
FUNÇÃO RESPIRATÓRIA DO SANGUE

II – CONTRIBUIÇÃO DO METABOLISMO ERITROCITÁRIO

João A. Martins e Silva*

RESUMO

A função respiratória do sangue é analisada através da participação do metabolismo eritrocitário. Neste aspecto, é desenvolvido o sistema metabólico da glicólise a par da síntese e degradação do 2,3-difosfoglicerato, considerado como o principal modulador metabólico da afinidade da hemoglobina para o oxigénio. Salientam-se os principais mecanismos reguladores da glicólise e ciclo de Rapoport-Luebering, por fim integrados em conjunto com alguns factores mais influentes na actividade de ambas as vias.

SUMMARY

Blood respiratory function. – Influence of erythrocyte metabolism

The blood respiratory function is related to erythrocyte metabolism Red cell glycolytic pathway and the synthesis and degradation of 2,3-diphosphoglycerate

* Professor de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Lisboa

(an essential compound associated with displacements of the oxygen dissociation curve) are evaluated, regarding their mutual influences and individual control mechanisms.

I. Introdução

A função primária dos eritrócitos é a de fornecer oxigénio aos tecidos, trocando-o com o dióxido de carbono a eliminar pelos pulmões. Esta actividade representou um passo evolutivo na escala animal, logo que o transporte de oxigénio passou a ser efectuado por uma «célula» especializada (o eritrócito) preenchida em grande parte por uma proteína específica para aquela função, a hemoglobina. De facto, a evolução do transporte de oxigénio em solução física para fixação a um pigmento aumentou a capacidade de oxigénio no sangue de 0,5 ml para 6 ml/100 ml, enquanto a diferenciação dos eritrócitos possibilitou a sua elevação para os 25 ml/100 ml verificados no sangue de mamíferos. Ainda que algum oxigénio continue a ser transportado em solução no plasma, esta quantidade é mínima em comparação com a veiculada pelos eritrócitos.

Em contraste, o dióxido de carbono é transportado no plasma essencialmente sob a forma de bicarbonato (de sódio) e, em menor proporção, como ácido carbónico. A formação de bicarbonato a partir do dióxido de carbono ao nível dos capilares periféricos, bem como a conversão do bicarbonato em dióxido de carbono nos pulmões, depende essencialmente de uma enzima eritrocitária (a anidrase carbónica) e trocas iónicas (cloreto por bicarbonato) através da membrana globular. Embora a função respiratória seja dependente de numerosas variáveis (já explicitadas na 1ª parte deste trabalho), tais como a constituição do ar atmosférico, função pulmonar, interacção pulmões/sangue, sistema cardiovascular e enzimas respiratórias teciduais, há que considerar a função respiratória dos eritrócitos como um interveniente destacado na respiração aeróbia dos tecidos periféricos.

Calcula-se que cada eritrócito contenha cerca de 350 milhões de moléculas de hemoglobina, distanciadas entre si aproximadamente de 10 angstroms. Esta será, em teoria, a mais elevada concentração de hemoglobina (cerca de 33%) que permite a rotação livre das suas moléculas sem impedir a difusão gasosa.

Por natureza, a especialização implica na prevalência de algumas qualida-

des. O eritrócito não está excluído desta regra, pelo que a sua participação activa no transporte de oxigénio requer a preservação das seguintes qualidades:

- a) Elevada concentração e manutenção das características funcionais de hemoglobina;
- b) Forma discoide suficientemente flexível para se adaptar os microvasos e facilitar as trocas de nutrientes e gases respiratórios com os tecidos e exterior;
- c) Capacidade de se deslocar por todos os sectores corporais durante cerca de 4 meses, sem perda significativa das capacidades funcionais e conteúdo.

O desenvolvimento das características referidas ocorreu à custa de outras. Ao contrário das restantes células do organismo humano, o eritrócito perde gradualmente, no decurso das sucessivas fases de maturação eritroide, o núcleo, ácidos nucleicos, ribossomas, mitocôndrias e outros organitos celulares. Em consequência, é sacrificada a possibilidade de o eritrócito adulto poder renovar as suas proteínas ou obter os elevados rendimentos energéticos próprios de células com cadeias respiratórias intactas.

O eritrócito maduro é constituído por um meio interior relativamente homogéneo e sem estrutura definida, separado por uma membrana do plasma e outros meios de suspensão envolventes. A membrana é actualmente considerada como uma camada dupla de lípidos complexos, atravessada, revestida ou onde se fixam, de ambos os lados, diversos tipos de proteínas. O interior do eritrócito é constituído por uma solução aquosa de hemoglobina em elevada concentração; cerca de 65% desse conteúdo é representado por água e cerca de 33% pela hemoglobina; a fracção restante inclui a metaemoglobina, lípidos, açúcares, electrólitos e cerca de uma centena de enzimas. Todavia, estes escassos 2% de constituintes globulares são essenciais para a função eritrocitária, participando na constituição da membrana (que controla as trocas iónicas e de pequenas moléculas com o meio exterior), enzimas, cofactores e outras substâncias adequadas ao fornecimento de energia às diferentes actividades metabólicas, accionadas por sistemas enzimáticos que, embora mais simples que os das células nucleadas, exibem funcionamento complexo.

O transporte de oxigénio pelo eritrócito não é uma actividade que, por si, dependa de energia metabólica.

Todavia, de forma a verificar-se com eficiência, é necessário que além da elevada concentração de hemoglobina em solução, todos os constituintes do

eritrocito sejam preservados de lesões oxidativas e que a hemólise osmótica seja evitada. A manutenção dos constituintes globulares no estado activo, a conservação dos gradientes iónicos através da membrana e a flexibilidade eritrocitária em circulação são propriedades que requerem energia metabólica.

As necessidades energéticas do eritrocito, relativamente escassas, são preenchidas em condições fisiológicas pela glicose, oxidada em grande parte através da via de Embden-Meyerhof. Uma fracção bastante menor mas variável de glicose é consumida, em alternativa, pela via das fosfopentoses, assegurando a formação de potencial redutor. Em associação à via glicolítica, de que partilha intermediários metabólicos, é formado o 2,3-difosfoglicerato (2,3 -DPG) que, entre outras funções, exerce profunda influência no transporte de oxigénio pela hemoglobina.

A sobrevivência do eritrocito em circulação depende, quase em absoluto, da síntese dos seus constituintes nos períodos de diferenciação e maturação intramedular; na fase extramedular, as necessidades energéticas e os escasos recursos disponíveis são delicadamente equilibrados, assegurando uma actividade duradoura ao eritrocito enquanto os seus componentes mantiverem as propriedades iniciais; defeitos moleculares nesses constituintes, ou lesões posteriormente adquiridas, podem conduzir à destruição precoce dos eritrocitos, a deficiências acentuadas nas funções inerentes à hemoglobina ou à restrição da deformabilidade globular. Em qualquer dos casos, aquelas anomalias predispoem a quadros patológicos de gravidade variável, por vezes letal. Como denominador comum a essas alterações subsiste, contudo, uma interferência negativa nas condições de fornecimento de oxigénio a todo o organismo.

Neste contexto, o presente trabalho incidirá particularmente na vida glicolítica, formação de 2,3-DPG e respectivas interregulações.

II. Metabolismo energético

SUBSTRACTOS E OPÇÕES METABÓLICAS

O eritrocito pode, em condições especiais e com facilidade, extrair energia a partir dos diversos tipos de substractos, designadamente a frutose, ma-

nose, inosina e a adenosina; pode ainda utilizar, com menor rendimento, a galactose e, em condições adequadas, alguns compostos peculiares, como o formaldeído. Todavia, o principal substrato energético dos eritrocitos em circulação é indubitavelmente a glicose, pelo que será o único a ser analisado em pormenor.

Após conversão em glicose 6-fosfato, 85 a 90% deste substrato é metabolizado pela via Embden-Meyerhof (Fig. 1), originando piruvato ou lactato; a glicose 6-fosfato restante atravessa a via oxidativa das fosfopentoses, perdendo um dos seus carbonos (C 1) sob a forma de CO_2 para se converter em pentoses e dar origem a dois intermediários comuns à via glicolítica (frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato). Uma fracção negligenciável da glicose pode ainda transformar-se em glicogénio.

Além da obtenção de energia, o consumo de glicose pela via glicolítica é indispensável para a modulação funcional da hemoglobina, através da formação do 2,3-DPG no ciclo de Rapoport-Luebering.

No conjunto, o consumo de glicose pela glicólise e vias das fosfopentoses assegura diversas funções eritrocitárias (Quadro I).

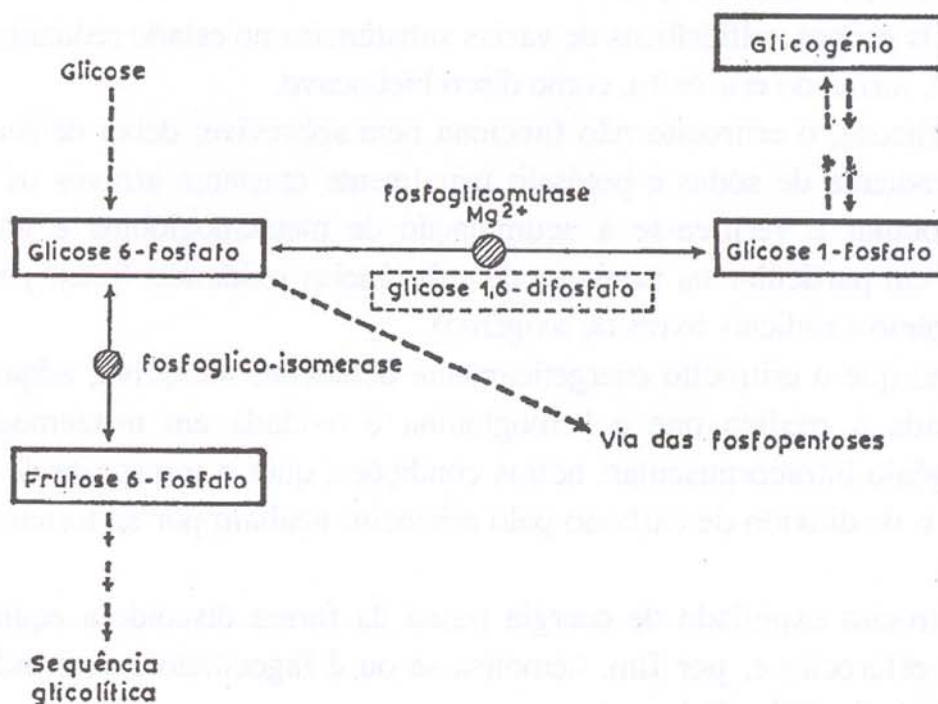


Fig. 1 – Opções metabólicas para a glicose 6-fosfato, catalisada através da glicólise (depois de se transformar em frutose 6-fosfato), aproveitada na síntese de glicogénio (após transformação em glicose 1-fosfato) ou sendo desviada para a via das fosfopentoses (por conversão em 6-fosfogluconato).

QUADRO I

FUNÇÕES DAS PRINCIPAIS VIAS DE OXIDAÇÃO DA GLICOSE NO ERITROCITO

Glicólise

(glicose 6-fosfato → → → lactato)

- ADP → ATP (p. ex., «bombas» de Na⁺, K⁺)
- NAD⁺ → NADH + H⁺ (p. ex., redução da metaemoglobina)
- 3-DPG → 2,3-DPG (p. ex., modulação da afinidade de hemoglobina para o oxigénio)

Via das fosfopentoses

(glicose 6-fosfato → → → CO₂ + pentoses. trioses. etc.).

- NADP⁺ → NADPH + H⁺ (p. ex., redução do glutatião oxidado)
- hexose → pentoses (p. ex., formação de substractos para a síntese de nucleóticos)

A energia eritrocitária torna-se fundamental a quatro níveis principais, para manter:

- a) A hemoglobina no estado reduzido (Fe²⁺);
- b) As bombas de Na⁺, K⁺;
- c) Os grupos sulfidrílicos de várias substâncias no estado reduzido;
- d) A forma do eritrócito, como disco bicôncavo.

Sem glicose, o eritrocito não funciona nem sobrevive; deixa de ser mantido o gradiente de sódio e potássio usualmente existente através da membrana globular e verifica-se a acumulação de metaemoglobina e glutatião oxidado, em particular na presença de substâncias oxidantes (p.ex. peróxido de hidrogénio e radicais livres de oxigénio).

Mesmo que o eritrocito energeticamente deficiente sobreviva, adquire cor acastanhada à medida que a hemoglobina é oxidada em metaemoglobina pelo oxigénio intracorpúscular; nestas condições, quer o transporte de oxigénio quer o de dióxido de carbono pelo eritrocito acabam por se tornar inoperacionais.

O eritrocito expoliado de energia passa da forma discoide a equinocito, depois a esferocito e, por fim, hemolisa-se ou é fagocitado e destruído pelo sistema retículo-endotelial.

Na glicólise a maior parte da energia obtida da glicose é conservada sob a forma de um composto fosforilado de alta energia, o adenosinotrifosfato (ATP). Paralelamente, é gerado potencial redutor, através da transformação

do nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD^+) na forma reduzida (NADH), indispensável como coenzima na redução da metaemoglobina em hemoglobina e à continuidade da glicólise.

A principal função da via das fosfopentoses eritrocitárias consiste na conservação do nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADP^+) na forma reduzida, NADPH . Esta coenzima assegura a regeneração do glutatião reduzido, utilizado na protecção dos componentes eritrocitários contra a peroxidação. Acessoriamente, a pentose obtida por oxidação e descarboxilação de hexose inicial pode ser usada na síntese de nucleótidos globulares e, em alternativa, transformar-se em gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato. Em consequência, o ATP e o 2,3-DPG, apesar de não serem formados na via da fosfopentoses, podem vir a ser obtidos à custa da glicose desviada para aquela via, após sucessivos rearranjos moleculares.

Grande parte do metabolismo eritrocitário processa-se em anaerobiose, o que, atendendo à elevada carga de oxigénio transportado pela hemoglobina, não deixa de ser um facto curioso. Esta particularidade é, contudo, justificada pela ausência de mitocôndrias nos eritrocitos maduros, que exclui a produção de largas quantidades de ATP a partir de concentrações mínimas de monossacáridos. Em consequência, o eritrocito depende exclusivamente da glicólise anaeróbia e da via das fosfopentoses para obter a energia metabólica que lhe é necessária, com participação mínima de oxigénio. Para tal, o eritrocito dispõe de enzimas, na generalidade idênticas às que intervêm na extracção de energia por oxidação anaeróbia da glicose em outros tecidos; exceptua-se a metaemoglobina-reductase, que parece ser exclusiva do eritrocito.

ENZIMAS E MODULADORES DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA

A quantidade de glicose oxidada em piruvato ou lactato, a actividade dos sistemas de transporte activo, a redução da metaemoglobina ou do glutatião, isto é, a importância de todas as actividades metabólicas eritrocitárias depende de numerosas variáveis, como o número de moléculas enzimáticas pré-existentes, concentração de substratos, cofactores, moduladores, temperatura e teor hidrogeniónico. Estes parâmetros não apresentam níveis constantes nem as enzimas exibem, no geral, valores máximos de actividade,

como sucede nos sistemas em condições cinéticas óptimas. Todavia, é na resposta de cada uma dessas enzimas a diversos moduladores específicos que assenta o processo geral da regulação do metabolismo eritrocitário.

Muitas das etapas da glicólise ou de outras vias metabólicas relacionadas com o consumo de glicose eritrocitária, são catalisadas por enzimas que, em geral, diminuem de actividade com a idade globular (Quadro II). Por sua vez, têm sido identificados defeitos em algumas dessas enzimas que, quando acentuados, são causa da doença hemolítica espontânea, genericamente designada por anemia hemolítica congénita não-esferocítica (Quadro III). É de notar que o defeito enzimático pode afectar a velocidade máxima (V_{max}) da reacção ou alterar-lhe de tal modo a cinética que a enzima deixa de funcionar nas condições *in vivo*.

