicos responsáveis pela forma esferocítica e efeitos hemolíticos. Registe-se, no entanto, que a sobrevivência dos esferócitos aumenta quando são introduzidos na circulação de doentes hepáticos com células «em alvo» ou «ouriço», onde abunda o colesterol e a lecitina.

A comunicação de Jacob e col. (1970), a propósito de uma proteína aparentemente específica dos esferocitos, com características idênticas às da actina, talvez permita, em breve, a decifração deste assunto, encarado por outro ângulo.

As proteínas, que constituem o mais importante componente das membranas eritrocitárias, subdividem-se em dois grupos, um formado pelos enzimas e o outro pelas proteínas que participam na sua estrutura e conformação próprias (Bolis e Gumperts, 1972).

A análise dessas proteínas, separadas dos lípidos, tem revelado grande heterogeneidade quer no peso molecular ou nos aminoácidos que as constituem. Apesar dos sucessos alcançados, ainda estamos longe de compreender a função de cada uma das proteínas individualizadas.

Tem sido isolado das membranas globulares um certo número de preparações com actividade enzimática. É provável que esses enzimas estejam unidos à superfície da membrana, em vez de constituírem fracções integrantes da sua estrutura, podendo mesmo equilibrar-se com enzimas idênticos, não fixados, existentes no citoplasma eritrocitário (van Bruggen, 1971).

A união dos enzimas à membrana torna-se sobretudo vantajosa ao desempenho de funções coordenadas, tais como as de algumas etapas da glicólise (p. ex., as catalisadas pela aldolase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e fosfoglicerato-quinase). Tanner e Gray (1971) isolaram da membrana de glóbulos vermelhos humanos, e identificaram como sendo a desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, um polipéptido com 33 000 daltons, compreendendo 5% do total proteico daquele revestimento. A organização física própria da membrana torna-se fundamental a estas actividades (Beutler, 1972a).

A acetilcolinesterase une-se à membrana das hemácias, constituindo um polipéptido com peso molecular aproximadamente igual a 90 000, que totaliza cerca de 0,2% da fracção proteica das membranas (Bellhorn e col., 1970). Os eritrócitos humanos são, entre os de mamíferos, aqueles que apresentam maior actividade da acetilcolinesterase. A actividade deste enzima tem a particularidade de variar em associação com diversas condições patológicas, se bem que as suas funções fisiológicas continuem por esclarecer. Sabe-se, no entanto, que os eritrócitos jovens têm maior actividade da acetilcolinesterase, justificando os níveis aumentados verificados na aceleração da eritropoiese (Herz e Kaplan, 1973).

A ATPase- Na^+ , K^+ , também localizada na membrana eritrocitária compõe-se de duas cadeias polipeptídicas, com 83 000 e 57 000 daltons de peso molecular (Dunham e Gunn, 1972). Foi possível identificar, em membranas de eritrócitos de bovinos, o intermediário fosforilado da ATPase- Na^+ , K^+ ,

além de outra proteína, também fosforilada, aparentemente relacionada com funções estruturais na manutenção da forma globular (Williams, 1972).

Entretanto, Rubin e col., (1972) encontraram uma proteína-quinase responsável pela fosforilação de componentes das membranas de eritrócitos humanos, especificamente activada pelo AMP cíclico. O receptor para este nucleótido integrar-se-ia firmemente na estrutura da membrana, enquanto o componente catalítico estaria unido por forças menos potentes. Desconhece-se qual é a verdadeira função desta proteína-quinase mas deixa-se em aberto a possibilidade de poder influenciar, por acção do AMP cíclico, as funções eritrocitárias (p. ex., estimulando a glicólise -Ford e Omachi, 1972) ou ser simples ponto de fixação para o transporte e armazenamento daquele nucleótido cíclico.

As proteínas estruturais incluem muitas cadeias polipeptídicas, de dimensões variáveis entre 280 000 e 15 000 daltons (Guidotti, 1972). Nenhuma parece participar além de 20% a 25% no total proteico, ainda que, no conjunto, as maiores perfaçam cerca de 60% das proteínas da membrana (Fairbanks e col., 1971).

Entre as fracções mais importantes, salienta-se a que, englobando quase 25% do total proteico, é constituída por três cadeias polipeptídicas, duas de grandes dimensões e a restante com 47 000 daltons de peso molecular. A composição assemelha-se à da actomiosina muscular. Na presença de catiões polimeriza-se e forma filamentos enrolados, sendo-lhe atribuídas funções relacionadas com a função globular (Marchesi e Steers, 1968; Hulla e Gratzer, 1972). Esta «espectrina» poderá ser idêntica às proteínas do tipo da actina, encontradas anteriormente nas membranas eritrocitárias, a que parece estar circunscrita a actividade da ATPase- Ca^{++} (Rosenthal e col., 1970). A remoção das moléculas contrácteis existentes na membrana ocasionaria o colapso dos eritrócitos. Robertson (1972) distinguiu estes polipéptidos ao microscópio electrónico como um conjunto de fibras idênticas às de actomiosina. A membrana eritrocitária seria, de acordo com este autor e com a maioria dos dados conhecidos, composta por uma zona central, sobretudo lipídica, talvez disposta em camada dupla, associada a componentes proteicos formando duas camadas simples de cada lado da parte lipídica, perfeitamente assimétricas entre si e mais condensadas na fase interna que na externa.

A coesão da membrana seria assegurada pela rede de fibras contrácteis, revestindo todo o glóbulo vermelho. Os lípidos e as proteínas parecem manter-se

unidos, também, por ligações electrostáticas, das mais importantes para o estabelecimento de qualquer membrana (Sheetz e Chan, 1972).

Pelo que se afirmou, é possível agrupar em duas categorias, muito discutíveis, os modelos apresentados para explicar a disposição relativa dos lípidos e proteínas nas membranas eritrocitárias. No primeiro grupo encontra-se o esquema de Davson, Dannielli e Robertson, em que o centro é composto por duas faixas, monomoleculares e adjacentes, de fosfolípidos. Em cada «folha» as extremidades polares (colina, etanolamina, etc.) apontariam para o exterior, enquanto as caudas hidrofóbicas ficariam em contacto ou misturadas no meio da membrana. O colesterol dispor-se-ia na camada lipídica, em posição intermediária entre as zonas polares e apolares, de modo a permitir a acção coesiva das forças de van der Waals. As superfícies polares entrariam em contacto, do lado interno e externo da membrana, com camadas proteicas essencialmente na conformação β .

Exames ultramicroscópicos de membranas eritrocitárias, originais ou obtidas por recombinação de lípidos e proteínas, confirmaram o aspecto trilaminar, com espessura aproximada a 70-80 Å (Zahler e Weibel, 1970). No conjunto, sugere-se que os lípidos actuam como cofactores estruturais das lipoproteínas. A apoiar esta hipótese encontram-se os estudos com membranas lipídicas modificadas, consideradas como a essência dos revestimentos celulares (Finkelstein, 1972).

Modelos deste tipo têm, contudo e em geral, a grande desvantagem de não tomarem em devida consideração as funções próprias de cada tipo celular, além de não estarem em acordo com alguns aspectos ultramicroscópicos observados (Lessin e col., 1972), ainda que assimetria notada na distribuição dos fosfolípidos (a fosfatidilcolina e a esfingomiéline predominariam na metade externa da camada lipídica das membranas celulares da maioria dos mamíferos) tenda a ladear o problema (Bretscher, 1972).

Na segunda categoria dos modelos estruturais da membrana consideram-se os lípidos agrupados em subunidades ou micelas globulares lipoproteicas, formando mosaicos contínuos. Estes esquemas, por serem também insuficientes para explicar as funções específicas das membranas, motivaram o aparecimento de modelos híbridos, em que se salienta o equilíbrio dinâmico da camada dupla lipídica e micelas lipoproteicas, suficientemente flexível para originar poros e, portanto, justificar a passagem de diversas substâncias (ver revisão por Johnston e Roots, 1972).

Entretanto, além de revestirem assimetricamente ambas as faces, algumas proteínas orientam-se de modo a atravessarem, ou penetrarem um pouco, a espessura da membrana eritrocitária (Steck e col., 1971), mais conforme ao esquema da estrutura geral das membranas (em mosaico) proposto por Singer e Nicolson (1972).

Para Capaldi e Green (1972) haveria duas espécies de proteínas estruturais, umas, intrínsecas, penetrando parcial ou totalmente através da membrana, outras, extrínsecas, mantidas à superfície por interações electrostáticas constituindo cerca de 50% do total proteico. As observações de Vanderkooi (1972) sobre a localização da rodopsina, mergulhada na membrana dos bastonetes, são favoráveis a este esquema. A «espectrina» seria um exemplo concreto de proteína extrínseca.

A posição de Stoeckenius (1972) procura conciliar os antagonismos descritos através de uma proposta bastante razoável: a membrana seria realmente composta, essencialmente, por uma camada dupla de lípidos, revestida por duas de proteínas, formando a barreira de que a célula carece; alterações localizadas na fracção lipídica, em zonas especializadas, assegurariam o transporte quando necessário. Esta é, aliás, a proposta de Finkelstein (1972), assim como a dos investigadores que, nos últimos anos, têm alinhado com o conceito da membrana trilaminar (Bangham, 1972).

Receptores

Além das proteínas mencionadas, que se inter-relacionam estreitamente com a parte lipídica para darem corpo à membrana, há que mencionar as cadeias polipeptídicas, com peso molecular entre 100 000 e 80 000, a que estão ligados resíduos de açúcares (Lenard, 1970). Estas moléculas contêm a actividade antigénica AB e MN, entre outras funções, parecendo dispor-se à superfície exterior da membrana globular (Marchesi e Andrews, 1971; Jackson e Seaman, 1972).

As glicoproteínas tal como os glicolípidos, tornam-se essenciais para que os eritrócitos mantenham a sua individualidade, quer sejam de indivíduos diferentes quer no próprio meio em que circulam em conjunto com elementos da mesma linhagem.

Com efeito, os seres multicelulares organizam-se em comunidades de cé-

lulas com actividades coordenadas. Essas unidades obedecem a características próprias, quer de função quer de estrutura, determinantes da especialização tecidual. A actividade de transporte e o contacto intercelular determinam a organização tecidual e a regulação do seu comportamento em grupo (Benedetti e col., 1973). Constata-se que existe ordem, pré-determinada na herança genética. O ambiente poderá, ou não, modificar significativamente o genótipo celular e, daqui, todo o organismo.

O estabelecimento da ordem celular deverá depender, em absoluto, da troca de informações entre as diversas unidades que constituem órgãos ou tecidos do mesmo corpo vivo. Só assim se compreenderá o crescimento, a diferenciação celular e a manutenção de homeostase em organismos multicelulares com desenvolvimento normal.

O fácil entendimento destas afirmações, que parecem verdades óbvias e estão ilustradas por inúmeros exemplos, não implica que o assunto ainda permaneça como um dos problemas centrais da biologia, pleno de atractivos e de importância, mas por enquanto pouco esclarecido.

Ainda que os conhecimentos actuais sejam algo limitados, há provas concretas que demonstram a existência de duas grandes formas de comunicação intercelular: umas que ocorrem através de contactos directos entre superfícies celulares adjacentes, outras que são mediadas por moléculas mensageiras que, lançadas nos sistemas circulatórios ou espaços intercelulares, vão transportando o sinal até aos receptores de células distantes. Ambas permitem que a célula reconheça os seus limites físicos e potencialidades funcionais.

Entre os exemplos do primeiro grupo encontram-se os interessantíssimos resultados de Loewenstein (1972), obtidos em diversos tecidos epiteliais analisados: os líquidos intracelulares podem difundir-se de uma célula para outra logo que as superfícies das respectivas membranas entrem em contacto mútuo. Os pontos de junção, devidamente isolados, são 1 000 a 10 000 vezes mais permeáveis aos iões inorgânicos utilizados do que as superfícies não aderentes entre si (Loewenstein, 1970). A concentração intracelular do ião cálcio condiciona a formação daqueles pontos de contacto: quando os níveis de cálcio no citoplasma se aproximam dos plasmáticos interrompe-se a comunicação intercelular. Este efeito pode ser consequente à redução do transporte activo do cálcio para o exterior, o que, como ficou demonstrado, se encontra associado à síntese do ATP e de outras fontes de energia intracelulares.

Moléculas de razoáveis dimensões (até cerca de 10 000 de P.M.) poderão

recorrer a este processo de comunicação intercelular. Neste grupo de partículas encontrar-se-iam metabólitos e outras substâncias cuja acção específica incide na regulação da actividade genética. As zonas de contacto intercelular seriam, assim, pontes de passagem segura para as moléculas controladoras do crescimento e diferenciação das células. De acordo com esta ideia, em todas as situações em que o desenvolvimento celular fosse desordenado, como sucede no cancro, não haveria comunicação de célula para célula. A hipótese está hoje comprovada, pelo menos para alguns tipos tumorais, *in vitro*: não se observaram zonas de junção entre duas ou mais células tumorais nem entre células cancerosas e normais (Loewenstein, 1973).

A passagem de informação através das zonas de aderência celular encontradas nos epitélios normais não se aplica, contudo, aos eritrócitos circulantes, pelo menos nas fases que precedem o seu envelhecimento. Na realidade, a membrana das hemácias tem carga negativa, que diminui à medida que os glóbulos envelhecem (Yaari, 1969). Aquelas cargas, que vêm sendo atribuídas aos grupos carboxílicos do ácido siálico do revestimento eritrocitário (Winzler, 1969; Bolis e Gomperts, 1972), são aparentemente suficientes para explicar as forças de repulsão intercelular que evitam os contactos entre os glóbulos circulantes; a redução da carga negativa, por tratamento enzimático dos glóbulos vermelhos, favorece a aglutinação por agentes químicos (Marikovsky e Danon, 1969) ou diminui a sua mobilidade electroforética (Streiff e col., 1971).

Estarão os eritrócitos desprovidos da capacidade de comunicar entre si ou de receber sinais exteriores? Sabe-se hoje que não. As reacções imunológicas ou as adaptações funcionais do glóbulo vermelho a diferentes situações de oxigenação, são exemplos bem claros e que atestam a sua susceptibilidade a influências exteriores, independentemente de quaisquer contactos directos célula-célula.

Uma grande variedade de actividades biológicas, não confinadas apenas aos sistemas hematológicos, requer a participação de receptores nas superfícies celulares.

Muitos destes processos, em que se identificaram claramente sectores específicos destinados à recepção dos sinais metabólicos, associam-se a funções especializadas; os receptores encontram-se apenas na população celular a que está destinada uma determinada actividade (Kornfeld e Kornfeld, 1971). É o que sucede, por exemplo, com os receptores adaptados ao com-

plexo vitamina B₁₂-factor intrínseco, localizados no epitélio do íleon distal (Mackenzie e col, 1968).

Por outro lado, a distribuição dos receptores poderá disseminar-se quando os efeitos biológicos incidem em diferentes tipos celulares, como se observa para a insulina (Illiano e Cuatrecasas, 1972), glucagina (Rodbell, 1972), catecolaminas (Rall, 1972), entre outras hormonas (Butcher e col., 1972).

A presença ou ausência de receptores nas membranas não é, contudo, o único factor de que depende a ocorrência de uma resposta ao seu estímulo específico. Nota-se este aspecto a propósito de fitoemaglutinina que, tendo receptores apropriados nos eritrócitos e linfócitos, ocasiona efeitos mutagénicos apenas neste tipo de células (Kornfeld e Kornfeld, 1971).

De qualquer modo, o facto de existirem receptores localizados em populações celulares seleccionadas, a que estão distribuídas funções específicas, é, só por si, prova bastante clara de que as membranas celulares são estruturas heterogéneas.

Há que admitir que os receptores das superfícies celulares, sendo componentes da membrana, apresentam estruturas adaptadas às moléculas exteriores a que se destinam. Usando membranas extraídas de células adiposas, Rodbell e col. (1970) conseguiram diferenciar os receptores específicos para a ACTH, epinefrina e secretina, recorrendo a agentes bloqueantes apropriados, ainda que o enzima estimulado (a adenilato ciclase) fosse comum a todas as hormonas.

A diversidade dos sinais metabólicos existentes, a par dos problemas técnicos que surgem ao tentar separar-se os receptores, com estrutura e funções intactas, do resto da membrana, continuam, no entanto, a ser os maiores obstáculos ao esclarecimento deste assunto.

O sucesso obtido nas pesquisas levadas a termo sobre os receptores de glucagina (Desbuquois e Cuatrecasas, 1972) e da insulina (Freychet e col., 1972), existentes nos hepatócitos, parece indicar que, num futuro próximo, será possível identificar a estrutura bioquímica da generalidade dos receptores, bem como a sua integração nas membranas celulares.

Os receptores específicos de fitoemaglutinina continuam a ser, apesar de tudo, os mais esclarecidos. Seguindo-se à sua libertação da superfície eritrocitária, por acção de tripsina, conseguiu-se purificar o receptor solubilizado e, nesta forma, verificar que a especificidade daquela glicoproteína residia nos oligossacáridos da molécula (Kornfeld e Kornfeld, 1970); a manose e a

galactose seriam açúcares importantes para a manutenção da actividade do receptor, ao inverso do ácido siálico, sem influência aparente. A porção peptídica do receptor seria também fundamental para a sua função; a digestão proteolítica da glicoproteína de elevado peso molecular, que constitui factor estrutural importante das membranas eritrocitárias, ocasionaria a perda de 90% da actividade biológica daqueles receptores. Sugeriu-se que as proteínas constituiriam o suporte apropriado para que as cadeias de oligossacáridos se mantivessem na conformação funcionalmente ideal.

Winzler (1969) havia proposto que a molécula glicoproteica estaria unida à membrana celular pelo segmento peptídico, na extremidade carboxílica, orientando-se a porção restante para o exterior, talvez sob a forma de uma haste mais ou menos rígida, por acção dos grupos siálicos. Os receptores para a fitoemaglutinina seriam parte integrante da glicoproteína das membranas eritrocitárias, o mesmo sucedendo com os receptores para os anticorpos dos sistemas MN. Parte dos haptenos dos grupos A e B surge também na glicoproteína mencionada, distribuindo-se o resto pelos glicolípidos (Maddy, 1970).

Conhecem-se actualmente numerosos anticorpos, homólogos e heterólogos, contra os antígenos da superfície eritrocitária. A maioria tem sido identificada na sequência de estudos sobre as compatibilidades dos grupos sanguíneos. As estruturas e propriedades gerais daqueles anticorpos podem ser analisadas a par dos grupos antigénicos que lhes servem de alvo, em que é comum a presença de oligossacáridos (Rosse e Lauf, 1970; Bird, 1971).

As funções a que se destinam os radicais químicos que, simultaneamente, servem de haptenos dos grupos sanguíneos, não deverão relacionar-se, senão por coincidência, com as suas propriedades imunológicas.

Entre diversas possibilidades, no conjunto pouco esclarecidas, parecem estar reservadas aos antígenos superficiais das membranas eritrocitárias actividades reguladoras da interacção celular.

Com efeito, toda a camada exterior do revestimento globular comporta-se, como já se disse, como um polianião (Winzler, 1969; Bird, 1972a). As cargas negativas das superfícies eritrocitárias, originadas na ionização dos grupos carboxílicos das moléculas de ácido siálico, e que mantém os glóbulos separados uns dos outros em circulação, são bloqueadas, em parte, assim que se sensibilizam as hemácias com anticorpos específicos. Os glóbulos vermelhos podem aglutinar-se logo que, entre cada par, surjam anticorpos bivalentes.

Desta acção, que resulta da alteração da carga superficial do eritrócito e que constitui a principal característica dos anticorpos em causa, quer participem ou não os componentes do complemento sérico, poderá depender a sobrevivência dos glóbulos vermelhos (Rosse e Lauf, 1970).

Esses antigénios diferem de indivíduo para indivíduo, sendo a sua presença ou ausência usada como base de classificação dos grupos sanguíneos humanos. Ginsburg (1972) refere que estão descritos mais de 250 antigénios eritrocitários, distribuídos por sistemas genéticos distintos. O mais importante é o ABO, em que os genes A e B, ao actuarem no substrato H determinado pelo gene H, produzem os antigénios A e B, respectivamente. O gene H utiliza um substrato precursor, glicoproteico ou glicolipídico, que termina numa cadeia oligossacárida com a estrutura β -galactose-(1-3) ou (1-4)-N-acetilglicosamina-(1-3)- β -galactose, etc. Os grupos O são ricos em H, por não haver genes A ou B que utilizem, aquele substrato. Existe uma situação muito rara (grupo «Bombaim») em que falta também o gene H (Bird, 1972a).

Exceptuando os antigénios dos grupos Lewis, todos os dos restantes grupos sanguíneos são parte intrínseca das membranas eritrocitárias. O sistema Lewis é constituído por esfingolípídeos que, circulando no soro associados às lipoproteínas locais, acabam por se fixar nos glóbulos vermelhos (Marcus, 1969). O revestimento próprio destes elementos celulares adapta-se perfeitamente a antigénios livres na circulação. Esta característica, que explica a facilidade de aglutinação evidenciada pelas hemácias, sempre que postas em contacto com os respectivos anticorpos, é frequentemente explorada em testes de hemaglutinação.

Bird (1971) considerou que os eritrócitos normais podem estar sujeitos a aglutinações aparentemente inespecíficas, devido à presença de variadíssimas substâncias no soro, em que se incluem auto-aglutininas, aglutininas para os grupos sanguíneos mais frequentes, múltiplas isoaglutininas específicas ou produtos de contaminação bacteriana e viral.

Noutras situações, tais como na TN-poliaglutinação, é a alteração química da estrutura da membrana eritrocitária que fundamenta a aglutinação de uma das duas populações globulares, coexistentes em determinado indivíduo, pelo anti-Tn existente no soro da maioria de humanos adultos (Bird, 1972b). Esta Tn-poliaglutinação talvez constitua um síndrome hemotológico definido, aparentemente adquirido, caracterizado por anemia hemolítica, leucopénia e trombocitopénia. O envolvimento simultâneo de eritrócitos,

leucócitos e plaquetas sugere que o factor, ou factores (até agora de origem desconhecida), responsáveis pelas alterações Tn, actuam na medula óssea (Bird e col., 1971). A N-acetilgalactosamina parece ser o principal determinante estrutural da especificidade Tn, funcionando como um antigénio receptor, exposto em consequência da remoção do ácido siálico a que estava ligado na superfície eritrocitária.

Do que foi dito, concluiu-se que a antigenicidade celular depende do tipo de grupos químicos que determinados componentes de membrana expõem na sua superfície plasmática.

Como antigénios, englobam-se constituintes estruturais, enzimas e receptores hormonais, entre outras substâncias que, no conjunto, poderão designar-se como receptores celulares.

A aplicação de proteases, ou a utilização de marcadores específicos permite caracterizar a topografia das proteínas e respectiva disposição arquitectural nas membranas. A digestão selectiva das proteínas veio confirmar a localização de antigénios superficiais, aliás já estabelecida nas aglutinações e lises celulares (Wallach, 1972). Foi desta maneira que se conseguiram identificar os segmentos peptídicos a que se unem, por exemplo, os haptenos dos grupos sanguíneos (Winzler, 1969).

ACTIVIDADES

Todas as actividades metabólicas teciduais exigem um adequado fornecimento de oxigénio. Este é transportado pelos eritrócitos que, para tal, necessitam de conter hemoglobina em quantidade e qualidade apropriadas.

Comparado com outras células humanas, o eritrócito adulto tem reservas energéticas e actividades metabólicas muito limitadas. A inexistência de mitocôndrias incapacita-os para o aproveitamento completo dos metabólitos destinados à produção energética, enquanto a perda do núcleo e dos ribossomas os deixa sem possibilidade de reagir, através da síntese proteica, a quaisquer influências exteriores ou de renovar os componentes estruturais e enzimáticos.

O mesmo sucede com a formação de lípidos, que se pensa ser nula (Harris e Kellermeyer, 1970). Pode-se afirmar, aliás, que a senescência eritrocitária começa nos normoblastos, se bem que mantenham a capacidade de for-

mar alguma hemoglobina, sintetizem lípidos e conservem intactos o sistema de citocrómios e o ciclo de Krebs, enquanto na fase de reticulócitos.

Subsistem, nos eritrócitos adultos, os enzimas necessários para que o metabolismo dos glúcidos prossiga através das vias de Embden-Meyerhof e das pentoses-fosfato, ocorrendo também a síntese do glicogénio, insignificante. Esses enzimas, em conjunto com os que utilizam a energia produzida, formam-se nas células nucleadas eritroblásticas medulares. Os eritrócitos adultos carecem da possibilidade de sintetizar novas moléculas enzimáticas para substituir as destruídas ao longo da sua vida.

Em consequência, as hemácias tornam-se estritamente dependentes do meio exterior, não só para o fornecimento de substratos metabólicos como, ainda, para a manutenção das membranas que as protegem. Poder-se-á adiantar que os glóbulos vermelhos sobrevivem e desempenham as suas funções de transporte de oxigénio enquanto se mantiverem activos os enzimas que lhes asseguram a produção de energia necessária. Esta, paradoxalmente em relação ao que se passa em outros níveis biológicos, não é canalizada para as actividades desempenhadas pela hemoglobina, e que são, afinal, a principal razão de existência do glóbulo vermelho e respectivos acessórios enzimáticos. O objectivo primordial da produção de energia química consiste em manter funcionais os eritrócitos para que aquele transporte, energeticamente passivo, possa executar-se. Segundo Beutler (1972a) a energia produzida nos eritrócitos é necessária para a conservação do ferro hemoglobínico no estado bivalente, para dinamizar o sistema enzimático que controla os níveis de potássio e sódio no interior globular, para que os grupos sulfidrílicos dos enzimas eritrocitários e da hemoglobina continuem reduzidos e, portanto, activos, e, finalmente, para que a forma bicôncava das hemácias não se modifique.

Entre as funções secundárias dos eritrócitos incluem-se as do transporte de purinas (pelo menos em murganhos), lípidos, hidratos de carbono, proteínas, ferro não hemoglobínico, iões, hormonas e vitaminas (Harris e Kellermeier, 1970), além da possibilidade de a hemoglobina poder equilibrar, através dos seus grupos básicos, o pH fisiológico do plasma (Surgenor, 1964).

Estrutura e funções da hemoglobina

Solomon (1971) considerou que algumas propriedades da água intraglobular resultavam da forma condensada das moléculas de hemoglobina, facilitando a sua existência em elevadas concentrações, ótimas para o transporte de oxigénio através da corrente sanguínea. Sendo a membrana impermeável aos catiões, os glóbulos vermelhos pareciam resistir à pressão osmótica imposta pelo meio exterior, conservando intacta a forma celular e o conteúdo hemoglobínico ao longo da sua existência. O volume globular relacionar-se-ia com a carga das moléculas de hemoglobina, espaçadas apenas 25 Å entre si nas células normais, em equilíbrio constante com os iões cloreto, a que as membranas eritrocitárias são facilmente permeáveis.

Pensa-se que a hemoglobina se dispõe ordenadamente no interior dos glóbulos vermelhos, não se excluindo a sua participação como componente estrutural da membrana (Rosenberg e Guidotti, 1969). Ponder (1954) havia já proposto um conceito de estrutura eritrocitária em que a concentração das proteínas da membrana diminuiria no sentido do interior globular, enquanto a da hemoglobina declinaria com a aproximação da superfície exterior. As moléculas de hemoglobina dispor-se-iam em melhor ordem nas porções adjacentes à membrana do que no interior eritrocitário, onde se observam cintilações características que se pensa representarem deslocações posicionais daquelas partículas (Burton e col., 1968).

O interior das hemácias apresentava-se, em exames ultramicroscópicos, como uma substância aparentemente homogénea, onde se individualizavam partículas minúsculas com cerca de 65 Å de diâmetro. Estes agregados, correspondentes a moléculas de hemoglobina, concentram-se sobretudo nas regiões anexas à membrana globular, diminuindo progressivamente para o interior celular (Lessin e col., 1969).

A síntese da hemoglobina atinge os valores máximos nas células eritróides, em fase de pró-eritroblasto ou de eritroblasto basófilo I (Turpin, 1970), declinando nas etapas seguintes até se anular por completo, nos eritrócitos adultos. Concluiu-se que a hemoglobina existente nos eritrócitos circulantes era, quase toda, formada na linhagem eritroblástica medular, à excepção de aproximadamente 20%, obtidos nas 24 a 48 horas de vida reticulocitária periférica (Simpson e Kling, 1968).

Isto deve-se a que, no decurso da sua maturação, a célula eritróide vai per-

dendo algumas capacidades metabólicas (normalmente presentes nas células vivas até ao seu desaparecimento) sem que, não obstante, deixe de ser funcional (Lowy e col., 1972). A inutilização do mecanismo enzimático da síntese do DNA nos normoblastos policromáticos, inicia uma série de acontecimentos naturais na maturação de toda a série eritróide. Segue-se a perda de DNA, associada à do próprio núcleo, na fase de normoblasto ortocromático e, após um curto intervalo, é eliminado o RNA. Entretanto, e posteriormente à exclusão do DNA, cessa a síntese de RNA, mantendo-se inalterada a formação das proteínas enquanto existirem moléculas funcionais de RNA mensageiro, ribossómico e de transferência nos normoblastos ortocromáticos e, mesmo, nos reticulocitos. A eliminação do RNA celular, correspondente à perda do retículo corável pelos métodos habituais, impede que qualquer proteína eritrocitária seja substituída nos eritrócitos circulantes.

Com a degradação dos enzimas que movimentam o ciclo de Krebs desaparecem as reacções iniciais da biossíntese do heme. A hemoglobina terá de ser elaborada sobretudo nas etapas medulares da maturação eritroblástica (Yataganas e col., 1970), através de um sistema enzimático complexo (Crystal e Anderson, 1972) mas excepcionalmente bem regulado (London e col., 1967; Rabinovitz e col., 1969; Gross e Rabinovitz, 1972).

Os estudos de cristalografia com os raios X efectuados por Perutz (1964), elucidaram, com grande clareza, a estrutura da hemoglobina e motivaram sucessivas e bem sucedidas pesquisas sobre os pigmentos respiratórios (Perutz, 1969, 1970).

Sabe-se, desde então, que as moléculas de hemoglobina dos mamíferos são compostas por quatro cadeias peptídicas, iguais duas a duas, cada uma complexada com o respectivo heme, a cujo ferro se une, reversivelmente, o oxigénio.

O enrolamento tridimensional das cadeias de hemoglobina assemelha-se, extraordinariamente, ao da cadeia simples de mioglobina (Kendrew, 1961). Os grupos heme ficam protegidos pelas reentrâncias formadas por aminoácidos apolares com que contactam, através de cerca de 60 átomos, por forças de van der Waals. Estes aminoácidos têm-se revelado constantes em todas as globinas normais dos mamíferos estudados à data (Weatherall, 1971), variando nas hemoglobinas instáveis que fundamentam situações hemolíticas típicas (White e Dacie, 1971).

Tudo leva a crer que os mencionados aminoácidos desempenham funções estruturais e conservadoras do heme, na forma química ideal para o transporte

de oxigénio. O heme isolado da globina perde esta capacidade. Por outro lado, a substituição de qualquer daqueles aminoácidos por outro, de carga ou tamanho diferentes, enfraquece a união com o grupo prostético ou o enrolamento em estrutura terciária da cadeia peptídica em causa, ocasionando a precipitação da hemoglobina (Jacob, 1970; Winterbourn e Carrel, 1972). Mantêm-se alguns grupos polares ou com carga eléctrica anexos à cavidade central da macromolécula, além dos que se localizam na superfície do tetrâmero.

A exclusão da água do interior da hemoglobina impõe-se como necessária para o transporte de oxigénio, no que é favorecido pela estrutura terciária da molécula. Esta conformação ainda permite que a hemoglobina se conserve solúvel no eritrócito, garantindo-lhe a sobrevivência. Pode considerar-se a manutenção da estrutura terciária de cada cadeia como o factor condicionante da solubilidade e estabilidade hemoglobínicas.

Todas as hemoglobinas de mamíferos têm a mesma configuração molecular. As quatro cadeias tomam a disposição espacial correspondente aos ângulos de um tetraedro irregular, em que existe um eixo comum a todas as cadeias (α e não- α), passando pelo centro escavado. Resulta, desta orientação, uma molécula quase esférica, cujas dimensões se aproximam de $64 \times 55 \times 50$ unidades angstrom.