À medida que o eritrocito envelhece, determinadas funções enzimáticas cruciais aproximam-se dos limites em que a preservação da integridade globular deixa de ser possível. Estes limites são alcançados mais rapidamente na presença de defeitos congénitos específicos a algumas dessas enzimas, directa ou indirectamente relacionadas com a manutenção do estado energético ou potencial redutor. Em consequência, é de prever que o senescência precoce do glóbulo afectado se reflecta numa situação de anemia hemolítica.

QUADRO II

VARIAÇÃO COM A IDADE DA ACTIVIDADE DE ALGUMAS ENZIMAS DA GLICÓLISE E VIA DAS FOSFOPENTOSAS DO ERITROCITO HUMANO

<i>Enzima</i>	<i>Actividade enzimática nos eritrocitos jovens</i>
Hexoquinase	Aumento acentuado
Glicose-fosfato isomerase	Normal
Fosfofrutoquinase	Normal ou aumentada
Aldolase	Aumento acentuado
Triose-fosfato isomerase	Aumento ligeiro
Gliceraldeído-fosfato desidrogenase	Aumento ligeiro
Fosfoglicerato-quinase	Normal
Fosfoglicerato-mutase	Aumentada
Enolase	Normal ou aumento ligeiro
Piruvato-quinase	Aumento acentuado
Desidrogenase láctica	Aumento ligeiro
Desidrogenase da glicose-6-fosfato	Aumento acentuado
Desidrogenase do 6-fosfogliconato	Aumentada

QUADRO III

LOCALIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS DEFEITOS ENZIMÁTICOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO ERITROCITÁRIO, NA ORIGEM DE ANEMIAS HEMOLÍTICAS CONGÊNITAS NÃO-ESFEROCÍTICAS

<i>Enzimas</i>	<i>Transmissão</i>
Hexoquinase	autossômica recessiva
Glicose-fosfato isomerase	autossômica recessiva
Fosfofrutoquinase	autossômica recessiva
Triose-fosfato isomerase	autossômica recessiva
Fosfoglicerato-mutase	cromossoma ×
Difosfoglicerato-mutase	autossômica recessiva (?)
Piruvato-quinase	autossômica recessiva
Desidrogenase da glicose 6-fosfato	cromossoma ×

CAPTAÇÃO DA GLICOSE

Antes de ser utilizada pelas enzimas de qualquer daquelas vias, a glicose (ou outros substratos já referidos), tem de atravessar a membrana eritrocitária, o que sucede prontamente por difusão facilitada, com a participação de um transportador local não identificado. A entrada da glicose no eritrocito é termo-dependente e insulina-independente. Ao contrário do que se verifica em muitos outros tipos celulares, a concentração da glicose em solução intraglobular é idêntica à existente no plasma. Por conseguinte, a utilização eritrocitária da glicose é independente da quantidade difundida do exterior.

Segue-se a fosforilação da glicose em glicose 6-fosfato, por acção da hexoquinase e com consumo de uma molécula de ATP. A formação de glicose 6-fosfato é indispensável para o seu aproveitamento metabólico pela glicólise e via das fosfopentoses. Todos os intermediários destas sequências metabólicas são compostos fosforilados, à excepção dos produtos finais da glicólise, o piruvato e lactato, que difundem para o plasma. A fixação do grupo fosfato naqueles intermediários tem três funções principais:

- Evitar a sua perda para o plasma, devido à fixação de um grupo polar de carga negativo;
- Criar grupos de união ou reconhecimento para a formação do complexo enzima-substrato em cada etapa;
- Conservar a energia química sob a forma de grupo fosfato.

Uma das características mais notáveis do metabolismo eritrocitário é a flexibilidade demonstrada pelas escassas sequências operacionais de que dispõe. É o que sucede com a alternativa imposta ao 1,3-difosfoglicerato (melhor designado como 3-fosfogliceroil-fosfato), que pode ser convertido em 2,3-DPG por uma mutase ou ser transformado em 3-fosfoglicerato por uma quinase. No primeiro caso não há formação de ATP mas, em contrapartida, da reacção catalisada pela fosfoglicerato-quinase (com conversão directa de 1,3-difosfoglicerato em 3-fosfoglicerato) resulta a fosforilação do adenosinodifosfato (ADP) em ATP.

Também pode variar a quantidade do NAD^+ reduzido em NADH. Havendo excesso de metaemoglobina, o NADH gerado na etapa da desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato pode ser consumido integralmente no decurso da redução de metaemoglobina. Nestas condições não é o lactato mas o piruvato o termo final da oxidação anaeróbia da glicólise, por carência de NAD^+ . Deixando de haver necessidade de NADH para a redução de metaemoglobina, o piruvato é novamente reduzido em lactato pela desidrogenase láctica, com recuperação do NAD^+ para sucessivas reutilizações pela desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato.

Na via das fosfopentoses observa-se idêntica flexibilidade metabólica na regulação da quantidade do NADP^+ reduzido em NADPH; o nível desta coenzima parece ser um importante factor regulador da actividade da desidrogenase da glicose 6-fosfato. Assim, quanto aumentam as necessidades em NADPH, p. ex., na presença de drogas que oxidam o glutatião, a oxidação directa pela via das fosfopentoses é automaticamente interrompida.

III. Via glicolítica

A glicólise, que consiste na oxidação progressiva em anaerobiose da glicose em lactato, ao longo de onze etapas enzimáticas, desenvolve-se em duas fases (Fig. 2).

A primeira consiste na preparação da glicose (e outros hexoses) para os etapas oxidativas, culminando na sua clivagem em duas trioses-fosfato: gliceraldeído 3-fosfato e diidroxiacetona-fosfato). Nesta fase são consumidas duas moléculas de ATP para fixar dois grupos fosfato ao nível do carbono 6 e depois ao carbono 1 da hexose, o que representa como que um investimen-

FUNÇÃO RESPIRATÓRIA DO SANGUE - II
CONTRIBUIÇÃO DO METABOLISMO ERITROCITÁRIO

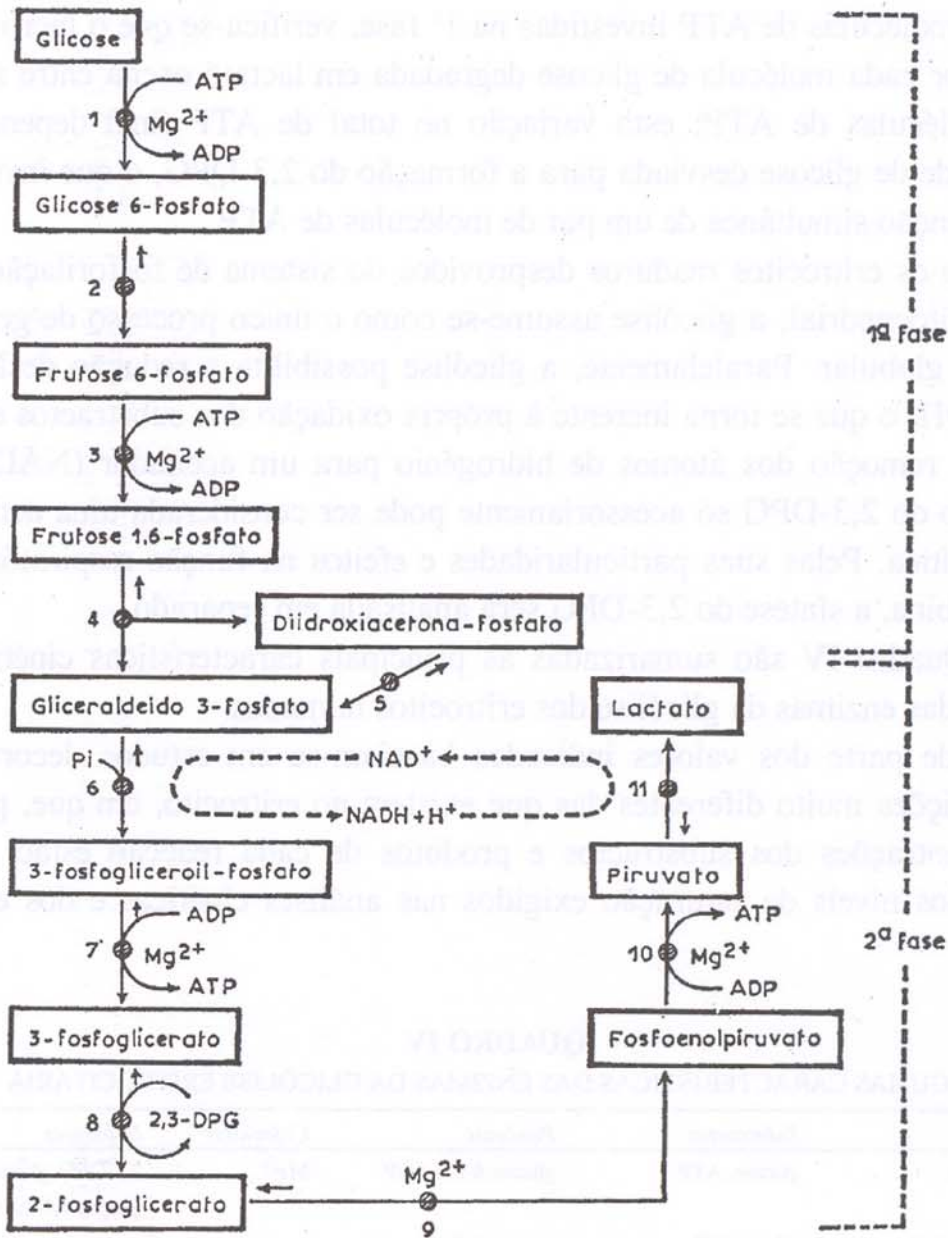


Fig. 2 - Sequência metabólica e enzimas da glicólise: 1=hexoquinase; 2=glicose-fosfato-isomerase; 3=fosfofrutoquinase; 4=aldolase; 5=triose-fosfato isomerase; 6=gliceraldeído-fosfato desidrogenase; 7=fosfoglicerato-quinase; 8=fosfoglicerato--mutase; 9=enolase; 10=piruvato-quinase; 11=desidrogenase láctica.

to energético a recuperar com dividendos na 2ª fase. Esta, que é uma sequência comum para todos os hexoses, inclui as etapas de oxidação-redução e os mecanismos conservadores energéticos, que possibilitam a recuperação do ATP a partir da fosforilação do ADP. Nesta fase podem ser formadas duas a quatro moléculas de ATP por cada molécula de glicose oxidada; subtraindo

as duas moléculas de ATP investidas na 1ª fase, verifica-se que o lucro energético por cada molécula de glicose degradada em lactato oscila entre zero a duas moléculas de ATP; esta variação no total de ATP final depende da quantidade de glicose desviada para a formação do 2,3-DPG, o que inviabiliza a obtenção simultânea de um par de moléculas de ATP.

Sendo os eritrocitos maduros desprovidos do sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial, a glicólise assume-se como o único processo de geração do ATP globular. Paralelamente, a glicólise possibilita a redução de NAD^+ em NADH, o que se torna inerente à própria oxidação dos substratos e conseqüente remoção dos átomos de hidrogénio para um aceitador (NAD^+). A formação do 2,3-DPG só acessoriamente pode ser considerada uma actividade glicolítica. Pelas suas particularidades e efeitos na função respiratória da hemoglobina, a síntese do 2,3-DPG será analisada em separado.

No Quadro IV são sumarizadas as principais características cinéticas e funções das enzimas da glicólise dos eritrocitos humanos.

Grande parte dos valores indicados baseiam-se em estudos decorrentes em condições muito diferentes das que existem no eritrocito, em que, p. ex., as concentrações dos substratos e produtos de cada reacção estão muito aquém dos níveis de saturação exigidos nas análises cinéticas e dos efeitos

QUADRO IV
ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS DA GLICÓLISE ERITROCITÁRIA

<i>Enzimas</i>	<i>Substratos</i>	<i>Produtos</i>	<i>Cofactores</i>	<i>Inibidores</i>
Hexoquinase	glicose, ATP	glicose 6-P e ADP	Mg^{2+}	2,3-DPG, glicose 6-P, glicose 1,6-P, H^+
Fosfoglicose-isomerase	glicose 6-P	frutose 6-P		
Fosfofrutoquinase	frutose 6-P e ATP	frutose 1,6-P e ADP	Mg^{2+} , K^+	2,3-DPG, ATP, H^+
Aldolase	frutose 1,6-P	gliceraldeído 3-P e diidroxiacetona-P		2,3-DPG
Triose-fosfato isomerase	diidroxiacetona-P	gliceraldeído 3-P		
Gliceraldeído-fosfato desidrogenase	gliceraldeído 3-P, Pi , e NAD^+	3-fosfogliceróil-P e NADH		3-fosfogliceróil-P, 2,3-DPG e NADH
Fosfoglicerato-quinase	3-fosfogliceróil-P e ADP	3-fosfoglicerato e ATP	Mg^{2+}	
Fosfoglicerato-mutase	3-fosfoglicerato	2-fosfoglicerato	2,3-DPG (?)	
Enolase	2-fosfoglicerato	fosfoenolpiruvato	Mg^{2+}	
Piruvato-quinase	fosfoenolpiruvato e ADP	piruvato e ATP	Mg^{2+} ; K^+	2,3-DPG, ATP
Desidrogenase láctica	piruvato, NADH	lactato, NAD^+		

dos moduladores da actividade enzimática. Todavia, os resultados apresentados oferecem a vantagem de serem apreciados numa base de uniformidade de meios e condições experimentais, impossível em condições fisiológicas.

Das onze reacções envolvidas, oito encontram-se muito perto do equilíbrio metabólico, pelo que são perfeitamente reversíveis; as restantes três reacções ocorrem com acentuada diminuição da energia livre padrão, estando, portanto, em franco desequilíbrio; estas etapas irreversíveis são catalisadas pelas três enzimas de glicólise a que se atribuem funções reguladoras: hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato-quinase. O controlo de glicólise parece depender primariamente da fosfofrutoquinase e, em segundo plano, da hexoquinase e piruvato-quinase, todas com características alostéricas. A desidrogenase do gliceraldeído-fosfato também evidencia propriedades de enzima alostérica mas a sua eventual acção reguladora na glicólise ainda não está clarificada.

GLICOSE 6-FOSFATO

Na primeira etapa, a glicose é fosforilada em glicose 6-fosfato pela hexoquinase. A enzima habitual nos eritrocitos (de que se reconhecem diversas isoenzimas, com pesos moleculares e propriedades químicas semelhantes) é inespecífica para o substrato, podendo utilizar, entre outros, a glicose, frutose ou manose. A glicose é o substrato mais comum, por duas razões principais:

- a) A afinidade da enzima (K_m) para a glicose é muito superior ao K_m para os restantes substratos;
- b) A glicose, que entra facilmente no meio globular, apresenta-se em concentrações que excedem as da saturação nas condições fisiológicas.

Em consequência, a glicose não é um factor limitativo à actividade da hexoquinase ou da glicólise em geral; a sua concentração intraglobular é habitualmente comparável à do meio exterior. Para actuar a hexoquinase depende do concurso de dois cofactores, o ATP e o Mg^{2+} , em geral, associados num complexo, ATP-Mg; pela sua reduzida concentração no meio globular, poderia admitir-se que aqueles cofactores não limitassem a actividade da hexoquinase. Todavia, a acção reguladora atribuída àquela enzima na actividade

glicolítica deixa em aberto a hipótese de que ambos os cofactores referidos possam condicionar significativamente as funções da hexoquinase (Fig. 3).