Dos 141 aminoácidos de cada cadeia α e dos 146 de cada β (ou γ ou δ), mais de $\frac{3}{4}$ estão compreendidos numa conformação em α hélice que Perutz dividiu em segmentos, de A a H; cada um dos resíduos dos aminoácidos recebe o seu número de ordem, designando-se as angulações pelas letras dos segmentos envolvidos. A extensão dos segmentos helicoidais é determinada, sobretudo, pela quantidade de angulações necessárias ao contacto dos aminoácidos apolares com o grupo heme ou entre si, por ligações hidrofóbicas, quer estejam na mesma hélice ou em hélices adjacentes. A preservação do ambiente hidrofóbico do grupo heme é o principal condicionador do enrolamento em α -hélice de cada polipéptido hemoglobínico, cuja estrutura mantém inalterada (Watson, 1966).

A relação heme-globina não se limita, contudo, às zonas de estabilização hidrofóbica constituídas nas reentrâncias, limitadas pelos aminoácidos apolares. O átomo de ferro hemínico une-se, por ligações covalentes, ao azoto do anel imidazólico da histidina F₈ (proximal), ficando em posição oposta, mas não directamente unido, ao grupo imidazólico da histidina E₇ (distal). A posição do heme é de tal ordem que as suas cadeias laterais, vinílicas e metíli-

cas, apontam para a respectiva bolsa hidrofóbica, enquanto as cadeias própionicas, polares, entram em relação com a água.

No conjunto, o tetrâmero hemoglobínico é formado por dois dímeros, assimétricos e sobrepostos. As áreas de contacto entre as cadeias, iguais e diferentes, salientam-se como factores importantes nas modificações espaciais que ocorrem quando o oxigénio é apreendido ou libertado pela molécula. Cada subunidade (dímero) relaciona-se, por interacções não polares, com o outro par, enquanto monómeros iguais contactam, em determinadas condições, através de pontes salinas fracas entre os aminoácidos terminais (Perutz e TenEyck, 1971).

Existem duas áreas principais, em que as subunidades α e β contactam entre si, designadas por $\alpha_1 \beta_1$ e $\alpha_1 \beta_2$. Os contactos $\alpha_1 \beta_1$ são os mais extensos e robustos, envolvendo 34 aminoácidos; em contrapartida, os $\alpha_1 \beta_2$ incluem apenas 19 resíduos de aminoácidos. Atendendo à simetria da molécula, $\alpha_2 \beta_2$ compreenderá 34 aminoácidos e $\alpha_2 \beta_1$ abrangerá outros 19.

Esta disposição estrutural permitiu que se deduzisse, e a seguir demonstrasse, a existência de duas formas, interconvertíveis na hemoglobina, a oxiemoglobina e a desoxiemoglobina (Muirhead e col., 1967). Comparando ambos os modelos, observou-se que as cadeias α e β rodavam enquanto as β se afastavam entre si, aumentando a distância entre os respectivos átomos de ferro de 33,4 para 40,3 Å, quando a hemoglobina perdia o oxigénio. As zonas $\alpha_1 \beta_1$ (e $\alpha_2 \beta_2$) estabilizariam o dímero $\alpha \beta$, enquanto as áreas de contacto $\alpha_1 \beta_2$ (e $\alpha_2 \beta_1$) seriam funcionalmente muito importantes, talvez para as interacções heme-heme. Para Tomita e col., (1973) ambas as superfícies $\alpha_1 \beta_1$ (α_1 e β_2) são fundamentais para que os efeitos de cooperação, relacionados com a afinidade para o oxigénio, possam evidenciar-se completamente.

Seria de esperar que os grupos heme que compõem uma molécula de hemoglobina se encontrassem dispostos nas proximidades uns dos outros, atendendo às funções que desempenham. A organização tetramérica da hemoglobina é, com efeito, muito mais eficiente para a distribuição do oxigénio pelos tecidos do que a das moléculas monoméricas, tais como a de lampreia (Love e col., 1971). No entanto, em contradição com as previsões mencionadas, cada grupo heme anicha-se suficientemente distanciado dos restantes, em sectores próprios da superfície da molécula tetramérica da hemoglobina, parecendo ignorarem-se uns aos outros (Perutz, 1964).

A inspecção das curvas de equilíbrio com o oxigénio permite identificar três propriedades importantes da hemoglobina – afinidade para oxigénio, interacção de cooperação e efeito Bohr – determinadas a pH diferentes e, simultaneamente, estabelece que cada subunidade participa, activamente, nas funções gerais de transporte (Ranney, 1972).

A estrutura polimérica da hemoglobina surge, assim, com grande significado na manutenção da curva sigmóide que caracteriza a sua combinação com o oxigénio, em contraste com a curva hiperbólica apresentada pela mioglobina, monomérica.

O aspecto sigmóide da curva que relaciona a saturação da hemoglobina pelo oxigénio, em função da pressão usada – curva de equilíbrio ou de dissociação do oxigénio da hemoglobina – fundamenta-se na possibilidade de combinação de cada molécula de hemoglobina reduzida com nenhuma, uma ou até quatro moléculas de oxigénio. A união da primeira molécula de oxigénio a um dos grupos heme acelera a ligação de moléculas sucessivas aos três grupos que restam, diminuindo, em correspondência directa, a tensão de oxigénio necessário (Perutz, 1970a).

Designou-se por interacções heme-heme a cooperação entre os grupos prostéticos da hemoglobina, visando facilitar a entrada ou saída do oxigénio. Poder-se-ia atribuir àquelas interacções o objectivo de aumentar a afinidade para o oxigénio, à medida que as suas moléculas se combinassem com os hemes, sucedendo o inverso com a dissociação progressiva do oxigénio. O efeito Bohr, elevações de temperatura e os fosfatos orgânicos intra-eritrocitários aumentam a eficiência de transporte, baixando, também, a afinidade da hemoglobina para o oxigénio nos tecidos. Entretanto, a alcalose ou a baixa de temperatura requerem que a pO_2 (mm Hg) seja inferior ao normal para que a hemoglobina liberte quantidades equivalentes de oxigénio (Oski e Gottlieb, 1971).

Em consequência das interacções heme-heme sobressai, imediatamente, uma vantagem de grande interesse fisiológico: obtêm-se saturações de oxigénio normais, ou quase, com tensões bastante inferiores às usuais nos alvéolos pulmonares. Assim, podem atingir-se saturações de 92 a 100% com tensões de oxigénio oscilando entre os 60 a 100 mm Hg. Atendendo ao acentuado declive da curva (Fig. 2), na zona em que a maior parte de oxigénio é captado ou descarregado nos tecidos, deduz-se que este gás é libertado prontamente na periferia, sendo a hemoglobina reoxigenada até à saturação nor-

mal quando se estabelecem ligeiras variações tensionais de oxigênio nos tecidos ou alvéolos pulmonares. Esta elasticidade de comportamento é absolutamente nula na mioglobina (Fig. 3).

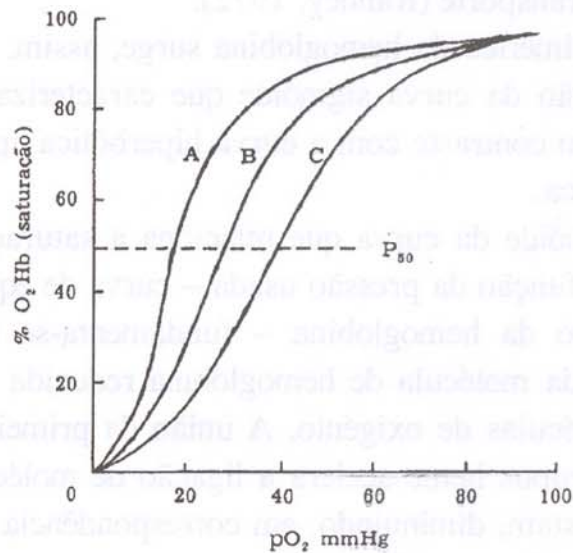


Fig. 2- Curvas de equilíbrio da hemoglobina com o oxigênio. A tensão de O₂ para 50% de saturação (P₅₀) oscila pelos 27 mm Hg no sangue humano normal, em situações fisiológicas (curva B); elevações de temperatura ou diminuições de pH baixam a afinidade da hemoglobina para o oxigênio (curva C), sucedendo o inverso (curva A) em condições opostas.

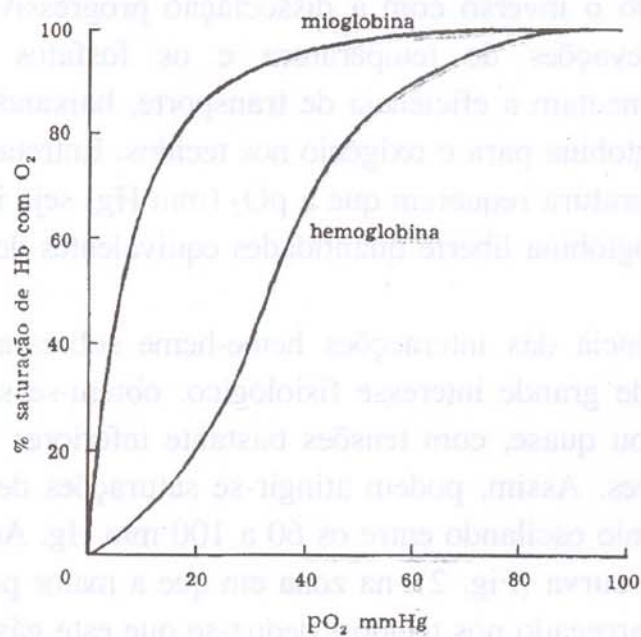


Fig. 3 - Curvas de saturação pelo oxigênio da mioglobina e da hemoglobina.

A natureza sigmóide da curva de dissociação do oxigénio na hemoglobina reflecte, afinal, modificações alostéricas da molécula, representável em duas configurações distintas e dependentes da união com outra estrutura, neste caso o oxigénio (Shulman e col., 1971). A ligação deste gás a um dos grupos heme da hemoglobina altera a configuração da molécula, sobretudo ao nível das cadeias β , cujas relações recíprocas modifica, facilitando a entrada de mais oxigénio e o seu acesso até aos restantes hemes. As diferenças de configuração verificadas (Perutz, 1964, 1969, 1970) entre a oxiemoglobina, compacta, e a desoxiemoglobina, em que as cadeias β se afastam, são suficientemente esclarecedoras do que se disse.

A inexistência de alterações estruturais e curvas sigmóides, respeitantes ao equilíbrio do oxigénio, em hemoglobinas constituídas apenas por cadeias iguais, tais como a Hb H (β_4) ou Hb Barts (γ_4), faz supor que as interacções heme-heme dependem da presença de dois pares de cadeias diferentes. As áreas de contacto entre essas cadeias deverão ser, pelo mesmo motivo, da maior importância para as actividades de cooperação entre os hemes, na sua união com o oxigénio.

As interacções heme-heme não correspondem, contudo, a mudanças significativas da configuração daqueles grupos, nem indicam que a oxigenação de um deles afecte directamente a afinidade dos restantes para o oxigénio (Shulman e col., 1969). Este efeito reflecte, antes de mais, modificações primárias na estrutura terciária de cada subunidade na oxigenação e desoxigenação que, secundariamente, ocasionam as mudanças de afinidade registadas em cada heme para os respectivos ligandos. Só então se evidenciam as alterações na configuração quaternária da hemoglobina, resultantes de movimentos acentuados das superfícies α_1 β_2 .

A união do oxigénio, a qualquer dos monómeros, modifica o ambiente que envolve o heme dos monómeros vizinhos (Asakura e Drott, 1971), processando-se a transmissão desses efeitos através das superfícies de contacto comum. As experiências de Gibson (1973) salientaram a existência de grandes, e até agora insuspeitadas, diferenças nas reacções do oxigénio com as subunidades α e β da hemoglobina: a associação e dissociação do oxigénio ocorre muito mais rapidamente nos monómeros β e pH alcalino. Trabalhos anteriores sugeriram que a reorganização molecular, conseqüente à oxigenação, era evidente logo que pelo menos dois grupos heme estavam oxigenados (Gibson e Par-khurst, 1968).

É discutível a forma funcional da hemoglobina, se bem que a tetramérica seja a que parece permitir contactos mais directos e interacções mais fáceis entre as subunidades (Perutz, 1970a).

Ainda de acordo com os resultados de Perutz, a desoxiemoglobina possui um certo número de ligações que lhe reduzem os movimentos internos. Essas pontes salinas, lançadas entre aminoácidos adjacentes às extremidades carboxílicas de todas as cadeias e outros resíduos próximos, são sucessivamente destruídas à medida que o tetrâmero recebe oxigénio, subunidade a subunidade. Às alterações de estrutura terciária seguem-se as de toda a molécula na forma saturada. Pode acrescentar-se que a remoção enzimática desses resíduos terminais carboxílicos afecta as interacções heme-heme.

Entretanto, a afinidade para o oxigénio é mais elevada na oxiemoglobina (na forma estrutural correspondente) do que na forma não oxigenada. Esta diferença resulta de alterações estereoquímicas impostas ao meio de acção do heme por diversos factores, em que sobressaem alterações iónicas. As variações de afinidade para o oxigénio em função do pH, associadas à maior aptência da desoxiemoglobina para os prótons, são aspectos do que se designa por efeito Bohr. No entanto, pelo que se conhece através de algumas hemoglobinas anormais (Stamatoyannopoulos e col., 1971; Beuzard e col., 1971), as alterações estruturais de que depende o efeito Bohr não parecem ser as mesmas que fundamentam as interacções «heme-heme» nas reacções com o oxigénio. De acordo com as estruturas conhecidas, a abertura ou encerramento das pontes salinas, afectas aos resíduos ionizáveis das extremidades das cadeias, são as situações que mais acentuadamente contribuem para o efeito Bohr (Perutz, 1970a; Perutz e Ten-Eyck, ; Kilmartin e Hewitt, 1971).

O efeito Bohr, influenciando o pH eritrocitário, repercute-se no aspecto da curva de dissociação da oxiemoglobina, representando-se como a relação entre $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$. Traduz-se como uma modificação do pH subsequente à união da hemoglobina com o O_2 ou como uma alteração da afinidade daquele tetrâmero para o gás, quando o pH varia (Poyart e col., 1972). Resulta da combinação do O_2 , CO_2 ou NO com o ferro reduzido ou quando a hemoglobina se oxida em metaemoglobina (Perutz, 1970b).

Podem considerar-se dois tipos de efeitos Bohr, um, ácido, decorrendo a pH inferior a 6 e que, provavelmente, não tem interesse fisiológico, o outro, alcalino, a valores de pH quase neutros (Perutz, 1970a,b). O efeito Bohr alcalino corresponde a um fenómeno da maior importância para a oxigenação

tecidual. Resume-se a uma troca de prótons pelo oxigénio transportado na hemoglobina, quando os valores de pH do meio são quase neutros ou, pelo menos, superiores a 6.

Os modelos atómicos derivados por Perutz, mostraram, com efeito, que as alterações estruturais consequentes à entrada ou saída de oxigénio dos seus pontos de união com a hemoglobina, modificam o ambiente próprio de três pares específicos de bases fracas (grupos próprios de seis aminoácidos) e, portanto, o estabelecimento das ditas pontes salinas. Desta maneira, a molécula recebe prótons quando descarrega oxigénio e vice-versa.

O efeito Bohr alcalino desempenha ao nível dos tecidos duas funções: ao perder oxigénio, a hemoglobina neutraliza os prótons libertados no sangue pelos tecidos periféricos, participando no transporte de CO_2 para os pulmões; simultaneamente, a acidificação do sangue, ao chegar aos tecidos, baixa a afinidade da hemoglobina para os seus ligandos, favorecendo a libertação de O_2 no local.

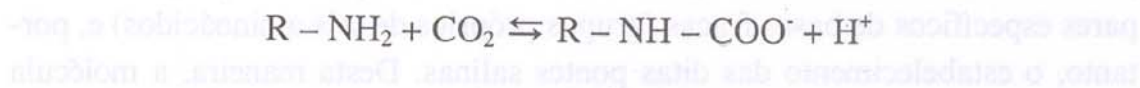
É concebível a existência de mecanismos inversos no trajecto pulmonar.

No conjunto, o efeito Bohr revela-se como sistema fundamental para o transporte de oxigénio e anidrido carbónico pelo sangue. Nos tecidos onde a tensão de oxigénio é mais baixa e a concentração de hidrogeniões é elevada pelo ácido láctico e anidrido carbónico, a alteração da curva de dissociação facilita a saída do oxigénio da hemoglobina. À medida que esta molécula perde o gás que transportou, entram prótons. A união destes com a desoxiemoglobina constitui uma fracção notável (cerca de 70%) do mecanismo de remoção do CO_2 que, difundido para o eritrócito, é aí convertido pela anidrase carbónica em ácido carbónico. Segue-se a dissociação imediata deste ácido e a difusão do ião bicarbonato para o plasma, deixando o hidrogénio para se combinar com a hemoglobina. A entrada do Cl^- para o eritrócito mantém o equilíbrio electrostático enquanto o Na^+ neutraliza o ião bicarbonato, no plasma.

A entrada do oxigénio, nos pulmões, para os eritrócitos, vai deslocar os prótons transportados e, por inversão de todo o esquema referido, liberta o CO_2 para os espaços alveolares (Harris e Kellmeyer, 1970; Ranney, 1972; Poyart e col., 1972).

O modelo funcional referido é, de facto, muito mais teórico que real. Diversos outros ligandos da hemoglobina são capazes de lhe modificar a importância. É o que sucede, por exemplo, com os derivados carbaminados que

contribuem para cerca de 12% (nos adultos) e 21% (no sangue fetal) da quantidade de CO₂ trocado no ciclo respiratório (Bauer, 1972). O CO₂ combina-se, reversivelmente, com os grupos α-aminados terminais das quatro cadeias α e β, da hemoglobina reduzida, formando carbaminoemoglobina. Representa-se esta reacção pela seguinte equação geral (Roughton, 1970):



A presença de carbamatos em sectores diferentes dos que recebem O₂ explica duas particularidades funcionais de hemoglobina:

1) A libertação de protões, representada na equação descrita em que se formam os carbamatos, é favorável à sua captação pela hemoglobina reduzida. Estes H⁺, ao ionizarem os grupos responsáveis pela constituição das pontes salinas, contribuem para a forma desoxi- e conseqüente libertação de O₂. Por outro lado, ao ligarem-se com a hemoglobina, os hidrogeniões modificam o efeito Bohr;

2) A alteração das estruturas terciária e quaternária, da hemoglobina depende das pontes salinas, em que participam resíduos das extremidades-N (Perutz, 1970a,b). A formação de carbamatos nas funções R-NH₂ tende a reforçar essas ligações e, por conseguinte, estabiliza a hemoglobina na configuração desoxi-. Por outras palavras, aumenta a solidez das pontes salinas, sendo necessária maior quantidade de energia para as cindir. Resulta daqui a diminuição de afinidade para o oxigénio, enquanto na oxigenação da hemoglobina baixam as possibilidades de formação dos carbamatos.

A variação do pH dependerá do contributo relativo de cada um dos fenómenos apontados, induzindo modificações sucessivas do efeito Bohr (Bauer, 1972).

Importa adiantar, desde já, que a formação de carbamatos, ou seja, a afinidade do anidrido carbónico para a hemoglobina, varia reciprocamente com a presença do 2,3-difosfoglicerato (Caldwell e col., 1971; Siggard-Andersen e col., 1972). Este composto, ao unir-se aos grupos aminados N-terminais das cadeias, desvia o equilíbrio de ionização para a forma protonada, diminuindo a formação de carbamatos.

É de salientar, a propósito, a importância do sector central da molécula hemoglobínica, formando uma cavidade limitada pelos segmentos terminais das hélices A (na extremidade NH₂) e H (na extremidade COOH). É neste espaço

que se localiza o 2,3-difosfoglicerato, onde se fixam os protões ou de que depende o efeito Bohr (Beuzard e col., 1971).

Entre os factores envolvidos no transporte de oxigénio pelos eritrócitos humanos encontra-se a função pulmonar, o débito cardíaco, a concentração de hemoglobina e por fim, a afinidade do oxigénio para esta hemoglobina (Lenfant e col., 1970). Em situações que exijam mais oxigénio ou em que diminua a capacidade de transporte deste gás pelo sangue (p. ex., nas anemias) o organismo recorre às funções pulmonares e cardíacas, exigindo-lhes maior esforço. Este tipo de adaptação instala-se rapidamente mas tem limites. Outro processo, mais lento, de elevar a capacidade de transporte do sangue, consiste em aumentar a concentração hemoglobínica. No entanto, o mecanismo que permite a libertação de maior quantidade de oxigénio, ao nível dos tecidos, é, ainda assim, o que diminui a sua afinidade para a hemoglobina. É aqui que as modificações de pH e, sobretudo, os fosfatos orgânicos eritrocitários, desempenham uma acção notável pela eficiência com que elevam o fornecimento de oxigénio, a pressões aceitáveis para os tecidos (Oski e Gottlieb, 1971). Por outro lado, a afinidade do oxigénio para as soluções de hemoglobina livre é superior à verificada, *in vitro*, em eritrócitos intactos, sugerindo a existência de um terceiro factor participante na reacção em causa (Chanutin e Curnish, 1967). Identificou-se, aliás, um componente electroforético em hemolisados frescos, que desaparecia em amostras antigas e reaparecia quando se adicionava 2,3-DPG e ATP.

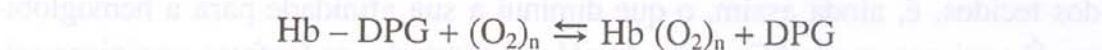
A curva de dissociação do oxigénio está, na realidade, sujeita a modificação por alguns ligandos intracelulares, particularmente os fosfatos orgânicos que se unem, de preferência, à desoxiemoglobina (Benesch e Benesch, 1967). O 2,3-difosfoglicerato e a adenosina trifosfato perfazem cerca de 90% dos fosfatos orgânicos eritrocitários. Os eritrócitos humanos e os de muitos outros mamíferos possuem concentrações invulgarmente elevadas de 2,3-DPG, em contraste com as de outros tipos celulares. O ATP aparece a níveis, cerca de quatro vezes inferiores (Bunn e Jandl, 1970). Adicionando fosfatos a soluções hemoglobínicas previamente dialisadas, obtinham-se decréscimos significativos da afinidade para o oxigénio, sucedendo o inverso quando se removiam aquelas substâncias (Benesch e col., 1968).

O mais importante daqueles fosfatos orgânicos, o 2,3-difosfoglicerato, actua como competidor alostérico do oxigénio, ao combinar-se com a desoxiemoglobina na proporção de 1 mole por tetrâmero hemoglobínico (Bunn e

Jandl, 1970). Verificou-se que ao entrar o oxigénio saía, prontamente, o DPG. Este facto parecia justificar a menor afinidade evidenciado pelo sangue total fresco (Benesch e col., 1968).

A remoção do oxigénio da hemoglobina pelo DPG sugere, ainda, que este composto tende a unir-se com a forma desoxi-, que estabiliza, diminuindo-lhe a afinidade para o oxigénio. O aumento da forma desoxi- em relação com a oxiemoglobina, bem como a elevação do pH, ampliam as concentrações eritrocitárias do DPG, como sugerem os resultados de Eaton e col. (1969) em indivíduos vivendo a altitudes bastante acentuadas.

A competição do oxigénio e do DPG para a hemoglobina, mesmo incidindo em locais estruturalmente distintos, poder-se-ia representar pela seguinte reacção geral:



A concentração do DPG eritrocitário parece determinar a afinidade da hemoglobina para o oxigénio sem que se notem, ou sejam escassas, interações proteicas por cooperação entre os grupos heme (Perutz, 1970b; Bunn e Briehl, 1970; Arnone, 1972). Dos estudos realizados concluiu-se que a concentração do DPG intracelular é, em geral, inversamente proporcional à afinidade para o oxigénio apresentada pela hemoglobina.

Encontraram-se níveis baixos de DPG e elevada afinidade para o oxigénio nas deficiências eritrocitárias em hexoquinase (Delivoria-Papadopoulos e col., 1969) em 2,3-DPG mutase (Lapie e col., 1970) ou no sangue armazenado para fins transfusionais (Dawson e Kocholaty, 1971); aqui, a afinidade para o oxigénio era tanto maior quanto mais antigo era o sangue, e, consequentemente, mais reduzida era a concentração do 2,3-DPG.

Registou-se o inverso nos indivíduos sujeitos a hipóxia induzida pela permanência em altitudes acentuadas, por doenças pulmonares crónicas ou por cardiopatias várias (Eaton e col., 1969; Lenfant e col., 1969, 1970; Woodson e col., 1970; Torrance e col., 1970; Roeth e col., 1972), em alguns tipos de anemia (Torrance e col., 1970a) ou, ainda, em indivíduos com deficiência da piruvato-quinase eritrocitária (Delivoria-Papadopoulos e col., 1969). Estão descritas, no entanto, excepções à regra evidenciada (Shappell e col., 1970).

As variações da curva de dissociação do oxigénio podem, ou não, ser proporcionais à concentração de hemoglobina existente: a P_{50} é inversamente

proporcional à gravidade da anemia, verificando-se o contrário nas doenças crônicas pulmonares; nos residentes em altitudes ou nas cardiopatias nota-se, em contrapartida, que os aumentos de concentração hemoglobínica são independentes dos desvios da curva de dissociação do oxigénio. Na generalidade dos casos existia relação directa entre os níveis de DPG e a P_{50} . Estas observações levaram Lenfant e col. (1970) a concluir, baseando-se em resultados *in vitro*, que as alterações dos fosfatos orgânicos eritrocitários condicionavam as variações de afinidade para o oxigénio.

É de salientar, entretanto, os resultados verificados por Edwards e Cannon (1972) em indivíduos normais submetidos a perdas moderadas de sangue: a diminuição dos níveis de hemoglobina acompanhou-se de aumento de P_{50} mas, em contrapartida, não se alterou a concentração de 2,3-DPG; pelo menos aqui, teria bastado a elevação da P_{50} para compensar a anemia, ao que não deveria ser estranho a entrada em circulação de eritrócitos jovens em quantidades significativas. Os reticulócitos caracterizam-se, neste aspecto, por menor afinidade para o oxigénio (Chapman e Schaunburg, 1967).

Sugeriu-se (Woodson e col., 1970) que a desoxiemoglobina existente no sangue venoso funcionaria como um estímulo para a produção de DPG, regulando também a sua própria afinidade para o oxigénio. *In vivo* surgiria outra variável, o efeito do pH arterial. As variações dos níveis de pH entre a acidose e a alcalose, em situações extremas, funcionariam como sinais desencadeadores do mecanismo de adaptação, essencial à eficiência da oxigenação tecidual. Esses sinais influenciariam então a formação do DPG, de tal modo que, por exemplo, nas situações de hipóxia associadas a alcalose respiratória, o sistema glicolítico eritrocitário seria solicitado a incrementar o abastecimento local daquela substância, após o que diminuiria a afinidade para o oxigénio transportado pela hemoglobina (Lenfant e col., 1970; Torrance e col., 1970a; Rorth e col., 1972). Diversos autores (Asakura e col., 1966; Yoshikawa e Minakami, 1968; Brewer e Eaton, 1971) demonstraram, com efeito, que o aumento dos fosfatos orgânicos referidos é consistente com a estimulação da glicólise pela desoxigenação da hemoglobina. A maior afinidade evidenciada pela desoxiemoglobina em receber aqueles compostos, em contraste com a oxiemoglobina, baixa a concentração do ATP e do DPG eritrocitários. Este desequilíbrio, associado a alterações do pH, estimulam a actividade dos enzimas glicolíticos do glóbulo vermelho.

Poder-se-á supor que o não funcionamento da glicólise ou, pelo menos, o

deficiente aproveitamento da glicose por esta via, conduz ao desvio da curva de dissociação da oxiemoglobina para a esquerda. A hipótese foi inteiramente confirmada em indivíduos portadores de *diabetes mellitus*, não controlados (Alberti e col., 1972) ou tratados com insulina (Ditzel, 1972). Em ambos os casos decresceu a produção globular de 2,3-DPG, com a aparente finalidade de proteger a estabilidade da oxiemoglobina dos efeitos nefastos da acidose. Sabe-se que o aumento de concentração hidrogeniônica diminui a glicólise eritrocitária, ao inibir as actividades de alguns enzimas envolvidos na produção do 2,3-DPG (Oski e Gottlieb, 1971), mas ficam por explicar os valores registados em diabéticos tratados, sem acidose.

De tudo o que se disse, sobressai o conceito de que a forma estereoquímica em que se encontra a hemoglobina eritrocitária condiciona a união com o 2,3-DPG que, por sua vez, está dependente das necessidades de oxigenação periférica.

Os resultados obtidos por Chanutin e Curnish (1967), quase simultaneamente com os de Benesch (1967), indicavam que a combinação da hemoglobina com intermediários fosforilados da glicólise era, aparentemente, responsável pela diminuição da afinidade da hemoglobina para o oxigénio. Havia desacordo, contudo, quanto ao tipo de hemoglobina que se ligava ao 2,3-DPG; enquanto os Benesch afirmavam que apenas a desoxiemoglobina (e nunca a oxiemoglobina) se unia àquele composto, outros grupos de trabalho admitiam que a forma oxigenada de hemoglobina possuía metade da afinidade para o 2,3-DPG, em relação com a desoxiemoglobina (Garby e col., 1969; Chanutin e Herman, 1969). Existiriam, nestes casos, pelo menos dois e até ao máximo de quatro pontos de união para o 2,3-DPG, com afinidade variável.

O 2,3-DPG apresenta-se com características acentuadamente aniónicas, justificando o estabelecimento de interacções com sete grupos catiónicos presentes nos polipéptidos hemoglobínicos (Bunn e Jandl, 1970; Oski e Gottlieb, 1971; Arnone, 1972). Ainda que não sejam conhecidos com exactidão, julga-se que os pontos de união apropriados para o 2,3-DPG (e para o ATP) estão localizados na cavidade central da molécula hemoglobínica ou, mais precisamente, entre as cadeias β (Benesch e col., 1968). Comprovou-se, em apoio desta afirmação, que as cadeias α isoladas eram incapazes de se unir ao 2,3-DPG, enquanto as cadeias β , em circunstâncias idênticas, recebiam $\frac{1}{4}$ de mole de 2,3-DPG por mole de cadeia β . Cadeias β associadas em tetrâme-

ro (hemoglobina H) recebem um mole daquele composto fosforilado por mole da hemoglobina, quer na forma oxi- ou desoxi-. Explicou-se esta particularidade por a β_4 ser pouco ou nada alterada na sua configuração, ao unir-se a ligandos, assemelhando-se estruturalmente à forma desoxi- da hemoglobina A. O aumento resultante da afinidade para o oxigénio, a par de menor cooperação heme-heme e ausência de efeito Bohr, não era influenciado pela união com o 2,3-DPG.

Diversos factos, condizentes com os resultados de Benesch e Benesch (1967), vêm consolidando a hipótese de que o 2,3-DPG se liga, em situações fisiológicas, à desoxiemoglobina, ou pelo menos, nunca à hemoglobina completamente oxigenada (Benesch e col., 1968; 1972a). Com efeito, a cavidade central da oxiemoglobina parece ser demasiado pequena para poder admitir uma molécula daquele composto; o alargamento de 6 Å na zona central, conseqüente à desoxigenação completa da molécula hemoglobínica, seria suficiente para a instalação do 2,3-DPG (Perutz, 1970b). Muirhead e col. (1967) já haviam detectado a presença do que classificaram como um ião fosfato ou sulfato na desoxiemoglobina, inexistente na forma oxigenada.

Em contrapartida, Brewer e Eaton (1971) consideram que a hemoglobina, parcialmente oxigenada, pode receber quase tanto 2,3-DPG como a forma oxigenada por completo. A perda de uma das quatro moléculas de oxigénio aumentaria a afinidade para o 2,3-DPG, não se diferenciando significativamente da desoxiemoglobina.

Obtiveram-se informações valiosas quanto aos pontos de união para o 2,3-DPG, nos estudos realizados com variantes de hemoglobina humana. Assim, ao observar-se que a hemoglobina F recebia muito menor quantidade daquele composto do que a hemoglobina A, passou a considerar-se a histidina 143 das cadeias β como elemento responsável pela diferença mencionada; na hemoglobina F aquele resíduo é, com efeito, substituído pela serina, sem carga, das cadeias γ (Garby e col., 1969; De Verdier e Garby, 1969). O aumento de afinidade para o oxigénio permite ao feto transferi-lo vantajosamente da circulação materna, mantendo-se a concentração do 2,3-DPG ao nível da observada em eritrócitos adultos (Duc e col., 1971; Salhany e col., 1971; Beuzard e col., 1971; Manso, 1972).

Entretanto, a substituição da mesma histidina pelo ácido aspártico origina a hemoglobina Hiroshima, cuja elevada afinidade para o oxigénio reflecte a perda da capacidade de união ao 2,3-DPG.

A conservação, na hemoglobina F ($\alpha_2 \gamma_2$) de alguma possibilidade de resposta ao 2,3-DPG, fez que se suspeitasse da existência de pontos de união diferentes, em parte apoiados pelos modelos estereoquímicos de Perutz (1970b). A posição da molécula, entre as cadeias β da hemoglobina, era muito favorável ao estabelecimento de ligações não só com as histidinas 143 mas também com as valinas das extremidades aminadas, além de resíduos de lisina em EF6. Bunn e Briehl (1970) sugeriram, a propósito, que o 2,3-DPG se unia à His¹⁴³ de uma cadeia β e à valina terminal das outras, encaixando-se num espaço limitado por ambas as cadeias. Estas hipóteses têm recebido confirmação bioquímica (Caldwell e col., 1971; Benesch e col., 1972b).

As modificações estereoquímicas consequentes à entrada do oxigénio na molécula tendem a expulsar o 2,3-DPG dos seus locais de união com a hemoglobina (Arnone, 1972). Com efeito, após a oxigenação, aumenta a distância entre os resíduos das extremidades NH₂ (de 16 Å para 20 Å), o que rompe as pontes de hidrogénio estabelecidas entre a hemoglobina e os grupos fosfato do 2,3-DPG. Simultaneamente, aproximam-se entre si, os dois segmentos H das cadeias β , acabando por expulsar a molécula de 2,3-DPG da cavidade em que se encontra, em fase da oxigenação ainda indeterminada (Perutz, 1970b; Arnone, 1972). Em contrapartida, o 2,3-DPG estabiliza a forma desoxi-, ao favorecer interações específicas das subunidades β (Fig. 4).

Capacidade metabólica eritrocitária

Vias de aproveitamento da glicose e produção de energia química

Há actualmente a noção de que os glóbulos vermelhos adultos possuem um metabolismo glucídico activo, que lhes é essencial para duas finalidades: transporte de oxigénio e sobrevivência em circulação (Brewer e Eaton, 1971).

É notável a simplicidade do metabolismo eritrocitário que aproveita a glicose (Fig. 5). Limita-se, na prática, quase inteiramente à glicólise e, em plano muito inferior, à via das fosfopentoses (Lowy e col., 1972; Beutler, 1972a). A presença de enzimas específicos para a síntese e degradação do glicogénio é pouco significativa, já que a quantidade desta forma de depósito nos glóbulos vermelhos é praticamente nula e, a que existe, sujeita-se a renovações muito aceleradas (Moses e col., 1968). Há que incluir, ainda, a

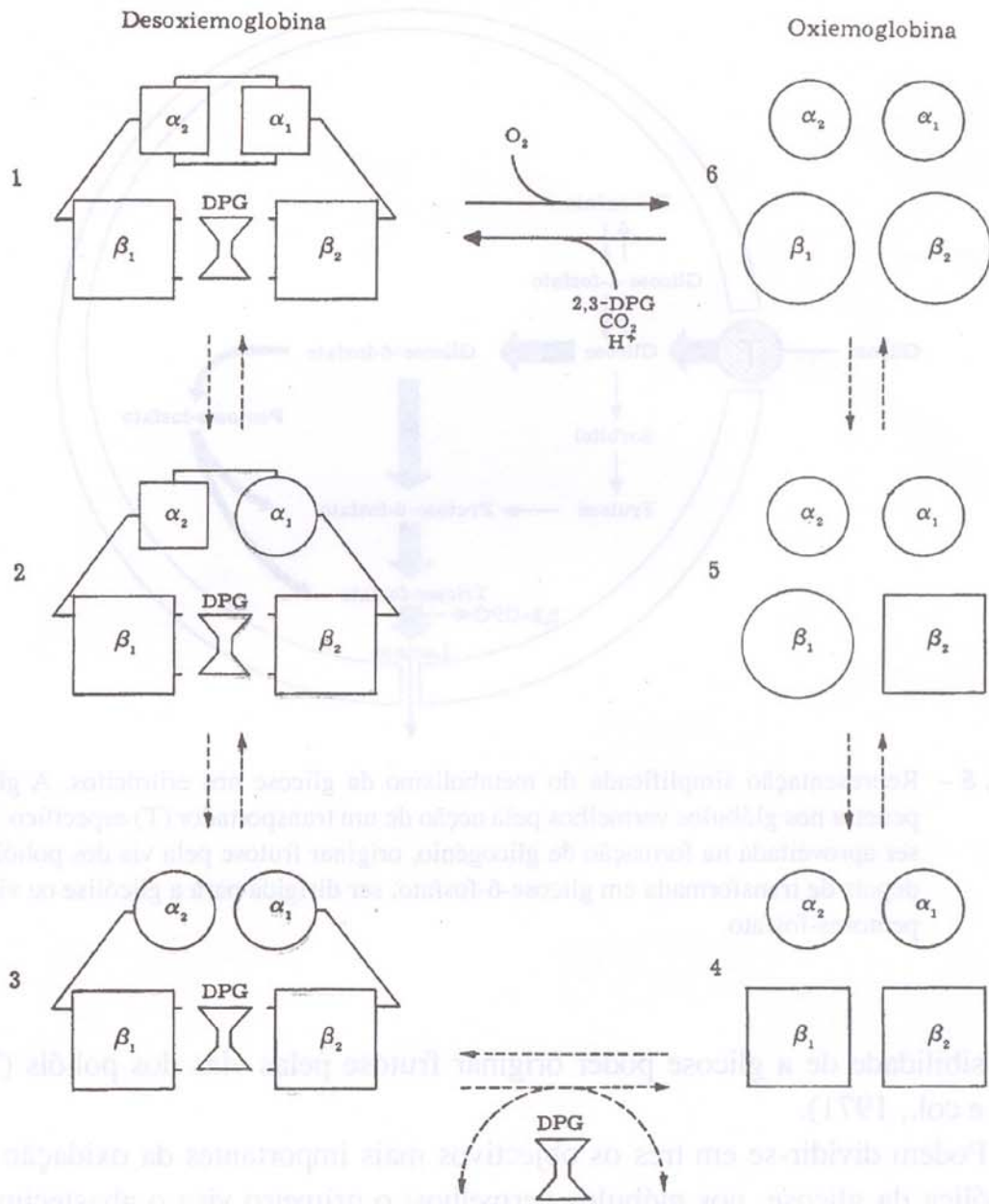


Fig. 4 – Diagrama mostrando uma hipotética sequência do alosterismo da hemoglobina, em contacto com o oxigénio (segundo Perutz, 1970a,b).

De 1 a 6 observa-se a oxigenação progressiva dos monómeros de uma molécula de desoxiemoglobina, considerando-se indiferentemente a ordem por que é feita. Em 1, 2 e 3 assiste-se à rotura das pontes salinas, começando pelas estabelecidas entre as cadeias α . Em 3 e 4 a forma desoxi- transforma-se em oxi-, após a rotura das pontes salinas de $\alpha_2\text{-}\beta_1$, e $\alpha_2\text{-}\beta_2$. A aproximação das cadeias β expulsa o 2,3-DPG. Em 5 e 6 representa-se a oxigenação das cadeias β .

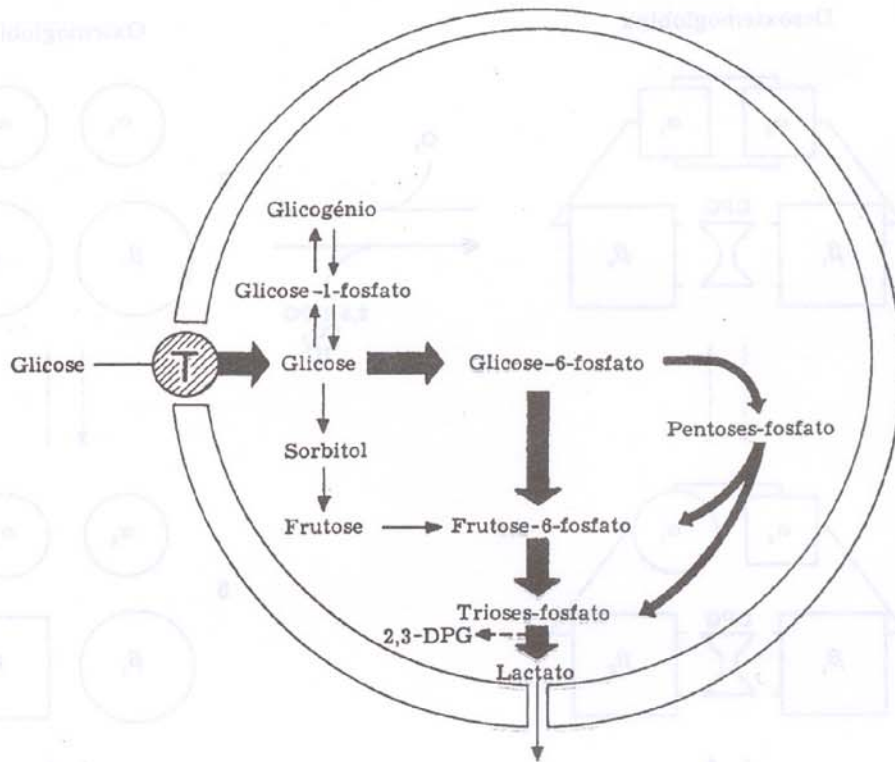


Fig. 5 – Representação simplificada do metabolismo da glicose nos eritrócitos. A glicose penetra nos glóbulos vermelhos pela acção de um transportador (T) específico. Pode ser aproveitada na formação de glicogénio, originar frutose pela via dos polióis ou, depois de transformada em glicose-6-fosfato, ser dirigida para a glicólise ou via das pentoses-fosfato.

possibilidade de a glicose poder originar frutose pelas vias dos polióis (Travis e col., 1971).

Podem dividir-se em três os objectivos mais importantes da oxidação metabólica da glicose, nos glóbulos vermelhos: o primeiro visa o abastecimento energético dos eritrócitos. Essa energia, química, é constituída, sobretudo, pelo ATP utilizável em variadíssimas funções próprias dos glóbulos. A maior parte do ATP provém da glicólise, ainda que seja possível a sua formação por vias diferentes, de significado fisiológico discutível. Com efeito, a concentração de purinas livres no plasma, muito reduzida, limita imediatamente a actividade dos enzimas que as convertem em nucleótidos, em particular adenílicos (Lowy e col., 1972). Sabe-se, no entanto, que incubando adenina durante 12 horas com eritrócitos humanos normais aumenta, para cerca do dobro, a quantidade do ATP intracelular; registou-se, ainda, que a adenosina

inibia a incorporação da adenina nos nucleótidos, o que seria a favor da existência de enzimas apropriados à execução destas etapas (Manohar e col., 1968; Valentine e Kürschner, 1972). Outro objectivo atende à formação do 2,3-DPG, através da derivação conhecida por via de Rapoport-Luebering. Implícito no que se disse acerca das funções da hemoglobina, sobressai a reacção de que, na generalidade dos casos, as variações dos níveis de 2,3-DPG afectam significativamente o transporte de oxigénio, quer estejam ou não envolvidos mecanismos de estimulação eritropoiética. O terceiro objectivo pretende a conservação da hemoglobina em estado funcional, ou, melhor, protege o conteúdo eritrocitário da acção nefasta dos compostos oxidantes (Harris e Kellermeyer, 1970).

São as necessidades globulares ou, indirectamente, as emanadas pelos tecidos periféricos, que ajustam a direcção em que se orienta o metabolismo oxidativo da glicose, através das vias mais responsáveis pelo bom funcionamento eritrocitário: glicólise e via das fosfopentoses (Rapoport, 1970).

A glicose surge-nos, assim como a principal fonte normal de energia ou de poder redutor a que recorrem os eritrócitos, recebendo-a do plasma.

Cerca de 90% da glicose consumida nas hemácias transforma-se em piruvato ou lactato, sendo os restantes 10% dirigidos para as etapas iniciadas pela desidrogenase da glicose-6-fosfato (Valentine, 1968).

A via de Embden-Meyerhof (Fig. 6), dotada de grande flexibilidade funcional, é assegurada, no glóbulo vermelho, por enzimas absolutamente idênticos (Beutler, 1972a) aos que dinamizam e regulam a oxidação anaeróbica da glicose nas restantes células do organismo humano (Scrutton e Utter, 1968; Weber, 1972).

As duas moléculas de ATP utilizadas na fase impulsionadora da glicólise (nas etapas catalisadas pela hexoquinase e pela fosfofrutoquinase) acabam por ser recuperadas, em geral com lucro, logo que se ultrapassa a desidrogenação do gliceraldeído-3-fosfato.

A produção de intermediários fosforilados na glicólise sujeita-se a dois grandes tipos de regulação, um afectando-a no conjunto e o outro incidindo em sectores restritos, em que se salienta a via de Rapoport-Luebering. Há razões para considerar que, de ambos os mecanismos, o primeiro é o mais relevante para as funções eritrocitárias (Brewer e Eaton, 1971), ainda que os enzimas que sintetizam ou degradam o 2,3-DPG possam, indirectamente, influir na actividade geral dos enzimas «chave» daquela via, sobretudo na fos-

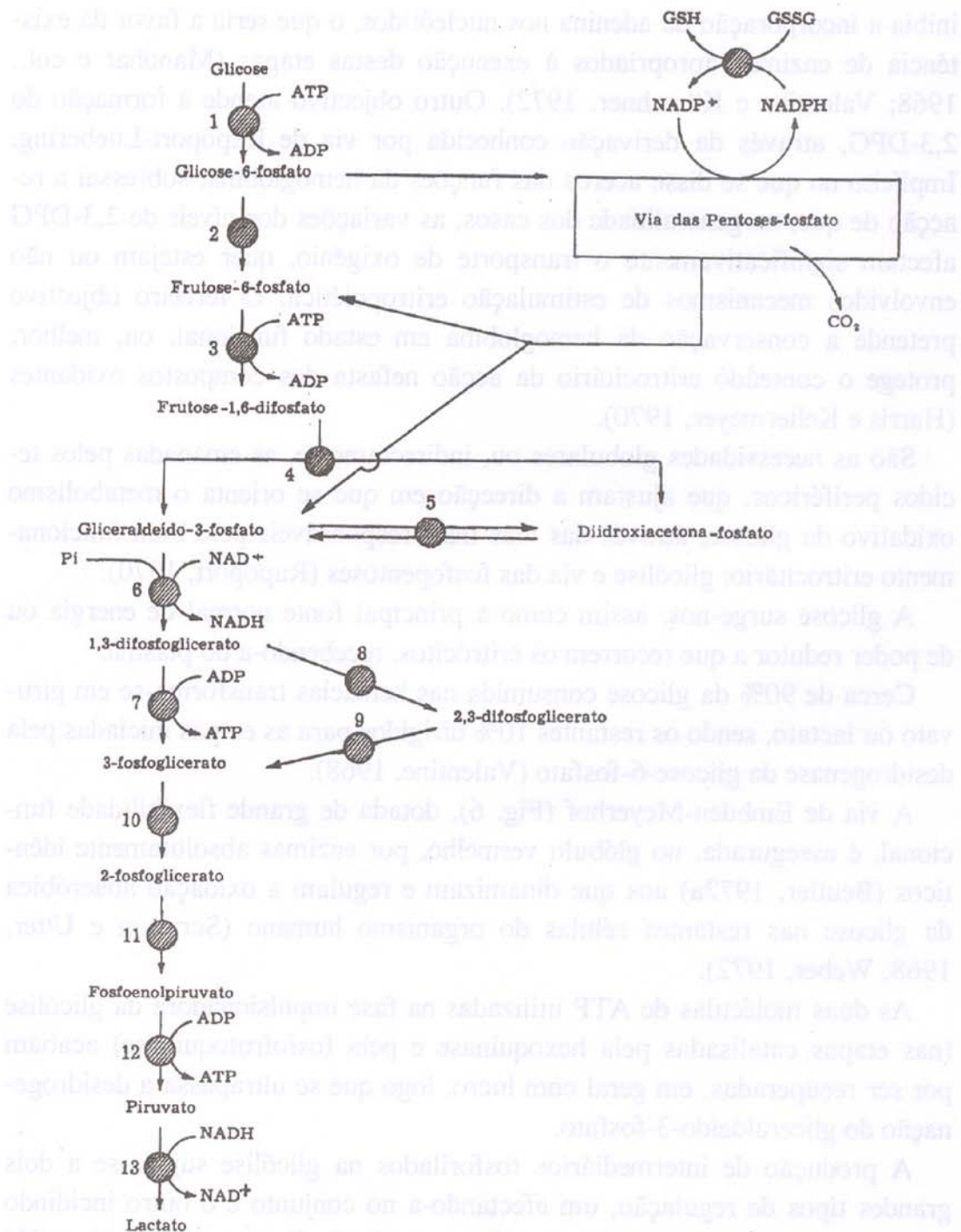


Fig. 6 - Metabolismo da glicose nos eritrócitos. Legenda: 1 - hexoquinase; 2 - fosfoexose-isomerase; 3 - fosfofrutoquinase; 4 - aldolase; 5 - triose-fosfato-isomerase; 6 - gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; 7 - fosfoglicerato-quinase; 8 - difosfoglicero-mutase; 9 - difosfoglicerato-fosfatase; 10 - fosfogliceromutase; 11 - enolase; 12 - piruvato-quinase; 13 - desidrogenase láctica.

fofrutoquinase (Minikami, 1969). A ramificação da via de oxidação anaeróbica da glicose, ao nível do 1,3-difosfoglicerato, permite o controlo da formação do ATP por cada mole de hexose metabolizada. A relação ATP/ADP eritrocitária é um factor importante nos sistemas reguladores de toda a glicólise, a que se associa o potencial de oxidação-redução celular, dependente dos valores absolutos de NAD^+ e de NADH (Omachi e col., 1969; Beutler, 1972a). A redução do NAD^+ em NADH dá-se na etapa activada pela desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, podendo o coenzima reduzido ser utilizado na reconversão da metaemoglobina em hemoglobina (com conseqüente formação de piruvato) ou ser aproveitado na redução do piruvato em lactato, por acção da desidrogenase láctica.

Qualquer destes produtos finais (lactato ou piruvato) difunde para o exterior dos glóbulos vermelhos, sendo reaproveitados por tecidos com gliconeogénese activa (Scrutton e Utter, 1968).

A via das pentoses-fosfato parece ajustar-se, na sua dinâmica, às exigências eritrocitárias em NADPH , formado em duas etapas consecutivas, por acção das desidrogenases da glicose-6-fosfato e do 6-fosfogliconato (Beutler, 1971). É na etapa catalisada por este enzima que ocorre a libertação de uma molécula de CO_2 , correspondente ao C_1 da glicose-6-fosfato oxidada. A pentose-fosfato resultante submete-se a diversas transformações moleculares, de que resultam, por fim, uma triose (gliceraldeído-3-fosfato) e uma hexose (frutose-6-fosfato). Estes compostos ingressam na glicólise como intermediários metabólicos, aptos a servirem de substratos aos enzimas respectivos (Fig. 7).

É de salientar, nesta via, a inexistência de qualquer etapa directamente geradora de ATP, sugerindo-se que o seu maior contributo para as funções eritrocitárias assenta na redução do NADP^+ em NADPH responsável pela defesa contra os agentes oxidantes intracelulares. Demonstrou-se, no entanto, que as pentoses sintetizadas nesta via são incorporadas, em associação com a adenina exterior, nos nucleótidos adenílicos de origem estranha à glicólise (Manohar e col., 1966).

Poder-se-á supor, em conformidade com os dados conhecidos, que o consumo de glicose pelos eritrócitos será, em parte, condicionado pelo estado funcional da hemoglobina que transportam, pela manutenção do equilíbrio iónico, enfim, por todas as funções que estão designadas às hemácias.

Não parecem despropositadas circunstâncias opostas, em que as funções

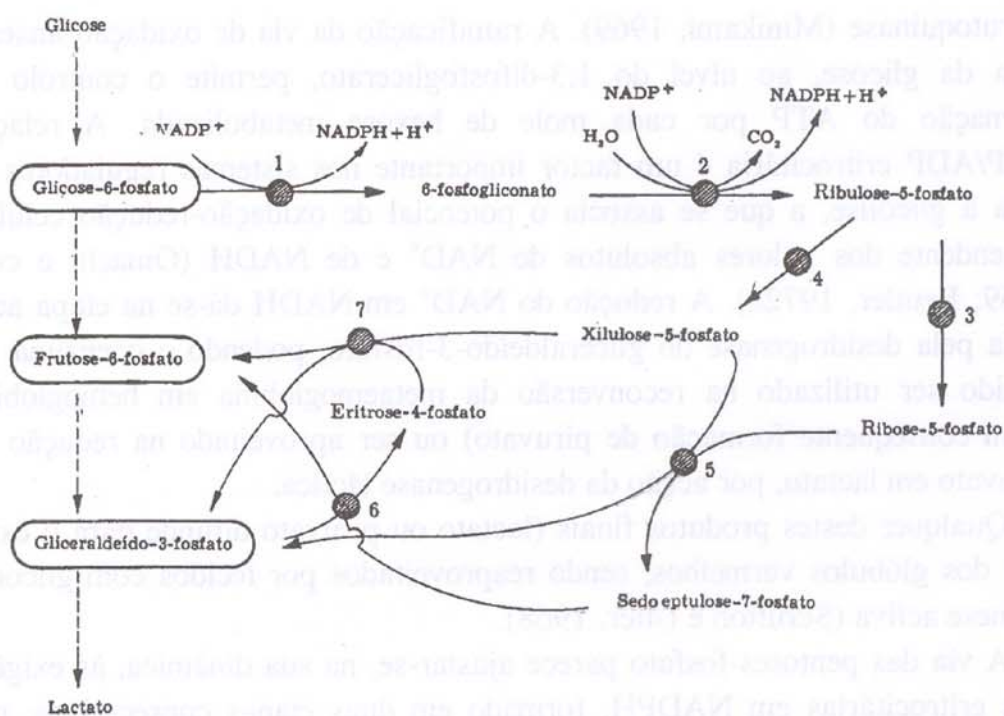


Fig. 7 – Via das fosfopentoses e respectivas conexões com a glicólise. As setas representam etapas catalisadas pelos seguintes enzimas: 1 - desidrogenase da glicose-6-fosfato; 2 - desidrogenase do fosfogliconato; 3 - ribose-fosfato-isomerase; 4 - ribose-fosfato-epimerase; 5 e 7 - transcetolase; 6 - transaldolase. Os intermediários comuns com a glicólise estão rodeados por um traço contínuo.

eritrocitárias dependam da quantidade e metabolização da glicose plasmática. Os resultados de Imarisio e col. (1969), obtidos de eritrócitos incubados num sistema em que era possível controlar o pH, pO_2 , produtos finais, glicose e co-factores, durante períodos variáveis, evidenciaram nítida subordinação da glicólise às necessidades energéticas globulares, expressa pela disponibilidade em ATP, por sua vez dependente da presença de glicose ou de adenina no meio de experiência. Submetendo eritrócitos normais à completa privação de glicose. Feig e col. (1972) observaram, uma hora depois, que as trioses-fosfato intracelulares haviam sido inteiramente consumidas, sendo o abastecimento de ATP feito através da metabolização do 2,3-DPG para piruvato e lactato. A concentração do ATP baixava gradualmente nas primeiras três horas, estabilizando a menos de 50% do valor inicial, acabando por se reflectir nos mecanismos de transporte iónico.

Que se poderá esperar em situações de hiperglicémia circulante? Ditzel (1972), ao estudar a afinidade para o oxigénio do sangue de quinze diabéticos sem acidose, propôs que a glicose seria aproveitada por diversas vias metabólicas eritrocitárias, não só para a glicólise mas ainda, também, pela via dos polióis e pela das fosfopentoses, estas funcionando mais activamente que o normal. Em consequência, talvez, da baixa da relação NAD/NADH_2 intracelular, diminui a concentração do 2,3-DPG, daqui resultando a maior afinidade para o oxigénio verificada no sangue daqueles doentes. Travis e col. (1971) também constataram, *in vitro*, o declínio do 2,3-DPG em eritrócitos incubados num meio rico em glicose. Em contrapartida, Alberti e col. (1972) não atribuem qualquer significado à concentração de 2,3-DPG, em casos de hiperglicémia.

Desconhece-se a importância que poderão ter, para o metabolismo eritrocitário *in vivo*, sobretudo em situações de emergência ou patológicas, os resultados de Ford e Omachi (1972). Estes investigadores demonstraram que a produção do lactato e a utilização da glicose aumentavam quando eritrócitos humanos eram incubados com o adenosina 3',5'-monofosfato cíclico ou o seu derivado dibutírico. Este efeito, absolutamente específico, acentuava-se pela adição de cafeína ao meio. No conjunto, o comportamento dos eritrócitos assemelhar-se-ia ao registado em diversos outros tecidos (Robison e col., 1971).

De tudo o que se focou, há a considerar que, entre a glicose fornecida aos glóbulos vermelhos e as quantidades oxidadas pelas metabólicas, tem de existir determinada margem de segurança, tornando viáveis adaptações fisiológicas. Brewer e Eaton (1971) afirmaram, em apoio desta hipótese, que o consumo habitual de glicose pelos eritrócitos normais era nitidamente inferior ao máximo calculado.

O influxo de glicose nos eritrócitos humanos é, também, cerca de 250 vezes superior ao das necessidades metabólicas globulares (Boris e Gomperts, 1972). É interessante que a actividade normal média da hexoquinase excede quase cinco vezes a capacidade de utilização da glicose pelos eritrócitos intactos (Beutler e Teeple, 1969). A velocidade de penetração não depende apenas das diferenças de concentração entre o meio exterior e o interior. Mantendo-se constantes ambos os níveis, diminui a transferência de glicose quando os seus valores absolutos aumentam. Propôs-se, inicialmente, que a passagem da glicose seria efectuada por um transportador móvel situado na membrana eritro-

citária, capaz de se combinar reversivelmente com a glicose em ambos os lados do revestimento, desprezando o concurso de qualquer sistema produtor de energia (Lieb e Stein, 1972). Este assunto é, contudo, objecto de larga controvérsia, após a introdução de teorias que, fundamentadas em estudos cinéticos, excluem a presença de transportadores. Um desses conceitos, formulado pelos mesmos investigadores, assenta na existência de um tetrâmero ($H_2 L_2$) proteico embebido na membrana eritrocitária, através do qual seria transferido o substrato. As subunidades H serviriam de ponto de união, com grande afinidade para a hexose, ao contrário das subunidades L, pouco receptivas. Este complexo teria duas conformações, uma em que os pontos de união estariam expostos ao solvente em qualquer das fases da membrana, a segunda concebendo esses mesmos sectores virados uns para os outros, comunicando entre si através do centro do tetrâmero, distribuindo-se as moléculas dos açúcares de acordo com as afinidades selectivas para os pontos de união. As variações estruturais seriam induzidas quando uma molécula do substrato se unisse a uma das subunidades. Nas concentrações baixas de glicose predominaria a ligação com os pontos apresentando afinidade elevada (H), ocasionando a outra conformação. Na cavidade central existiria agora o receptor de baixa afinidade, da subunidade L, face a face com a anterior, H. A glicose não penetraria no eritrócito, regressando-se à fase inicial. Quando ambas as subunidades (H e L) fossem ocupadas por moléculas de glicose (nas hiperconcentrações) já se admitiria a passagem para o interior globular, por transferência da glicose da subunidade L para a H, oposta.

O modelo citado parece resolver os problemas postos pelo transporte dos monossacáridos, em virtude da excelente concordância dos dados experimentais obtidos (Bolis e Gomperts, 1972). Registe-se, entretanto, que o transporte de glicose parece depender da composição da membrana eritrocitária, como sugerem os resultados de Moore e Hall (1971) em glóbulos de adultos ou recém-nascidos.

É de notar entretanto, que os mecanismos de transporte dos açúcares utilizados por muitos tipos celulares, entre os quais se contam os eritrócitos, parecem recorrer ao mesmo processo, o de transporte mediado ou facilitado. O metabolismo celular, através do fornecimento de energia química, surge como factor essencial à penetração activa dos açúcares, sobretudo nas células intestinais e dos túbulos renais para o que concorre ainda o ião sódio (Kaback, 1970; Curran, 1972).

Relação entre o metabolismo da glicose e o estado funcional da hemoglobina

O glóbulo vermelho depende inteiramente da via de Embden-Meyerhof para a obtenção de energia química, sob a forma de ATP. Por cada molécula de glicose metabolizada em piruvato ou lactato são geradas duas moléculas de ATP. O desvio de cerca de 90% da glicose obtida pelos eritrócitos para o sistema glicolítico é um argumento suficientemente forte da sua importância (Yunis e Yasmineh, 1969; Beutler, 1972a). Há nítida correlação entre a actividade da glicólise, a produção e a concentração do ATP.

A concentração de ATP varia com a idade dos glóbulos vermelhos, sendo necessários níveis razoáveis para que estes sobrevivam, quer *in vivo* quer no sangue armazenado para transfusões (Harris e Kellermeyer, 1970). A quantidade de ATP intraglobular parece ser geneticamente determinada, registando-se alterações sensíveis de indivíduo para indivíduo ou entre populações diferentes (Brewer, 1969).

Já se focaram os dois grandes processos utilizados pelo eritrócito para alterar as concentrações dos substratos intermediários da glicólise, de modo a ajustar a quantidade de ADP fosforilada por molécula de glicose, as concentrações de NAD⁺ reduzido ou a produção de 2,3-DPG.

Tomando em conta o principal objectivo funcional dos glóbulos vermelhos, a oxigenação tecidual, interessará relacionar esta actividade com o sistema em que se processa a glicólise ou, sobretudo, com a via de Rapoport-Luebering. Com efeito, nas situações que exijam maior facilidade de dissociação do oxigénio do seu portador, a hemoglobina, quando as restantes funções gerais (cardíacas, pulmonares, resposta eritropoiética) forem insuficientes para o efeito, há que esperar a aceleração do ritmo de consumo da glicose, devendo suceder o inverso em condições opostas (Brewer e Eaton, 1971). O grau de utilização do ATP e, sobretudo, do 2,3-DPG, ocasionando oscilações nos respectivos níveis eritrocitários, participará, certamente, no controlo da glicólise, por influências alostéricas exercidas nos seus enzimas reguladores, modificando-lhes a actividade. As variações fisiológicas da hemoglobina entre a forma oxigenada ou a livre de oxigénio serão, através das modificações estruturais que as caracterizam, dos principais indutores do aproveitamento dos intermediários energéticos produzidos na glicólise (Garby e col., 1969; Caldwell e col., 1971).

Infere-se daqui que o metabolismo anaeróbio da glicose e as concentrações ou alterações estruturais da hemoglobina, resultantes da fixação ou saída de oxigénio da molécula, funcionam em estreita cooperação, exibindo perfeita interdependência (Bunn e Jandl, 1970; Kaplan, 1971a; Oski e Gottlieb, 1971; Rorth e col., 1972).

Os principais enzimas reguladores da glicólise nos eritrócitos são a hexoquinase, a fosfofrutoquinase e a piruvato-quinase, a que se associam os que formam e degradam o 2,3-DPG pela via de Rapoport-Luebering (Tsuboi e Fukunaga, 1965; Rose e Warms, 1966). Sugeriu-se, ainda, que a desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato poderia constituir um sector de controlo adicional.