Quer o substrato quer o produto de hexoquinase existem em concentrações de equilíbrio metabólico, o que vem apoiar a acção reguladora da enzima, inibida pelo seu produto final e outros metabolitos, com destaque para o ADP e 2,3-difosfoglicerato; este metabolito compete com o ATP-Mg para a enzima, cuja actividade eritrocitária é predominantemente regulada pela relação ATP-Mg/glicose 6-fosfato. A inibição pela glicose 6-fosfato, muito importante em condições fisiológicas, é antagonizada pelo fosfato inorgânico (Pi) e ATP, sendo a actividade da enzima também dependente de grupos sulfidrílicos.

Além da glicose 6-fosfato, também a glicose 1,6-difosfato inibe a hexoquinase; esta inibição, parcialmente revertida pelo Pi em competição com o complexo ATP-Mg, assume particular importância em condições fisiológicas, pois que a glicose 1,6-difosfato, assim como a glicose 6-fosfato, inibem a hexoquinase em concentrações sobreponíveis às intraglobulares.

De todas as enzimas da glicólise, a hexoquinase é a que revela menor capacidade de utilização de substratos nas condições de saturação (V_{max}), sendo levemente excedentária ao consumo de glicose nos eritrocitos de humanos normais (Tabela I). Em condições patológicas (p. ex., anemias) ou especiais (p. ex., indivíduos em hipóxia de altitude, aguda ou crónica), a hexoquinase parece assumir acção importante na estimulação da glicólise, subjacente ao aumento das exigências em 2,3-difosfoglicerato.

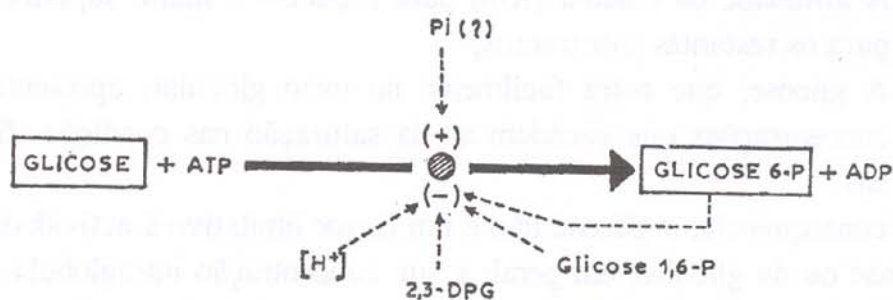


Fig. 3 – Principais reguladores fisiológicos da actividade da hexoquinase eritrocitária. O pH óptimo da enzima é de 8,1 a 8,3. A inibição pela glicose 6-fosfato, glicose 1,6-difosfato e 2,-difosfoglicerato é antagonizada pelo complexo ATP-Mg (verdadeiro substrato da reacção). O eventual efeito activador do fosfato inorgânico baseia-se na oposição à inibição pela glicose 6-fosfato, sobretudo a pH baixo (cerca de 7,0).

TABELA I

ACTIVIDADE RELATIVA DAS ENZIMAS DA GLICÓLISE ERITROCITÁRIA(*)

<i>Enzimas</i>	<i>Actividade relativa (μ moles/substrato/h/ml de eritrocitos, a 25°C)</i>
Hexoquinase	5
Fosfoglicose-isomerase	151
Fosfofrutoquinase	82
Aldolase	31
Triose-fosfato isomerase	5 100
Gliceraldeído-fosfato desidrogenase	800
Fosfoglicerato-quinase	1 910
Fosfoglicerato-mutase	228
Enolase	95
Piruvato-quinase	158
Desidrogenase láctica	1 257
Consumo de glicose	3

(*) Adaptado de Chapman et al, J Clin Invest 41: 1249, 1962.

FRUTOSE 6-FOSFATO

Na 2ª etapa da glicólise ocorre a transformação da glicose 6-fosfato em frutose 6-fosfato, por acção de uma isomerase específica e com concentrações de substrato e produto da reacção quase de equilíbrio.

A glicose 6-fosfato também se encontra em equilíbrio com a glicose 1-fosfato, através da glicose 1,6-difosfato e por acção da fosfoglicomutase (Fig. 1). A glicose 1-fosfato é utilizada na síntese das escassas reservas de glicogénio eritrocitário e, em alternativa, o produto da sua degradação que, após ser convertido em glicose 6-fosfato, é reaproveitado através da sequência glicolítica. A intertransformação com a frutose 6-fosfato é a opção com maior importância metabólica, ao possibilitar a reciclagem da glicose 6-fosfato pela via das fosfopentoses e, sobretudo, o aproveitamento energético da glicose através da glicólise.

FRUTOSE 1,6-DIFOSFATO

Segue-se a 2ª fosforilação de substrato, neste caso a frutose 6-fosfato pela fosfofrutoquinase; o produto da reacção é a frutose 1,6-difosfato, sendo para o

efeito indispensável a participação do complexo ATP-Mg como cofactor enzimático (Fig. 4). Os níveis do substracto e produto estão em franco desequilíbrio, pelo que a reacção em causa é uma das etapas reguladoras da glicólise. A fosfofrutoquinase é uma enzima alostérica, aparentemente constituída por 4 cadeias polipeptídicas, semelhantes mas não idênticas; a forma activa da enzima é um tetrâmetro com peso molecular de 420 000 ou superior, sendo as cadeias isoladas inactivas; uma ou duas dessas cadeias podem conter o centro activo, recebendo as restantes os diversos moduladores de actividade.

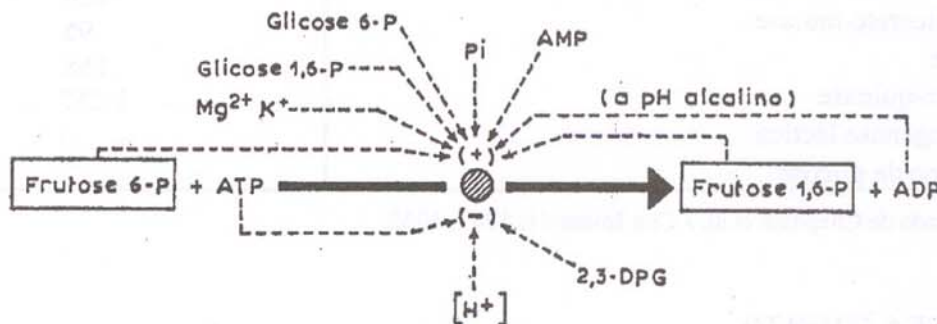


Fig. 4 – Principais reguladores fisiológicos da actividade da fosfofrutoquinase. O ATP é simultaneamente um substracto (sob a forma de ATP-Mg) e inibidor (na forma livre) da reacção sendo, nesta capacidade, antagonizado pelo fosfato inorgânico. O pH óptimo da enzima é aproximadamente de 8,0 a 8,4, sendo inibida a valores inferiores de pH. À medida que o pH se aproxima do limiar fisiológico, aumenta a afinidade da enzima para a frutose 6-fosfato e diminui o efeito inibidor exercido pelo ATP (em competição com aquele outro substracto da reacção). A afinidade da enzima para o ATP-Mg é também levemente diminuída pelo aumento de concentração da frutose 6-fosfato. A concentrações fisiológicas de ATP, a fosfofrutoquinase encontra-se numa forma quase inactiva, pelo que a sua actuação depende, quase integralmente, dos efeitos de moduladores positivos, que se opõem à inibição pelo ATP. Além do fosfato inorgânico, a enzima é activada pelo AMP, ADP, glicose 1,6-difosfato, glicose 6-fosfato e frutose 1,6-difosfato.

A função dos substractos da fosfofrutoquinase, que são simultaneamente efectores que se interrelacionam de modo recíproco, representa uma característica, essencial da regulação enzimática. De facto, poder-se-á considerar que aquela enzima tem dois substractos, sendo um o complexo ATP-Mg e o outro a frutose 6-fosfato. A afinidade da fosfofrutoquinase para o ATP-Mg é muito superior à da hexoquinase, sendo ligeiramente deprimida pelo aumento de concentração da frutose 6-fosfato. O ATP é simultaneamente um forte

inibidor da enzima; reprimindo a fixação da frutose 6-fosfato; esta, por sua vez, alivia a inibição pelo ATP, actuando como modulador positivo. O efeito de qualquer daqueles efectores enzimáticos depende do pH; aparentemente, a reconhecida influência exercida pelo pH na glicólise eritrocitária é, em grande parte, centrada na etapa catalisada pela fosfofrutoquinase, que actua a um pH óptimo de 8,0-8,4. Quando o pH aumenta, a glicólise também aumenta; nestas condições, os níveis da glicose 6-fosfato e frutose 6-fosfato diminuem, a par de acumulações da frutose 1,6-difosfato. Verifica-se o mesmo para a hexoquinase activada pelo aumento de pH, embora em menor grau.

A afinidade da frutose 6-fosfato para a fosfofrutoquinase é acentuada pelo aumento do pH, nos limites fisiológicos; em contrapartida, a inibição pelo ATP, que compete com a frutose 6-fosfato para a enzima, diminui rapidamente com idêntica variação do pH. No seu todo, ambos os efeitos convergem para um reforço da actividade da fosfofrutoquinase quando o pH aumenta.

Nas concentrações fisiológicas de ATP intraglobular (cerca de 1,5 mM) a fosfofrutoquinase encontra-se virtualmente inibida, pois actua apenas a 0,1% da sua capacidade. Isto significa que a acção fisiológica da fosfofrutoquinase é quase integralmente determinada pela acção de moduladores positivos, que libertam a inibição pelo ATP. Entre outros activadores daquela enzima eritrocitária, destacam-se o AMP, ADP, frutose 1,6-difosfato, glicose 6-fosfato, Pi e glicose 1,6-difosfato.

A glicose 1,6-difosfato e o AMP são, neste aspecto, poderosos activadores da fosfofrutoquinase, revelando já os seus efeitos a níveis bastantes inferiores aos fisiológicos. A acção do AMP é tanto mais nítida quanto mais a enzima se encontra inibida pelo ATP. Em contraste, o ADP é um activador mais directo, actuando exclusivamente a pH alcalino. Não obstante, admite-se que a relação ADP/ATP seja um importante factor na regulação da actividade da fosfofrutoquinase.

O Pi é um antagonista da inibição pelo ATP, com o qual compete para o centro inibidor, em concentrações fisiológicas; a glicose 6-fosfato, de forma mais atenuada, exhibe o mesmo comportamento. Acessoriamente, alguns cations, como o Mg^{2+} e o K^+ , afectam a actividade da fosfofrutoquinase. A acção do Mg^{2+} expressa-se indirectamente através da concentração do complexo ATP-Mg, mas a importância da sua acção *in vivo* é por enquanto

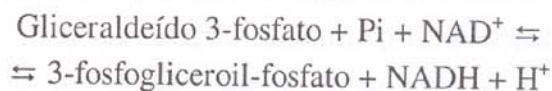
desconhecida. De facto, a ATP-Mg é, mais que o ATP, um substrato da fosfofrutoquinase e outras quinases, sendo o ATP, em contrapartida, um inibidor mais potente daquela enzima do que o complexo ATP-Mg. Todavia, o 2,3-difosfoglicerato acentua o efeito inibidor daquele complexo, assumindo-se como o principal catião multivalente com acção inibidora sobre a fosfofrutoquinase.

TRIOSES-FOSFATO

Seguidamente, a frutose 1,6-difosfato é clivada em duas trioses (gliceraldeído 3-fosfato e diidroxiacetona-fosfato) por acção da enzima aldolase; ambas as trioses-fosfato são interconvertíveis por uma isomerase; a reacção decorre fisiologicamente na direcção do gliceraldeído 3-fosfato, que é o único substrato da desidrogenase que dá continuidade à glicólise a partir deste ponto; em consequência não há, normalmente, acumulação da diidroxiacetona-fosfato.

3 - FOSFOGLICEROIL-FOSFATO

O gliceraldeído 3-fosfato está continuamente a ser transformado num intermediário metabólico bastante instável, o 3-fosfogliceroil-fosfato ou 1,3-difosfoglicerato. Esta reacção, reversível e catalisada pela desidrogenase do gliceraldeído-fosfato, requer fosfato inorgânico, sendo a única etapa metabólica eritrocitária em que o Pi é incorporado directamente num derivado dos açúcares. Em termos energéticos, esta etapa é uma dos mais importantes da sequência glicolítica, ao conservar a energia de oxidação do grupo aldeído (do gliceraldeído 3-fosfato) num produto com uma ligação fosfato de alta energia. Para o efeito, torna-se crítica a presença de um oxidante (NAD⁺) que, ao aceitar os electrões do grupo aldeído oxidado, passa ao estado reduzido (NADH). No conjunto, poder-se-á dizer que a desidrogenase da gliceraldeído-fosfato actua com dois substratos (gliceraldeído 3-fosfato e P) e uma coenzima (NAD⁺), revelando comportamento alostérico numa reacção quase em equilíbrio metabólico:



A enzima específica é constituída por 4 subunidades idênticas, em cada uma das quais existe um centro de fixação para o NAD^+ ; a união de uma molécula de NAD^+ diminui a afinidade da desidrogenase para as restantes, embora eleve a sua actividade intrínseca.

Pelos seus reconhecidos efeitos estimuladores na glicólise eritrocitária e ao participar na formação do 3-fosfogliceróil-fosfato, poderia supor-se que a Pi actuasse preferencialmente nesta etapa. Todavia, o aumento dos níveis de Pi parece ser mais influente como antagonista da inibição da fosfofrutoquinase pelo ATP, ou a hexoquinase pela glicose 6-fosfato, do que pela sua acção na desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato; de facto, a deficiência acentuada em Pi não parece limitar a formação do 3-fosfogliceróil-fosfato, ao contrário do que sucede na insuficiência relativa em NAD^+ ou inibição pelo NADH. A relação NAD^+/NADH deverá exercer uma importante acção reguladora na 2ª fase, de glicólise, particularmente nas situações em que possa aumentar, de forma substancial, o aporte de trioses-fosfato provenientes da 1ª fase da glicólise ou da via das fosfopentoses. Nestas circunstâncias, o NAD^+ poderá ser insuficiente para a quantidade de gliceraldeído 3-fosfato a oxidar. Uma outra alternativa pouco provável em condições fisiológicas, mas verificada em situações especiais (p. ex., conservação do sangue para transfusões com suplementos de Pi e inosina), reside na menor conversão do piruvato em lactato, com abaixamento dos níveis de NAD^+ regenerado na reacção. Nestas condições, os níveis de NAD^+ eritrocitário tornam-se insuficientes para impulsionar a etapa catalisada pela desidrogenase do gliceraldeído-fosfato, a menos que se adicione também um suplemento de piruvato.

3 - FOSFOGLICERATO

Na etapa seguinte ocorre a transformação do 3-fosfogliceróil-fosfato em 3-fosfoglicerato, que constitui a 1ª etapa geradora do ATP na sequência glicolítica. A enzima interveniente, a fosfoglicerato-quinase, requer Mg^{2+} e utiliza o ADP e o 3-fosfogliceróil-fosfato como substractos da reacção, acentuadamente exergónica:



Através desta reacção e da imediatamente anterior, a energia de oxidação de um grupo aldeído em carboxilato é conservada sob a forma de uma molécula

la de ATP. Na realidade, são obtidas duas moléculas de ATP, atendendo a que cada molécula de glicose é clivada na primeira metade da glicólise em duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato, subsequentemente oxidadas.