A hexoquinase, ao catalisar a fosforilação da glicose na posição 6, permite o acesso das hexoses à glicólise ou à sequência oxidativa directa (Beutler e Teeple, 1969). A concentração deste enzima decresce com o envelhecimento globular (Valentine e col., 1967) e a sua carência, congénita, ocasiona uma forma rara de doença hemolítica (Valentine, 1971). A hexoquinase é fortemente inibida pela glicose-6-fosfato, recuperando a actividade na presença de fosfato inorgânico. Suspeita-se que a estimulação do consumo da glicose por eritrócitos incubados com fosfato inorgânico resulta da diminuição dos níveis da glicose-6-fosfato, por aumentar a actividade da fosfofrutoquinase. Note-se que o 2,3-DPG também aparenta inibir a hexoquinase, constituindo um poderoso meio de controlo de toda a via glicolítica (Beutler, 1971). Nas carências hereditárias diminuí, obviamente, a concentração eritrocitária do 2,3-DPG, em paralelo com os valores de P_{50} (Delivoria-Papadopoulos e col., 1969).

A piruvato-quinase, ao contrário do enzima precedente, catalisa uma das etapas em que é formado o ATP, por conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato (Rose e Warms, 1966). O potássio parece ser, junto com o magnésio, um cofactor importante para a sua actividade (Leonard, 1972). Deficiências congénitas deste enzima provocam anemias hemolíticas não esferocíticas (Tanaka e Paglia, 1971), registando-se, também, aumento do 2,3-DPG e dos valores de P_{50} (Delivoria-Papadopoulos e col., 1969) ou da relação 2,3-DPG/ATP (Buc e col., 1972).

A fosfofrutoquinase é, de todos os enzimas glicolíticos, o que exerce controlo mais eficiente sobre toda a via de utilização anaeróbica da glicose (Rose e Warms, 1966). Quando está ausente dos glóbulos de humanos, ocasiona anemias hemolíticas de grau moderado (Waterbury e Frenkel, 1972),

decrecendo a sua concentração à medida que os eritrócitos normais envelhecem (Beutler, 1972a). Em indivíduos com eritrócitos deficientes em piruvato-quinase verifica-se a inibição da fosfofrutoquinase, para evitar, aparentemente, o consumo de NAD^+ , mantendo o estado de oxidação-redução celular dentro dos valores normais (Buc e col., 1972). A intensidade quase normal da glicólise, registada nas deficiências de piruvato-quinase, interpretam-se através do bloqueio ao nível deste enzima que, por inibição retrógrada, baixa a actividade de fosfofrutoquinase.

○ Ao pH normal do plasma, a actividade de fosfofrutoquinase é determinada pela relação ATP/ADP, concentrações de ATP ou de fosfato inorgânico, livres e disponibilidade de frutose-6-fosfato. O aumento dos níveis intra-eritrocitários de fosfato inorgânico (e do ADP) acelera, notavelmente, a utilização da glicose, elevando ainda a proporção ATP/ADP e acumulando frutose-1,6-difosfato e trioses-fosfato (Tsuboi e Fukunaga, 1965; Rose e Warms, 1966).

Concentrações excessivas de ATP exercem efeitos contrários, inibindo a actividade enzimática. Esta acção parece bastante apropriada como mecanismo de adaptação às necessidades eritrocitárias: uma vez satisfeitos em ATP, para todas as suas funções, dá-se o ajustamento metabólico para níveis inferiores, mais económicos.

○ A actividade da fosfofrutoquinase é muito sensível ao pH do meio de reacção, elevando-se quando este sobe e vice-versa. Assim, a valores de pH inferiores a 7,4 reduz-se drasticamente o consumo da glicose, aumentam as hexoses monofosfato e diminui a frutose-1,6-difosfato (Minikami e Yoshikawa, 1965). Estes resultados sugerem que a fosfofrutoquinase seja inibida pelos hidrogeniões. Staal e col., (1972) demonstraram que a inibição pelo ATP é condicionada pelo pH. Ao contrário do que sucede com a hexoquinase, o 2,3-DPG não inibiria a fosfofrutoquinase de eritrócitos humanos (Staal e Koster, 1972), no que discordam Tarui e col., (1972), usando glóbulos de coelhos.

○ A actividade da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, bastante mais acentuada nos eritrócitos jovens, assegura a dupla função de oxidar e fosforilar o gliceraldeído, originando o 1,3-difosfoglicerato (Yunis e Yasmineh, 1969).

△ A concentração do fosfato inorgânico, associada à do NAD^+ , condiciona a actividade daquela desidrogenase. O NADH resultante tem dois destinos possíveis, ou para a redução da metaemoglobina, formando-se piruvato

como produto final de glicólise ou, quando o NADH não é reoxidado pelo processo anterior, visando a redução do piruvato pela desidrogenase láctica (Beutler, 1972a). Observou-se que variações nas concentrações de NADH eritrocitário regulam a glicólise. Na ausência de glicose no meio de incubação baixa o nível de NADH (Omachi e col., 1969).

Mills (1969) considerou que, em situações de aumento do pH ou do fosfato inorgânico, havia como que uma transferência das atribuições reguladoras da fosfofrutoquinase, na glicólise e talvez ainda na síntese de 2,3-DPG, para etapas situadas abaixo, nomeadamente a da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato e da fosfoglicerato-quinase. Este último enzima actua na dependência da concentração do 1,3-difosfoglicerato e da relação ATP/ADP. A sua actividade baixa quando se elevam os valores de ATP, formando-se mais 3-fosfoglicerato quando, pelo contrário, predomina o ADP. No conjunto, seria viável concluir que as condições que estimulam a desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato dependem, em parte, da activação da fosfofrutoquinase (Oski e Gottlieb, 1971).

Chega-se agora a um ponto crucial, o da formação e utilização do 2,3-DPG. A concentração deste intermediário equilibra-se de acordo com a actividade de duas enzimas, o que o forma do 1,3-difosfoglicerato (a 2,3-difosfoglicerato-mutase) e o que o catabolisa em 3-fosfoglicerato (a 2,3-difosfoglicerato-fosfatase), ambos sujeitos a um mecanismo geral de regulação muito curioso (Fig. 8).

A biossíntese do 2,3-DPG, por acção da mutase, é uma reacção irreversível, em que um grupo fosforilo do 1,3-DPG é transferido para o 3-fosfoglicerato, com regeneração de monofosfato:



Concentrações moderadas de fosfatos inorgânicos, ou muito baixas do 2,3-DPG, inibem a actividade da mutase, por sua vez activada pelo 2-difosfoglicerato (Rose, 1968).

Alpers (1972) considera o efeito inibidor do fosfato inorgânico pouco adaptado às condições fisiológicas intra-eritrocitárias. Com efeito, atendendo aos níveis habitualmente existentes nos eritrócitos, seria preciso um grande decréscimo para que, de acordo com os cálculos, a mutase funcionasse. A hipótese mais adaptada consistirá em propor a existência de um outro componente globular que anule a influência do fosfato inorgânico. Com o 2,3-

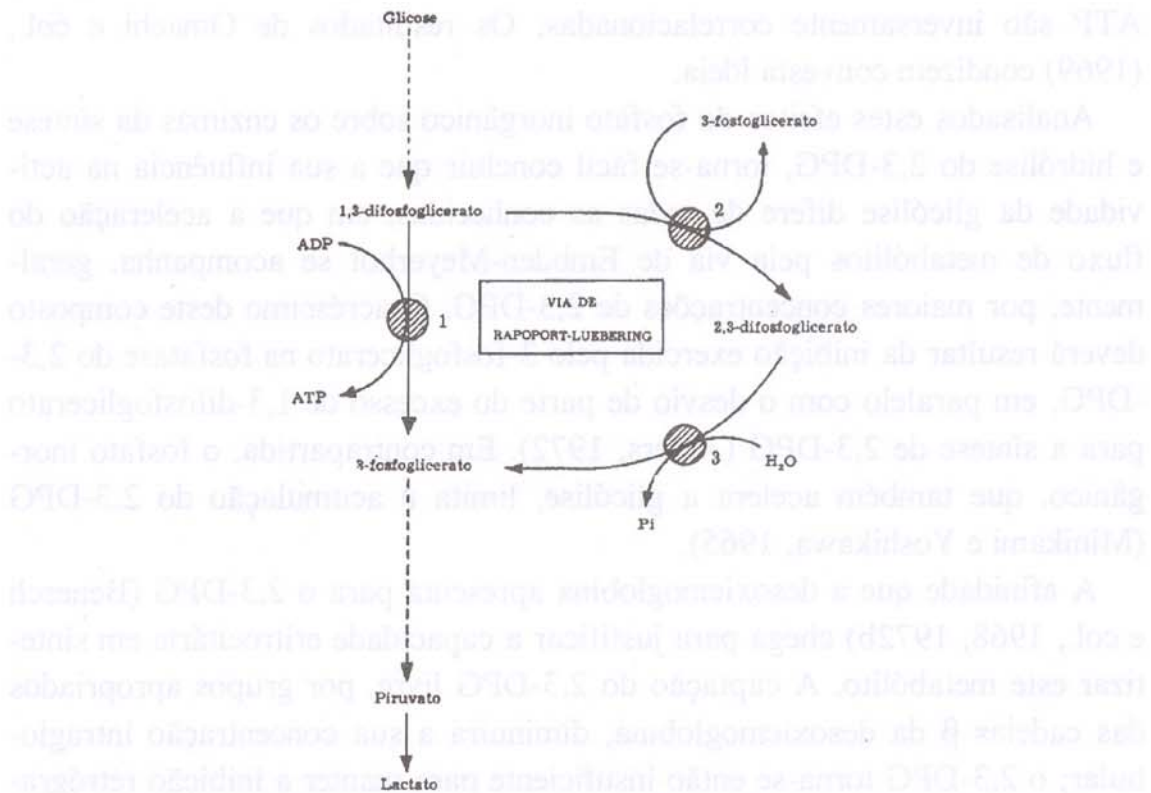


Fig. 8 – Via de Rapoport-Luebering, em que se forma e catalisa o 2,3-difosfoglicerato.

1 - fosfoglicerato-quinase; 2 - 2,3-difosfoglicerato-mutase; 3 - 2,3-difosfoglicerato-fosfatase.

DPG não haveria qualquer problema, pois o controlo da sua própria síntese seria, em conjunto com a receptividade da desoxiemoglobina para aquele composto, um óptimo processo de regular as concentrações eritrocitárias.

As surpresas acentuam-se quando se analisa a etapa catalisada pela fosfatase, em que, por hidrólise, o 2,3-difosfoglicerato é reintegrado, através do 3-fosfoglicerato, na via principal glicolítica:



Esta fosfatase é estimulada pelo fosfato inorgânico e inibida pelo 3-fosfoglicerato (Harkness e Rorth, 1969).

Rose e Liebowitz (1970) interpretaram a activação da fosfatase por um dos seus produtos da reacção, o fosfato inorgânico, como um excelente processo adaptivo pelo qual os glóbulos vermelhos obteriam ATP à custa do 2,3-DPG, atendendo a que as concentrações do fosfato inorgânico e as do

ATP são inversamente correlacionadas. Os resultados de Omachi e col., (1969) condizem com esta ideia.

Analisados estes efeitos do fosfato inorgânico sobre os enzimas da síntese e hidrólise do 2,3-DPG, torna-se fácil concluir que a sua influência na actividade da glicólise difere de todas as conhecidas, em que a aceleração do fluxo de metabólitos pela via de Embden-Meyerhof se acompanha, geralmente, por maiores concentrações de 2,3-DPG. O acréscimo deste composto deverá resultar da inibição exercida pelo 3-fosfoglicerato na fosfatase do 2,3-DPG, em paralelo com o desvio de parte do excesso de 1,3-difosfoglicerato para a síntese de 2,3-DPG (Alpers, 1972). Em contrapartida, o fosfato inorgânico, que também acelera a glicólise, limita a acumulação do 2,3-DPG (Minikami e Yoshikawa, 1965).

A afinidade que a desoxiemoglobina apresenta para o 2,3-DPG (Benesch e col., 1968, 1972b) chega para justificar a capacidade eritrocitária em sintetizar este metabólito. A captação do 2,3-DPG livre, por grupos apropriados das cadeias β da desoxiemoglobina, diminuirá a sua concentração intraglobular; o 2,3-DPG torna-se então insuficiente para manter a inibição retrógrada sobre a mutase, facilitando a actividade que lhe é específica. Eritrócitos intactos sem acesso ao oxigénio apresentam glicólise mais activa e formam mais 2,3-DPG, enquanto hemolisados eritrocitários incubados com desoxiemoglobina conduzem ao aumento da síntese do 2,3-DPG (Oski e col., 1970). Conclui-se, daqui, que o 2,3-DPG é recebido pela desoxiemoglobina à medida que é gerado, aliviando a mutase da inibição exercida por aqueles compostos e, portanto, acelerando a sua própria síntese.

A competição entre a 2,3-DPG-mutase e a fosfoglicerato-quinase para o 1,3-difosfoglicerato é, também, um factor a ter em conta na regulação dos níveis de 2,3-DPG.

Pensa-se que a concentração intraglobular de ADP condiciona uma ou outra actividade enzimática, sendo estimulada a da fosfoglicerato-quinase quando baixa a relação ATP/ADP eritrocitária (Bunn e Jandl, 1970).

Rose e Warms (1966) e Omachi e col., (1969) verificaram que a disponibilidade em NAD^+ das hemácias poderá depender da produção de 2,3-DPG. Quando esta é elevada diminui o fluxo das trioses-fosfato para o piruvato e lactato, não se dando a reoxidação do NAD^+ necessário à actividade da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, por ser hipoactiva a desidrogenase láctica. Adicionando piruvato a eritrócitos naquelas condições conseguiu-se a

remoção do NADH e a conversão das trioses acumuladas em 1,3-difosfoglicerato.

Propôs-se que o pH eritrocitário mediasse, também, a produção de 2,3-DPG (Astrup, 1970). Sabe-se, pelo que se disse atrás, que o aumento de pH eleva a actividade da glicólise e, por outro lado, a desoxigenação da hemoglobina, ao provocar a captação de hidrogeniões, torna o meio eritrocitário mais alcalino. Como a desoxiemoglobina motiva a síntese do 2,3-DPG, seria lógico relacionar a estimulação da actividade da mutase do 2,3-DPG com a subida do pH. Oski e Gottlieb (1971) consideraram, contudo, que desoxiemoglobina e o aumento intra-eritrocitário do pH, mas nunca este factor isolado, talvez actuassem sinergicamente. De qualquer modo, a elevação do pH diminui os pontos de ligação para o 2,3-DPG na molécula de hemoglobina (Brewer e Eaton, 1971).

Finalmente, o 2,3-DPG exerce notável acção controladora sobre o metabolismo anaeróbico da glicose, ao inibir a actividade da hexoquinase (Beutler, 1971), afectando indirectamente, os níveis globulares de ATP e do próprio 2,3-DPG. Srivastava e Beutler (1972), ao comprovarem o efeito inibidor do 2,3-DPG, não só sobre a hexoquinase mas ainda na fosfofrutoquinase, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e fosfoglicomutase, consideram-no de grande importância fisiológica na regulação da sua síntese intraglobular.

Metabolismo da metaemoglobina

A metaemoglobina designa a hemoglobina em que os ferroemes estão oxidados em ferriemes, por si incapacitados de se unir reversivelmente ao oxigénio (Jaffé e Neumann, 1968). Com efeito, para que a hemoglobina possa transportar o oxigénio necessita que o ferro esteja reduzido, dispondo de um ponto de condensação para receber aquela molécula (Perutz, 1970a). O oxigénio, ao ligar-se àquela posição, receberia um electrão do ferro hemínico, ficando o oxigénio como um anião «superóxido», estável (Wittenberg e col., 1970). Se a região hidrofóbica que rodeia o heme for submetida a influências oxidantes, o ferro transforma-se rapidamente na forma férrica que caracteriza a metaemoglobina. Esta, ao dispor apenas de cinco electrões não emparelhados, perde a capacidade de receber oxigénio. A sexta posição de

coordenação é, então, ocupada pela água ou por ligandos aniónicos do tipo do cianeto, alterando-lhe as propriedades, sobretudo detectáveis nas variações do espectro de absorção Keitt, 1972).

A água que entra para a bolsa hemínica da metaemoglobina estabiliza o ferro na forma trivalente, reversível em ferrosa unicamente por reacções químicas. Em contrapartida, o oxigénio é removido ao diminuir a sua pressão, na oxiemoglobina. Estas diferenças justificam as capacidades de transformação da oxiemoglobina e da metaemoglobina em desoxiemoglobina (Perutz e TenEyck, 1971).

Está ainda por esclarecer completamente o mecanismo de oxidação da hemoglobina. A lentidão que a caracteriza na presença de oxigénio, explica-se, em parte, pela natureza hidrofóbica do meio em que se localizam os grupos heme (Perutz, 1970a). Alterações na composição globínica nos sectores referidos, como se verifica em alguns tipos de hemoglobinas (M, de metaemoglobina), resultam em notável aumento da oxidação espontânea em metaemoglobina, forma em que se conservam estáveis e, também, inoperantes (Lehmann e Huntsman, 1972).

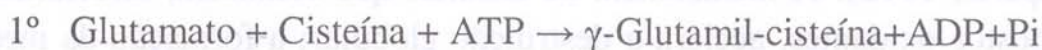
Para que o oxigénio chegue aos tecidos é preciso, pois, que os glóbulos vermelhos contenham o mínimo possível de metaemoglobina e que a possam converter à forma reduzida quando sujeitos a influências oxidantes (Harris e Kellermeyer, 1970). Entre 0,2 a 3% da hemoglobina total é transformada, diariamente em indivíduos normais, em metaemoglobina: a concentração circulante oscila por 1%, reflectindo a existência de equilíbrio fisiológico entre a formação e a redução da metaemoglobina. Esta redução, que pressupõe a transferência de electrões para o ferro trivalente, originando a forma ferrosa, é garantida nos glóbulos vermelhos normais por um equipamento enzimático ou, talvez também, por substâncias redutoras, que excedem bastante, no conjunto, o ritmo de oxidação da hemoglobina.

Diversos agentes redutores, constituintes habituais dos eritrócitos (p. ex., ácido ascórbico, glutatião e compostos sulfidrílicos), organizam-se como que numa segunda linha de defesa (de importância muito discutível) contra os oxidantes, activa quando falham os sistemas enzimáticos (Jaffé e Neumann, 1968; Jaffé e Hsieh, 1971). Demonstrou-se que o ácido ascórbico actuava directamente nos eritrócitos de doentes com metaemoglobinemia hereditária, quer *in vivo* ou *in vitro*, bem como em glóbulos vermelhos de indivíduos normais (Jaffé, 1964). A metaemoglobina seria reduzida pelo ácido ascórbico

co, formando-se hemoglobina e ácido desidroascórbico. Este poderia ser reconvertido em ácido ascórbico, por acção de uma redutase específica, dependente do GSH (Hughes e Maton, 1968). Ainda que Scott e col., (1965) considerassem este processo como responsável pela conversão de 16% da metaemoglobina, é-lhe conferido escasso significado (Jaffé e Hsieh, 1971).

Atribuiu-se também ao glutatião reduzido uma certa participação directa na redução da metaemoglobina que, para Scott e col. (1965), oscilaria pelos 12% da capacidade globular total. *In vitro*, pelo menos, parece ser muito lento e ineficiente o contributo prestado pelo glutatião (Jaffé, 1964; Jaffé e Neumann, 1968), ainda que relacionado com muitas reacções dentro e, possivelmente, fora dos glóbulos (Prins e Loos, 1969), que resultam na formação do GSSG. É de notar que, recentemente, foram descritos três casos de anemia hemolítica, além de sinais de hiperemólise nos respectivos familiares, atribuíveis à diminuição dos níveis globulares em glutatião reduzido, talvez por deficiência congénita da glutatião-sintetase (Lo e col., 1972).

O glutatião eritrocitário encontra-se em permanente renovação mantendo-se constante a sua concentração, em geral sob a forma reduzida, durante a vida média globular (Dimant e col., 1955). A síntese do glutatião efectua-se em duas etapas, ambas verificadas em hemolisados eritrocitários humanos (Jackson, 1969):



É a segunda etapa, catalisada pela glutatião-sintetase, que parece estar deficitária nos indivíduos com hemólise e baixa concentração de GSH eritrocitário.

Entre as reacções atribuídas ao glutatião reduzido, com provável significado para a integridade dos eritrócitos, salientam-se as de inibição competitiva com os agentes oxidantes ou a de recuperação de sectores estruturais previamente oxidados (Prins e Loos, 1969):

- 1) aceitando radicais oxidantes, como qualquer grupo tiol;
- 2) reduzindo pontes sulfidrílicas em enzimas glicolíticos ou na hemoglobina, sujeitos a processos oxidativos;
- 3) actuando em estreita associação com dois sistemas enzimáticos apropriados à eliminação de peróxidos, a catalase e a peroxidase.

Os glóbulos vermelhos são, na realidade, muito ricos em catalase, utilizada na decomposição do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. Estas enzimas funcionam, aparentemente, apenas quando as concentrações de peróxido de hidrogénio são muito elevadas ou na ausência da regeneração do GSH, ficando a degradação deste composto a cargo da glutatíon-peroxidase quando existe pouco O_2H_2 (Dimant e col, 1955; Mills e Randall, 1959). As observações de que a carência hereditária da catalase não ocasiona alterações hematológicas (Takahara, 1971), enquanto na deficiência do sistema da glutatíon-peroxidase surgem crises hemolíticas por exposição a drogas oxidantes (Beutler, 1971), justificam que se atribua maior interesse fisiológico ao segundo mecanismo. Esta opinião foi recentemente confirmada *in vitro* (Tudhope e Leece, 1971) e na revisão apresentada por Kaplan (1971b).

A indução de hemólise por drogas resulta, em geral, do efeito exercido pelo composto no metabolismo eritrocitário, sendo menos frequentemente associada a reacções imunológicas. A maioria das substâncias que, por acção tóxica, actuam nos eritrócitos, promovem a oxidação da hemoglobina e destroem, talvez, a estrutura normal da membrana globular (Dacie, 1967; White e Dacie, 1971). Os grupos sulfidrílicos, muito sensíveis a influências tóxicas, são, com efeito, essenciais à manutenção da estrutura própria das membranas globulares ou, até, para a conservação dos mecanismos de transporte específicos (Bolis e Gomperts, 1972). A inexistência de enzimas que catalisem, directamente, os compostos oxidantes, acelera a destruição globular; a formação da metaemoglobina e a precipitação irreversível da hemoglobina desnaturada como corpos de Heinz são etapas paralelas que sinalizam a morte precoce dos eritrócitos intoxicados (Tudhope e Leece, 1971; Beutler, 1972a) e a sua remoção pelo baço (Weiss e Tavassoli, 1970).

A formação de corpos de Heinz, associada ao aumento de hemólise globular, é tida como conseqüente a três causas principais; presença de hemoglobinas instáveis, secundária à ingestão de diversos compostos químicos ou resultante da deficiência de um dos sistemas redutores globulares (White e Dacie, 1971).

Pensa-se que a destruição, *in vivo*, dos eritrócitos que contêm corpos de Heinz depende da interacção destes aglomerados com a membrana periférica, com a qual se unem por ligações sulfidrílicas, enfraquecendo-lhe a resistência e capacidade de deformação (Jacob, 1970; Lessin e col., 1972).

A actividade da glutatíon-peroxidase depende, indirectamente, do forne-

cimento de NADPH que, por sua vez, resulta da actividade das desidrogenases que actuam na via das fosfopentoses (Fig. 9). Seria de esperar, assim, que a privação de glicose ocasionasse o aumento da metaemoglobina, em virtude de a diminuição do fluxo daquele substrato, fosforilado pela via mencionada, provocar a deficiente recuperação do GSSH e, portanto, pôr em causa o efeito protector exercido pela glutatião-peroxidase sobre a hemoglobina. Esta hipótese foi inteiramente corroborada pelas observações de Mills e Randall (1959) e por Tudhope e Leece (1971), *in vitro*.

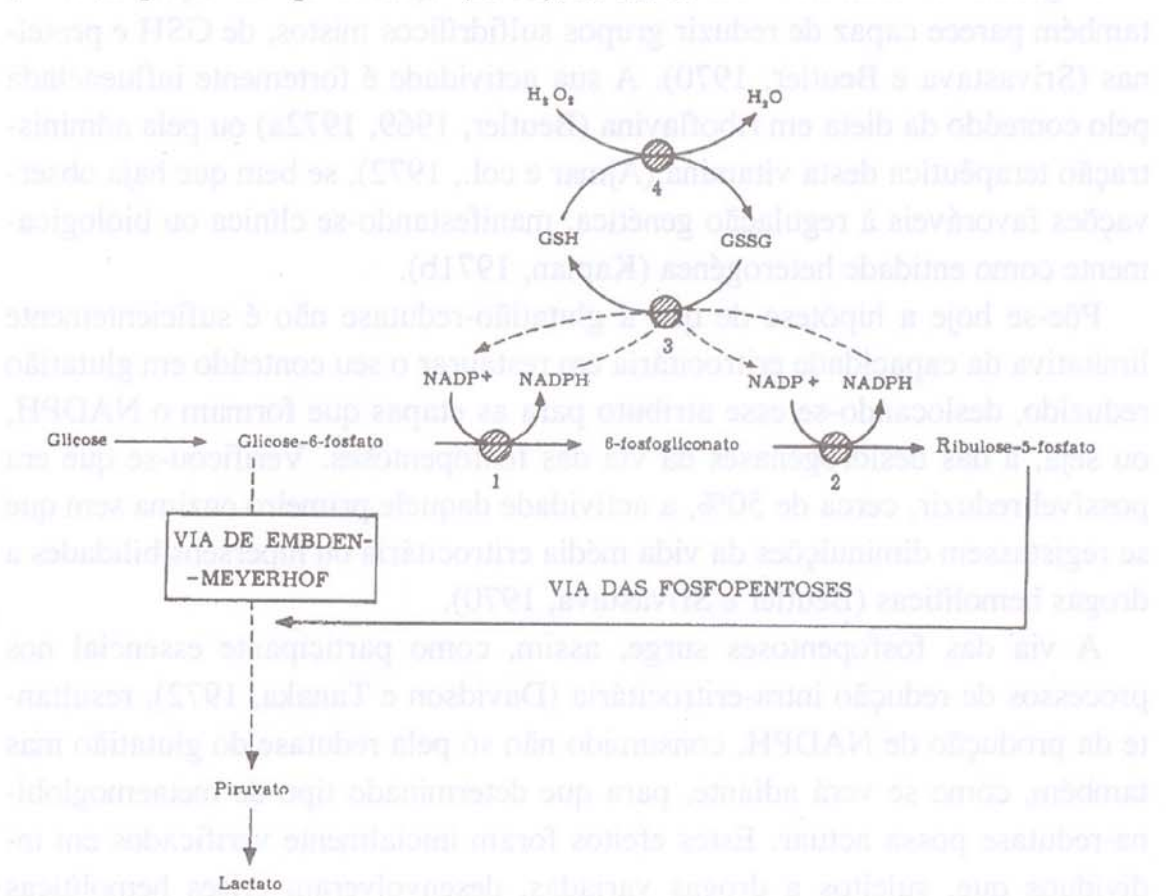


Fig. 9 – Mecanismo eritrocitário de redução do glutatião e eliminação do peróxido de hidrogénio.
 1 - desidrogenase da glicose-6-fosfato; 2 - desidrogenase do 6-fosfogliconato;
 3 - glutatião-redutase; 4 - glutatião-peroxidase.

Por outro lado verificou-se, *in vitro*, que a formação da metaemoglobina, consequente à exposição prolongada dos eritrócitos ao efeito nocivo de algumas substâncias tóxicas, oxidantes, se acompanhava de diminuição do GSH, consumido na tentativa de manter reactivos alguns grupos de hemoglobina. Resultava, deste esforço, o aumento de actividade da via das fosfo-

pentoses (Jacob e Jandl, 1966). Está ainda pouco esclarecido o grau de participação da glutatíão-peroxidase, sobretudo nas deficiências hereditárias, como mecanismo protector do meio eritrocitário. Esta dúvida apoia-se na existência de um outro enzima, a glutatíão-redutase, cuja acção, incidente na redução do GSSG em GSH, requer a presença de NADPH ou NADH como dadores de electrões, ainda que nos eritrócitos intactos utilize apenas o NADPH (Rieber e col., 1968).

A glutatíão-redutase é um enzima flavínico que, além da acção descrita, também parece capaz de reduzir grupos sulfidrílicos mistos, de GSH e proteínas (Srivastava e Beutler, 1970). A sua actividade é fortemente influenciada pelo conteúdo da dieta em riboflavina (Beutler, 1969, 1972a) ou pela administração terapêutica desta vitamina (Ajmar e col., 1972), se bem que haja observações favoráveis à regulação genética, manifestando-se clínica ou biologicamente como entidade heterogénea (Kaplan, 1971b).

Põe-se hoje a hipótese de que a glutatíão-redutase não é suficientemente limitativa da capacidade eritrocitária em restaurar o seu conteúdo em glutatíão reduzido, deslocando-se esse atributo para as etapas que formam o NADPH, ou seja, a das desidrogenases da via das fosfopentoses. Verificou-se que era possível reduzir, cerca de 50%, a actividade daquele primeiro enzima sem que se registassem diminuições da vida média eritrocitária ou hipersensibilidades a drogas hemolíticas (Beutler e Srivastava, 1970).

A via das fosfopentoses surge, assim, como participante essencial nos processos de redução intra-eritrocitária (Davidson e Tanaka, 1972), resultante da produção de NADPH, consumido não só pela redutase do glutatíão mas também, como se verá adiante, para que determinado tipo de metaemoglobina-redutase possa actuar. Estes efeitos foram inicialmente verificados em indivíduos que, sujeitos a drogas variadas, desenvolveram crises hemolíticas espectaculares. Estudos mais aprofundados não tardaram em relacionar a desidrogenase da glicose-6-fosfato com alguns desses acontecimentos, observando-se que a deficiência daquele enzima estava na base da maior susceptibilidade aos compostos administrados, sobretudo à primaquina (Carson, 1968; Beutler, 1972b; Motulsky, 1972).

A deficiência da desidrogenase da glicose-6-fosfato é uma afecção hereditária ligada ao cromossoma X, existente em milhões de pessoas e de que estão descritas mais de 100 variantes, caracterizadas ou por menor estabilidade, ou menor actividade enzimática ou uma combinação de ambas (Kirkman, 1968;

Motulsky, 1972; Beutler, 1972b). As populações Negras ou de origem mediterrânica são muito susceptíveis a este erro (ou experiência evolutiva?) genético. Observou-se que as tribos bantas de Moçambique apresentavam um índice médio de 13% de deficientes, alargado para 20% ao Sul do Save (Manso, 1966), em que, posteriormente, se isolaram quatro novas variantes (Reys e col., 1970).

Registam-se crises hemolíticas em portadores desta anomalia, sujeitos não só a antimaláricos do tipo de primaquina mas também a drogas muito diversas (Frazer e Vesell, 1968; Beutler, 1972a), tais como o ácido acetilsalicílico, sulfonamidas, nitrofurantoína e, até, ao azul de metileno que, paradoxalmente, não produz qualquer efeito nocivo, bem pelo contrário, em indivíduos com deficiência congénita da metaemoglobina-redutase (Smith e Thron, 1972).

A desidrogenase do 6-fosfogliconato é, em contrapartida, muito menos susceptível a alterações hereditárias. Os raríssimos casos descritos caracterizam-se, por vezes, por anemia hemolítica crónica com corpos de Heinz eritrocitários. Aqui, tal como sucede com a desidrogenase da glicose-6-fosfato, forma-se menos NADPH, o que, conseqüentemente, conduz a acentuada instabilidade do glutatião (Valentine, 1972a).

Conhece-se pouco, todavia, acerca do mecanismo exacto que, nos indivíduos com deficiência da desidrogenase da glicose-6-fosfato, conduz à destruição globular.

Frazer e Vesell (1968) demonstraram que diversos compostos químicos provocam hemólise, *in vitro*, logo que metabolizados em derivados hidroxilados, muito mais oxidantes que as substâncias iniciais. Sugeriu-se, então, que o aumento intraglobular de intermediários oxidantes ao ocasionarem a lesão da membrana, talvez por oxidação dos grupos sulfidrílicos aí localizados, tornariam os eritrócitos deficitários naquele enzima bastante susceptíveis à fragmentação no trajecto circulatório. O decréscimo em glutatião reduzido seria secundário à diminuição do NADPH, por carência da desidrogenase em causa. A produção de metaemoglobina e, talvez também, a desnaturação da molécula hemoglobínica, poderiam considerar-se efeitos colaterais dos intermediários oxidantes existentes nos glóbulos.

Danon e col., (1961) já haviam descrito alterações do estroma de eritrócitos deficientes, muito semelhantes às que surgem com o envelhecimento normal do glóbulo. As hemácias jovens, das variantes do tipo africano, evi-

denciam muito maior actividade da desidrogenase da glicose-6-fosfato que as antigas, rapidamente eliminadas da circulação (Piomelli e col., 1968; Motulsky, 1972). A aparente protecção conferida pela deficiência daquela enzima em indivíduos simultaneamente portadores de drepanocitose fundamenta-se nesta perspectiva (Piomelli e col., 1972).

A destruição eritrocitária, subsequente à administração de drogas oxidantes, é, em geral, precedida pela diminuição dos teores globulares em GSH, após o que retoma os níveis habituais. Concluiu-se daqui que os glóbulos destruídos eram os carenciados em GSH (Beutler, 1972b).

A metaemoglobina doseada no sangue de indivíduos deficitários que haviam ingerido drogas hemolíticas não era superior ou, por vezes, era inferior aos níveis fisiológicos (Beutler, 1959).

Pensa-se que a redução da metaemoglobina está inalterada nos glóbulos vermelhos deficientes em desidrogenase da glicose-6-fosfato e, por si, não acelera a destruição eritrocitária (Jaffé e Neumann, 1968; Jaffé e Hsieh, 1971).

O conteúdo globular em GSH e, sobretudo, os mecanismos que garantem a sua manutenção, parecem ser os mais fortes oponentes ao efeito nocivo das drogas oxidantes, permitindo não só eliminar metabólitos prejudiciais como ainda conservar intactas as características estruturais, quer da membrana quer da hemoglobina. A protecção conferida pelo GSH não é suficiente, pelo menos nos glóbulos deficitários em desidrogenase da glicose-6-fosfato; a adição de glicose ou inosina a eritrócitos normais preserva o seu conteúdo em GSH, o que já não sucede em glóbulos com menor concentração enzimática. Se o GSH for oxidado poderá ser reduzido, rapidamente, nas células normais capazes de obter o NADPH por oxidação da glicose. Eritrócitos normais em meio expoliado de glicose, ou glóbulos deficientes, não conseguem obter NADPH em quantidade que baste para manter o GSH no estado reduzido (Beutler e col., 1957; Glader e Conrad, 1972).

Apesar de a actividade da via das fosfopentoses ser independente da concentração de glicose no meio de incubação dos eritrócitos, é fortemente estimulada por substâncias oxidantes (Davidson e Tanaka, 1972). Este esforço de adaptação não será correspondido quando nos glóbulos não existirem níveis suficientes da desidrogenase da glicose-6-fosfato. Assim, a redução do glutatião torna-se uma etapa fundamental para a manutenção do seu efeito protector intra-eritrocitário, quer actue directamente ou através dos sistemas enzimáticos centrados no glutatião. A falência dos mecanismos de regenera-

ção do glutatião reduzido acabará por expor a hemoglobina à oxidação e consequente desnaturação, a menos que entre em acção um segundo sistema enzimático, o das redutases da metaemoglobina.

No conjunto, poder-se-á subdividir os mecanismos antioxidantes eritrocitários em dois grupos, um constituído pelo glutatião, pela glutatião-peroxidase, pela glutatião-redutase e pela catalase, que se encarrega de absorver o potencial oxidante do oxigénio molecular, sendo o outro, o das redutases da metaemoglobina, activo nas formas oxidadas da hemoglobina, convertendo-a ao estado funcional. Este sistema parece ser, de ambos, o mais eficaz (Keitt, 1972).

Quando tal sistema protector se torna insuficiente desequilibra-se a relação, habitualmente existente, entre a oxidação e a redução da hemoglobina. A consequente acumulação de metaemoglobina nos eritrócitos, acima de um certo valor, é uma das características essenciais da metaemoglobinémia. Estas afecções subdividem-se em dois grandes grupos: hereditárias e adquiridas. As metaemoglobinémias adquiridas são, de longe, muito mais comuns, sobretudo em crianças, e ocorrem quando os eritrócitos são expostos a compostos ou drogas tóxicas, oxidantes. De acordo com o esquema proposto por Jaffé e Neumann (1968) esta situação resultaria de maior tendência da hemoglobina a oxidar-se. A metaemoglobinémia tóxica não persiste, em geral, mais de 24 a 72 horas após ser removido ou metabolizado o agente intoxicante.

As metaemoglobinémias hereditárias podem subdividir-se nas de causa enzimática e nas associadas a alterações da porção globínica da hemoglobina. São situações muito raras mas interessantes, na maioria filiadas no primeiro subgrupo, por deficiência congénita de qualquer dos enzimas que reduzem a metaemoglobina à forma funcional. As restantes são hemoglobinopatias (do tipo M), em que alterações estruturais das cadeias α ou β , nos sectores globínicos que envolvem o heme, favorecem a estabilização da hemoglobina no estado oxidado (Ozsoylu, 1972).

A redução da metaemoglobina pressupõe a transferência de electrões para o ferro trivalente, originando a forma ferrosa, em reacções habitualmente catalisadas por enzimas activos na presença de nucleótidos pirimídicos reduzidos (Jaffé e Hsieh, 1971).

Pode considerar-se a glicólise ou, mais propriamente, a etapa de conversão do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato, como uma das linhas mestras em que assenta o sistema enzimático fisiologicamente adaptado à

redução da metaemoglobina, em eritrócitos normais (Fig. 10). Esta reacção requer NADH como coenzima de metaemoglobina-reductase, gerado na desidrogenação do gliceraldeído-3-fosfato. Parte do NADH poderá encaminhar-se, também, para a etapa a cargo de desidrogenase láctica, se não for utilizado na redução da metaemoglobina.

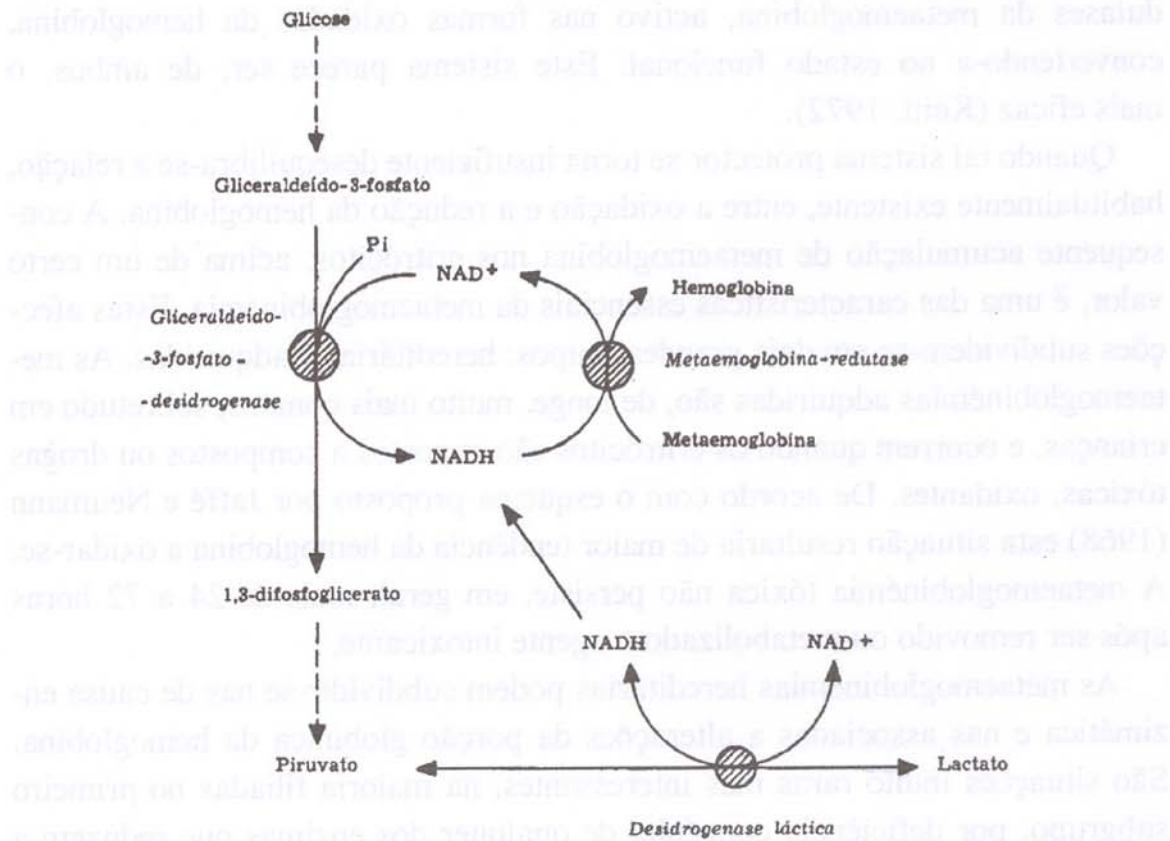


Fig. 10– Etapa enzimática de conversão da metaemoglobina em hemoglobina, por acção da NADH-diaforase (metaemoglobina-reductase).

No entanto, o NADH produzido pela desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato não é, obrigatoriamente, o único que intervém junto ao sistema de redução considerado, pois demonstrou-se, *in vitro*, que qualquer reacção originando NADH conduzia ao mesmo resultado. Com efeito, incubando glicose ou outros metabólitos (fumarato, lactato, malato, formaldeído, etc.) que, normalmente, são integrados na glicólise em etapas que não passam pelo gliceraldeído, com eritrócitos humanos normais submetidos, antes, à

oxidação pelo nitrito de sódio, obtinha-se a redução da metaemoglobina (Jaffé e Neumann, 1968).

A disponibilidade eritrocitária em NADH, mais do que a actividade da glicólise, determina a redução da metaemoglobina. Este facto foi comprovado quando se estimulou a formação do lactato pelo fosfato inorgânico, registando-se um ligeiríssimo acréscimo do poder redutor intra-eritrocitário.

Pelo contrário, ao elevar-se a quantidade do NAD, por incubação dos glóbulos com ácido nicotínico, observou-se notável redução da metaemoglobina (Jaffé e Neumann, 1968; Keitt, 1972). A estimulação da glicólise pelo fosfato inorgânico, em eritrócitos incubados com glicose, associa-se, também, a pequeno aumento daquela redução. Entretanto, o já por si baixo valor de redução da metaemoglobina, em eritrócitos nitidamente deficientes em metaemoglobina-redutase, não é alterado pela presença de concentrações crescentes de NAD^+ . Observaram-se resultados intermédios em eritrócitos de heterozigotos daquela afecção, em que é inferior ao normal a taxa da redutase (Jaffé e Neumann, 1968). A utilização de glicose, a produção de lactato, as concentrações de ésteres orgânicos do fosfato, as dos nucleótidos púricos ou pirimídicos, bem como as actividades dos enzimas da glicólise, eram geralmente normais nos eritrócitos deficientes (Jaffé, 1966).

Ao inibir-se a glicólise com substâncias que a bloqueiam além do gliceraldeído-3-fosfato, não se alterava, quase nada, a redução da metaemoglobina, o que mais uma vez, foi atribuído às suficientes concentrações intraglobulares de NADH existente. A elevação concomitante de 2,3-DPG descrita nestas experiências (Keitt e col., 1966), a par de algum aumento de redução da metaemoglobina, sugere que a glicose é canalizada para a via de Rapoport-Luebering, de preferência à produção directa de piruvato, de modo a poupar NADH para a conversão da metaemoglobina na forma reduzida. Se houvesse formação inalterada de piruvato, o NADH seria consumido na etapa da desidrogenase láctica. A estimulação pelo fluoreto ocorria em concentrações que inibiam completamente a utilização anaeróbica da glicose ou na ausência deste substrato no meio de incubação, mas já não sucedia em eritrócitos de um doente com deficiência congénita de metaemoglobina-redutase. Este facto também motivou que se sugerisse a existência de uma certa quantidade de substratos intraglobulares, talvez derivados do catabolismo dos nucleótidos adenílicos, utilizáveis pelo sistema redutor dependente do NADH (Keitt e col., 1966). Eritrócitos de indivíduos deficientes em

NADH-diaforase, incubados com nucleótidos e açúcares, não reduziam a metaemoglobina, ao contrário de glóbulos normais (Jaffé Neumann, 1968).

Os resultados descritos são extremamente favoráveis à presença de um sistema enzimático específico para a redução da metaemoglobina globular, actuando em estreita associação com a via glicolítica (Fig. 10).

Scott e col. (1965) isolaram duas proteínas, com actividade próprias da NADH-redutase, de eritrócitos humanos normais. Um desses enzimas (a NADH-redutase 1) seria responsável por 61% da capacidade globular em reduzir a metaemoglobina *in vitro*, e 90% *in vivo*. A NADH diaforase I actuaría ligada ao flavina-adenina dinucleótido, sendo muito diminuta a sua acção quando na presença de NADPH (1,5% da calculada para o NADH). Formar-se-iam complexos entre o substrato e o enzima, com redução da flavina pelo NADH, este reduzindo o aceitador final, a metaemoglobina. A restante actividade (cerca de 10%) dependeria de um segundo enzima, a NADH-diaforase II, não flavínica.

Kuma e col. (1972) apresentaram resultados ligeiramente diferentes. O mecanismo de redução da metaemoglobina nos eritrócitos, pela NADH-redutase, seria, para Kuma e Inomata (1972) um pouco mais complicado por haver uma proteína intermediária transportando electrões entre a flavo-proteína e a metaemoglobina.

Considera-se a existência de múltiplas aberrações nas NADH-metaemoglobina-redutases dos eritrócitos humanos, umas diferindo na carga, outras com características funcionais ou estruturas variadas (Jaffé e Hsieh, 1971). A metaemoglobinémia hereditária poderá resultar, assim, da síntese diminuída ou maior instabilidade do enzima normal ou, então, da produção de um enzima anormal com estabilidade ou actividade distintas. Nem todas as variantes apresentam deficiências significativas de actividade passando despercebidas na clínica, em contraste com outras francamente manifestas.

Schwartz e col. (1972), ao estudarem cinco indivíduos com metaemoglobinémia hereditária, associaram-na à existência de uma variante instável da NADH-metaemoglobina-redutase. Concluiu-se, em face da anormal perda de actividade enzimática ao longo de vida eritrocitária, que as características heterogéneas da acumulação de metaemoglobina, *in vivo*, resultavam, sobretudo, da inactivação acelerada daquela variante, paralela ao envelhecimento globular.

Kuma e col. (1972) confirmaram, na generalidade, os resultados anteriores, ao isolarem de eritrócitos humanos normais três proteínas não hemoglobínicas, com actividade enzimática própria das NADH-redutases (diaforases A, B e C). A diaforase A, que participaria em 90% de toda a actividade das NADH-redutases nos glóbulos vermelhos normais, existiria em concentrações inferiores a 3% do habitual em hemácias metaemoglobinémicas, enquanto a C, responsável por 10% da actividade nas células normais, alargaria a sua participação nos deficientes. A diaforase B, observada em glóbulos normais ou metaemoglobinémicas, actuaría com o NADH ou NADPH. No conjunto, seriam idênticos à NADH-metaemoglobina-redutase I de Scott e col. (1965), sendo a diaforase A a de maior importância fisiológica no eritrócito humano. Kuma e Inomata (1972), ao purificarem esta fracção enzimática, observaram-lhe um espectro de absorção característico das flavoproteínas. O enzima teria 1 mole de FAD como grupo prostético de 1 mole de apoenzima.

Este sistema, capaz de reduzir directamente sem intermediários, a metaemoglobina eritrocitária, parece ser a principal via de que dispõem, para o efeito, os glóbulos vermelhos normais. Para Scott e col. (1965), seria responsável por 67% da redução de toda a metaemoglobina.

A verificação de que eritrócitos de indivíduos com metaemoglobinémia hereditária conseguiam reduzir a metaemoglobina a velocidade quase idêntica à de glóbulos normais quando se associava azul de metileno à glicose, levou Gibson (1948) a formular a hipótese da existência de um segundo sistema enzimático accionado por aquele composto.

Constatou-se, mais tarde, que o azul de metileno funcionava como transportador de electrões entre o enzima (uma das metaemoglobinas-redutases) e o respectivo coenzima, o NADPH, acelerando ainda a via das fosfopentoses devido à reoxidação do NADPH.

Parece ser muito limitada a importância fisiológica desta redutase-NADPH dependente, para a redução da metaemoglobina. Scott e col. (1965) atribuíram-lhe 5% de toda a actividade referida. Diversas outras observações excluem-na quase por completo. Assim, em eritrócitos deficientes em desidrogenase da glicose-6-fosfato é normal a concentração da metaemoglobina, na ausência de azul de metileno, desde que não haja alterações da NADH-diaforase.

Por outro lado, enquanto eritrócitos normais rapidamente convertem a metaemoglobina à forma reduzida, na presença de azul de metileno, *in vitro*,

glóbulos vermelhos deficientes em desidrogenase de glicose 6-fosfato estão, nas mesmas condições experimentais, desprovidos de qualquer capacidade de resposta equivalente.

Sass e col., (1967) apresentaram o caso de um doente sem metaemoglobinemia, cujos eritrócitos, apesar de serem deficientes em metaemoglobina-redutase (NADPH), conseguiam reduzir moléculas hemoglobínicas previamente oxidadas pelo nitrito. Todos estes resultados consolidam a opinião de que a NADPH-redutase é, quanto muito, um enzima auxiliar com actividade própria, independente da exercida pela NADH-redutase. A existência de erros genéticos afectando esta redutase, ou a ligada ao NADPH, é um facto suficientemente comprovativo.

Para Keitt (1972), as desidrogenases que funcionam na presença de transportadores de electrões seriam enzimas que, devido a mutações, perderiam importância, motivando a quase completa abolição de resposta da via das fosfopentoses à metaemoglobina.

ENVELHECIMENTO E DESTRUIÇÃO DOS GLÓBULOS VERMELHOS

Todas as células de um organismo têm o seu tempo de vida, durante o qual variam a actividade e funções que lhes são próprias.

Salientando a escassez dos dados ainda hoje disponíveis a propósito do envelhecimento em geral, Godstein (1971) definiu este fenómeno como «a perda progressiva e desfavorável da adaptação biológica, associada à diminuição da expectativa de sobrevivência com o decorrer do tempo, expressa pela maior vulnerabilidade e inferior viabilidade na presença das forças normais da mortalidade».

O envelhecimento celular está na dependência de dois grandes factores, um compreendendo os processos fisiológicos em evolução, o outro resultante das modificações ambientais. Abstraindo deste último ponto, a vida média celular será determinada pelos génotipos respectivos, fundamentando-se, portanto, numa base genética. As influências externas poderão, secundariamente, introduzir alterações no génotipo, prejudicando a sua expressão.

O glóbulo vermelho não escapa a esta regra biológica. Tem o seu tempo de vida, desde o momento em que é formado nos órgãos eritropoiéticos até ser removido da circulação, normalmente pelo sistema retículo-endotelial do

baço (Berlin, 1964). Defeitos intra- ou extracorpúsculares encurtam habitualmente a vida das hemácias.

Os eritrócitos humanos em circulação constituem, assim, uma população muito heterogénea em idade, desde células muito jovens (menos de 5 dias) até glóbulos muito antigos (cerca de 120 dias). Foi possível verificar que o processo de envelhecimento incidia em diversas alterações biofísicas e bioquímicas, entre as quais sobressaía o decréscimo da actividade de vários enzimas, menor utilização da glicose, inferior conteúdo lipídico, diminuição do potássio e aumento do sódio e maior fragilidade osmótica (Yunis e Yasmineh, 1969).

Estas variáveis têm de, forçosamente, influir na capacidade de transporte de oxigénio pelos eritrócitos.

Como os níveis eritrocitários de ATP e 2,3-DPG dos glóbulos antigos são apenas ligeiramente inferiores aos existentes nos mais jovens, discute-se se as reservas energéticas intracelulares serão, por si, a causa primária da morte eritrocitária. Considera-se que os glóbulos vermelhos «vivem» enquanto se mantiverem funcionais os seus enzimas, a menos que se interponham influências exógenas (Harris e Kellermeyer, 1970).

A impossibilidade de substituição dos constituintes lipídicos e proteicos eritrocitários é, por si, o principal determinante da sobrevivência globular em circulação, independentemente de forças exteriores. Esta incapacidade instala-se desde a fase de maturação dos normoblastos policromatófilos e culmina com a passagem a reticulócitos. À perda consequente do DNA, associada ao núcleo, segue-se a saída do RNA. Assim, em paralelo com a carência de DNA nos normoblastos ortocromáticos cessa a formação do RNA. A partir desta fase os precursores eritrocitários formam proteínas à custa dos ácidos ribonucleicos pré-sintetizados. O desaparecimento progressivo das mitocôndrias, ribossomas e ácidos ribonucleicos deixa-os entregues aos constituintes formados anteriormente ou, por outras palavras, induz o começo do envelhecimento globular. Qualquer proteína perdida ou inactivada nas etapas subsequentes do eritrócito maduro não é substituída por moléculas equivalentes (Lessin e Bessis, 1972; Lowy e col., 1972).

O glóbulo vermelho adulto é, portanto, um elemento celular estritamente dependente do sistema enzimático glicolítico para o resto da sua vida, em circulação. O mecanismo exacto que o destrói é ainda pouco claro e o que se sabe provém, na maioria, do estudo de eritrócitos anormais. Com efeito, os eritrócitos de indivíduos com doença hemolítica, congénita ou hereditária,

estão mais predispostos à destruição que os normais, podendo a anormalidade depender do tipo de hemoglobina que contêm, do metabolismo glicolítico, da estrutura da membrana ou de diversos outros parâmetros que, estando alterados, isolados ou em conjunto, comprometem, além das funções específicas, a sobrevida globular (Brain, 1971).

A destruição dos eritrócitos anormais põe problemas um pouco diferentes da mencionada para os normais. Aqueles são removidos por três mecanismos gerais (Cooper e Jandl, 1972):

- 1) glóbulos com ligeiras deficiências são assinalados por baços com maior capacidade de renovação que o normal;
- 2) hemácias mais lesadas são eliminadas pelo baço, e, em geral, por todo o sistema retículo-endotelial;
- 3) eritrócitos ainda mais anormais podem ser destruídos em circulação, libertando os seus componentes no plasma.

Os glóbulos vermelhos normais mas no fim de vida são sequestrados pelo baço e aí destruídos (Berlin, 1964). Desconhece-se o mecanismo que permite àquele órgão reconhecer os glóbulos envelhecidos, mas, como se verá adiante, têm sido propostas várias hipóteses que se aplicam, em parte aos processos de eliminação dos glóbulos anormais. É de notar, entretanto, que a esplenectomia não aumenta a vida média globular, sugerindo a participação do restante sistema retículo-endotelial nas alterações, sequestrações e destruições globulares.

A estabilidade ou actividade da generalidade dos enzimas eritrocitários é, pelo que vem sendo afirmado aqui, dos factores que mais influem na durabilidade das hemácias circulantes. Esta ideia é sustentada, ainda, pelo conhecimento de que a deficiência em alguns enzimas da glicólise ou vias anexas tem sido relacionada com as causas de diversas doenças ou situações hemolíticas humanas (Beutler, 1971; Schmidt, 1971; Kaplan, 1971a; Valentine, 1968, 1970, 1971, 1972a).

O metabolismo energético dos reticulócitos é, em geral, mais activo que o dos eritrócitos adultos, para o que contribui, sem dúvida, a existência de mitocôndrias funcionais. O consumo de oxigénio pelos reticulócitos é 60 vezes superior aos dos glóbulos vermelhos maduros, sendo a utilização de glicose cerca de 10 vezes maior (Beutler, 1972a). Esta particularidade permite aos reticulócitos fosforilar grandes quantidades de ADP em ATP,

Sabe-se, entretanto, que o dinamismo glicolítico diminui progressivamente à medida que os eritrócitos envelhecem, em paralelo com o decréscimo da relação

ATP/ADP intraglobular (Harris e Kellermeyer, 1970). Parece aceitável que se atribuam estes factos a alterações na actividade dos enzimas que regulam o metabolismo geral da glicose e que condicionam o seu aproveitamento pela via anaeróbica ou oxidativa.

A actividade destes enzimas poderá depender dos seguintes factores (Rapport, 1970):

- 1) quantidade e estabilidade enzimáticas;
- 2) concentração dos substratos e produtos de reacção, assim como a afinidade dos enzimas para os substratos e cofactores;
- 3) pH;
- 4) concentração globular de cofactores, sobretudo do fosfato inorgânico, relação ATP/ADP ou NAD^+/NADH ;
- 5) relação entre a oxiemoglobina e a sua forma desoxigenada.

É de salientar que a actividade dos enzimas referidos não diminui, ao longo de vida globular, de uma forma homogénea. Por outro lado, alguns enzimas são pouco influentes na dinâmica geral das respectivas vias, contrastando com diversos outros, considerados reguladores.

A hexoquinase é um dos enzimas que diminui com o envelhecimento eritrocitário. Células jovens são muito mais ricas em hexoquinase que glóbulos antigos, de tal modo que se utiliza esta característica como índice de idade da população eritrocitária (Valentine e col., 1967; Valentine, 1971). Hutton (1972) confirmou estes resultados em murganhos normais ou tratados com substâncias hemolisantes. Glóbulos deficientes em hexoquinase justificam a ocorrência de anemias hemolíticas não esferocíticas. A incapacidade de fosforilação da glicose, específica desta anormalidade, parece ser, assim, a causa da hemólise e, também, quando progressiva com a idade dos eritrócitos normais, da destruição fisiológica ao nível do baço (Valentine, 1968).

Os bons resultados obtidos com a esplenectomia, nos doentes portadores desta afecção, parecem resultar da eliminação de um meio (o baço) em que é reduzida a concentração de glicose (Keitt, 1969).

A escassez de hexoquinase, associada à carência de glicose, explicam as baixas concentrações de glicose-6-fosfato detectadas nos eritrócitos de indivíduos doentes ou dos parentes heterozigotos. Entretanto, Delivoria-Papadopoulos e col. (1969) verificaram que nas deficiências de hexoquinase diminuía a quantidade de 2,3-DPG globular. Se extrapolarmos esta observação para os eritrócitos normais, em que vai diminuindo a actividade da he-

xoquinase, não será demasiado supor a mesma evolução para os níveis da 2,3-DPG, o que, na realidade, foi confirmado (Bunn e Jandl, 1970; Harris e Kellermeyer, 1970; Oski e Gottlieb, 1971).

A maior afinidade que a hemoglobina de eritrócitos envelhecidos em circulação demonstra para o oxigénio (Brewer e Eaton, 1971) poderá ser, em parte, explicada pelo declínio da actividade da hexoquinase, através da formação do 2,3-DPG.

A fosfoexose-isomerase é, também, mais activa nos eritrócitos jovens que em fases posteriores (Beutler, 1972a), conhecendo-se diversos casos de anemia hemolítica não esferocítica motivados por deficiência naquele enzima (Paglia e col., 1969).

A fosfofrutoquinase é, pelo que já se afirmou, um dos três enzimas mais importantes, senão o principal, da glicólise. A sua actividade está consideravelmente elevada nos eritrócitos jovens, diminuindo com o tempo a circulação. Estão descritas várias situações hemolíticas, com moderado encurtamento da vida média globular, reticulocitose ligeira e hiperplasia medular, sugerindo processos de compensação (Waterbury e Frenkel, 1972).

A aldolase diminui com a idade globular. É discutível o significado que poderá ter a deficiência congénita deste enzima em indivíduos com esferocitose hereditária (Chapman, 1969).

A triose-fosfato-isomerase é o enzima mais activo da via glicolítica principal, sobretudo nos glóbulos mais jovens. Estão descritas anemias hemolíticas por deficiência hereditária deste enzima (Valentine, 1971).

Não parece haver, ou são focos de controvérsia, variações sensíveis de actividade dos restantes enzimas glicolíticos com a idade globular (Beutler, 1972a). Note-se, no entanto, que a deficiência congénita em piruvatoquinase é uma das causas mais importantes de doença hemolítica não esferocítica (Buc e col., 1972), a segunda mais comum entre as enzimopatias hereditárias dos glóbulos vermelhos (Valentine, 1972), com as quais mantém muitos pontos comuns, não só no aspecto clínico como em morfologia eritrocitária. Na generalidade das anemias hemolíticas de causa enzimática a concentração do enzima varia em paralelo com a gravidade da afecção (Valentine, 1971). A hemólise das deficiências da piruvato-quinase não se afastam destas normas (Valentine, 1972b; Tanaka e Paglia, 1971);

A falta de dados absolutamente comprovativos de que a actividade da piruvato-quinase decresce ao longo do envelhecimento fisiológico das hemá-

cias não permite que se considere aquela situação hemolítica como a «exacerbação» de um processo natural, tal como vinha sendo tentado para os enzimas anteriores. Aliás, escasseia a quantidade de diversos outros enzimas glicolíticos (p. ex., a fosfoglicerato-quinase) nos eritrócitos de doentes com anemias hemolíticas, sem que estejam descritas variações de concentração sensíveis entre glóbulos jovens ou antigos (Valentine, 1971).

A discrepância focada é tanto mais estranha, no caso de piruvato-quinase, quando se reconhece ser este enzima um dos que catalisa a formação do ATP. O bloqueio da glicólise ao nível considerado motiva a acumulação anormal de alguns intermediários fosforilados, em que sobressai o 2,3-DPG (Delivoria-Papadopoulos e col., 1969). Além da incapacidade selectiva em gerar ATP, nota-se que os glóbulos vermelhos não conseguem «movimentar» o NAD^+ e o NADH entre as desidrogenases do gliceraldeído-3-fosfato e a láctica (Rose e Warms, 1966).

Nas deficiências graves em piruvato-quinase, a anemia hemolítica deverá ser consequente ao bloqueio do aproveitamento completo da glicose a este nível, ocasionando menor produção da energia química vital para o eritrócito (Valentine, 1972b). A hemólise não será mais do que secundária à associação do processo fisiológico de envelhecimento (em que as actividades enzimáticas gerais do glóbulo vão diminuindo com a idade) com uma alteração hereditária impeditiva da formação de piruvato e, sobretudo, da regeneração do ATP, localizada ao nível da piruvato-quinase.

Este ponto de vista patogénico, relacionando determinado enzima com a manutenção da integridade globular, é apoiado pelas descrições de mutantes com actividades variáveis, mas específicas da piruvato-quinase, originando anemias clínicas e hematologicamente indiferenciáveis (Tanaka e Paglia, 1971).

O defeito da síntese do ATP nos eritrócitos adultos, por ser considerada a mais grave consequência metabólica da carência de piruvato-quinase, torna sugestiva a hipótese que o considera como factor relevante no mecanismo de hemólise globular.

A deficiência congénita em 2,3-DPG-mutase parece ocasionar anemias hemolíticas (Rose, 1968), em paralelo com a baixa produção de 2,3-DPG. Seria de esperar, então, atendendo ao efeito que este composto provoca na hexoquinase, inibindo-a (Schrivastava e Beutler, 1970), maior actividade glicolítica geral, por libertação daquele enzima do seu «freio» fisiológico. No entanto, a ausência do 2,3-DPG vai limitar, sobremaneira, o lucro energético da glicólise,

ao diminuir a actividade da fosfogliceromutase, enzima que parece depender do 2,3-DPG, como cofactor. Os eritrócitos apresentam, assim, menor quantidade de ATP e 2,3-DPG. A concentração intraglobular em ATP seria neste exemplo tal como nos anteriores, o denominador comum em que assenta a destruição normal ou patológica das hemácias, contrastando com a heterogeneidade de comportamento do 2,3-DPG.