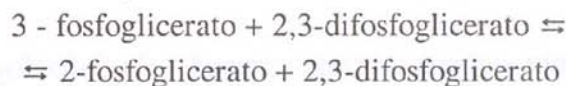
A grandeza da reacção é determinada pelas concentrações de 3-fosfogliceratoil-fosfato e ADP-Mg; o Mg^{2+} apenas em concentrações elevadas, não-fisiológicas, activa a enzima, por sua vez inibida pelo complexo ATP-Mg. Entretanto, a fosfoglicerato-quinase compete com a difosfoglicerato-mutase para o mesmo substracto, o 3-fosfogliceratoil-fosfato. Estão ainda pouco clarificados os factores que influenciam a distribuição do substracto comum à glicólise (i) e ciclo de Rapoport-Luebering (ii):

- (i) 3-fosfogliceratoil-fosfato \rightarrow 3-fosfoglicerato
ou
(ii) 3-fosfogliceratoil-fosfato \rightarrow 2,3-difosfoglicerato \rightarrow 3-fosfoglicerato

Quaisquer que sejam esses factores revelam-se de extrema importância na determinação das concentrações relativas intraglobulares do 2,3-DPG e ATP (normalmente de 4/1) e, conseqüentemente nas funções específicas que estes metabolitos exercem nos eritrocitos. Entre outros mecanismos, poder-se-á adiantar que o ADP em excesso favorece a conversão do 3-fosfogliceratoil-fosfato em 3-fosfoglicerato; por sua vez, a concentração do 2,3-DPG pré-existente inibe a própria mutase formadora, também inibida a pH ácido.

2 - FOSFOGLICERATO

A glicólise prossegue com a transformação do 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato por uma mutase Mg^{2+} - dependente, que utilizaria o 2,3-DPG como intermediário da reacção:



Aparentemente, a mutase transferiria o grupo 3-fosfato do 2,3-DPG para a posição 2 do 3-fosfoglicerato, dando origem ao 2-fosfoglicerato e permitindo a recuperação da molécula intermediária (2,3-DPG). Todavia, observações recentes utilizando 3-fosfoglicerato e enzima em elevado grau de purificação, sugerem que a isomerização reversível do 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato pode ser catalisada pela fosfoglicerato-mutase na ausência do 2,3-DPG.

Dessas observações foi possível concluir que o 2,3-DPG não é um cofactor mas apenas um activador secundário da mutase que actua na reacção por mecanismo ainda obscuro. Todavia, será admissível que aquela enzima se encontre completamente fosforilada nos eritrocitos circulantes e, consequentemente, participe na reacção por transferência de um grupo fosforilo.

Em condições normais, a reacção encontra-se em equilíbrio pelo que não deveria intervir na regulação dos níveis do 2,3-DPG nem no fluxo dos substratos pela porção terminal da glicólise. A fosfoglicerato-mutase, que exhibe grande afinidade para o 2,3-DPG, apresenta também actividade própria da fosfatase daquele metabolito, todavia, sem acção fisiológica aparente. O problema é, contudo, muito mais complexo e será analisado em conjunto com a síntese e degradação do 2,3-DPG.

FOSFOENOLPIRUVATO E PIRUVATO

Segue-se a desidratação do 3-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato por acção de uma enolase; esta reacção, consiste numa oxi-redução intramolecular do 3-fosfoglicerato (a molécula da água é removida a partir dos seus carbonos 2 e 3) é a 2ª etapa glicolítica em que se forma um composto fosfato de alta energia (o fosfoenolpiruvato):



Antes de se fixar ao substracto, a enolase tem de formar um complexo com um catião divalente (Mg^{2+} ou Mn^{2+}). Aparentemente, a reacção encontra-se em equilíbrio, mas a transformação do substracto em produto reflecte-se numa redistribuição de energia que confere ao produto elevada capacidade exergónica na etapa seguinte, irreversível em condições fisiológicas:



Esta etapa, catalisada pelo piruvato-quinase, é o 2º ponto da glicólise onde ocorre a formação de ATP. Até aqui, a glicose e respectivos produtos de transformação metabólica que fluem através da sequência glicolítica haviam utilizado duas moléculas de ATP, regenerando outras duas; na etapa catalisada pela piruvato-quinase é finalmente obtido o lucro energético, representado por duas moléculas de ATP por cada hexose convertida em dois fragmentos de 3 carbonos.

Obviamente a reacção encontra-se em desequilíbrio, favorecendo a síntese do produto e participando activamente na regulação da glicólise, sobretudo ao nível da sua parte terminal. A piruvato-quinase exibe comportamento cinético semelhante ao da fosfofrutoquinase e apresenta características idênticas às da isoenzima predominante no fígado. É portanto uma enzima alostérica que, além de um catião divalente (Mn^{2+} ou Mg^{2+}) requer o K^+ como actlvadores fisiológicos (Fig. 5). Tal como a fosfofrutoquinase, é inibida pelo ATP nas concentrações eritrocitárias usuais, em competição com o fosfoenolpiruvato. A frutose 1,6-difosfato actua como activador da reacção, bem como a glicose 1,6-difosfato, o que se reveste de grande importância atendendo a que as concentrações deste metabolito nos eritrocitos humanos são consideravelmente superiores às da frutose 1,6-difosfato. Para actuar convenientemente, a piruvato-quinase deve estar insaturada pelos seus substractos (fosfoenolpiruvato e ADP). O fosfoenolpiruvato converte a enzima numa forma mais activa, enquanto o ATP permite a estabilização da piruvato-quinase na forma menos activa; esta interconversão na conformação da piruvato-quinase é contudo mais lenta do que se poderia prever em face das variações bruscas dos ligandos que se fixam à enzima: A frutose 1,6-difosfato parece intervir naquela isomerização lenta, aumentando a afinidade da enzima para o fosfoenolpiruvato. A activação pela frutose 1,6-difosfato, assim como a inibição pelo ATP, são pH-dependentes, acentuan-

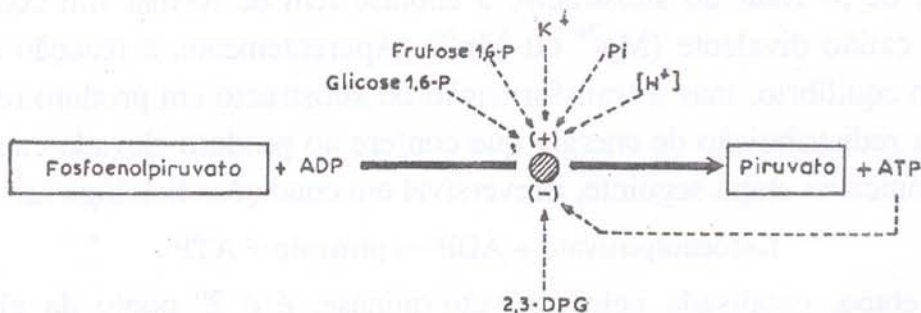


Fig. 5 – Principais reguladores fisiológicos da piruvato-quinase. A enzima é inibida pelo ATP, em competição com o fosfoenolpiruvato, sendo aquele efeito reforçado pelo aumento de pH. A piruvato-quinase actua a pH óptimo próximo de 7, sendo activada pelo aumento da concentração hidrogeniónica. A enzima é também estimulada pelo fosfato e ião potássio. Tal como a inibição pelo ATP, a activação pela frutose 1,6-difosfato é pH-dependente acentuando-se a pH alcalino: o fosfato inorgânico opõe-se à inibição pelo ATP, sendo a enzima inibida pelo 2,3-difosfoglicerato.

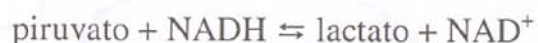
do-se com o aumento do pH. A inibição pelo ATP é desbloqueada pelo Pi, tal como sucede para a fosfofrutoquinase. Em consequência há que admitir que parte da estimulação da glicólise pelo Pi seja também efectuada pela activação da piruvato-quinase.

Possivelmente, o 2,3-DPG é outro modulador da piruvato-quinase, inibindo-a; por vezes, a actividade desta enzima parece influenciar a relação 2,3-DPG/ATP intraglobular, acentuando-se quando se encontra inibida e vice-versa.

LACTATO

Por fim, o piruvato gerado na reacção anterior pode difundir do eritrocito para o plasma ou ser reduzido em lactato pela desidrogenase láctica intraglobular. O destino do piruvato depende da relação NAD^+/NADH e pH intraglobular; quando existe NADH suficiente e o pH é baixo o piruvato é convertido em lactato, por sua vez em equilíbrio com a fracção plasmática. Por conseguinte, a distribuição do lactato entre ambos os compartimentos é a prevista pelo equilíbrio de Donnan, ao contrário do piruvato que, ao ser constantemente reduzido em lactato, se apresenta em concentrações intraglobulares cerca de 50% inferiores aos valores teóricos. *In vivo*, sobrevêm variações na concentração de piruvato, influenciadas por eventuais inibidores ou activadores intraglobulares da actividade da desidrogenase láctica.

A desidrogenase láctica pode funcionar em ambas as direcções, muito mais que as restantes enzimas da glicólise:



A distribuição das isoenzimas da desidrogenase láctica dos eritrocitos humanos é, em tudo, idêntica do músculo cardíaco; constituída por 4 cadeias polipeptídicas, pode utilizar o NAD^+ ao pH óptimo de 8,5 e, em alternativa, o NADH^+ embora a pH óptimo de 6,0 e com apenas 1/6 da actividade molecular, o que parece não ter interesse biológico relevante.

Como o piruvato e o lactato são passíveis de difusão fácil para o plasma, verifica-se que o metabolismo corporal pode, em determinadas circunstâncias, influenciar o metabolismo eritrocitário através do efeito exercido por variações da relação lactato/piruvato na relação NAD^+/NADH . Na falta de NAD^+ , a etapa catalisada pela desidrogenase do gliceraldeído-fosfato torna-se limitativa, provocando a acumulação do gliceraldeído 3-fosfato.

IV. Ciclo de Rapoport-Luebering

Existem dois desvios metabólicos relevantes na glicólise eritrocitária, um localizado ao nível da glicose 6-fosfato (donde parte a via das fosfopentoses), situando-se o outro no 3-fosfogliceróil-fosfato, onde se inicia o ciclo de Rapoport-Luebering. Ambos os desvios reinserem-se, através dos seus produtos (gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato ou 3-fosfoglicerato, respectivamente) na via principal glicolítica.

Admitia-se ainda recentemente que o ciclo de Rapoport-Luebering incluía duas enzimas, a difosfoglicerato-mutase e a difosfoglicerato-fosfatase, ambas catalisando reacções irreversíveis. Para ambas as enzimas foram identificadas deficiências congénitas, relacionadas com o desenvolvimento de anemias hemolíticas não-esferocíticas por mecanismos ainda obscuros. A via em causa teria como funções primárias a síntese e hidrólise do 2,3-DPG, formado por rearranjo molecular do 3-fosfogliceróil-fosfato pela mutase e transformado em 3-fosfoglicerato e fosfato inorgânico pela fosfatase (Fig. 6).

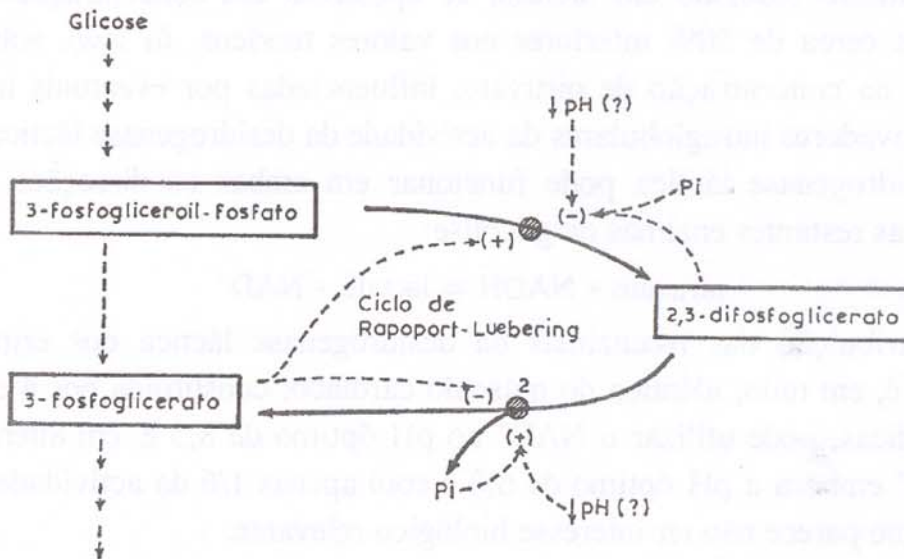


Fig. 6 – Ciclo de Rapoport-Luebering, evidenciando a formação e degradação do 2,3-difosfoglicerato, em relação com a via glicolítica. O 2,3-difosfoglicerato é o principal inibidor da sua formação, ao actuar na «mutase» específica, enquanto a actividade da «fosfatase» é inibida pelo fosfoglicerato, por sua vez activador daquela «mutase». O fosfato inorgânico comporta-se como activador da «fosfatase» e inibidor da «mutase», sendo a acumulação do 2,3-difosfoglicerato favorecida a pH elevado.

Actualmente, considera-se que a via de Rapoport-Luebering está sob o controlo de uma única enzima, a difosfoglicerato-sintase, que participa na síntese e degradação do 2,3-DPG segundo mecanismos a discutir mais adiante (Fig. 7).

CONCENTRAÇÃO E FUNÇÕES POTENCIAIS DO 2,3-DIFOSFOGLICERATO

Embora observada em outros tecidos, a conversão do 3-fosfogliceroil-fosfato em 2,3-DPG assume particular relevo nos eritrocitos de algumas espécies de mamíferos, entre as quais a humana. Ao longo de inúmeras observações em sistemas experimentais diferentes, ainda não foi possível justificar integralmente os elevados níveis atingidos pelo 2,3-DPG eritrocitário. Entre outras hipóteses, têm sido sugeridas as seguintes funções para aquele metabolito:

- a) Reserva de grupos fosfato, reflectindo o conteúdo e fornecimento do fosfato corporal;
- b) Participação no equilíbrio Donnan entre o glóbulo vermelho e o plasma, contribuindo para a estabilidade iónica e evitando ao máximo as variações de pH e volume eritrocitários;
- c) Influência no transporte do K^+ , talvez mediado pela «difosfoglicerato-fosfatase» ou por fixação à desoxiemoglobina;
- d) Modulador da actividade glicolítica, actuando ao nível das quinases e fosfoglicerato-mutase;
- e) Modulador da função respiratória da hemoglobina.

Esta última acção parece ser a de maior importância, ao privilegiar o único meio em que a hemoglobina exerce acção fisiológica. A confirmar-se nos eritrocitos humanos o que foi recentemente verificado em lisados reticulocitários de coelhos, o 2,3-DPG poderia também participar na síntese da hemoglobina no decurso da maturação eritroide; nestas preparações, o 2,3-DPG parece estimular a síntese proteica e, paralelamente, a da hemoglobina a baixas concentrações, inibindo-a a níveis fisiológicos (mais elevados). Em conformidade, torna-se admissível que a hemoglobina e o 2,3-DPG cooperem na regulação das próprias sínteses.

A acumulação de hemoglobina, ao fixar o 2,3-DPG, estimularia a síntese do 2,3-DPG (liberta da inibição pelo seu produto, o 2,3-DPG) e, ao mesmo

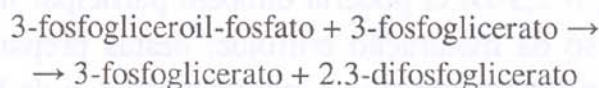
tempo, inibiria a actividade da «fosfatase», por restrição do substracto (o 2,3-DPG). Por sua vez, o 2,3-DPG estimularia a síntese da hemoglobina enquanto ambos não atingissem os níveis habituais nos reticulocitos, como sucede *in vivo*; neste ponto, o efeito estimulador seria substituído pela inibição da síntese de hemoglobina pelo 2,3-DPG, de forma a limitar os níveis máximos de hemoglobina nos eritrocitos maduros.