Observaram-se nos eritrócitos de diversos indivíduos níveis de ATP anormalmente elevados (por vezes associados a hemólise), carência de 2,3-DPG-fosfatase, aumento dos nucleótidos adenílicos, etc. Vem sendo repetidamente descrita a deficiência parcial da ribose-fosfato-pirofosfoquinase nos glóbulos afectados, desconhecendo-se em que medida poderá participar nos efeitos descritos (Valentine e col., 1972).

Paglia e col. (1970) verificaram, em contrapartida, a existência de concentrações subnormais de ATP em indivíduos com sinais evidentes de doença hemolítica, sem que tivessem detectado anomalias enzimáticas na glicólise, na ATPase ou no mecanismo de recuperação do ATP.

Boivin e col. (1971) registaram num rapaz e progenitores deficiência grave ou intermediária, respectivamente, da adenilato-quinase, o enzima que interconverte os nucleótidos adenílicos. Associava-se, no *propositus*, a uma forma moderada de anemia hemolítica não esferocítica.

Finalmente, ainda a propósito de ATP, há que mencionar a deficiência da ATPase como causa de algumas situações hemolíticas, com características semelhantes às descritas (Hanel e Cohn, 1972). Se bem que continue por esclarecer a patogénese da hemólise, julga-se que a redução da síntese de ATPase (dependente do sódio, potássio e magnésio) explica a deficiência verificada e conseqüente alteração do transporte iónico.

Comparando as concentrações de ATP nos eritrócitos de deficientes em ATPase e normais, não se verificaram as diferenças significativas que seriam de esperar se a hemólise resultasse da menor utilização energética pelos processos metabólicos globulares. Esta observação permite que se diferencie a hemólise por carência em ATPase da que surge nos glóbulos extremamente ricos em ATP, cujo mecanismo é, sem dúvida, muito obscuro.

Chega-se agora a uma plataforma de entendimento, através dos factos mencionados:

1º A glicose diminui progressivamente com a idade influenciada pela ac-

tividade de alguns dos seus enzimas; a esta evolução natural podem sobrepor-se os bloqueios que caracterizam as enzimopatias eritrocitárias.

2º Com a diminuição do rendimento da glicólise, por um ou outro dos motivos apresentados, baixa a produção de ATP e a relação ATP/ADP, e são vulneráveis as concentrações relativas do NAD^+ e NADH ou as de 2,3-DPG.

3º O decréscimo de ATP, por excesso de consumo ou por produção inferior, pode comprometer a viabilidade globular. O conteúdo eritrocitário em ATP ou os mecanismos que o utilizam serão, em conjunto, dos principais condicionadores de sobrevivência globular, em circunstâncias fisiológicas ou anormais. Nos glóbulos humanos normais deverá ser a hexoquinase o enzima que, ao perder actividade com a idade, vai refreando progressivamente a produção de ATP, auxiliado pelos enzimas subsequentes.

Conhecem-se diversas anemias hemolíticas relacionadas com a via das fosfopentoses (Kaplan, 1971a), através da qual não se forma, directamente, ATP. Esta sequência enzimática tem como finalidade principal nos eritrócitos a manutenção da hemoglobina na forma reduzida (Jaffé e Hsieh, 1971). As desidrogenases da glicose-6-fosfato e do 6-fosfogliconato são enzimas muito mais activos nas hemácias jovens do que em etapas posteriores, ao contrário da redutase do glutatião, em que não se detectou qualquer diferença significativa (Harris e Kellermeyer, 1970).

Desta maneira, se a via das fosfopentoses comparticipar activamente no processo de envelhecimento globular deverá fazê-lo à custa do declínio progressivo dos seus dois primeiros enzimas. A hemólise por deficiência nestes enzimas resultaria da aceleração dessa evolução, natural.

A deficiência da desidrogenase da glicose-6-fosfato é, de todos os defeitos enzimáticos eritrocitários, a causa mais comum de hemólise crónica, sobrepondo-se nitidamente à da piruvato-quinase (Motulsky, 1972; Beutler, 1972b).

Em contraste com os defeitos enzimáticos da via glicolítica principal, que causam hemólises espontâneas, os da desidrogenase da glicose-6-fosfato, bem como os dos restantes enzimas que, associados ao circuito das fosfopentoses, asseguram o potencial redutor eritrocitário, são desencadeados por agentes exteriores, em geral drogas medicamentosas.

O polimorfismo que caracteriza a deficiência hereditária da desidrogenase da glicose-6-fosfato explica as diferenças de resposta a tóxicos ou sintomatologias conhecidas, desde síndromas hemolíticos agudos (ocorrendo

após a administração de drogas, alimentos ou no decurso de algumas infecções), icterícia neonatal e, muito mais raramente, doença hemolítica congénita não esferocítica (Kaplan, 1971b; Motulsky, 1972).

A hemólise consequente a esta enzimopatia tem sido objecto de estudos aprofundados. Poder-se-ia pensar que o bloqueio de utilização da glicose pela via das fosfopentoses, ao ocasionar a diminuição dos metabólitos que vão ser reintegrados na glicólise anaeróbia, a partir da frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, ocasionaria algum decréscimo da produção do ATP. No entanto, e atendendo à pouca quantidade de glicose normalmente transformada em pentoses (Beutler, 1971), não é de considerar como significativa para os mecanismos que aproveitam o ATP e, por conseguinte, são responsáveis pela conservação do eritrócito no estado funcional, a ligeira diminuição dos níveis do primeiro enzima da via das fosfopentoses nas deficiências congénitas.

A destruição globular deverá ser provocada por outros factores. A importância que a produção de NADPH toma nos processos de redução eritrocitária já mencionados, em que se salienta, a prevenção de degradação oxidativa da hemoglobina, poderia explicar a hemólise de duas maneiras: ou através da formação de metaemoglobina ou pela lesão da membrana eritrocitária, directamente pelos compostos oxidantes (não destruídos ou inactivados, devido à falta de GSH ou de enzimas redutores operacionais), ou por alterações, induzidas pelos corpos de Heinz.

A acumulação de metaemoglobina é não só característica do envelhecimento globular em situações fisiológicas (Harris e Kellermeyer, 1970) como ainda consequente a deficiências hereditárias incidentes nas NADH-metaemoglobina redutases. Em qualquer das situações a metaemoglobina, por si, não diminui a vida média globular (Jaffé e Neumann, 1968; Keitt, 1972), o que permite excluir, desde já, este factor. Também, na deficiência da desidrogenase da glicose-6-fosfato não há produção sensível de metaemoglobina apesar da provável alteração da NADPH-redutase não ser importante para o controlo dos níveis normais da metaemoglobina. Resta a lesão da membrana globular como a hipótese mais provável da hemólise em situações anormais. A diminuição de actividade da desidrogenase da glicose-6-fosfato, além da outra desidrogenase da mesma via, ao longo do envelhecimento fisiológico, não deverá assumir isoladamente importância equivalente, pelas razões expostas.

O abaixamento, com a idade, das diversas actividades enzimáticas intra-eritrocitárias não parece, assim, condicionar directamente a destruição normal dos eritrócitos, a menos que se torne limitante por bloqueios localizados em qualquer dos sectores focados. O aumento de afinidade para o oxigénio, associado à diminuição dos níveis de 2,3-DPG, ambos característicos em glóbulos progressivamente mais velhos, não têm, provavelmente, relação com a vida média eritrocitária (Haidas e col., 1972). Nas situações hereditárias, as alterações da composição eritrocitária, dependentes da idade, deixam de ser aparentemente críticas. A destruição globular dá-se ao acaso, sendo a sequestração independente do tempo de vida do eritrócito, mas submetida ao defeito de que é portador.

A acumulação de produtos de degradação da hemoglobina, sob a forma de corpos de Heinz, é um facto conhecido e frequente nas deficiências congénitas da desidrogenase da glicose-6-fosfato (Beutler, 1971; Beutler, 1972b). Resulta da perda do heme da molécula hemoglobínica (Jacob e Winterhalter, 1970), favorecendo a precipitação da globina. Esta, ao ligar-se a grupos sulfidrílicos da membrana eritrocitária (Jacob, 1971) origina os corpos de Heinz. Pode considerar-se o decréscimo da actividade formadora do NADPH, necessário para a redução do complexo hemoglobina-GSH originado pelas drogas ou compostos oxidantes, como a causa primária de formação dos corpos de Heinz (Shrivastava e Beutler, 1970).

Os glóbulos vermelhos tornar-se-iam, a partir desta etapa, muito mais susceptíveis à destruição na circulação esplénica. O baço encarregar-se-ia de remover os corpos de Heinz, em conjunto com fragmentos da membrana eritrocitária anexa (Rifkind, 1965), produzindo microesferócitos facilmente destruídos. Este mecanismo pressuporia o enrijamento da membrana eritrocitária, por fixação da globina precipitada. Os glóbulos menos deformáveis seriam presa fácil do sistema retículo-endotelial. Outra hipótese (Jacob, 1970) considera que os corpos de Heinz mobilizam os grupos tiólicos das membranas eritrocitárias, com os quais constituem pontes sulfidrílicas, ocasionando o aumento da permeabilidade e edema do glóbulo, que acaba por ter o mesmo destino ao nível do baço. Amare e col. (1972) sugeriram outro mecanismo, em que os corpos de Heinz seriam expulsos das hemácias, fora do sistema retículo-endotelial, por um sistema contráctil.

As anemias hemolíticas por deficiência em GSH ou em peroxidase de glutatião seriam explicáveis por mecanismos idênticos (Kaplan, 1971b; Beu-

tlar, 1971). Sugeriu-se, aliás, idêntica solução para as anemias hemolíticas congénitas motivadas por hemoglobinas instáveis (White e Dacie, 1971; Winterbourn e Carrell, 1972).

A eliminação fisiológica dos glóbulos vermelhos normais não deverá, contudo, relacionar-se demasiado com o compromisso destes sistemas que formam ou utilizam o glutatião. Tanto quanto se sabe (Harris e Kellermeyer, 1970), as concentrações dos enzimas ou substratos em causa não diferem, significativamente, entre os eritrócitos jovens ou os envelhecidos. De qualquer maneira, ressalta da exposição a importância que a estrutura da membrana (ou forma eritrocitária poderá ter no processo de selecção natural dos glóbulos vermelhos pelo sistema retículo-endotelial.

Em que medida a forma ou a capacidade de deformação dos glóbulos vermelhos induzem o mecanismo de destruição fisiológica? Que factores influenciam essas características estruturais?

A resposta a estas perguntas permite que se compreendam, razoavelmente bem, as etapas finais da vida eritrocitária.

Bunn (1972), ao rever as alterações descritas por diversos investigadores, tornou bem clara a importância que a deformação das hemácias tem na determinação da sua sobrevivência.

A forma discóide do eritrócito normal resulta, como se sabe, do excesso da área superficial da membrana em relação com o volume globular. Esta característica permite ao eritrócito adaptar-se às dimensões internas da microcirculação. Quando o volume aumenta, em confronto com a superfície globular, diminui a capacidade de deformação do glóbulo, agora mais esférico e rígido e, portanto, mais sujeito a «encalhar» no trajecto capilar.

Ganzoni e col. (1971), ao estudarem uma população eritrocitária normal, *in vivo*, notaram redução do volume e perda significativa da hemoglobina, em progressão com a idade das hemácias; estas características haviam sido observadas anteriormente apenas nos macrócitos induzidos por anemia (Ganzoni e col., 1969). Sugeriu-se, a propósito, que os macrorreticulócitos seriam remodelados por fenómenos intravasculares, talvez por fragmentação, até se alcançar uma população com índices normais, sem diminuição do tempo de vida. Ambos os trabalhos tiveram o mérito de estabelecer a independência relativa dos glóbulos normais em circulação, da função sequestradora do baço ou do sistema retículo-endotelial, em geral. A perda de hemoglobina e de água seriam desiguais durante a senescência, com aparente

ganho de água em paralelo com a diminuição do volume globular. Estas alterações poderiam resultar de diferenças de permeabilidade à água e a electrólitos, por modificações específicas da membrana, progressivas com o envelhecimento. Esta teoria justificaria o declínio das concentrações da hemoglobina, mesmo que não houvesse fragmentação globular. No entanto, se a concentração de hemoglobina aumentasse à periferia das hemácias, por desnaturação ou saída da água e electrólitos, a remoção contínua de secções da membrana no decurso das passagens dos eritrócitos pela circulação esplénica (Weiss e Tavassoli, 1970) arrastaria a hemoglobina fixada nesses fragmentos, diminuindo a sua concentração em maior proporção que a da água (Ganzoni e col., 1971). O baço daria início à remodelação das hemácias, agora mais rígidas por conterem grandes concentrações de hemoglobina desnaturada na face interna da membrana.

Come e col. (1972) demonstraram, também, que os reticulócitos em circulação, originados por estimulação da eritropoiese *in vivo*, estavam sujeitos a um processo de fragmentação superficial visando a eliminação de parte da sua área.

Ainda que sendo sugestiva a participação do baço como remodelador globular, ficou por esclarecer se a perda da membrana ocorreria apenas em glóbulos vermelhos produzidos em resposta a estímulos eritropoiéticos ou se seria, também, característica da maturação normal eritrocitária, confinada particularmente à medula óssea. Estes resultados foram substanciados pelos de Shattil e Cooper (1972), em que se verificou a perda progressiva dos lípidos totais dos eritrócitos, em conjunto com o aumento da fragilidade osmótica durante a sua maturação. A proporção entre o colesterol e os fosfolípidos manteve-se constante nas membranas de reticulócitos adultos. A esplenectomia diminuiu a quantidade de lípidos removidos, originando eritrócitos adultos ricos em lípidos, que, em situações normais, são expoliados substancialmente destes compostos nas etapas de maturação. O baço evidenciou-se como um dos factores responsáveis pelas alterações descritas. Tomando em conta a área superficial dos eritrócitos, proporcional ao conteúdo lipídico das suas membranas (Cooper, 1970), poder-se-á concluir que a remoção dos lípidos ao longo do envelhecimento globular (van Gestel e col., 1965) favorece a constituição de formas pouco elásticas, mais esféricas e, por conseguinte, com maior fragilidade osmótica (Shattil e Cooper, 1972). A baixa da relação entre a superfície e o volume globulares, ocasionada pela saída dos lípi-

dos, precede a diminuição do volume, até se atingir o ponto de equilíbrio nas fases que precedem a destruição. Winterbourn e Batt (1970) demonstraram muito poucas diferenças na composição dos lípidos dos eritrócitos humanos com mais de 80% do tempo médio de vida.

Por outro lado, em diversas doenças hemolíticas, os glóbulos vermelhos perdem os lípidos das membranas no decorrer da sua destruição (Cooper e Jandl, 1969). Acontece o mesmo nas situações patológicas que alteram a troca passiva dos lípidos entre o plasma e os eritrócitos (Shohet, 1972). A composição lipídica das membranas globulares surge como índice valioso da idade celular. A remoção progressiva desses compostos ou a alteração do seu fornecimento às hemácias parecem fazer parte dos mecanismos fisiológicos da senescência globular ou da hemólise. O baço será o principal condicionador daquele processo para os eritrócitos adultos, ainda que completado por outros factores, incidentes na deformação e volume celulares.

A deformabilidade dos eritrócitos pode ser influenciada pelo meio interno. Weed e col. (1969) observaram maior rigidez em eritrócitos intactos expoliados de ATP. Por sua vez, este metabólito diminui com a idade globular (Harris e Kellermeyer, 1970; Haidas e col., 1971), desconhecendo-se se o declínio verificado basta para justificar a deformação da membrana, *in vivo*.

A membrana celular parece dispor de «poros» revestidos por cargas positivas que repelem, e portanto impedem, a passagem de catiões, enquanto permitem o acesso de água e aniões, (Passow, 1964). A concentração de sódio é cerca de 15 vezes superior no plasma, em relação ao conteúdo celular, ao contrário do potássio, cujos níveis intra-eritrocitários são aproximadamente 20 vezes os do plasma.

O gradiente iónico mantém-se estável em condições normais, apesar da passagem de algum potássio para fora e de sódio para dentro dos glóbulos vermelhos.

Para compensar este transporte passivo de iões no sentido do menor gradiente, os eritrócitos recorrem a um mecanismo de acção contrária, impulsionado pelo ATP e dinamizado por enzimas específicos (Durnham e Gunn, 1972). Aliás, considera-se a existência de diversas «bombas» apropriadas à movimentação do potássio para o interior e do sódio para o exterior das hemácias. A «bomba» IA representa 50% da capacidade de expulsão activa do sódio, necessitando da presença deste ião e do potássio. Sai uma molécula de Na^+ por cada molécula de K^+ que entra, aproximadamente. A «bomba» IB

assemelha-se à anterior mas não depende do K^+ . Ambas são activadas pelo ATP, em contraste com a «bomba» II (25% da capacidade eritrocitária de expulsão de Na^+).

O sistema de transporte activo dos referidos catiões parece localizar-se na membrana dos glóbulos, também considerada como o ponto de apoio de alguns enzimas glicolíticos, p. ex., a fosfoglicerato-quinase e a desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (Beutler, 1972a). Esses enzimas, trabalhando em conjunto, poderiam também aproveitar o fosfato inorgânico proveniente do exterior para formar ATP, com a ajuda de gliceraldeído-3-fosfato. A fosforilação do ADP em ATP no interior globular seria altamente vantajosa, por se situar nas proximidades dos sistemas de transporte que aproveitam cerca de 15% de todo o ATP gerado dentro dos glóbulos vermelhos (Harris e Keller-meyer, 1970). Se bem que a membrana eritrocitária seja impermeável ao ATP, verificou-se que a adição deste composto a eritrócitos carenciados conduzia à transformação das células esféricas em glóbulos discoides (Nakao e col., 1960).

Eritrócitos de cães expostos a diversas concentrações de ATP tornaram-se mais permeáveis ao K^+ e ao Na^+ , sendo este efeito bloqueado pelo cálcio (Parker e Snow, 1972). O ATP plasmático parece ser também aproveitável portanto, pelas superfícies das hemáticas, o que concorda com os resultados de Forrester e Lind (1969), em outros tipos celulares. O sistema enzimático de transporte iónico disporia então de duas fontes de ATP, uma interna e a outra plasmática, apesar do ATP extracelular não ser, aparentemente, consumido ou metabolizado.

Sugeriu-se (Parker e Snow, 1972) a existência de pontos superficiais estereoespecíficos para o ATP exógeno, talvez catiónicos, em que seriam induzidas alterações de carga ou estruturais.

Weed e col. (1969) observaram maior viscosidade das suspensões eritrocitárias e menor capacidade de deformação dos glóbulos incubados em meio desprovido de substrato. Ambos os efeitos desapareceram nas duas horas seguintes à adição de adenosina. Além do ATP, que diminuía, verificou-se a subida da concentração do cálcio intraglobular quando a viscosidade aumentava e os eritrócitos ficavam menos deformáveis, o que era compensado pela adenosina. Os eritrócitos passavam melhor ou pior, através de filtros artificiais consoante a viscosidade e a deformação das suas membranas. Ainda que considerando a viscosidade, a deformação da membrana ou a facilidade de passa-

gem por filtros como consequentes a alterações do volume globular, influenciadas pela expoliação metabólica, aqueles investigadores consideraram o cálcio como detentor de acção específica sobre as proteínas da membrana e/ou na hemoglobina aí fixada. Esta proposta fundamentou-se nos trabalhos de Marchesi e Steers (1968), em que se demonstrou a presença de filamentos semelhantes à actina na superfície interna da membrana das hemácias. O cálcio, que desempenha importante acção contráctil na actina muscular, aumentaria a rigidez do revestimento globular. Eritrócitos pobres em ATP perderiam a possibilidade de expulsar activamente o cálcio para o exterior, favorecendo a invasão dos glóbulos por este catião. Sabe-se que, além das «bombas» de sódio e potássio, o glóbulo vermelho dispõe de uma ou mais adenosina-trifosfatases activadas pelo Ca^{++} actuando em associação com proteínas fibrilhares situadas na face interna da membrana (Rosenthal e col, 1970; Wolf, 1972). Estas alterações da microcirculação, em particular nos sinusóides esplénicos, limitariam a sobrevivência globular (LaCelle e Weed, 1971).

Tem sido sugerido, com certa reserva, que a elevada pressão osmótica exercida pela hemoglobina e por aniões não permeáveis em solução nos eritrócitos, ao favorecer a entrada de água e catiões, poderia ocasionar a sua hemólise se não existisse um mecanismo responsável pela expulsão de sódio para o exterior (Jandl, 1965). Entretanto, glóbulos concentrados ou expoliados de glicose, ou possuindo qualquer defeito no metabolismo energético, tornam-se mais sensíveis aos processos de destruição, aparentemente relacionada com a diminuição da capacidade de deformação (Jandl e Aster, 1967). O controlo do volume globular sujeitar-se-ia, assim, à actividade da glicólise e ao transporte activo de sódio para fora dos eritrócitos.

A ATPase- Na^+ , K^+ dependente é, de todos, o mecanismo de maior importância na regulação dos gradientes iónicos das hemácias (Durnham e Gunn, 1972).

A identidade do comportamento, quer em face de inibidores do transporte do N^+ e K^+ quer a própria cinética de activação, são a favor de que o sistema de transporte ou a ATPase para aqueles catiões correspondem à mesma entidade.

A reacção geral catalisada pela Na^+ , K^+ -ATPase parece ocorrer em três etapas (Glynn, 1968):

- 1.^a Fosforilação do enzima, na dependência do Na^+ e Mg^+ , originando ADP como produto;

- 2.^a O intermediário fosforilado é transformado noutro composto, também fosforilado, por mudança de conformação ou transferência do fosfato de um ponto para outro do enzima, ou ambos os mecanismos;
- 3.^a Finalmente, na presença de K^+ e Mg^{+} , liberta-se ortofosfato, por acção de uma fosfatase específica.

O K^+ e o Na^+ seriam transportados activamente, por troca mútua, por mecanismo comum. O K^+ estimularia, no exterior, a expulsão do sódio (Gardner e col., 1971), por sua vez necessário no interior para que o potássio pudesse entrar nos glóbulos (Poznansky e Solomon, 1972). A activação do transporte de ambos os catiões pelos eritrócitos intactos e a estimulação da respectiva ATPase nas membranas, comportar-se-iam de acordo com as concentrações do Na^+ e K^+ .

Haveria assim uma assimetria espacial de activação enzimática por ambos os catiões, relativa à posição do enzima na membrana: os pontos de união para o K^+ estariam orientados na superfície exterior, encontrando-se os do Na^+ na face interna da membrana (Whittam e Weed; 1970). Esta especificidade não é absoluta pois que o Na^+ exterior pode competir para o transportador do K^+ , orientado para dentro do glóbulo vermelho (Gardner e col., 1971). Em circunstâncias normais, a perda de alguma quantidade de K^+ , por reversão completa do mecanismo da ATPase, permite a síntese de ATP (Glynn e col., 1970).

A efectivação do mecanismo de transporte de catiões e, indirectamente, o controlo do volume eritrocitário, aparentam depender das ATPases ou, melhor, da quantidade de energia química disponível. Whittam e Wiley (1967) puderam verificar que o transporte activo dos catiões aumentava, unicamente, com a concentração de ATP, até ao limiar de saturação. Entretanto, Yunis e Arimura (1966) observaram que eritrócitos jovens detinham ATPases com actividade de transporte superior às existentes em glóbulos vermelhos envelhecidos. Estes factos, aliados ao conhecimento de que o ATP declina com a senescência eritrocitária, tornam atraente a hipótese que considera os mecanismos de transporte activo dependentes do metabolismo energético intracelular. Parker e Hoffman (1967) demonstraram que o ritmo da glicólise era superior ao normal em eritrócitos com transporte activo mais intenso, declinando quando se refreava a transferência dos catiões. A fosfogliceratoquinase seria o enzima da glicólise com maior acção reguladora na «bomba» para o Na^+ e K^+ (Fig. 11). Esta, ao consumir o ATP, aumentaria a disponibi-

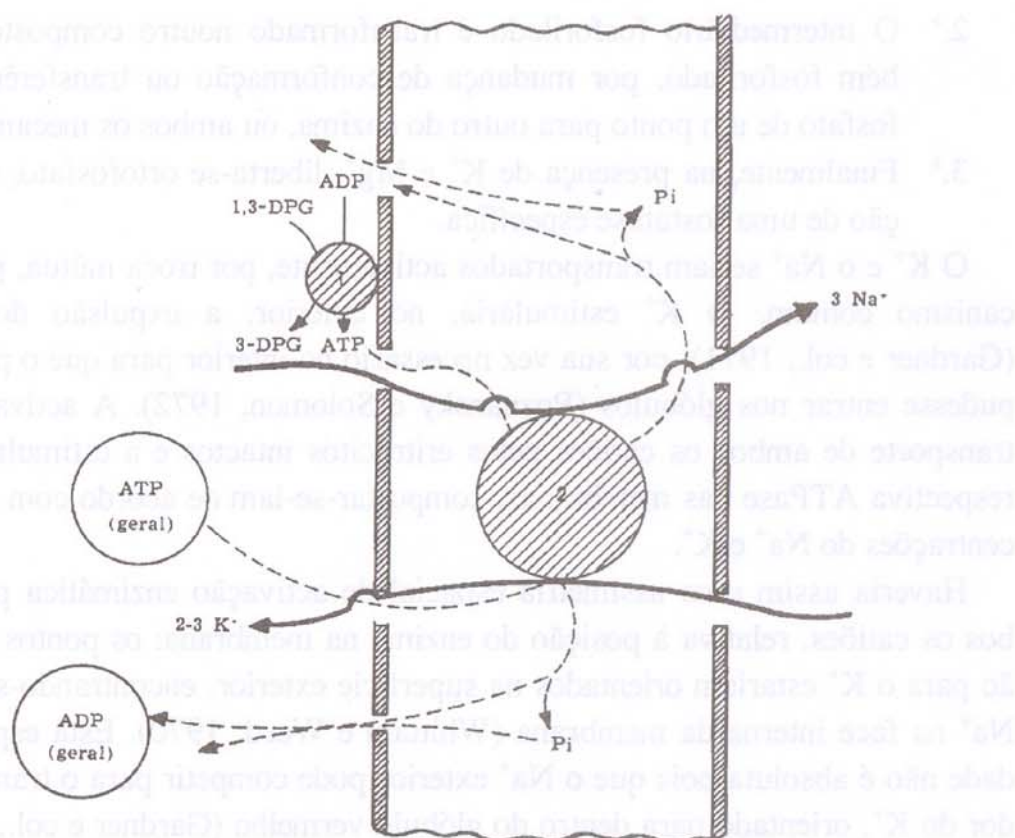


Fig. 11 – Esquema do mecanismo provável de transporte activo do Na^+ e K^+ pela Na^+ , K^+ -ATPase (2) em relação com a actividade da fosfoglicerato-quinase (1) e níveis gerais de ATP intraglobular.

1,3-DPG: 1,3-difosfoglicerato; 3-PG: 3-fosfoglicerato.

(Segundo as hipóteses de Parker e Hoffman, 1967; Feig e col., 1972.)

lidade do ADP a utilizar na transformação enzimática do 1,3-difosfoglicerato em 3-fosfoglicerato, afectando, assim, a produção de lactato. O aumento paralelo em fosfato inorgânico, proveniente da hidrólise do ATP pela ATPase, exerceria funções igualmente estimuladoras ao nível da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, elevando a concentração do 1,3-difosfoglicerato. É de notar que nenhum dos dois enzimas mencionados pode considerar-se como limitativo da glicólise em eritrócitos intactos, tendo em conta apenas os níveis intra-eritrocitários de ADP (Rose e Warms, 1970).

Feig e col. (1972), usando eritrócitos, incubados em meio desprovido de glicose, verificaram que a energia utilizada no efluxo de Na^+ parecia provir da reacção da fosfofrutoquinase, sendo o transporte activo de K^+ dinamizado por energia de origem diferente, contrariando, em certa medida, os resulta-

dos de Whittman e Wiley (1967). Com efeito, Feig e col. (1972) notaram que o influxo de K^+ diminuía muito pouco, mesmo quando as concentrações de ATP desciam cerca de 50% abaixo do normal. O efluxo activo de sódio declinava quase 70% quando se esgotavam as trioses-fosfato, sendo pouco afectado pelas concentrações intraglobulares de ATP. O transporte de K^+ seria independente do controlo exercido pela fosfofrutoquinase, condicionando-se aos níveis gerais, intracelulares, de ATP. As duas «bombas», ainda que possivelmente interdependentes, parecem usar ATP de origem diferente.

A favor da relativa insensibilidade do transporte activo de Na^+ às concentrações de ATP mencionam-se os trabalhos de Cividalli e col. (1971), em indivíduos com talassémia: eritrócitos jovens com inclusões hemoglobínicas denotavam grande actividade no transporte de sódio para o exterior, apesar de os níveis de ATP intraglobular serem muito semelhantes aos de eritrócitos expoliados de glicose.

Vem a propósito referir que a permeabilidade da membrana eritrocitária ao K^+ (ao contrário do que sucede com o Na^+) é condicionada pelas concentrações internas e externas de cálcio sobretudo em glóbulos sem depósitos energéticos (Blum e Hoffman, 1972). O transporte activo de K^+ seria activado pelo Ca^{++} endógeno neste tipo de hemácias, devido à existência de pontos de fixação específicos da face interna das respectivas membranas. Quando os glóbulos tivessem suficiente quantidade de ATP deixaria de se dar a acumulação do cálcio no seu interior. A expoliação das cargas positivas do interior dos eritrócitos facilita a entrada de outros catiões (Na^+), associados à água. Esta medida de compensação, prejudicial por afectar a forma globular, facilitaria a destruição dos eritrócitos (Cooper e Jandl, 1972; Parker e Welt, 1972).

Póznansky e Solomon (1972) encararam o problema de maneira um pouco diferente, ao estudarem o transporte do potássio em eritrócitos humanos com variações de volume. Estas não seriam o reflexo de alterações induzidas no metabolismo da glicose mas, pelo contrário, dependeriam da conformação e propriedades dos receptores celulares específicos para os catiões. Quando as hemácias se retraem, altera-se a conformação dos receptores e, logo a seguir, aumenta o influxo de sódio e potássio para restaurar o volume normal. Quando os glóbulos se dilatam dá-se o processo inverso, diminuindo o influxo.

A hemólise ou a destruição eritrocitária fisiológica poderiam considerar-se, pelo que foi afirmado, como consequentes a situações que alterassem a

permeabilidade da membrana globular aos catiões. O volume globular deixaria de estar sob controlo quando qualquer factor influenciasse a membrana ou, mais propriamente, os receptores ou o sistema enzimático de transporte activo dos catiões. Modificações incidentes a vários níveis de glicólise poderiam ser, também, causa muito importante dessas falhas de regulação.

Conhecem-se, na realidade, diversas situações hemolíticas, em geral hereditárias, aparentemente secundárias a alterações de permeabilidade dos catiões, ainda que por vezes se sobreponham outras anomalias.

A estomatocitose é, de todas as anomalias, a que mais claramente envolve perturbações do transporte de catiões (Oski e col., 1969). Os eritrócitos, morfológicamente anormais, contêm elevada concentração de Na^+ e baixos níveis de K^+ , sujeitando-se a hemólises fáceis. Atribuiu-se este defeito à hipoactividade da Na^+ , K^+ -ATPase, a que se associava maior consumo de glicose e produção de lactato. Os glóbulos aumentam de volume e tornam-se mais permeáveis ao Na^+ quando envelhecem, o que talvez seja consequente a modificações da permeabilidade da membrana ao transporte do Na^+ ou à incapacidade da ATPase.

A eliptocitose (Peters e col., 1966) e a esferocitose, hereditárias (Jacob, 1968; Zipursky e Israels, 1971), são exemplos de situações hemolíticas de causa semelhante. Os eritrócitos mais jovens parecem ser, aqui, muito mais permeáveis ao Na^+ do que os envelhecidos mas, surpreendentemente, aquele catião não se acumula, sendo a sua concentração intraglobular equivalente à normal. A actividade da «bomba» de sódio evidenciou-se bastante acima do habitual.