A concentração do 2,3-DPG intraglobular reflecte o equilíbrio entre as reacções que o sintetizam e degradam, por sua vez influenciadas, isoladamente ou em conjunto, por diversos factores com envolvimento fisiológico. Isto significa que as alterações dos níveis do 2,3-DPG patenteiam a actividade geral da sequência glicolítica e, em particular, a do ciclo de Rapoport-Luebering, ambos submetidos a controlo metabólico.

Embora todos os cálculos conhecidos estejam cheios de incertezas, admite-se que apenas 20 a 25% do fluxo glicolítico seja desviado para a formação do 2,3-DPG, sendo a fracção maioritária utilizada na obtenção do ATP, por conversão directa do 3-fosfogliceróil-fosfato em 3-fosfoglicerato. Há, no entanto, observações que referem valores substancialmente mais baixos, em que apenas 1/8 a 1/10 do fluxo glicolítico total seria partilhado pela síntese do 2,3-DPG.

SINTESE DO 2,3-DIFOSFOGLICERATO POR UMA MUTASE ESPECÍFICA

A quantidade do 2,3-DPG sintetizado dependeria primariamente da concentração do 3-fosfogliceróil-fosfato e, em segundo lugar, da concentração em que existe no estado livre intraglobular, dos níveis de 3-fosfoglicerato e de Pi. Ainda que o 3-fosfoglicerato seja um cofactor da reacção, comportar-se-ia também como um substracto da «mutase», recebendo um grupo fosforilo por transferência intramolecular irreversível:



De acordo com os estudos cinéticos originais, a «difosfoglicerato--mutase» exibiria grande afinidade para os seus substractos e para alguns inibidores ou activadores; entre os inibidores destaca-se o 2,3-DPG, cujo acção seria já evidente a baixas concentrações, comportando-se como inibidor competitivo para o 3-fosfoglicerol-fosfato e não-competitivo com o 3-fosfoglicerato; o fosfato

inorgânico também competiria com o 3-fosfoglicerato, inibindo a «mutase». Contudo, comparada com a importância da acção reguladora exercida pela concentração do 3-fosfogliceroil-fosfato e, talvez também, à do 2,3-DPG na síntese deste metabolito, a dependência do 3-fosfoglicerato e Pi seria pouco relevante. A formação do 2,3-DPG seria afectada pelo pH; a valores inferiores o pH 6,9, a «difosfoglicerato-mutase» era completamente inibida, sendo activada a valores superiores. O efeito do pH na formação do 2,3-DPG justificaria que, no estado de equilíbrio metabólico, a partilha do fluxo metabólico pelo sistema formador daquele metabolito diminuísse de 24% a pH 7,4 para 12% a pH 7,04. No entanto, estas conclusões, referentes a estudos com incubações eritrocitárias, contradizem os resultados com a enzima purificada, que se revela insensível aos efeitos do pH.

Em condições normais, a reacção em causa estaria fortemente desviada na direcção do produto, o 2,3-DPG, apesar do efeito inibidor deste composto na actividade da «mutase» e o facto de existir em concentrações intraglobulares muito superiores às do 3-fosfogliceroil-fosfato. Justificar-se-ia daqui que a actividade da «difosfoglicerato-mutase» fosse calculada em apenas 1% da sua capacidade potencial.

Todavia, a síntese do 2,3-DPG pode ser estimulada em condições experimentais pelo aumento da concentração do 3-fosfogliceroil-fosfato. Este efeito parece ser habitualmente observado, em situações fisiológicas quando aumenta a percentagem de desoxiemoglobina, para a qual o 2,3-DPG revela grande afinidade; ao diminuir a sua concentração no estado livre e, por consequência, a inibição exercida na «mutase», sobrevém um aumento da síntese do 2,3-DPG. Explica-se assim que a concentração daquele metabolito possa ser em anaerobiose cerca de 40% superior aos níveis verificados em aerobiose, o que, de certo modo, se assemelha ao efeito Pasteur.

Ao depender da concentração de 3-fosfogliceroil-fosfato, a síntese do 2,3-DPG acaba por ser influenciada, indirectamente, pela actividade conjunta de algumas enzimas da glicólise, tais como a fosfofrutoquinase, desidrogenase do gliceraldeído-fosfato, fosfoglicerato-quinase e piruvato-quinase. De uma forma geral, poder-se-á dizer que activação das duas primeiras e/ou a inibição das duas últimas favorece a acumulação do 3-fosfogliceroil-fosfato e, por consequência, a sua transformação em 2,3-DPG. A diminuição dos níveis do 2,3-DPG observada em indivíduos com deficiência congénita da hexoquinase ou fosfofrutoquinase ou, pelo contrário, o aumento verificado nos

deficientes em piruvato-quinase eritrocitária, poderiam ser explicados por aqueles mecanismos.

HIDRÓLISE DO 2,3-DIFOSFOGLICERATO POR UMA FOSFATASE ESPECÍFICA

A degradação do 2,3-DPG era atribuída a uma entidade enzimática, a «difosfoglicerato-fosfatase», considerada como uma das enzimas (entre as relacionadas com glicólise eritrocitária) com menor capacidade catalítica. Ao remover um grupo fosfato do substracto, a «fosfatase» originaria o 3-fosfoglicerato, numa reacção irreversível:



Ao contrário do verificado para a «difosfoglicerato-mutase», a actividade da «fosfatase» não dependeria da concentração do substracto. Em consequência, as variações na actividade degradativa do 2,3-DPG resultariam, quase em absoluto, de alterações na actividade da «fosfatase», por sua vez afectada pela presença de determinados aniões. Assim, a reacção catalisada pela «fosfatase» seria estimulada pela adição de cloreto ou fosfato; na ausência de cloreto, o fosfato revela-se pouco eficaz. A adição de ambos os iões em concentrações fisiológicas estimularia em cerca de 15 vezes a actividade da «fosfatase», pelo contrário inibida por concentrações elevadas de qualquer daqueles iões. Desta forma, e a somar à sua acção na actividade glicolítica geral, o Pi seria um importante modulador da degradação do 2,3-DPG. O fosfoglicolato, que também pode ocorrer no eritrocito, estimularia a «fosfatase» cerca de 1 500 vezes.

Como os níveis de 2,3-DPG diminuem a pH ácido pensava-se que a «fosfatase» também tivesse um pH óptimo fixado em 6,5. Em consequência, quando o pH intraglobular diminuísse dos valores normais (7,2) para aqueles níveis, sobreviria uma maior decomposição do 2,3-DPG (por activação da «fosfatase») sucedendo o inverso a pH alcalino. Observações subsequentes, ao revelarem que o pH óptimo da «fosfatase» se situava a 7,2 lançaram a dúvida sobre aquela hipótese; como alternativa foi proposto que a diminuição dos níveis do 2,3-DPG resultaria da redução da sua síntese, em consequência da actividade glicolítica geral ser mais lenta a pH ácido.

Em incubações eritrocitárias a actividade da «fosfatase» do 2,3-DPG seria afectada pelo pH apenas a baixas concentrações daquele metabolito, sen-

do independente do pH em condições de saturação; a pH ácido, aumentaria a afinidade da «fosfatase» para o 2,3-DPG, acelerando a sua degradação. Resta esclarecer qual destes efeitos predomina *in vivo*, pois não só os resultados obtidos *in vitro* ou em preparações diferentes não coincidem entre si, como também a sua extrapolação para as condições fisiológicas não oferece garantias suficientes.

Igualmente controversos são os efeitos exercidos pelo 3-fosfoglicerato; aplicando os valores da enzima isolada às condições intraglobulares, haveria que concluir (pela elevada relação 2,3-difosfoglicerato/3-fosfoglicerato), que a «fosfatase» actua sempre no máximo da sua capacidade, não sendo inibida pelo 3-fosfoglicerato, como parecia suceder.

Atendendo às diferenças entre as actividades atribuídas a ambas as enzimas consideradas para o ciclo de Rapoport-Luebering, nitidamente favoráveis à «mutase», poderia dizer-se que a concentração do 2,3-DPG era, nos eritrocitos, e pelo menos *in vitro*, particularmente influenciada pela sua síntese. Todavia, a degradação pela «fosfatase» assumiria particular relevância quando a enzima estivesse fortemente activada ou quando diminuísse a síntese do 2,3-DPG.

Todas as incertezas sugeridas para a síntese e degradação do 2,3-DPG, em conjunto com a diversidade das funções atribuídas àquele metabolito, presente nos eritrocitos em concentrações muito superiores às existentes, p. ex., no músculo esquelético, justificaram numerosas e exaustivas análises dedicadas ao assunto nos últimos anos.

HIPÓTESE DA ENZIMA ÚNICA. A DIFOSFOGLICERATO-SINTASE

Originalmente, o 2,3-DPG estaria directamente envolvido em três reacções enzimáticas, atribuídas a três enzimas diferentes: a transformação do 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato seria catalisada pela fosfoglicerato-quinase, enquanto a síntese e degradação do 2,3-DPG estaria a cargo da «difosfoglicerato-mutase» e da «difosfoglicerato-fosfatase», respectivamente. Todavia, estudos subsequentes com a «fosfoglicerato-mutase» de levedura sugeriram que a enzima, constituída por um dímero, catalisaria também a síntese e degradação do 2,3-DPG, através de partilha de um centro activo comum para as três actividades enzimáticas. Seguidamente, foi proposto que

o metabolismo de 2,3-DPG estaria sob o controlo de uma proteína catalítica multifactorial, também com actividade própria de «fosfoglicerato-mutase». Tal como fora verificado na levedura, as três actividades enzimáticas estariam, nos eritrocitos, confinadas a um centro activo comum: cada molécula enzimática teria dois centros separados, um exclusivo para a fixação de monofosfogliceratos e outro para difosfogliceratos. A actividade própria da «mutase» do 2,3-DPG seria desenvolvida quando um dos centros estivesse ocupado pelo 3-fosfoglicerato e o outro pelo 3-fosfogliceroil-fosfato; se ambos os centros estivessem ocupados pelo 2- ou 3-fosfoglicerato e 2,3-DPG, a enzima comportar-se-ia como a fosfoglicerato-mutase; se o centro para o 2,3-DPG estivesse ocupado por este metabolito e o outro fixasse um activador (Pi ou fosfoglicolato) a enzima actuaría como o difosfoglicerato-fosfatase. A inibição desta actividade enzimática pelos monofosfogliceratos resultaria da sua conversão em fosfoglicerato-mutase.

Este esquema, ainda que aliciante, começou a ser contestado quando se verificou que a «fosfoglicerato-mutase» poderia actuar independentemente do 2,3-DPG. No entanto, para o metabolismo do 2,3-DPG, revestir-se-ia de grande importância fisiológica a centralização de duas actividades enzimáticas no centro activo comum da mesma molécula proteica. Nestas condições, a reacção prevalente resultaria da afinidade relativa dos substractos para a enzima e da concentração intraglobular dos substractos; o mesmo ligando, ao fixar-se à molécula enzimática, poderia activar uma das suas actividades catalíticas e, simultaneamente, inibir a outra, amplificando-lhe os efeitos metabólicos. É de notar que o esquema proposto difere do controlo usual para as enzimas alostéricas, que catalisam reacções irreversíveis; ao contrário deste sistema, em que participam dois tipos diferentes de enzimas, o metabolismo do 2,3-DPG, representado por duas reacções irreversíveis, seria intervencionado por uma única enzima multifuncional, contudo, sensível a modulações opostas em duas reacções irreversíveis (Fig. 7).

Por fim, tornou-se evidente que a transformação do 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato é catalisada por uma enzima (fosfoglicerato-mutase) estruturalmente distinta da que catalisa a síntese e degradação do 2,3-DPG «difosfoglicerato-mutase/fosfatase» ou, simplesmente, sintase do 2,3-DPG). Cada entidade enzimática parece ser constituída por um par de subunidades, idênticas entre si e específicas para cada dímero, por sua vez codificadas num locus genético próprio. Todavia, além das funções principais atrás referidas,

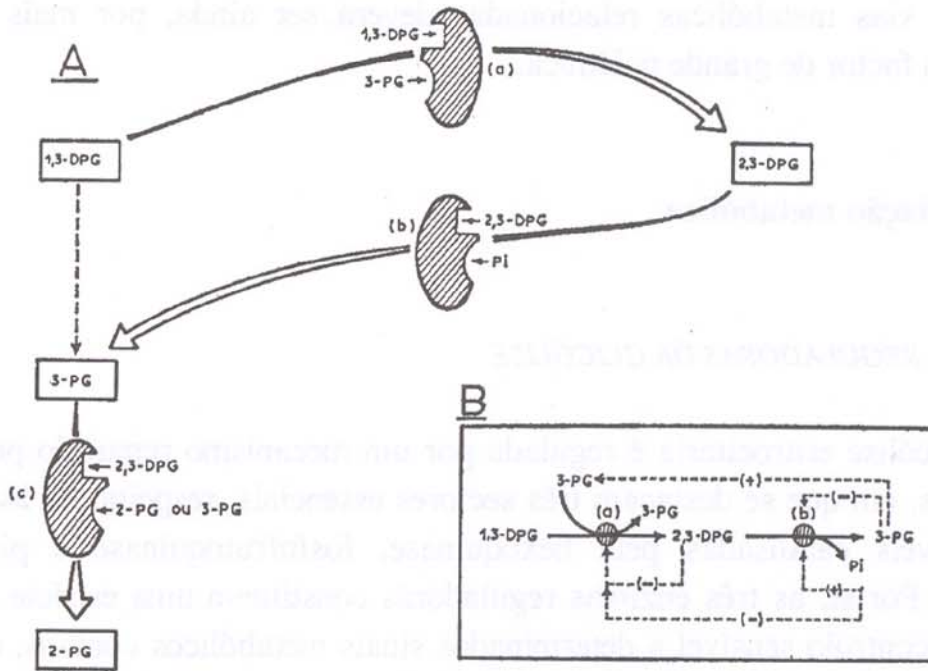


Fig. 7 - Representação esquemática das três actividades catalíticas propostas para a difosfoglicerato-sintase. A enzima, multifuncional, teria como actividades primárias a síntese (a) e degradação (b) do 2,3-DPG e, acessoriamente, revelaria actividades enzimáticas próprias da fosfoglicerato-mutase. Todas as actividades enzimáticas seriam catalisadas num centro activo comum, sensível às concentrações relativas de diversos metabolitos eritrocitários, sobretudo monofosfogliceratos e difosfogliceratos. B - A síntese e degradação do 2,3-DPG representaria, segundo este esquema, uma situação particular, em que a mesma enzima alostérica participaria em duas reacções metabólicas irreversíveis, de efeito opostos. A regulação de ambas as reacções não perderia eficácia, já que os activadores de uma das reacções, ao inibirem a outra actividade catalítica de enzima, reforçaria os efeitos metabólicos pretendidos.

cada uma das enzimas exerce uma actividade secundária. Assim, enquanto a fosfoglicerato-mutase também catalisa a hidrólise do 2,3-DPG, a 2,3-difosfoglicerato-sintase pode intervir na transformação do 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato. Não há provas de que a fosfoglicerato-mutase eritrocitária purificada catalise a síntese do 2,3-DPG, ao contrário do que sucede no músculo e ainda em preparações relativamente impuras da enzima eritrocitária. Dos estudos efectuados, torna-se evidente que ambas as enzimas têm um grupo aminado por unidade activa, com funções catalíticas distintas; o grupo da sintase do 2,3-DPG seria essencial para a fixação dos fosfogliceratos, enquanto o da fosfoglicerato-mutase teria especificidade para os monofosfogliceratos. Apesar dos avanços recentemente registados, o metabolismo do 2,3-

-DPG e vias metabólicas relacionadas deverá ser ainda, por mais alguns anos, um factor de grande polémica.

V. Regulação metabólica

ENZIMAS REGULADORAS DA GLICÓLISE

A glicólise eritrocitária é regulada por um mecanismo repartido por várias etapas, em que se destacam três sectores essenciais, respeitantes às etapas irreversíveis catalisadas pela hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvatoquinase. Por si, as três enzimas reguladoras constituem uma espécie de unidade de controlo sensível a determinados sinais metabólicos comuns, como o pH, Pi, relação ATP/ADP ou NAD⁺/NADH, entre outros. Daquelas enzimas, a fosfofrutoquinase parece assumir a função de principal sensor e coordenador da actividade glicolítica.

As etapas catalisadas pelas três quinases da glicólise caracterizam-se por grande desnível termodinâmico, sendo particularmente sensíveis à influência de efectores (Fig. 8). Duas dessas enzimas, a piruvato-quinase e a fosfofrutoquinase, exibem acentuado comportamento alostérico com cooperatividade positiva, ou seja a sua acção é progressivamente reforçada por número crescente de moléculas de substracto, o que parece revestir-se de grande importância funcional.

Entretanto, cada uma das restantes etapas glicolíticas em relativo equilíbrio metabólico também partilha algumas responsabilidades na regulação daquela sequência; quer pelas características das respectivas enzimas quer pela modulação das suas actividades pelas concentrações de substractos, produtos ou efectores específicos, cada uma das etapas opera em condições que tendem a influenciar significativamente toda a sequência glicolítica. Apesar da grande diferença existente entre a actividade máxima de cada uma das enzimas da glicólise, verifica-se que a sua actividade real é determinada pela concentração de um ou mais substractos, o que corresponde a uma actuação em condições de sub-saturação.

Em consequência do exposto, a concentração de cada um dos intermediários metabólicos e produtos finais da glicólise depende da actividade das di-

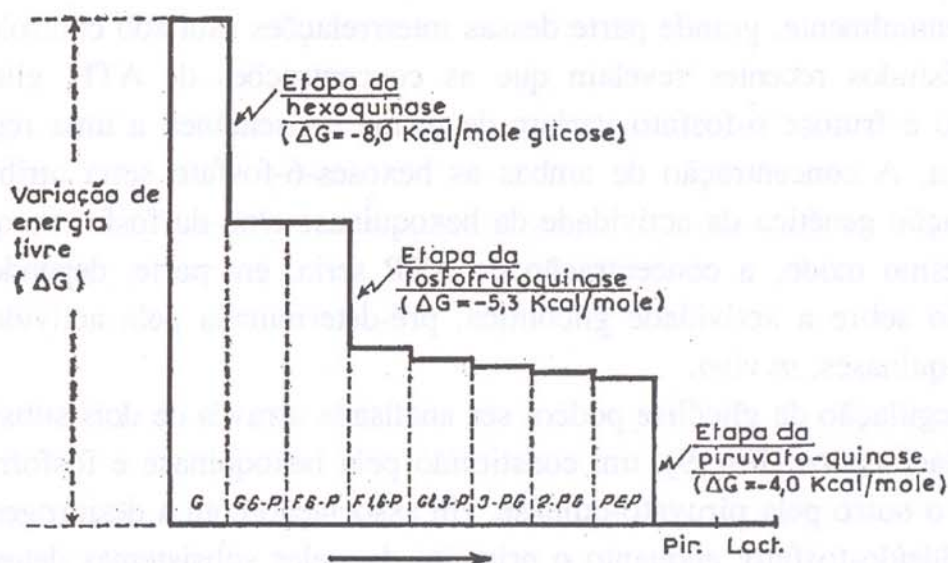


Fig. 8 – Variação energética aproximada da glicólise eritrocitária, segundo Minakami e Yoshikawa (J. Biochem, 59: 139, 1966). É de notar que, à excepção de 3 etapas (catalisadas pelas enzimas reguladoras), todas as restantes se encontram em virtual equilíbrio. A irreversibilidade (e características reguladoras) das etapas baseia-se na acentuada diminuição da energia livre que caracteriza cada uma dessas transformações. (G=glicose; G6-P=glicose 6-fosfato; F6-P=frutose 6-fosfato; F1,6-P=frutose 1,6-bis-fosfato; G1,3-P=gliceraldeído 3-fosfato; 3-PG=3-fosfoglicerato; 2-PG=2-fosfoglicerato; PEP =fosfoenol-piruvato).

versas enzimas intervenientes na oxidação da glicólise, particularmente das quinases reguladoras. Exceptuando os reagentes das reacções catalisadas por estas enzimas, que revelam concentrações muito variáveis, todos os outros oscilam por níveis sensivelmente idênticos, próprios de reacções em relativo equilíbrio metabólico. Por sua vez, determinados metabolitos variam entre si de forma recíproca (Quadro V).

QUADRO V

VARIAÇÃO RECÍPROCA DE ALGUNS METABOLITOS DA GLICÓLISE

- | | |
|-----|--|
| (a) | Glicose 6-fosfato, frutose 6-fosfato/frutose 1,6-difosfato, diidroxiacetona-fosfato, gliceraldeído 3-fosfato |
| (b) | $\frac{\text{ATP}}{\text{ADP/AMP}}$ |
| (c) | $\frac{\text{Piruvato, NAD}^+}{\text{Lactato, NADH}}$ |

Eventualmente, grande parte dessas interrelações está sob controlo genético. Estudos recentes revelam que as concentrações de ATP, glicose 6-fosfato e frutose 6-fosfato variam de forma consentânea a uma regulação genética. A concentração de ambas as hexoses-6-fosfato seria atribuível à modulação genética da actividade da hexoquinase e/ou da fosfofrutoquinase. Do mesmo modo, a concentração de ATP seria, em parte, dependente do controlo sobre a actividade glicolítica, pré-determinada pela actividade daquelas quinases, *in vivo*.

A regulação da glicólise poderá ser analisada através de dois subsistemas interrelacionados (Fig. 9), um constituído pela hexoquinase e fosfofrutoquinase e o outro pela piruvato-quinase, em associação com a desidrogenase do gliceraldeído-fosfato; enquanto o primeiro daqueles subsistemas determina a actividade glicolítica global, o segundo intervém como coordenador entre ambas as fases da glicólise, isto é, entre as etapas iniciais de preparação e fosforilação das hexoses, e a parte final, constituída pelas reacções da oxidação-redução e formação de ATP.

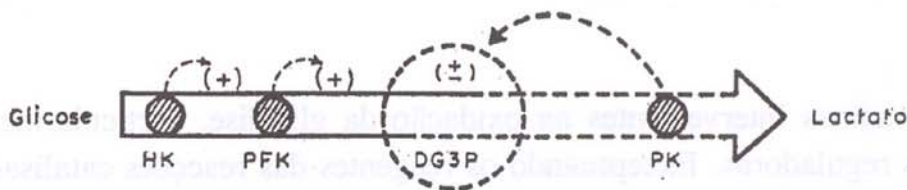


Fig. 9 – A hexoquinase (HK) e a fosfofrutoquinase (PFK) constituem um subsistema determinante da actividade glicolítica global, coordenado pelo subsistema que engloba a piruvato-quinase (PK) e, talvez também, pela desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato (DG3P).

HEXOQUINASE-FOSFOFRUTOQUINASE.
FACTORES INFLUENTES NO SUBSISTEMA

A glicólise é estimulada quando a inibição do sub-sistema hexoquinase-fosfofrutoquinase é desbloqueado por activadores metabólicos. O par glicose 6-fosfato/frutose 6-fosfato e o ATP são os principais determinantes funcionais daquelas enzimas. Quando a concentração de glicose 6-fosfato excede determinados limites, compete com o ATP para as hexoquinase, inibindo-a;

por seu lado, a inibição da fosfofrutoquinase pelo ATP é antagonizada pela frutose 6-fosfato, cuja concentração relativamente à da glicose 6-fosfato, é fixada pela fosfoglicose-isomerase. Em consequência, a estimulação da hexoquinase pelo ATP (como ATP-Mg) pode ser acompanhada pela inibição simultânea da fosfofrutoquinase, ocasionando a acumulação da glicose-6-fosfato e, daí, a inibição de hexoquinase (Fig. 10).

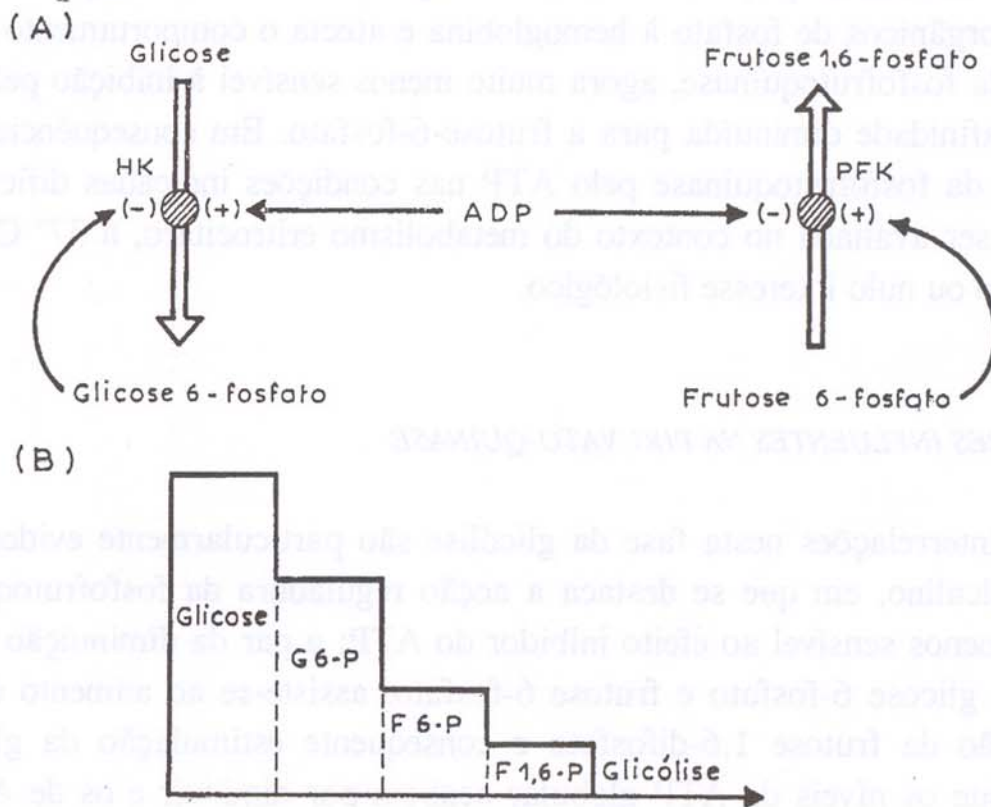


Fig. 10 – Regulação do subsistema hexoquinase-fosfofrutoquinase. (A) A inibição da fosfofrutoquinase (PFK) pelo ATP ocasiona a acumulação da frutose 6-fosfato e, consequentemente, a da glicose 6-fosfato. Nesta condição é inibida a hexoquinase (HK), por competição do excesso de glicose 6-fosfato com o ATP. Em (B) são representadas arbitrariamente as concentrações dos substratos e metabolitos nas fases referenciadas.

Todavia, sabe-se que o envelhecimento eritrocitário evolui com diminuição progressiva da actividade de diversas enzimas eritrocitárias, em que se incluem as da glicólise. A depressão da actividade glicolítica parece ser particularmente sensível à diminuição da actividade da fosfofrutoquinase, muito acentuada, e que decorre a par do abaixamento dos níveis globulares de ATP. Esta situação pode ser evitada com suplementos de adenina e inosina,

que aumentam a formação de ATP; caso contrário, a diminuição da actividade da fosfofrutoquinase induziria novo decréscimo dos níveis de ATP, com reflexos na actividade enzimática, agora ainda mais reprimida.

Em conformidade com aquelas observações, o ATP actuará como um activador indispensável à fosfofrutoquinase, o que, quer nas enzimas isoladas quer na sequência glicolítica nem sempre se verifica. A principal razão para aquelas diferenças deverá ser procurada na temperatura a que se encontram os eritrocitos que, entre outras alterações, favorece a fixação dos compostos orgânicos de fosfato à hemoglobina e afecta o comportamento cooperativo da fosfofrutoquinase, agora muito menos sensível à inibição pelo ATP e com afinidade diminuída para a frutose-6-fosfato. Em consequência, a activação da fosfofrutoquinase pelo ATP nas condições indicadas dificilmente poderá ser avaliada no contexto do metabolismo eritrocitário, a 37° C, tendo reduzido ou nulo interesse fisiológico.

FACTORES INFLUENTES NA PIRUVATO-QUINASE

As interrelações nesta fase da glicólise são particularmente evidenciadas a pH alcalino, em que se destaca a acção reguladora da fosfofrutoquinase, agora menos sensível ao efeito inibidor do ATP; a par da diminuição dos níveis da glicose 6-fosfato e frutose 6-fosfato, assiste-se ao aumento da concentração da frutose 1,6-difosfato e consequente estimulação da glicólise, ainda que os níveis de ATP globular acabem por diminuir e os de AMP se elevem.

A piruvato-quinase, pela sua vez, não limita o fluxo glicolítico, como pode ser verificado em heterozigotos deficientes naquela enzima, ou em incubações de hemolisados de eritrocitos normais a que se adiciona um suplemento enzimático; em qualquer destes casos não são observadas alterações no fluxo metabólico, concluindo-se que a quantidade do piruvato-quinase usualmente existente parece ser mais do que suficiente para as suas actividades, catalítica e reguladora.

Entretanto, a importância da piruvato-quinase na coordenação dos 2/3 finais da sequência glicolítica e na distribuição de metabolitos entre a via principal e o ciclo de Rapoport-Luebering, é acentuada por variações de pH. De facto, a piruvato-quinase, assim como a fosfofrutoquinase, são enzimas

cruciais para a actividade glicolítica, sendo sensibilizadas de forma diferente ao mesmo pH (Fig. 11). Em concentrações de substrato próximas das fisiológicas, a piruvato-quinase apresenta actividade máxima abaixo de pH 7 e escassa actividade acima de pH 8,0; pelo contrário, a fosfofrutoquinase, assim como a hexoquinase, exibem actividade máxima acima de pH 8,0 e escassa actividade a pH 7.

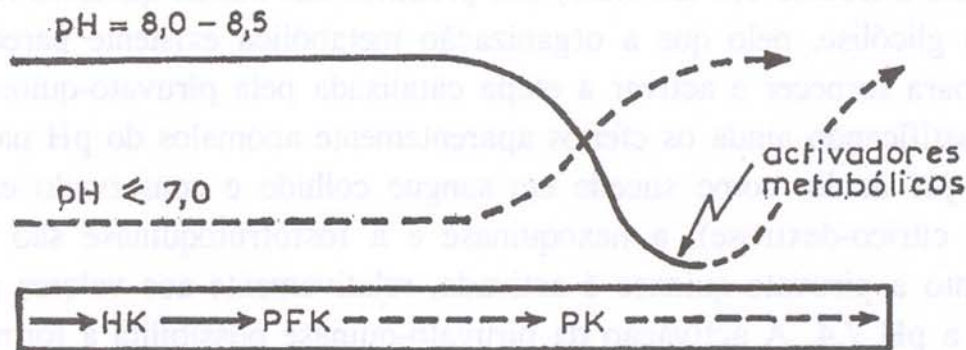


Fig. 11 – Actividade glicolítica relativa, dependente do pH óptimo da hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato-quinase (PK). A glicólise não é inibida a pH alcalino ao nível da piruvato-quinase devido à activação por diversos metabolitos intraglobulares.