O defeito consistiria, essencialmente, no aumento da permeabilidade da membrana globular ao Na^+ . Para compensar este influxo, anormal, entraria em acção o mecanismo de transporte activo correspondente, mais acelerado, consumindo-se mais ATP e, portanto, aumentando a actividade glicolítica. Logo que os glóbulos chegassem ao baço diminuiria a glicose e, paralelamente a sua utilização pela via enzimática anaeróbia, declinando a produção de ATP. A ATPase deixaria de funcionar, ocasionando a acumulação de Na^+ e, em breve, os glóbulos incubados “rebertariam” (Jacob, 1968). Propõe-se, ainda, que os glóbulos esgotados em ATP, mais sujeitos a perderem fragmentos da membrana ricos em lípidos, tornar-se-iam mais esféricos e, portanto, menos deformáveis em face de agressões, sobretudo na microcirculação (Cooper e Jandl, 1969). O baço é o principal captor dos esferócitos estagnados na microcirculação (Molnar e Rapaport, 1972).

Zipursky e Israels (1971) não concordam com a hipótese que a atribui o encurtamento da vida dos eritrócitos à maior permeabilidade da membrana ao sódio. As concentrações intraglobulares deste catião, assim como o mecanismo de transporte activo, podem ser idênticas aos de indivíduos doentes sem que os familiares estudados apresentem esferocitose significativa. O aumento de permeabilidade ao sódio reflectiria simplesmente a existência de um defeito da membrana.

Ikoku e Fielding (1972), utilizando eritrócitos de indivíduos normais e expondo-os a soluções hipertónicas de NaCl, com que reproduziram as alterações características da esferocitose hereditária, puderam sugerir, no entanto, que a permeabilidade excessiva ao sódio é um factor importante na patogénese daquela afecção. Estas controvérsias atestam, perfeitamente, o desconhecimento presente sobre o defeito molecular da esferocitose hereditária.

Muito mais rara que a doença hemolítica anterior, a eliptocitose hereditária apresenta, também como causa aparente, aumento da permeabilidade ao Na⁺ (Peters e col., 1966).

Diversas outras situações, discutidas por Parker e Welt (1972), apresentam defeitos de transporte catiónico, quer de origem genética quer adquiridas. No conjunto, existem alterações graves ao conteúdo do volume globular, em geral conduzindo a hemólise fácil, sobretudo quando os eritrócitos são sujeitos a privações ou desgastes metabólicos excessivos ou prolongados.

O aumento de permeabilidade dos eritrócitos a catiões não parece estar, necessariamente, associado à hemólise, como demonstraram Honig e col. (1971) em diversos indivíduos da mesma família. Os glóbulos apresentavam teor de Na⁺ aproximadamente normal mas baixo nível de K⁺, enquanto o consumo de glicose, *in vitro*, era, nos eritrócitos do *propositus*, cerca de 60% vezes superior aos valores normais. Sugeriu-se que a inexistência de hemólise poderia reflectir a capacidade dos eritrócitos compensarem a maior permeabilidade catiónica por aumento da actividade glicolítica, tal como sucede, pelo menos até determinado momento, na esferocitose hereditária.

Quando atravessa a microcirculação o glóbulo vermelho tem de se deformar suficientemente e a todo o instante, evitando a estagnação que lhe seria fatal. Qualquer causa que torne os eritrócitos rígidos implica destruições rápidas. Poder-se-á inferir, daqui, que as oscilações da forma eritrocitária são essenciais às funções que executam; logo que os glóbulos ficam indeformáveis perdem utilidade e, como estorvo, importa que sejam eliminados.

Esta deverá ser a base em que actua o sistema retículo-endotelial, ao receber os sinais, ainda desconhecidos, que lhe permite sequestrar e destruir as hemácias impróprias, quer fisiologicamente envelhecidas quer de origem anormal.

LaCelle e Arkin (1970) utilizaram esta hipótese para explicar a destruição das hemácias senescentes no baço. Os eritrócitos, ao envelhecerem, tornar-se-iam menos deformáveis.

Quando os eritrócitos em senescência, mais rígidos, atravessam a micro-circulação esplénica, são retidos nos cordões da polpa vermelha. Ao perderem oxigénio dar-se-ia o desvio do ATP livre, intraglobular para a molécula hemoglobínica. A diminuição consequente dos níveis de ATP, sob a forma livre, alteraria a rigidez e posterior destruição dos eritrócitos.

Não se sabe em que medida é valorizável a captação dos glóbulos vermelhos envelhecidos pelo baço, discutindo-se o seu interesse nos mecanismos de destruição fisiológica.

Prankerd (1963) sugeriu que a acção do baço, associada à do restante sistema retículo-endotelial na eliminação de eritrócitos normais, seria caracterizada por nítida passividade, ao contrário do sucedido em diversas situações hemolíticas, em que o baço constitui o centro destruidor por excelência. Nestas situações anormais de hiperactividade esplénica, nota-se acentuado aumento da quantidade de glóbulos vermelhos, ou resíduos, captados pelas células endoteliais e macrófagos que bordejam os canais circulatórios. Molnar e Rapoport (1972) descreveram estes aspectos em baços retirados de doentes com esferocitose hereditária.

Após a esplenectomia mantém-se inalterada a sobrevivência globular mas eleva-se a quantidade de lípidos das membranas, assim como a área superficial dos eritrócitos (Cooper e Jandl, 1969). Se a deformação das hemácias estivesse relacionada, especificamente, com a capacidade de captação esplénica, seria de esperar que nas situações em que o baço não existe e aumentam os lípidos das respectivas membranas fosse maior a expectativa de vida eritrocitária, o que não se verifica. Assim, as funções do baço, quanto à destruição fisiológica das hemácias, permanecem bastante confusas. Aliás, há que mencionar a actividade reparadora daquele órgão sobre eritrócitos com inclusões prejudiciais, tais como grânulos sideróticos, vestígios nucleares e corpos de Heinz, etc. A permanência destes agregados nos glóbulos vermelhos condiciona a sua sobrevivência, a menos que sejam removidos pelo baço (La Celle e Weed, 1971).

A hemólise que caracteriza diversas alterações patológicas é um problema também pouco esclarecido. Cooper e Jandl (1972) estabeleceram três mecanismos principais de destruição prematura eritrocitária, sujeitos a especulação:

- 1 Por anomalias próprias da membrana (na forma, deformação, transporte iónico, por união com proteínas ou na constituição química);
- 2 Por alteração da hemoglobina;
- 3 Por factores extrínsecos.

A sobrevivência normal dos eritrócitos não aparenta relacionar-se com qualquer dos factores descritos, quando isolados. A progressão das diversas modificações detectadas no envelhecimento globular, sobretudo a diminuição da capacidade energética e o declínio da resistência e da deformação dos eritrócitos em circulação, são aspectos que, só em conjunto, terão influência na maior ou menor precocidade da destruição globular.

*

* *

Do que se afirmou restam-nos alguns factos concretos e muitas incertezas e, no fundo, a confirmação das palavras com que Ponder caracterizou o glóbulo vermelho há um quarto de século: um microcosmos!

BIBLIOGRAFIA

- AJMAR F., GAETANI G., GARRÉ C., BIANCHI G., SALVIDIO E. Effect of primaquine on erythrocytes with NADH-methemoglobin reductase deficiency and low glutathione reductase activity. *Brit. J. Haematol.* 1972; 23: 333-341.
- ALBERTI K.G.M.M., DARLEY J.H., EMERSON P.M., HOCKADAY T.D.R. 2,3-diphosphoglycerate and tissue oxygenation in uncontrolled *diabetes mellitus*. *Lancet* 1972; 2: 291-395.
- ALPERS J.B. Metabolic regulations involving phosphoglycerate. In «Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Cells», E. Kun and S. Grisolia (ed.), Wiley-Interscience, New York 1972; p. 33-55.
- AMARE M., LAWSON B., LARSEN W.E. Active extrusion of Heinz bodies in drug-induced haemolytic anaemia. *Brit J Haematol.* 1972; 23: 215-219.
- ARNONE A. X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. *Nature* 1972; 237: 146-149.
- ASAKURA T., SATO Y., MINIKAMI S., YOSHIKAWA H. Effect of deoxygenation of intracellular hemoglobin on red cell glycolysis. *J. Biochem.* 1966; 5: 524-526.

- ASAKURA T., DROTT H.R. Evidence of heme-heme interaction in heme-spin-labeled hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1971; 44: 1199-1204.
- ASTRUP P. Red cell pH and oxygen affinity of hemoglobin. *N. Engl. J. Med.* 1970; 283: 202-204.
- BANGHAM A.D. Lipid bilayers and biomembranes. *Ann. Rev. Biochem.* 1972; 41: 753-776.
- BAUER C. The contribution of carbamate in human adult and foetal blood to the CO₂ exchange during the respiratory cycle. In «Hemoglobin and Red Cell Structure and Function», G. J. Brewer (ed.), Plenum Press, New York 1972; p. 225-234.
- BELLHORN M.B., BLUMENFELD O.O., GALLOP P.M. Acetylcholinesterase of the human erythrocyte membrane. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1970; 39: 267-273.
- BENEDETTI E.L., DUNIA I., DIAWARA A. The organization of the plasma membrane in mammalian cells. *Europ. J. Cancer* 1972; 9: 263-272.
- BENESCH R., BENESCH R.E. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1967; 26: 162-167.
- BENESCH R., BENESCH R.E., YU C.I. Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 1968; 59: 526-532.
- BENESCH R.E., MAEDA N., BENESCH R. 2,3-diphosphoglycerate and the relative affinity of adult and foetal hemoglobin for oxygen and carbon monoxide. *Biochem. Biophys. Acta* 1972a; 257: 178-182
- BENESCH R.E., BENESCH R., RENTHAL R.D., MAEDA N. Affinity labelling of the polyphosphate binding site of hemoglobin. *Biochemistry* 1972b; 11: 3576-3582.
- BERLIN N.I. Life span of the red cell. In «The Red Blood Cell. A Comprehensive Treatise», C. Bishop e D. M. Surgenor (ed.), Acad. Press, New York 1964; p. 423-450.
- BEUTLER E., ROBSON M., BUTTENWIESER E. The mechanism of glutathione destruction and protection in drug-sensitive and non-sensitive erythrocytes. *In vitro* studies. *J. Clin. Invest.* 1957; 36: 617-619.
- BEUTLER E. The hemolytic effect of primaquine and related compounds. A review. *Blood* 1959; 14: 103-109.
- BEUTLER E. The stimulation of red cell glutathione reductase activity by riboflavin supplementation. *Science* 1969; 165: 613-616.
- BEUTLER E., TEEPLE L. Mannose metabolism in the human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 1969; 48: 461-466.
- BEUTLER E., SRIVASTAVA S.K. Relationship between glutathione reductase activity and drug induced haemolytic anemia. *Nature* 1970; 226: 759-760.
- BEUTLER E. Abnormalities of the hexose monophosphate shunt. *Sem. Hematol.* 1971; 8: 311-347.
- BEUTLER E., SRIVASTAVA S.K. Composition of the erythrocyte. In «Hematology», W. J. Williams, E. Beutler, A. Erslev and R W. Rundles (ed.), McGraw-Hill Book Co., New York 1972; p. 94-100.

- BEUTLER E. Energy metabolism, membrane function and maintenance of erythrocytes. In «Hematology», W. J. Williams, E. Beutler, A. J. Erslev and RW. Rundles (ed.), McGraw-Hill Book Co., New York 1972a; p. 132-144.
- BEUTLER E. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency. In «The Metabolic Basis of Inherited Diseases», 3th ed., J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden e D. S. Fredrickson (ed.), McGraw-Hill Book Co., New York 1972b; p. 1358-1388.
- BEUTLER E. Drug-induced anemia. Fed. Proc. 1972c; 31: 141-146.
- BEUZARD Y., BRUN B., COHEN-SOLAL M. Hemoglobinopathies par anomalie de structure. Nouv. Rév. Franç. Hematol. 1971; 1: 61-82.
- BIRD G.W.G. Erythrocyte polyagglutination. Nouv. Rév. Franç. Hematol. 1971; 11: 885-896.
- BIRD G.W.G., SHINTON N.K., WINGHAM J. Persistent mixed-field polyagglutination. Brit. J. Haematol., 1971; 21: 443-453.
- BIRD G.W.G. The red cell. Brit. Med. J. 1972a; 1: 293-297.
- BIRD G.W.G. Membrane abnormalities in polyagglutinable erythrocytes. Acta Haematol. 1972b; 47: 193-199.
- BLAIS J.J.B.P., GEIL P.H. Deformation behavior of erythrocyte ghost. Biopolymers, 1969; 8: 275-287.
- BLUM R.M., HOFFMAN J.F. Ca-induced K transport in human red cells: localization of its Ca-sensitive site to the inside of the membrane. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1972; 46: 1146-1152.
- BOIVIN P., GALAND C., HAKIM J., SIMONY D., SELIGMAN M. Une nouvelle érythroenzymopathie. Anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire et déficit héréditaire en adénylate-kinase érythrocytaire. Presse Méd. 1971; 79: 215-218.
- BOLIS L., GOMPERTS B.D. Red blood cells. In «Transport and Accumulation in Biological Systems», E. J. Harris (ed.), Univ. Park Press, Baltimore 1972; p. 93-146.
- BRAIN M.C. The red cell and hemolytic anaemia. In «Recent Advances in Haematology», A Goldberg and M. C. Brain (ed.), Churchill Livingston, Edinburgh 1971; p. 146-193.
- BRETSCHER M.S. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. Nature New Biology 1972; 236: 11-12.
- BREWER G.J. Adenosinetriphosphate. In «Biochemical Methods in Red Cell Genetics», J. J. Yunis (ed.), Acad. Press, New York 1969; p. 201-230.
- BREWER G.J., EATON J.W. Erythrocyte metabolism: interaction with oxygen transport. Science 1971; 171: 1205-1211.
- BUC H., NAJMAN A., COLUMELLI S., CARTIER P. Déficit en congénital pyruvate kinase érythrocytaire: étude cinétique de l'enzyme et conséquences métaboliques. Clin. Chim. Acta, 1972; 38: 131-140.
- BUNN H.F., BRIEHL R.W.C. The interaction of 2,3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins. J. Clin. Invest. 1970; 49: 1088-1095.
- BUNN H.F., JANDL J.H. Control of hemoglobin function within the red cell. N. Engl. J. Med. 1970; 282: 1414-1420.

- BUNN H.F. Erythrocyte destruction and hemoglobin catabolism. *Sem. Hematol.* 1972; 9: 3-17.
- BURT D.H., GREEN J.W. The sodium permeability of butanol treated erythrocytes: the role of calcium. *Biochem. Biophys. Acta* 1971; 225: 46-55.
- BURTON A.L., ANDERSON W.L., ANDREWS A.V. Quantitative studies on the flicker phenomenon in the erythrocytes. *Blood*, 1968; 32: 819-822.
- BUTCHER R.W., ROBISON G.A., SUTHERLAND E.W. Cyclic AMP and hormone action. In «Biochemical Action of Hormones», vol. II, G. Litwack (ed.), Acad. Press, New York 1972; p. 21-54.
- BROWN H.D., CHATTOPADHYAY S.K. Organelle-bound enzymes. In «Chemistry of the Cell Interface», part A, H. D. Brown (ed.), Acad. Press, New York 1971; p. 73-203.
- CALDWELL P.R.B., NAGEL R.L., JAFFÉ E.R. The effect of oxygen, carbon dioxide pH and cyanate on the binding of 2,3-diphosphoglycerate to human hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1971; 44: 1504-1509.
- CANHAM P.B., BURTON A.C. Distribution of size and shape in populations of normal human red cells. *Circ. Res.* 1968; 2: 405-422.
- CAPALDI R.A., GREEN D.E. Membrane proteins and membrane structure. *Febs. Letters*, 1972; 25: 205-209.
- CARSON P.E. Haemolysis due to inherited erythrocyte enzyme deficiencies. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 1968; 151: 765-776.
- CHANUTIN A., CURNISH R.R. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1967; 121: 96-102.
- CHANUTIN A., HERMAN E. The interaction of organic and inorganic phosphates with hemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1969; 131: 180-184.
- CHAPMAN D., WALLACH D.F.H. Recent physical studies of phospholipids and natural membranes. In «Biological Membranes. Physical Fact and Function», D. Chapman (ed.), Acad. Press, New York 1968; p. 125-202.
- CHAPMAN R.G., SCHAUMBURG L. Glycolysis and glycolytic enzyme activity of aging red cell in man. *Brit. J. Haematol.* 1967; 13: 665-678.
- CHAPMAN R.G. Red cell aldolase deficiency in hereditary spherocytosis. *Brit. J. Haematol.* 1969; 16: 145-152.
- CHEN L.F., LUND D.B., RICHARDSON T. Essential fatty acid and glucose permeability of lecithin membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 1971; 225: 89-95.
- CIDIVALLI G., LOCKER H., RUSSEL A. Increased permeability of erythrocyte membrane in thalassemia. *Blood* 1971; 37: 716-724.
- COME S.E., SHOHET S.B., ROBINSON S.H. Surface remodelling of reticulocytes produced in response to erythroid stress. *Nature New Biology* 1972; 236: 157-158.
- COOPER R.A., JANDL J.H. The role of membrane lipids in the survival of red cells in hereditary spherocytosis. *J. Clin. Invest.* 1969a; 48: 736-744.
- COOPER R.A., JANDL J.H. The selective and conjoint loss of red cell lipids. *J. Clin. Invest.* 1969b; 48: 906-914.

- COOPER R.A. Lipids of human red cell membrane: normal composition and variability in disease. *Sem. Hematol.* 1970; 7: 296-322.
- COOPER R.A., DILOY-PURAY M., LANDO P., GREENBERG M.S. An analysis of lipoproteins, bile acids, and red cell membranes associated with target cells and spur cells in patients with liver disease. *J. Clin. Invest.* 1972; 51: 3182-3192.
- COOPER R.A., JANDL J.H. Destruction of erythrocytes. In «Hematology» W. J. Williams, E. Beutler, A. J. Erslev and R. W. Rundles (ed.), McGraw-Hill Book Co., New York 1972; p. 178-190.
- CRYSTAL R.G., ANDERSON W.P. Initiation of hemoglobin synthesis: comparison of model reactions that use artificial templates with those using natural messenger RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1972; 69: 706-711.
- CURRAN P.F. Active transport of amino acids and sugars. *Arch. Int. Med.* 1972; 121: 258-269.
- DACIE J.V. "The Haemolytic Anaemias". IV., Churchill, London. 1967.
- DANON D., SHEBA C., RAMOT B. The morphology of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes: electronmicroscopic studies. *Blood* 1961; 17: 229-234.
- DAVIDSON W.D., TANAKA K.R. Factors affecting pentose phosphate pathway activity in human red cells. *Brit. J. Haematol.* 1972; 23: 371-385.
- DAVSON H. Growth of the concept of the paucimolecular membrane *Circulation* 1962; 26: 1022-1037.
- DAWSON R.B., KOCHOLATY W.F. Hemoglobin function in stored blood: VI. The effect of phosphate on erythrocyte ATP and 2,3-DPG. *Ann. J. Clin. Path.* 1971; 56: 656-660.
- DELIVORIA-PAPADOPOULOS M., OSKI F.A., GOTTLIEB A.J. Oxygen-hemoglobin dissociation curves: effect of inherited enzyme defects of the red cell. *Science* 1969; 165: 601-602.
- DESBUQUOIS B., CUATRECASAS P. Independence of glucagons receptors and glucagon in activation in liver cell membranes. *Nature, New Biology* 1972; 236: 202-204.
- DE VERDIER C.H., GARBY L. Low binding of 2,3-diphosphoglycerate to haemoglobin: A contribution to the knowledge of the binding site and an explanation for its high oxygen affinity of foetal blood. *Scand. J. Clin. Invest.* 1969; 23: 149-151.
- DEWEY M.M., BARR L. Some considerations about the structure of cellular membranes. In «Current Topics in Membranes and Transport», vol. I, F. Bronner and A. Kleinzeller (ed.), Acad. Press, New York 1970; p. 1-33.
- DIMANT E., LANDBERG E., LONDON I.M. The metabolic behavior of reduced glutathione in human and avian erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1955; 213: 769-778.
- DINTENFASS L. Internal viscosity of the red cell and a blood viscosity equation. *Nature* 1968; 219: 956-958.
- DITZEL J. Impaired oxygen release caused by alterations of the metabolism in the erythrocytes in diabetes. *Lancet* 1972; 1: 721-723.
- DODGE J.T., MITCHELL C., HANAHAN D.J. The preparation and chemical character-

- istics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 1963; 100: 119-130.
- DODGE J.T., PHILLIPS G.B. Composition of phospholipids and of phospholipid fatty acids and aldehydes in human red cells. J. Lipid Res. 1967; 8: 667-675.
 - DUC G., ENGEL K., TUCHSMID P. Effet du 2,3-diphosphoglycérate (DPG) érythrocytaire sur l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène dans le sang complet de l'adulte et du nouveau-né. Schweiz med. Wschr. 1971; 101: 1792-1794.
 - DUNHAM P.B., GUNN R.B. Adenosine triphosphatase and active cation transport in red blood cell membrane. Arch. Int. Med. 1972; 129: 241-247.
 - EATON J.W., BREWER G.J., GROVER R.F. Role of red cell 2,3-diphosphoglycerate in the adaptation of man to altitude. J. Lab. Clin. Med. 1969; 73: 603-609.
 - EDWARDS M.J., CANON B. Oxygen transport during erythropoietic response to moderate blood loss N. Engl. J. Med. 1972; 287: 115-119.
 - FAIRBANKS G., STEEK T.L., WALLACH D.F.H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry, 1971; 10: 2606-2617.
 - FEIG S.A., SEGEL G.B., SHOHET S.B., NATHAN D.G. Energy metabolism in human erythrocytes. II. Effects of glucose depletion. J. Clin. Invest. 1972; 51: 1547-1554.
 - FINKELSTEIN A. Thin lipid membranes. A model for cell membranes. Arch. Int. Med. 1972; 129: 229-240.
 - FORD D.L., OMACHI A. Influence of cyclic 3',5'-AMP on glycolysis in human erythrocytes. Biochem. Biophys. Acta 1972; 279: 587-592.
 - FORRESTER T., LIND A.R. Identification of adenosine triphosphate in human plasma and the concentration in the venous effluent of forearm muscles before, during, and after sustained contractions. J. Physiol. 1969; 204 : 347-364.
 - FOX C.F. The structure of cell membranes. Scient. Amer. 1972; 226: 31-39.
 - FRASER I.M., VESELL E.S. Effect of drugs and drug metabolites on erythrocytes from normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient individuals. Ann. N. Y. Acad. Sc. 1968; 151: 777-794.
 - FREYCHET P., KAHN R., ROTH J., NEVILLE Jr. D.M. Insulin interactions with liver plasma membranes. Independence of binding of the hormone and its degradation. J. Biol. Chem. 1972; 247 : 3953-3961.
 - FUNG Y.C.B., TONG P. The theory of the sphering of red blood cells. Biophys. J. 1968; 8: 175-198.
 - GANZONI A., HILLMAN R.S., FINCH C.A. Naturation of the reticulocyte. Brit. J. Haematol. 1969; 16: 119-134.
 - GANZONI A.M., OAKES R., HILLMAN R.S. Red cell aging in vivo. J. Clin. Invest. 1971; 50: 1373-1378.
 - GARBY L., GERBÈR G., DE VERDIÈR C.H. Binding of 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate to human haemoglobin A. Europ. J. Biochem. 1969; 10: 110-115.
 - GARDNER J.D., SHIBOLET S., GINZLER E.R. A two site model for sodium transport in human erythrocytes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1971; 45: 1548-1553.

- GIBSON Q.H. The reduction of methemoglobin in red blood cells and studies on the cause of idiopathic methemoglobinemia. *Biochem. J.*, 1948; 42: 13-23.
- GIBSON Q.H., PARKHURST L.J. Kinetic evidence for a tetrameric functional unit in hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 243: 5521-5524.
- GIBSON Q.H. The contribution of the α and β chains to the kinetics of oxygen binding to and dissociation from hemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 1973; 70: 1-4.
- GINSBURG V. Enzymatic basis for blood groups in man. *Adv. Enzymol.* 1972; 36: 131-149.
- GLADER B.E., CONRAD M.E. Cyanate inhibition of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nature* 1972; 237: 336-338.
- GLYNN I.M. Membrane adenosine triphosphatase and cation transport. *Brit. Med. Bull.* 1968; 24: 165-169.
- GLYNN L.M., LEW V.C., LUTHI U. Reversal of the potassium entry mechanisms in red cells with and without reversal of entire pump cycle. *J. Physiol.*, 1970; 207: 371-391.
- GOLDSTEIN S. The biology of aging. *N. Engl. J. Med.*, 1971; 285: 1120-1129.
- GROSS M., RABINOVITZ M. Control of globin synthesis in cell-free preparations of reticulocytes by formation of a translational repressor that is inactivated by heme. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1972; 69: 1565-1568.
- GROSS G.P., HATHAWAY W.E. Fetal erythrocyte deformability. *Pediat. Res.* 1972; 6: 593-599.
- GUIDOTTI G. The composition of biological membranes. *Arch. Int. Med.* 1972; 129: 194-201.
- HAIDAS S., LABIE D., KAPLAN J.C. 2,3-diphosphoglycerate content and oxygen affinity as a function of red cell age in normal individuals. *Blood.* 1971; 38: 463-467.
- HANEL H.K., COHN J. Adenosine triphosphatase deficiency in a family with non-spherocytic haemolytic anaemia. *Scand. J. Haematol.*, 1972; 9: 28-35.
- HARKNESS D.R., ROTH S. Purification and properties of 2,3-diphosphoglyceric and phosphatase from human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1969; 34: 849-856.
- HARRIS J.W., KELLERMEYER R.W. "The Red Cell". Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass. 1970.
- HERZ F., KAPLAN E. A review: human erythrocyte acetylcholinesterase. *Pediat. Res.* 1973; 7: 204-214.
- HILLE B. Ionic permeability changes in active axon membranes. *Arch. Int. Med.* 1972; 129: 293-298.
- HONIG G.R., LACSON P.S., MAURER H.S. A new familial disorder with abnormal erythrocyte morphology and increased permeability of the erythrocytes to sodium and potassium. *Pediat. Res.* 1971; 5: 159-166.
- HUGHES R.E., MATON S.C. The passage of vitamin C across the erythrocyte membrane. *Brit. J. Haematol.* 1968; 14 : 247-255.
- HULLA F.W., GRATZER W.B. Association of high-molecular weight proteins in the red cell membrane. *Febs Letters*, 1972; 25: 275-278.

- HUTTON J.J. Glucose-metabolizing enzymes of the mouse erythrocyte: activity changes during stress erythropoiesis. *Blood* 1972; 39: 542-553.
- HUXLEY H.E. The mechanism of muscular contraction. *Science* 1969; 164: 1356-1366.
- ILLIANO G., CUATRECASAS P. Modulation of adenylate cyclase activity in liver and fat cell membranes by insulin. *Science* 1972; 175: 906-908.
- IKOKU N.B., FIELDING J. Production of spherocytosis and increased osmotic fragility in normal erythrocytes by sodium stress. *Brit. J. Haematol.*, 1972; 22: 643-650.
- IMARISIO J.J., GENDELMAN B., STROTHER J.A. Red cell in vitro metabolism in approximate steady-state. *Metabolism* 1969; 18: 1033-1047.
- JACKSON L.J., SEAMAN G.V.F. Physicochemical properties of some glycoproteins released from human erythrocyte membranes by trypsin. *Biochemistry* 1972; 11: 44-49.
- JACKSON R.C. Studies on the enzymology of glutathione metabolism in human erythrocytes. *Biochem. J.* 1969; 111: 309.
- JACOB H.S., JANDL J.H. Effects of sulphhydryl inhibition on red blood cells. I Glutathione in the regulation of the hexose monophosphate pathway. *J. Biol. Chem.* 1966; 241: 4243-4250.
- JACOB H.S. Dysfunction of the red blood cell membrane in hereditary spherocytosis. *Brit. J. Haematol.* 1968; 14: 99-104.
- JACOB H.S., WINTHERHALTER K.H. The role of hemoglobin heme loss in Heinz body formation: studies with a partially heme-deficient hemoglobin and with genetically unstable hemoglobins. *J. Clin. Invest.* 1970; 49: 2008-2016.
- JACOB H.S., RUBY A., OVERLAND E.S., MAZIA D. A protein abnormality in red cell membranes of hereditary spherocytes. *J. Clin. Invest.*, 49: 48a.
- JACOB H.S. Mechanisms of Heinz body formation and attachment to red cell membrane. *Sem. Hematol.* 1970; 7: 341-354.
- JAFFÉ E.R. Metabolic processes involved in the formation and reduction of methemoglobin in human erythrocytes. In «The Red Blood Cell. A Comprehensive Treatise». C. Bishop e D. M. Surgenor (ed.), Acad. Press, New York 1964; p. 397-422.
- JAFFÉ E.R. Hereditary methemoglobinemia associated with abnormalities in the metabolism of erythrocytes. *Ann. J. Med.* 1966; 41: 786-798.
- JAFFÉ E.R., NEUMANN G. Hereditary methemoglobinemia and the reduction of methemoglobin. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 1968; 151: 795-806.
- JAFFÉ E.R., HSIEH H.S. DPNH-methemoglobin reductase deficiency and hereditary methemoglobinemia. *Sem. Hematol.* 1971; 8: 417-437.
- JANDL J.H., SIMMONS R.L., CASTLE W.B. Red cell filtration and the pathogenesis of certain anemias. *Blood* 1961; 18: 138-148.
- JANDL J.H. Leaky red cells: an analytical review. *Blood* 1965; 26: 367-382.
- JANDL J.H., ASTER R.H. Increased splenic pooling and the pathogenesis of hypersplenism. *Am. J. Med. Sc.* 1967; 253: 383-398.