Atendendo a que as três quinases referidas participam na regulação da glicólise seria previsível que o pH óptimo para aquela sequência oscilasse por pH 7,5, o que não parece suceder; experiências com eritrocitos intactos demonstraram que a produção de lactato a partir da glicose decorre a pH óptimo de 8,1, o que se aproxima bastante do pH óptimo para a fosfofrutoquinase e hexoquinase e difere do requerido pela piruvato-quinase. Explica-se daqui a acumulação da frutose 1,6-difosfato e de ambas as trioses-fosfato verificada a pH alcalino, por um lado, devido à reduzida acção reguladora da fosfofrutoquinase a pH superior a 7,6 e, por outro lado, devido à limitação imposta pelo piruvato-quinase, pouco activa naquelas concentrações hidrogeniónicas. Nestas condições, acentua-se a restrição do piruvato, com reflexos imediatos na regulação $NAD^+/NADH$, que diminui cerca de duas vezes quando o pH passa de 7,2 para 8,2, ocasionando ainda a diminuição do ATP e elevação do ADP e AMP.

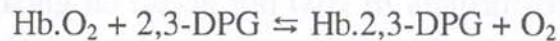
Parecem existir moduladores intraglobulares que activam a piruvato-quinase a pH alcalino; a frutose 1,6-difosfato será um desses moduladores, a

par de outros intermediários fosforilados da glicólise embora não esteja ainda claro se as concentrações requeridas são as necessárias em condições fisiológicas. Dos estudos com enzimas purificadas verifica-se que a piruvato-quinase é activada, por ordem decrescente de eficácia, pela frutose 1,6-difosfato >fosfoenolpiruvato> glicose 6-fosfato; esta relação poderia ser diferente nas condições globulares, considerando as reduzidas concentrações eritrocitárias do fosfoenolpiruvato. Todavia, os restantes metabolitos (glicose 6-fosfato e frutose 1,6-difosfato) são produtos das outras quinases reguladoras da glicólise, pelo que a organização metabólica existente parece ser a ideal para fornecer e activar a etapa catalisada pela piruvato-quinase (Fig. 11), justificando ainda os efeitos aparentemente anómalos do pH na glicólise. A pH ácido, como sucede em sangue colhido e conservado em ACD (ácido cítrico-dextrose), a hexoquinase e a fosfofrutoquinase são inibidas enquanto a piruvato-quinase é activada, relativamente aos valores determinados a pH 7,4. A activação da piruvato-quinase possibilita a formação de ATP, contudo, à custa do consumo de 2,3 difosfoglicerato e fosfoenolpiruvato.

Ao diminuir a relação $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ a pH alcalino, sobrevêm alterações na reacção da desidrogenase do gliceraldeído-fosfato; a acumulação do substracto da reacção, o gliceraldeído 3-fosfato, reforçada pelo decréscimo eventual do P_i , acompanha-se do aumento dos substractos da reacção antecedente. Estas alterações não dependem do efeito do pH na desidrogenase do gliceraldeído-fosfato a pH 7,2 e, mesmo, a valor superior. A actividade daquela enzima revela-se dependente da fosfofrutoquinase a pH mais baixo e da piruvato-quinase a valores superiores de pH, exercendo, por seu lado, reduzida acção reguladora na glicólise, neste caso indirectamente influenciada pela relação $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$. A demonstrar a importância desta relação estão os resultados obtidos com oxidantes (p. ex.. azul do metileno) que, ao elevarem a relação $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$, ocasionam a depleção da frutose 1,6-difosfato e trioses-fosfato; os redutores exercem efeitos opostos.

Entretanto, pH superior a 8,5, quer a frutose 1,6-difosfato quer as trioses-fosfato voltam a diminuir, neste caso, devido ao acentuado decréscimo em ATP, manifestamente insuficiente para a fosforilação da glicose pela hexoquinase; em consequência, diminui o fluxo glicolítico. A pH alcalino, o excesso relativo na fosforilação da glicólise pela hexoquinase e fosfofrutoquinase e subsequente acumulação de metabolitos, deixam de ser equilibra-

dos pela formação de ATP, elevando-se a relação ADP/ATP. A piruvato-quinase exerce, nestas condições, uma poderosa acção reguladora na formação de ATP e, indirectamente, na síntese do 2,3-difosfoglicerato. Enquanto a utilização do fluxo metabólico pela fosfoglicerato-quinase é determinada pela concentração de 3-fosfogliceroil-fosfato e relação ADP-Mg/ATP-Mg, a formação do 2,3-difosfoglicerato depende da relação 3-fosfogliceroil-fosfato/2,3-difosfoglicerato, sendo favorecida a pH alcalino. Os níveis de Mg^{2+} intraglobular influenciam ainda o efeito exercido pela 2,3-difosfoglicerato na actividade da piruvato-quinase; a baixas concentrações de Mg^{2+} , o 2,3-difosfoglicerato inibe a piruvato-quinase, verificando-se o oposto em concentrações elevadas daquele ião. Resta esclarecer se o efeito do 2,3-difosfoglicerato é exercido por interacção directa com a enzima ou por quelatar o Mg^{2+} , indispensável à sua actividade catalítica. Ao determinar a formação do 2,3-DPG e ATP eritrocitários, a piruvato-quinase influencia marcadamente a regulação metabólica globular e funções da hemoglobina. Neste aspecto, ambos os metabolitos são potencialmente capazes de controlar a cedência de oxigénio para os tecidos, ao fixarem-se de preferência à desoxiemoglobina, em vez da oxiemoglobina:



O 2,3-DPG é o mais importante de ambos, não só por se fixar mais fortemente à desoxiemoglobina como ainda por existir em concentrações mais elevadas que o ATP, nos eritrocitos. Teoricamente um aumento de 25% na concentração de 2,3-DPG eleva em cerca de 22% a cedência de oxigénio da hemoglobina, em repouso.

No decurso do ciclo normal de oxigenação-desoxigenação eritrocitária são de prever oscilações na actividade glicolítica, em parte determinadas pelo pH intraglobular. Essas alterações, com reflexo na formação do 2,3-DPG, talvez estejam relacionadas com o comportamento da piruvato-quinase. Assim, à medida que os eritrocitos circulam dos pulmões para os tecidos periféricos, aumenta a percentagem de desoxiemoglobina e, simultaneamente, a actividade glicolítica; sendo os níveis de nucleótidos adenílicos globulares substancialmente superiores aos do fosfoenolpiruvato, prevalece a conformação menos activa da piruvato-quinase, que reage mais lentamente ao aumento progressivo da fosfoenolpiruvato quando a glicólise é induzida. O atraso na utilização da fosfoenolpiruvato possibilita a formação de 2,3-

DPG e de todos os metabolitos relacionados, facilitando a libertação de oxigénio para os tecidos durante a perfusão capilar. Níveis transitoriamente elevados do fosfoenolpiruvato aceleram a conversão da piruvato-quinase na sua forma mais activa, possibilitando a utilização de intermediários glicolíticos (que se haviam acumulado a montante) e a deplecção do 2,3-DPG; após serem restaurados os níveis iniciais daqueles metabolitos, o processo repetir-se-ia sucessivamente no decurso da desoxigenação-oxigenação *in vivo* dos eritrocitos.

Outro mecanismo regulador da piruvato-quinase consiste na variação para um estado alostérico menos activo, por acção de proteína-quinases dependentes do AMP cíclico; essa conformação, subsequente à incorporação de 4 grupos fosfato por tetrâmero, caracteriza-se por uma afinidade reduzida para o fosfoenolpiruvato e aumento da inibição pelo ATP, em tudo comparável à enzima hepática; as propriedades cinéticas para a frutose 1,6-difosfato não são afectadas pela fosforilação.

Na ausência de metabolitos cíclicos, a piruvato-quinase eritrocitária pode ser fosforilada, *in vitro* na presença de elevadas concentrações de ATP.

A importância fisiológica daquela alteração é evidente para a enzima hepática que, ao ser fosforilada *in vivo* por acção da glicagina, reprime a glicólise a favor da activação da neoglicogénese. A inexistência de neoglicogénese eritrocitária não permite explicar do mesmo modo o efeito da fosforilação da proteína quinase. Todavia, a fosforilação endógena daquela enzima eritrocitária não se acompanha de alterações no consumo da glicose ou formação de lactato e outros intermediários glicolíticos; particularmente, as relações fosfoenolpiruvato/piruvato e 2,3-DPG/ATP, modificadas em situações de deficiência congénita ou inibição da piruvato-quinase, não são afectadas pela fosforilação da enzima. Poder-se-ia admitir que as concentrações da frutose 1,6-difosfato e glicose 1,6-difosfato são sempre suficientemente elevadas para estabilizar a enzima na forma activa, esteja ou não fosforilada.

Mesmo que a fosforilação da piruvato-quinase fosse limitativa da glicólise, ficava por explicar o mecanismo subjacente que a regula. Na realidade, a adenilato-ciclase nos eritrocitos humanos maduros não só apresenta actividade muito baixa como ainda é insensível aos efeitos hormonais, ao contrário do que sucede nos eritroblastos e reticulocitos, que contêm adenilato-ciclase bastante activa. Resta ainda esclarecer se a fosforilação da piruvato-quinase ocorre *in vivo* e se, de facto, exerce qualquer acção fisiológica.

REGULAÇÃO DA SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO 2,3-DIFOSFOGLICERATO

Os níveis intraglobulares de 2,3-difosfoglicerato resultam de um equilíbrio entre a sua síntese e degradação, na dependência da concentração do 3-fosfoglicerato e outros factores pouco esclarecidos. Em termos gerais, poder-se-á considerar que a concentração do 2,3-DPG aumenta quando a actividade da fosfofrutoquinase é, relativamente à da piruvato-quinase, superior, quer por diminuir a inibição da fosfofrutoquinase quer por menor actividade da piruvato-quinase.

De facto, tem sido referida uma relação inversa entre a actividade da piruvato-quinase e os níveis do 2,3-DPG. Esta interrelação resultaria de duas condições intraglobulares: na primeira, todas as reacções entre a frutose 1,6-difosfato e o fosfoenolpiruvato estão em virtual equilíbrio metabólico; a segunda, resulta da concentração do fosfoenolpiruvato ser habitualmente muito superior à do valor do seu K_m para a piruvato-quinase. Em consequência, quando a concentração do fosfoenolpiruvato (e dos metabolitos que o originam) aumenta, eleva-se também o nível do 3-fosfogliceroil-fosfato, agora desviado para a síntese do 2,3-DPG.

Esta situação é comprovada em eritrocitos deficientes em piruvato-quinase, em que todos os intermediários metabólicos a montante se encontram elevados; em consequência, assiste-se à activação da «difosfoglicerato-mutase», eventualmente associada a menor actividade da «difosfoglicerato-fosfatase».

Além do efeito do pH e da relação de actividades fosfofrutoquinase/piruvato-quinase, a distribuição do 3-fosfogliceroil-fosfato para o ciclo de Rapoport-Luebering é também favorecida pelo aumento do P_i ; a proporção eleva-se ainda mais em anaerobiose, talvez devido à diminuição do efeito inibidor exercido pelo 2,3-difosfoglicerato sobre a própria «mutase», na sequência da fixação preferencial daquele metabolito à desoxiemoglobina em excesso. Todavia, nos eritrocitos humanos que contêm 2,3-difosfoglicerato e hemoglobina em abundância, parece actuar outro mecanismo, que tende a elevar o teor globular do 2,3-difosfoglicerato em anaerobiose. Esse mecanismo baseia-se em que a desoxiemoglobina, sendo um ácido mais fraco que a forma oxigenada, fixa iões de hidrogénio, o que se reflecte no aumento do pH intraglobular. Embora pequena, esta alteração do pH em anaerobiose deverá influenciar fortemente o metabolismo do 2,3-difosfoglicerato, aumen-

tando a sua concentração eritrocitária. Já foi referida a rápida degradação do 2,3-difosfoglicerato no sangue preservado em ACD, por diminuição do pH para níveis ácidos. Esta modificação assume grande interesse clínico, já que o sangue conservado em ACD não cede oxigénio aos tecidos nas condições desejáveis. De facto, sendo o 2,3-difosfoglicerato um modulador essencial da afinidade da hemoglobina para o oxigénio, a sua presença em baixas concentrações reflecte-se numa maior dificuldade de dissociação do oxigénio para os tecidos periféricos; a situação só é normalizada mais de 24h depois da transfusão, quando a concentração do 2,3-difosfoglicerato recuperar os níveis normais. Para obviar a este inconveniente, propõe-se que seja transfundido apenas sangue com teor normal em 2,3-difosfoglicerato; em alternativa, procura-se diminuir a degradação do 2,3-difosfoglicerato ou restaurar os níveis daquele metabolito nos eritrocitos em depósito, antes da transfusão.

Entre outros processos utilizados, salienta-se a elevação do pH no meio da colheita e preservação, adição de diversos compostos (p. ex., nucleósidos, fosfato inorgânico, piruvato, azul de metileno, dipiridamol, diidroxiacetona, ácido ascórbico) ou a conservação das amostras congeladas. Evidenciam-se muito eficazes na regeneração do 2,3-difosfoglicerato no sangue em depósito as incubações com misturas de inosina, piruvato e fosfato(ou diidroxiacetona e gliceraldeído).

A elevação do 2,3-DPG é uma das consequências do aumento do pH, que também acelera a glicólise. Na sua origem estaria a activação da fosfofrutoquinase a pH alcalino e subsequente acumulação do 3-fosfogliceroil-fosfato, disponível para a síntese no 2,3-DPG; a eventual activação da «difosfoglicerato-mutase» a pH elevado reforçaria o teor intraglobular em 2,3-DPG, talvez sem interferência significativa do 3-fosfoglicerato, também elevado naquelas condições. A valores inferiores de pH verificar-se-ia o oposto, isto é, a inibição da glicólise e redução dos níveis de 2,3-DPG; prolongando as observações *in vitro*, a depressão inicial da glicólise a pH baixo acaba por ser anulada, talvez devido à interrupção do efeito inibidor do 2,3-DPG nas diversas enzimas globulares que afecta (Quadro IV).

Todavia, mesmo que o pH permaneça elevado, a concentração de 2,3-DPG não aumenta indefinidamente, o que poderá ser explicado através de dois mecanismos:

- a) A pH superior ao fisiológico diminui a fixação do 2,3-DPG à hemoglobina, o que eleva a fracção livre intraglobular daquele metabolito

e, por conseguinte, reforça a inibição prolongada sobre a «difosfoglicerato-mutase»;

- b) O 2,3-DPG é um anião e, como tal, afecta o equilíbrio Donnan e o pH intraglobular.

De facto, os 4 grupos de carga negativa existentes na molécula de 2,3-DPG (Fig. 12). impedem-na de atravessar a membrana para o plasma. Daqui resulta que o aumento da concentração do 2,3-DPG (anião não-penetrante) altere a distribuição dos aniões penetrantes (cloreto e bicarbonato) e hidrogeniões, entre o eritrocito e o plasma; o aumento da saída dos aniões penetrantes é compensada pela entrada de hidrogeniões em quantidades crescentes, ocasionando a diminuição do pH intraglobular influente na degradação do 2,3-DPG (activada) e actividade glicolítica (inibida).