- JOHNSTON P.V., ROOTS B.L. "Nerve Membranes. A Study of the Biological and Chemical Aspects of Neuron-Glia Relationships". Pergamon Press, Oxford 1972; p. 143-175.
- KABACK H.R. Transport. *Ann. Rev. Biochemistry* 1970; 39: 561-598.
- KAPLAN J.C. Métabolisme érythrocytaire et transport d'oxygène. *Schweiz. Med. Wschr.* 1971a; 101: 1751-1754.
- KAPLAN J.C. Defects of glutathione reducing and synthesizing reactions in the red cell. *Europ. J. Clin. Biol. Res.* 1971b; 16: 523-528.
- KEITT A.S., SMITH T.W., JANDL J.H. Red cell «pseudomosaicism» in congenital methemoglobinemia. *N. Engl. J. Med.* 1966; 275: 398-405.
- KEITT A.S. Hemolytic anemia with impaired hexokinase activity. *J. Clin. Invest.* 1969; 48: 1997-2007.
- KEITT A.S. Hereditary methemoglobinemia with deficiency of NADH-methemoglobin reductase. In «The Metabolic Basis of Inherited Disease», 3.^a ed., J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden and D. S. Fredrickson (ed.), McGraw-Hill Book Co., New York 1972; p. 1389-1397.
- KENDREW J.C. The three-dimensional structure of a protein molecule. *Scient. Amer.* 1961; 205: 96-105.
- KILMARTIN J.V., HEWITT J.A. The effect of removal of C-terminal residues on cooperative interactions in hemoglobin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1971; 36: 311-314.
- KIRKMAN H.N. Glucose-6-phosphate dehydrogenase variants and drug-induced hemolysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1968; 151: 753-764.
- KORNFELD R., KORNFELD S. The structure of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1970; 245: 2537-2545.
- KORNFELD S., KORNFELD R. Cell surface receptors – structure and function. In «Progress in Hematology», vol. VII, E. B. Brown and C. V. Moore (ed.), Grune & Stratton, New York 1971; p. 161-183.
- KUMA F., ISHIZAWA S., HIRAYAMA K., WAKAJIMA H. Studies on methemoglobin reductase. I. Comparative studies of diaphorases from normal and methemoglobinemic erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1972; 247: 550-555.
- KUMA F., INOMATA H. Studies on methemoglobin reductase. II. The purification and molecular properties of reduced nicotinamide adenine dinucleotide – dependent methemoglobin reductase. *J. Biol. Chem.* 1972; 247: 556-560.
- LABIE D., COHENSOLAL M., BYCKOVA V. La fonction respiratoire en chimie pathologique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1970; 52: 1271-1277.
- LACELLE P.L., ARKIN B. Acquired rigidity: a possible determinant of normal RBC life span. *Blood* 1970; 36: 837.
- LACELLE P.L. Alteration of membrane deformability in haemolytic anemia. *Sem. Hematol.* 1970; 7: 355-371.
- LACELLE P.L., WEED R.I. The contribution of normal and pathologic erythrocytes to

- blood rheology. In «Progress in Hematology», vol. VII, E. B. Brown e C. V. Moore (ed.), Grune & Stratton, New York 1971; p. 1-32.
- LEHMANN H., HUNTSMAN R.G. The hemoglobinopathies. In «The Metabolic Basis of Inherited Disease», 3.a ed., J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden and D. S. Fredrickson (ed.), McGraw-Hill Book Co., New York 1972; p. 1398-1431.
 - LENARD J. Proteins and glycolipid components of human erythrocyte membranes. *Biochemistry* 1970; 9: 1129-1132.
 - LENFANT C., TORRANCE J.D., FINCH C.A. The regulation of hemoglobin affinity for oxygen in man. *Trans. Ass. Amer. Phys.* 1969; 82: 121-128.
 - LENFANT C., TORRANCE J.D., WOODSON R., FINCH C.A. Adaptation to hypoxia. In «Red Cell Metabolism and Function», G. J. Brewer (ed.), Plenum Press, New York 1970; p. 203-212.
 - LEONARD H.A. Human pyruvate kinase. Role of the divalent cation in the catalytic mechanism of the red cell enzyme. *Biochemistry* 1972; 11: 4407-4414.
 - LESSIN L.S., JENSEN W.N., PONDER E. Molecular mechanism of hemolytic anemia in hemozygous hemoglobin C disease. Electron microscopy study by the freeze-etching technique. *J. Exp. Med.* 1969; 139: 443-446.
 - LESSIN L.S., BESSIS M. Morphology of the erythron. In «Hematology», W. J. Williams, E. Beutler, A J. Erslev, R W. Rundles (ed.), McGraw-Hill Book Co., New York 1972; p. 62-93.
 - LESSIN L.S., JENSEN W.N., KLUG P. Ultrastructure of the normal and hemoglobinopathic red blood cell membranes. *Arch. Int. Med.* 1972; 129 : 306-319.
 - LIEB W.R., STEIN W.D. Carrier and non-carrier models for sugar transport in the human red blood cell. *Biochem. Biophys. Acta* 1972; 265: 187-207.
 - LO S.S., MARTI H.R., HITZIG W.H. Hemolytic anemia associated with decreased concentration of reduced glutathione in red cells. *Acta Haematol.* 1971; 46: 14-23.
 - LOEWENSTEIN W.R. Intercellular communication. *Scient. Amer.* 1970; 222: 78-86.
 - LOEWENSTEIN W.R. Cellular communication through membrane junctions. *Arch. Int. Med.* 1972; 129: 299-305.
 - LOEWENSTEIN W.R. Membrane junctions in growth and differentiation. *Fed. Proc.* 1973; 32: 60-64.
 - LONDON I.M., TAVILL AS., VANDERHOFF G.A., HUNT T., GRAYZEL AI. Erythroid cell differentiation and the synthesis and assembly of hemoglobin. *Developmental Biology Supplem.* 1967; 1: 227-253.
 - LOVE W.G., KLOCK P.A, LATTMAN E.E., PADLAN E.A, WARD Jr. K.B., ENDRICKSON W.A. The structures of lamprey and blood-worm hemoglobins in relation to their evolution and function. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1971; 36: 349-357.
 - LOWY B.A., JAFFÉ E.R., HUNT T., LONDON I.M., KAPLAN B.H. Synthetic and metabolic activities of the erythrocyte. In «Hematology», W. J. Williams, E. Beutler, A J. Erslev and R W. Rundles (ed.), McGraw-Hill Book Co., New York 1972; p. 100-124.

- MACKENZIE I.L., DONALDSON R.M., TRIER J.S. Antibodies to intestinal microvillous membranes. II. Inhibition of intrinsic factor mediated attachment of vitamin B₁₂ to hamster brush borders. *J. Exp. Med.* 1968; 128: 375-386.
- MADDY A.H., MALCOLM B.R. Protein conformations in the plasma membrane. *Science* 1965; 150: 1616-1617.
- MADDY A.H. Erythrocyte membrane proteins. *Sem. Hematol.* 1970; 7: 275-295.
- MANOHAR S.V., DENSTEDT O.F., RUBINSTEIN D. Metabolism of the erythrocyte. XVI. Incorporation of glucose into adenine nucleotides by human and rabbit erythrocytes. *Canad. J. Biochem.* 1966; 44: 59-66.
- MANOHAR S.V., LERNER M.H., RUBINSTEIN D. The metabolism of the erythrocyte. XVIII. Inhibition of nucleotide synthesis in human erythrocytes by adenosine. *Canad. J. Biochem.* 1968; 46: 445-450.
- MANSO C. A desidrogenase da glucose-6-fosfato nos glóbulos vermelhos dos bantos de Moçambique, Tese de doutoramento, Lisboa. 1966.
- MANSO C. Difosfoglicerato nos eritrócitos. Sua importância em situações de anóxia. *J. Soc. Ciênc. Méd.* 1972; 136: 567-578.
- MARCHESI V.T., ANDREWS E.P. Glycoproteins: isolation from cell membranes with lithium diiodosalicylate. *Science* 1971; 174: 1247-1248.
- MARCHESI V.T., STEERS Jr.E. Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane. *Science* 1968; 159: 203-204.
- MARCUS D.M. The ABO and Lewis blood group systems. *N. Engl. J. Med.* 1969; 280: 994-1006.
- MARIKOVSKY Y., DANON D. Electron microscope analysis of young and old red blood cells stained with colloidal iron for surface charge evaluation. *J. Cell. Biol.* 1969; 43: 1-7.
- MILLS G.C., RANDALL H.P. Hemoglobin catabolism. II. The protection of haemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 1959; 232: 589-594.
- MILLS G.C. The physiologic regulation of erythrocyte metabolism. *Texas Rep. Biol. Med.* 1969; 27: 773-779.
- MINAKAMI S., YOSHIKAWA H. Inorganic phosphate and erythrocyte glycolysis. *Biochem. Biophys. Acta* 1965; 99: 175-178.
- MINAKAMI S. Effect of oxygen tension on glycolysis in erythrocytes. *Försvarsmedicin* 1969; 5: 181-186.
- MOORE T.J., HALL N. Kinetics of glucose transfer in adult and fetal human erythrocytes. *Pediat. Res.* 1971; 5: 356-359.
- MOTULSKY A.G. Hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Fed. Proc.* 1972; 31: 1286-1292.
- MOLNAR Z., RAPPAPORT H. Fine structure of the red pulp of the spleen in hereditary spherocytosis. *Blood* 1972; 39: 81-98.
- MOSES S.W., CHAYOTH R., LEVIN S., LAZAROVITZ E., RUBINSTEIN D. Glucose

- and glycogen metabolism in erythrocytes from normal and glycogen storage disease type III subjects. *J. Clin. Invest.* 1968; 47: 1343-1347.
- MUIRHEAD H., COX J.M., MAZZARELLA L., PERUTZ M.F. Structure and function of haemoglobin. III. A three dimensional Fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at 5.5 Å resolution. *J. Molec. Biol.* 1967; 28: 117-156.
 - MURPHY J.R. Erythrocyte metabolism. VI. Cell shape and the location of cholesterol in the erythrocyte metabolism. *J. Lab. Clin. Med.* 1965; 65: 756-774.
 - NAKAO M., NAKAO T., YAMAZOE S. Adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cells. *Nature* 1960; 187: 945-946.
 - NATHAN D.G., SHOHET S.B. Erythrocyte ion transport defects and hemolytic anemia: «hydrocytosis» and «desiccytosis». *Sem. Hematol.* 1970; 7: 381-408.
 - NICOLSON G.L., SINGER S.J. Electron microscopic localization of macromolecules on membrane surfaces. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 1972; 195: 368-375.
 - OHKI S. Excitability of artificial membrane as an analogy to excitable biological membrane. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 1972; 195: 457-480.
 - OMACHI A., SCOTT C.B., PARRY T.E. Influence of glycolysis on NADH content in human erythrocytes. *Ann. J. Path.* 1969; 216: 527-530.
 - OSKI F.A., NAIMAN J.L., BLUM S.F., ZARKOWSKI H.S., WHAUN J., SHOHET S.B., GREEN A., NATHAN D.G. Congenital hemolytic anemia with high-sodium, low-potassium red cells. Studies of three generations of a family with a new variant. *N. Engl. J. Med.* 1969; 280: 909-916.
 - OSKI F.A., GOTTLIEB A.J., MILLER W.W., DELIVORIA-PAPADOPOULOS M. The effects of deoxygenation of adult and fetal hemoglobin on the synthesis of red cell 2,3-diphosphoglycerate and its in vivo consequences. *J. Clin. Invest.* 1970; 49: 400-407.
 - OSKI F.A., GOTTLIEB A.J. The interrelationships between red blood cell metabolites, hemoglobin and the oxygen equilibrium curve, In «Progress in Hematology», vol. VII, E. B. Brown and C. V. Moore (ed.), Grune & Stratton, New York 1971; p. 33-67.
 - OZSOYLU S. Congenital methemoglobinemia due to hemoglobin M. *Acta Hematol.* 1972; 47: 225-232.
 - PAGLIA D.E., HOLLAND P., BAUGHAN M.A., VALENTINE W.N. Occurrence of defective hexose phosphate isomerization in human erythrocytes and leucocytes. *N. Engl. J. Med.* 1969; 280: 66-71.
 - PAGLIA D.E., VALENTINE W.N., TARTAGLIA A.P., KONRAD P.N. Adenine nucleotide reduction associated with a dominantly transmitted form of nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood* 1970; 36: 837.
 - PARKER J.C., HOFFMAN J.F. The role of membrane phosphoglycerate kinase on the control of glycolytic rate by active cation transport in human red blood cells. *J. Gen. Physiol.* 1967; 50: 893-916.
 - PARKER J.C., SNOW R.L. Influence of external ATP on permeability and metabolism of dog red blood cells. *Amer. J. Physiol.* 1972; 223: 888-893.

- PARKER J.C., WELT L.G. Pathological alterations of cation movements in red blood cells. Arch. Int. Med. 1972; 129: 320-332.
- PASSOW H. Ion and water permeability of the red blood cell. In «The Red Blood Cell. A Comprehensive Treatise», C. Bishop and D. M. Surgenor (ed.), Acad. Press, New York 1964; p. 71-145.
- PELLETIER M., LUDENS J.H., FANESTIL D.D. The role of aldosterone in active sodium transport. Arch. Int. Med. 1972; 129: 248-257.
- PERUTZ M.P. The hemoglobin molecule. Scient. Amer. 1964; 211: 64-76.
- PERUTZ M.P. X-Ray analysis structure and function of enzymes. Europ. J. Biochem. 1969; 8: 455-466.
- PERUTZ M.F. Stereochemistry of cooperative effects of hemoglobin. Nature 1970a; 228: 726-734.
- PERUTZ M.F. The Bohr effect and combination with organic phosphates. Nature 1970b; 228: 734-739.
- PERUTZ M.F., TENNEYCK L.F. Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1971; 36: 295-310.
- PETERS J.C., ROWLAND M., ISRAELS L.G., ZIPURSKY A. Erythrocyte sodium transport on hereditary ellyptocytosis. Canad. J. Physiol. Pharmacol. 1966; 44: 817-827.
- PHILLIPS G.B., DODGE J.T., HOWE C. The effect of aging of human red cells in vivo on their fatty acid composition. Lipids 1969; 4: 544-549.
- PINDER D.N. Shape of human red cells. J. Theor. Biol. 1972; 34: 407-410.
- PIOMELLI S., CORASH L.M., DAVENPORT D.D., MIRAGLIA J., AMOROSI E.L. *In vivo* lability of glucose-6-phosphate dehydrogenase in Gd^A and Gd^{Mediterranean} deficiency. J. Clin. Invest. 1968; 47: 940-948.
- PIOMELLI S., REINDORF C.A., ARZANIAN M.T., CORASH L.M. Clinical and biochemical interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle-cell anemia. N. Engl. J. Med. 1972; 287: 213-217.
- PITTMAN J.G., MARTIN D.P. Fatty acid biosynthesis in human erythrocytes: evidence in mature erythrocytes for an incomplete long chain fatty acid synthesizing system. J. Clin. Invest. 1966; 45: 165-172.
- PONDER E. "Hemolysis and Related Phenomena". Grune & Stratton: New York. 1948.
- PONDER E. Analytical review: present concepts of the structure of the mammalian red cell. Blood 1954; 9: 227-235.
- POYART G.-F., BURSAUX E., FREMINET A. Effet Bohr et affinité de l'hémoglobine pour l'O₂, Ann. Biol. Clin. 1972; 30: 213-217.
- POZNANSKI M., SOLOMON A.K. Effect of cell volume on potassium transport in human red cells. Biochem. Biophys. Acta 1972; 274: 111-118.
- PRANKERD T.A.J. The spleen and anaemia. Brit. J. Med. 1963; 1: 517-524.
- PRINS H.K., LOOS J.A. Glutathione. In «Biochemical Methods in Red Cell Genetics», J. J. Yunis (ed.), Acad. Press, New York 1969; p. 115-137.

- RABINOVITZ M., FREEDMAN M.L., FISHER J.M., MAXWELL C.R. Translational control in hemoglobin synthesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1969; 34: 567-578.
- RALL T.W. Role of adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP) in actions of catecholamines. *Pharmacol. Reviews* 1972; 24: 399-409.
- RANNEY H.M. Transport functions of the erythrocyte. In «Hematology», W. J. Williams, E. Beutler, A J. Erslev and R. W. Rundles (ed.), McGraw-Hill Book Co., New York 1972; p. 144-151.
- RAPOPORT S. On the metabolic regulation of glycolysis in erythrocytes. *Bull. Soc. Chem. Biol.* 1970; 52: 1169-1186.
- RAZIN S. Reconstitution of biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1972; 205: 241-296.
- REYS L., MANSO C., STAMATOYANNOPOULOS G. Genetic studies on Southeastern bantu of Mozambique. I. Variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Amer. J. Human Gen.* 1970; 22: 203-215.
- RIEBER E.E., KSOWER N.S., JAFFÉ E.R. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide and the reduction of oxidized glutathione in human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 1968; 47: 66-71.
- RIFKIND R.H. Heinz body anemia. An ultrastructural study. II. Red cell sequestration and destruction. *Blood* 1965; 26: 433-448.
- ROBERTSON J.D. The structure of biological membranes. *Arch. Int. Med.* 1972; 129: 202-228.
- ROBISON G.A., BUTCHER R.W., SUTHERLAND E.W. Cyclic AMP. Acad. Press: New York. 1971.
- RODBELL M., BIRNBAUMER L., POHL S.L. Adenyl cyclase in fat cells. III. Stimulation by secretin and the effects of trypsin on the receptors for lipolytic hormones. *J. Biol. Chem.* 1970; 245: 718-722.
- RODBELL M. Regulation of glucagon action and its receptors. In «Glucagon», P. J. Lefebvre and R. H. Unger (ed.), Pergamon Press, Oxford 1972; p. 61-75.
- RORTH M., NYGAARD S.F., PARVING H.H. Red cell metabolism and oxygen affinity of healthy individuals during exposure to high altitude. In «Hemoglobin and Red Cell Structure and Function», G. J. Brewer (ed.), Plenum Press, New York 1972; p. 361-372.
- ROSE I.A., WARMS J.V.B. Control of glycolysis in the human red blood cell. *J. Biol. Chem.* 1966; 241: 4848-4854.
- ROSE I.A., WARMS J.V.B. Control of red cell glycolysis. *J. Biol. Chem.* 1970; 245: 4009-4015.
- ROSE Z.B. The purification and properties of diphosphoglycerate mutase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1968; 243: 4810-4820.
- ROSE Z.B., LIEBOWITZ J. 2,3-diphosphoglycerate phosphatase from human erythrocytes. General properties and activation by anions. *J. Biol. Chem.* 1970; 245: 3232-3239.
- ROSENBERG S.A., GUIDOTTI G. The proteins of the erythrocyte membrane. In «Red

- Cell Membrane. Structure and Function», G. A. Jamieson and T. Greenwalt (ed.), J. B. Lippincott, Philadelphia 1969; p. 93-116.
- ROSENTHAL AS., KREGENOW F.M., MOSES H.L. Some characteristics of Ca⁺⁺ dependent ATPase activity associated with a group of erythrocyte membrane proteins which form fibrils. *Biochem. Biophys. Acta* 1970; 196: 254-268.
 - ROSSE W.F., LAUF R.K. Effect of immune reactions on the red cell membrane. *Sem. Rematol.* 1970; 7: 323-340.
 - ROUGHTON F.J.W. Some recent work on the interactions of oxygen, carbon dioxide and haemoglobin. *Biochem. J.* 1970; 117: 801-812.
 - RUBIN C.S., ERLICHMAN J., ROSEN O.M. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase of human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 1972; 247: 6135-6139.
 - RUTTEN M.G. "The Origin of Life by Natural Causes". Elsevier Publ. Co: Amsterdam. 1971.
 - SALHANY J.M., MIZUKAMI H., ELIOT R.S. The deoxygenation kinetic properties of human fetal hemoglobin: effect of 2,3-diphosphoglycerate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1971; 45: 1350-1356.
 - SASS M.D., CARUSO C.J., FARHANGI M. TPNH-methemoglobin reductase deficiency: a new red cell enzyme defect. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70: 760-767.
 - SCHMIDT P.M. Les anémies hémolytiques congénitales. *Schweiz. Med. Wschr.* 1971; 101: 187-190.
 - SCHWARTZ J.M., PARESS P.S., ROSS J.M., DIPILLO F., RIZEK R. Unstable variant of NADH-methemoglobin reductase in Puerto Ricans with hereditary methemoglobinemia. *J. Clin. Invest.* 1972; 51: 1594-1601.
 - SCOTT E.M., DUNCAN I.W., EKSTRAND V. The reduced pyridine nucleotide dehydrogenases of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1965; 240: 481-485.
 - SCRUTTON M.C., UTTER M.F. The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues. *Ann. Rev. Biochem.* 1968; 37: 249-302.
 - SHAPPELL S.D., MURRAY J.A., NASSER M.G., WILLS R.E., TORRANCE J.D., LENFANT C.J.M. Acute change in hemoglobin affinity for oxygen during angina pectoris. *N. Engl. J. Med.* 1970; 282: 1219-1224.
 - SHATTIL S.J., COOPER R.A. Maturation of macroreticulocyte membranes in vivo. *J. Lab. Clin. Med.* 1972; 79: 215-227.
 - SHEETZ M.P., CHAN S.L. Proton magnetic resonance studies of whole human erythrocyte membranes. *Biochemistry* 1972; 11: 548-555.
 - SHLATZ L., MARINETTI G.V. Hormone-calcium interactions with the plasma membrane of rat liver cells. *Science* 1972; 176: 175-177.
 - SHOHET S.B., NATHAN D.G., KARNVOSKY M.L. Stage in the incorporation of fatty acids into red blood cells. *J. Clin. Invest.* 1968; 47: 1096-1108.
 - SHOHET S.B. Release of phospholipid fatty acid from human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 1970; 49: 1668-1678.

- SHOHET S.B. Hemolysis and changes in erythrocyte membrane lipids. *N. Engl. J. Med.* 1972; 286: 577-583, 638-644.
- SHULMAN R.G., OGAWA S., WERTHRICH K., YAMANE T., PEISACH J., BLUMBERG W.E. The absence of «heme-heme» interactions in hemoglobin. *Science* 1969; 165:251-257.
- SHULMAN R.G., OGA W.A.S., HOPFIELD J.J. An allosteric model of hemoglobin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1971; 36 : 337-341.
- SHRIVASTAV B.B., BURTON A.C. Evidence from studies of birefringence of structure across the dimple region of red cells. *J. Cell Physiol.* 1969; 74: 101-119.
- SIGGAARD-ANDERSEN O., SALLING N., NØRGAARD-PEDERSEN B., RÖRTH M. Oxygen linked hydrogen ion binding of human hemoglobin. Effects of carbon dioxide and 2,3-diphosphoglycerate. III. Comparison of the Bohr effect and the Haldane effect. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1972; 29: 185-193.
- SIMPSON C.F., KLING J.M. The mechanism of mitochondrial extrusion from phenylhydrazine-induced reticulocyte in the circulating blood. *J. Cell Biol.* 1968; 36: 103-108.
- SINGER S.J., NICOLSON G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175: 720-731.
- SKALAK R., BRANEMARK P.-I. Deformation of red blood cells in capillaries. *Science* 1969; 164: 717-719.
- SMITH R.P., THRON C.D. Hemoglobin, methylene blue and oxygen interactions in human red cell. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 1972; 183: 549-558.
- SOLOMON A.K. The state of water in red cells. *Scient. Amer.* 1971; 224: 88-96.
- SRIVASTAVA S.K., BEUTLER E. Glutathione metabolism of the erythrocyte. The enzymic cleavage of glutathione-haemoglobin preparations by glutathione reductase. *Biochem. J.* 1970; 119: 353-359.
- STAAL G.E.J., KOSTER J.F., BANZIGER C.J.M., VAN MILLIGEN-BOERSMA L. Human erythrocyte phosphofructokinase: its purification and some properties. *Biochem. Biophys. Acta* 1972; 276: 113-123.
- STAAL G.E.J., KOSTER J.F. Influence of 2,3-diphosphoglycerate on phosphofructokinase of human erythrocytes? *Febs. Letters* 1972; 23: 29-30.
- STAMATOYANNOPOULOS G., BELLINGHAM. A.J., LENFANT C., FINCH C.A. Abnormal hemoglobins with high and low oxygen affinity. *Ann. Rev. Med.* 1971; 22: 221-234.
- STECK T.L., FAIRBANKS G., WALLACH D.F.H. Disposition of the major proteins in the isolated erythrocyte membrane. Proteolytic dissection. *Biochemistry* 1971; 10: 2617-2624.
- STOECKENIUS W. Discussion paper: membrane models. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 1972; 195: 35-36.
- STREIFF F., STOLTZ J.F., GENETET B. Mobilité électrophorétique du globule rouge. *Nouv. Rév. Franç. Rématol.* 1971; 11: 913-927.
- SURGENOR D.M. The transport of oxygen and carbon dioxide. In «The Red Blood Cell», C. Bishop and D. M. Surgenor (ed.), Acad. Press, New York 1964; p. 340-357.

- SWEELY C.C., DAWSON G. Lipids of the erythrocyte. In «Red Cell Membrane: Structure and Function», G. A. Jamieson and T. J. Greenwalt (ed.), J. B. Lippincott, Co., Philadelphia 1969; p. 172-232.
- TAKAHARA S. Acatalasemia and hypocatalasemia in the Orient. *Sem. Hematol.* 1971; 8: 397-416.
- TANAKA K.R., PAGLIA D.E. Pyruvate kinase deficiency. *Sem. Hematol.* 1971; 8: 367-396.
- TANNER M.J.A., GRAY W.R. The isolation and functional identification of a protein from human erythrocyte «ghost». *Biochem. J.* 1971; 125: 1109-1117.
- TARUI S., KONO N., UYEDA K. Purification and properties of rabbit erythrocyte phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 1972; 247: 1138-1145.
- TOMITA S., ENOKI Y., OCHIAI T., KAWASE M. Cleavage at the $\alpha_1\beta_1$ contact and its effect on the oxygen equilibrium of human haemoglobin. *J. Molec. Biol.* 1973; 73: 261-274.
- TORRANCE J.D., LENFANT C., CRUZ J., MARTICORENA E. Oxygen transport in residents at high altitude. *Resp. Physiol.* 1970a; 11: 1-15.
- TORRANCE J., JACOBS P., RESTREPS A., ESCHBACH J., LENFANT C., FINCH C.A. Intraerythrocytic adaptation to anemia. *N. Engl. J. Med.* 1970b; 283: 165-169.
- TRAVIS S.F., MORRISON A.D., CLEMENTS R.S., WINEGRAD A.L., OSKI F.A. Metabolic alterations in the human erythrocyte produced by increases in glucose concentration. *J. Clin. Invest.* 1971; 50: 2104-2112.
- TSUBOI K.K., FUKUNAGA K. Inorganic phosphate and enhanced glucose degradation by the intact erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 1965; 240: 2806-2810.
- TUDHOPE G.R., LEECE S.P. Red cell catalase and the production of methaemoglobin, Heinz bodies and changes in osmotic fragility due to drugs. *Acta Haematol.* 1971; 45: 290-302.
- TURNER J.D., ROUSER G. Precise quantitative determination of human blood lipids by thin layer triethylaminoethyl cellulose column chromatography. *Anal. Biochem.* 1970; 38: 423-436.
- TURPIN F. Contenu en hémoglobine des érythroblastes humains aux différents stades de maturation. Étude par microspectrophotométrie. *Nouv. Rév. Franç. Hematol.* 1970; 10: 747-754.
- VALENTINE W.N., OSKI F.A., PAGLIA D.E., BAUGHAM M.A., SCHNEIDER A.S., NAIMAN G.L. Hereditary hemolytic anemia with hexokinase deficiency: Role of hexokinase in erythrocyte aging. *N. Engl. J. Med.* 1967; 276: 1-11.
- VALENTINE W.N., KÜRSCHNER K.K. Studies on human hemolytic anemia due to inborn errors. XII Congress Intern. Soc. Hematol., New York, Sept. 1972.
- VALENTINE W.N. Deficiencies associated with Embden-Meyerhof pathway and other metabolic pathways. *Sem. Hematol.* 1971; 8: 348-366.
- VALENTINE W.N. The normal metabolism of human erythrocytes nucleotide metabolism. I. Monoisotopic methodologies. *Blood* 1968; 30: 666-673.
- VALENTINE W.N., ANDERSON H.M., PAGLIA D.E., JAFFÉ E.R., KONRAD P.N.,

- HARRIS S.R. Studies on human erythrocyte nucleotide metabolism II. Nonspherocytic hemolytic anemia, high red cell ATP and ribosephosphate pyrophosphokinase (RPK, E.C.2.7.6.1) deficiency. *Blood* 1972; 39: 674-684.
- VALENTINE W.N. Enzyme deficiencies in which associated hemolytic anemia is absent or uncertain. In «Hematology», W. J. Williams, S. Beutler, A. J. Erslev and R. W. Rundles (ed.), McGraw-Hill Book Co., New York 1972a; . 407-409.
 - VALENTINE W.N. Pyruvate kinase (PK) deficiency. In «Hematology», W. J. Williams, E. Beutler, A. J. Erslev and R. W. Rundles (ed.), McGraw-Hill Book Co., New York 1972b; p. 400-403.
 - VAN BRUGGEN J.T. Chemistry of the membrane. In «Chemistry of Cell Interface», H. D. Brown (ed.), Acad. Press, New York 1971; p. 1-32.
 - VANDERKOOI G. Molecular architecture of biological membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 1972; 195: 6-15.
 - VAN GASTEL C., VAN DER BERG D., DE GIER J., VAN DEENEN L.L. Some lipids characteristics of normal red blood cells of different age. *Brit. J. Haematol.* 1965; 11: 193-199.
 - WALLACH D.F.H. The dispositions of proteins in the plasma membranes of animal cells: analytical approaches using controlled peptidolysis and protein labels. *Biochim. Biophys. Acta* 1972; 265: 61-83.
 - WATERBURY L., FRENKEL E.P. Hereditary nonspherocytic hemolysis with erythrocyte phosphofructokinase deficiency. *Blood* 1972; 39: 415-425.
 - WATSON H.C. Structural interaction of heme with protein. In «Heme and Hemoproteins», B. Chance, R. W. Estabrook and T. Yonetani (ed.), Acad. Press, New York 1966; p. 63-66.
 - WEATHERALL D.J. The abnormal haemoglobin. In «Recent Advances in Haematology», A. Goldberg and M. C. Brain (ed.), Churchill Livingstone, Edinburgh 1971; p. 194-218.
 - WEBER G. Integrative action of insulin at the molecular level. *Israel J. Med. Sc.* 1972; 8: 325-343.
 - WEED R.L., LACELLE P.L., MERRIL E.V. Metabolic dependence of red cell deformability. *J. Clin. Invest.* 1969; 48: 795-809.
 - WEISS L., TAVASSOLI M. Anatomical hazards to the passage of erythrocytes through the spleen. *Sem. Hematol.* 1970; 7: 372-380.
 - WELLS R., SCHMID-SCHÖHBEIN H. Red cell deformation and fluidity of concentrated cell suspensions. *J. Appl. Physiol.* 1969; 27: 213-217.
 - WHITE J.M., DACIE J.V. The unstable hemoglobins – molecular and clinical features. In «Progress in Hematology», vol. VII, E. B. Brown and C. V. Moore (ed.), Grune & Stratton, New York 1971; p. 69-109.
 - WHITTAM R., WILEY S. Potassium transport and nucleoside metabolism in human red cells. *J. Physiol.* 1967; 191: 633-652.

- WHITT AM R., WHEELER K.P. Transport across cell membranes. *Ann. Rev. Physiol.* 1970; 32: 21-60.
- WILLIAMS R.O. The phosphorylation and isolation of two erythrocyte membrane proteins *in vitro* *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1970; 47: 671-678.
- WINTERBOURN C.C., BATT R.D. Lipid composition of human red cells of different ages. *Biochem. Biophys. Acta* 1970; 202: 1-8.
- WINTERBOURN C.C., CARRELL R.W. Characterization of Heinz bodies in unstable haemoglobin haemolytic anaemias. *Nature* 1972; 240: 150-152.
- WINTROBE M.M. *Clinical Hematology*, 6.^a ed., Herry Kimpton: London. 1967.
- WINZLER R.J. A glycoprotein in human erythrocyte membranes. In «Red Cell Membranes», Jamieson, G. A and Greenwalt, T. J. (ed.), J. B. Lippincott Company, Philadelphia 1969; p. 157-171.
- WITTENBERG J.B., WITTENBERG B.A., PEISACH J., BLUMBERG W.E. On the state of the iron and the nature of the ligand in oxyhemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 1970; 67: 1846-1853.
- WOLF H.U. Studies on a Ca²⁺-dependent ATPase of human erythrocyte membranes. Effects of Ca²⁺ and H⁺. *Biochim. Biophys. Acta* 1972; 266: 361-375.
- WOODSON R.D., TORRANCE J.D., SHAPELL S.D., LENFANT C. The effect of cardiac disease on hemoglobin-oxygen binding. *J. Clin. Invest.* 1970; 49: 1349-1356.
- YAARI A Mobility of human red blood cells of different age groups in an electric field. *Blood* 1969; 33: 159-163.
- YATAGANAŞ X., GAHRTON G., THORELL B. DNA, RNA and hemoglobin during erythroblast maturation. *Exptl. Cell Res.*, 62: 254-261.
- YOSHIKAWA H., MINAKAMI S. Regulation of glycolysis in human red cell. *Folia Hematol.* 1968; 89: 357-375.
- YUNIS A.A., ARIMURA G.K. Na-K dependent adenosine triphosphatase of mamalian reticulocytes and mature red blood cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1966; 121: 327-329.
- YUNIS J.J., YASMINEH W.G. Glucose metabolism in human erythrocytes. In «Biochemical Methods in Red Cell Genetics», J. J. Yunis (ed.), Acad. Press, New York 1969; p. 1-49.
- ZAHLER P., WEIBEL W.R. Reconstitution of membranes by recombining proteins and lipids derived from erythrocyte stroma. *Biochem. Biophys. Acta* 1970; 219: 320-328.
- ZIPURSKY A., ISRAELS L.G. Significance of erythrocyte sodium flux in the pathophysiology and genetic expression of hereditary spherocytosis. *Pediat. Res.* 1971; 5: 614-617.