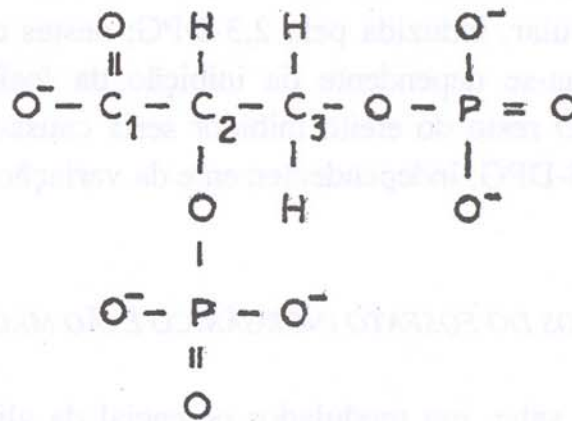


Fig. 12 – Estrutura do 2,3-difosfoglicerato, com destaque para as características polares da molécula.

EFEITO METABÓLICO DO 2,3-DIFOSFOGLICERATO

Outra das funções do 2,3-DPG, não relacionadas directamente com as propriedades respiratórias da hemoglobina, consiste na inibição de algumas das enzimas da glicólise, da via das fosfopentoses e do metabolismo dos nucleótidos. Estes efeitos inibidores resultam da interacção do 2,3-DPG com as proteínas catalíticas e/ou formação de quelatos com um cofactor indispensável, o Mg^{2+} . Conforme foi referido, a actividade glicolítica diminui nos eritrocitos que contêm elevada concentração do 2,3-DPG. Em princípio, esse

efeito inibidor é influenciado por determinadas condições intraglobulares, tais como a percentagem de desoxiemoglobina presente.

De todas as enzimas da glicólise, a hexoquinase é a que se revela mais sensível à inibição pelo 2,3-DPG, deste modo influenciando toda a sequência metabólica; em contrapartida, desconhece-se a relevância fisiológica do efeito inibidor produzido pela 2,3-DPG nas restantes enzimas glicolíticas (fosfofrutoquinase, aldolase, desidrogenase do gliceraldeído-fosfato, fosfogliceratoquinase), que não parecem ser afectadas significativamente por concentrações elevadas daquele metabolito. Quanto à piruvato-quinase, embora seja inibida por concentrações elevadas de 2,3-DPG, não deverá exercer grande influência na consumo da glicose em eritrócitos com 2,3-DPG em excesso, atendendo à localização em que se encontra na sequência glicolítica.

Observações exaustivas permitiram concluir que cerca de 50% da inibição da glicólise em eritrócitos com 2,3-DPG elevado seria devida à diminuição do pH intraglobular, induzida pelo 2,3-DPG; nestas condições, a actividade glicolítica torna-se dependente da inibição da fosfofrutoquinase, por diminuição do pH. O resto do efeito inibidor seria causado pela inibição da hexoquinase pela 2,3-DPG, independentemente da variação do pH.

EFEITOS METABÓLICOS DO FOSFATO INORGÂNICO E IÃO MAGNÉSIO

O Pi é, como se sabe, um modulador potencial da glicólise eritrocitária. Quando em concentrações elevadas e a pH alcalino estimula a fosfofrutoquinase, libertando-a da inibição pelo ATP. Todavia, aquelas condições de pH impõem uma restrição ao fluxo metabólico através do piruvato-quinase, ocasionando a acumulação de metabolitos precedentes e a diminuição da relação NAD^+/NADH ; em consequência, a desidrogenase do gliceraldeído fosfato acaba por ser inibida, quer pela insuficiência em NAD^+ quer pelo excesso de produto (3-fosfogliceroil-fosfato).

Além do efeito induzido na fosfofrutoquinase, o Pi é um activador importante da hexoquinase e da piruvato-quinase, ao diminuir a inibição imposta, respectivamente, pela glicose 6-fosfato e ATP; é ainda um substracto essencial à gliceraldeído-fosfato desidrogenase e, pelo menos *in vitro*, opõe-se à acumulação do 2,3-DPG. *In vivo*, a deficiência em fosfato circulante, quando acentuada, pode inibir a glicólise eritrocitária, devido essencialmente à limi-

tação da desidrogenase do gliceraldeído-fosfato. Este efeito, evidenciado ao fim de algumas semanas, traduz-se na diminuição dos níveis eritrocitários de ATP e 2,3-DPG; a restrição em ATP acaba por limitar a fosforilação da glicose pela hexoquinase, reforçando a diminuição da actividade glicolítica.

Tal como sucede para o Pi, também deficiências dietéticas em Mg^{2+} induzem experimentalmente, em ratos e cães, a diminuição da glicólise eritrocitária. Em parte, este efeito resultará do envolvimento do Mg^{2+} , sob a forma de complexos com nucleótidos adenílicos (ATP-Mg, ADP-Mg) nas reacções catalisadas pelas 4 quinases glicolíticas. Aparentemente, a hexoquinase é a enzima mais sensível à falta de ATP-Mg, seguindo-se, por ordem de importância, a piruvato-quinase; a diminuição dos níveis de ADP-Mg parece ser a causa da acumulação acentuada de metabolitos que precedem a reacção catalisada por aquela enzima.

EFEITOS REGULADORES DA VIA DAS FOSFOPENTOSSES

A glicólise é potencialmente afectada pela actividade da via das fosfopentoses. Embora o assunto ainda não tenha sido devidamente estudado, é admissível que em situações de maior consumo de glicose pela via das fosfopentoses aumente a concentração de gliceraldeído-3-fosfato e frutose 6-fosfato na via glicolítica, contribuindo para a elevação dos níveis de ATP e 2,3-DPG. Este mecanismo é evidenciado pela eficácia da inosina e azul de metileno no aumento da concentração do 2,3-DPG. O efeito da inosina resulta da sua transformação em ribose-fosfato e subsequente utilização pela via das fosfopentoses; o azul do metileno, ao reoxidar o NADPH, eleva o consumo de glicose por aquela via, conduzindo a idênticos resultados *in vitro*. Eventualmente, a piruvato-quinase poderá ser protegida da oxidação intraglobular por aumento do formação de NADPH. Aquela enzima revela-se muito sensível à oxidação dos seus grupos sulfidrílicos que, por ser muito rápida, altera de imediato as respectivas propriedades cinéticas. Embora a frutose 1,6-difosfato, como modificador alostérico, possa ultrapassar os efeitos de oxidação da piruvato-quinase, restaurando-lhe a actividade máxima, admite-se a existência de um mecanismo intraglobular com igual eficácia *in vivo*.

DEPENDÊNCIA DA ANAEROBIOSE

O efeito estimulador da anaerobiose no aumento do 2,3-DPG globular já foi referido. Entretanto, a actividade glicolítica é, em glóbulos vermelhos incubados sob azoto, também acelerada, assemelhando-se este comportamento ao efeito Pasteur nas células com mitocôndrias. Na presença de oxigénio, verificou-se o oposto isto é, diminuição da glicólise e da formação do 2,3-DPG. Isto não significa que o oxigénio participe directamente nas oxidações metabólicas eritrocitárias, pois que incubações com monóxido de carbono conduzem a idênticos resultados. Na base deste mecanismo encontra-se a hemoglobina que, ao fixar o oxigénio ou, mais avidamente ainda, o monóxido de carbono, induz efeitos relevantes na glicólise e ciclo de Rapoport-Luebering. A situação reveste-se de importância prática, confirmada pela elevação dos níveis de 2,3-DPG em indivíduos com hipóxia de altitude, insuficiência respiratória crónica ou anemia de diversos tipos.

Inicialmente, pensava-se que a diminuição da glicólise e do 2,3-DPG resultasse da acidificação intraglobular, subsequente à libertação de hidrogeniões fixados à desoxiemoglobina no decurso da sua reoxigenação ou fixação de monóxido de carbono.

Ao verificar-se que as concentrações do 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato e fosfoenolpiruvato aumentavam em glóbulos oxigenados ou incubados com monóxido de carbono (ao contrário do que se poderia prever unicamente pela diminuição do pH), foi proposto em alternativa um outro mecanismo, centrado no 2,3-DPG; assim, este metabolito, ao dissociar-se da desoxiemoglobina no decurso da oxigenação ou fixação de monóxido de carbono, seria o responsável directo pela diminuição da sua própria síntese (ao inibir a «difosfoglicerato-mutase») e pela depressão de actividade glicolítica em geral (ao inibir as quinases). É admissível que, além do 2,3-DPG, também os outros fosfocompostos (sobretudo o ATP) eritrocitários com afinidade para a desoxiemoglobina participem na regulação da glicólise, ao influenciarem a hexoquinase e fosfofrutoquinase. Todavia, *in vitro*, a estimulação da glicólise pela desoxiemoglobina poderá verificar-se sem que haja alteração da concentração intraglobular de 2,3-DPG e ATP; a baixa dos níveis daqueles metabolitos no estado livre devido à sua fixação à desoxiemoglobina, justifica a diminuição do efeito inibidor exercido sobre a hexoquinase, fosfofrutoquinase e, talvez também, sobre a piruvato-quinase, com reflexos na activação da

glicólise. A inalteração dos níveis de 2,3-DPG nas condições referidas será atribuída à lentidão que caracteriza a resposta do seu sistema formador à anaerobiose; isto não invalida que o 2,3-DPG aumente gradualmente durante dias, em situações de hipoxemia *in vivo*, embora torne improvável a adaptação dos níveis daquele metabolito no decurso do ciclo de oxigenação/desoxigenação da hemoglobina. Em consequência, poder-se-ia concluir que o estado de oxigenação da hemoglobina influencia, por si, a actividade glicolítica eritrocitária em condições fisiológicas.

Agradecimentos

O autor agradece ao Sr. Chim W. San pela ilustração gráfica do texto e à Sra. D. Emília Alves, que o dactilografou.

Este trabalho insere-se no âmbito da linha 2 do Centro MbL2-INIC.

BIBLIOGRAFIA

- ASAKUTA T., SATO Y., MINAKAMI S., YOSHIKAWA H. pH dependency of 2,3-diphosphoglycerate content in red blood cells. *Clin Chim Acta* 1966; 14: 480.
- BADWEY J.A., WESTHEAD E.W. Hysteretic response of human erythrocyte pyruvate kinase to phosphoenolpyruvate. *J Biol Chem* 1976; 251: 5600.
- BADWEY J.A., WESTHEAD EW. Potencial regulatory properties of human erythrocyte pyruvate kinase. In: «The Red Cell». G J Brewer (ed) Alan R Liss New York 1978, pg 299.
- BEUTLER E. 2,3-diphosphoglycerate affects enzymes on glucose metabolism in red blood cells. *Nature New Biol* 1971; 232: 20.
- BEUTLER E. «Hemolytic Anemia in Disorders of Red Cell Metabolism». Plenum Med Book Co New York 1978.
- BRAND K. QUADFLIEG K.H. Interrelationship between energy metabolism from various substrates and the 2,3-diphosphoglycerate bypass in human erythrocytes. *Acta Biol Med Germ* 1977; 36: 507.
- BREWER G.J. General red cell metabolism In: «The Red Blood Cell», vol I, 2ª ed D MacSurgenor (ed) Acad Press New York 1974; pg 387.
- BREWER GJ. Red cell metabolism and function. In: «The Red Blood Cell», vol I, 2ª ed D MarSurgenor (ed) Academic Press New York 1974; pg 473.
- DAWSON R.B., ELLIS T.J., SPURLOCK D.W., HERSHEY R.T. Blood preservation using metabolic regulators and nutrients. I Pyruvate and DHA (dihydroxyacetone). *Milit Med* 1976; 141: 691.

- DAWSON R.B., HERSHEY R.T., MYERS C.S. Preservation of erythrocytes using metabolic regulation and nutrients. V Inosine and methylene blue. *Amer J Clin Path* 1978; 69: 505.
- DELIVORIA-PAPADOPOULOS M., OSKI F.A. FOTTLIEB A.J. Oxygen hemoglobin dissociation curves: effect of inherited enzyme defects of red cell. *Science* 1969; 165: 601.
- DUHM J., GERLACH E. Metabolism and function of 2,3-diphosphoglycerate in red blood cells. In «The Human Red Cell in Vitro», T J Greenwalt e G A Jamieson (eds) Grune & Stratton Inc New York 1974; pg 111.
- 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.
- GILROY T.E., BREWER G.J., SING C.F. Quantitative genetics of human erythrocyte glycolytic intermediate concentration. In: «The Red Cell», G J Brewer (ed) Alan R Liss Inc New York t 1978. pg 363.
- HASS L.F., MILLER K.B. The identification of multiple molecular forms of human red cell phosphoglycerate mutase and 2,3-disphosphoglycerate synthase by isoelectric focusing. *J Biol Chem* 1978; 253: 3798.
- HASS L.F., MILLER K.B. Human erythrocyte phosphate glycerate mutase-evidence for normal catalysis in the absence of added 2,3-disphospho-D-glycerate. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 95: 132.
- HARVEY J.W., KANEKO J.J. Glucose metabolism of mammalian erythrocytes. *J Cell Physiol* 1976; 89: 219.
- HONDA K., MIYAMOTO M., SASAKAWA S. Changes in 2,3-DPG content and oxygen affinity in erythrocytes stored at 4°C. *Vox Sang* 1979; 37: 229.
- IKURA K., NARITA H., SASAKI R., CHIBA H. Immunochemical and enzymatic properties of biphosphoglycerate mutase/phosphotase and phosphoglyceromutase from human erythrocytes. *Eur J Biochem* 1978; 89: 23.
- JACOBASCH G., MINAKAMI S., RAPOPORT S.M. Glycolysis of the erythrocyte. In: «Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes», H Voshikawa e S Rapoport (eds), Urban & Schwarzenberg München 1974; pg. 55.
- LEE C.S., O'SULLIVAN W.J. Properties and mechanism of human erythrocyte phosphoglycerate-kinase. *J Biol Chem* 1975; 250: 1275.
- LUQUE J., RONCALÉS P., TEGERO R., PINILLA M. Comparative activation by AMP and cyclic AMP of rat erythrocyte and reticulocyte glycolysis. *Acta Biol Med Germ* 1977; 36: 631.
- MANDERCAN J., BOIVIN P. Étude de quelques propriétés de la phosphofrutokinase érythrocytaire de l'homme normal. *Biochimie* 1973; 55: 1341.
- MARIE J., BUC H., SIMON M.P. KAHN A. Phosphorylation of human erythrocyte pyruvate-kinase by soluble cyclic-ATP - dependent protein kinase. *Eur J Biochem* 1980; 108: 251.

FUNÇÃO RESPIRATÓRIA DO SANGUE – II
CONTRIBUIÇÃO DO METABOLISMO ERITROCITÁRIO

- MOORE L.C., BREWER G.J., OELSLEGEL F.J.JR., BREWER L.F., SCHOOMAKER E.B. Pharmacologic stimulation of erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate production in vivo. *J Pharmacol. Exp Therap* 1977; 203: 722.
- MURPHY J.R. Erythrocyte metabolism II Glucose metabolism and pathways. *J Lab Clin Med* 1960; 55: 286.
- NAKAS M., NAKAYAMA T. Decrease in phosphofru-to-kinase activity during blood preservation and the effect of intracellular ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 95: 1294.
- NARITA H., YANAGAWA S., SASAKI R., CHIBA H. Synthesis of 2,3-bisphosphoglycerate synthase in erytroid cells. *J Biol Chem* 1981; 256: 7055.
- OSKI F.A., GOTTLIEB A.J., MILLER W.W., DELIVORIA-PAPADOPOULOS M. The effects of desoxygenation of adult and fetal hemoglobin on the synthesis of red cell 2,3-diphosphoglycerate and its *in vivo* compensation. *J Clin Invest* 1970; 49: 400.
- QUADFLIEG K.H., BRAND K. Carbon balance studies with various substracts in human erythrocytes. *Acta Biol Med Germ* 1977; 36: 639.
- RAPOPORT I., BERGER H., RAPOPORT S.M., ELSNER R., GERBER G. Response of the glycolysis of human erythrocyte to the transition from the oxygenated to the deoxygenated state at constant intracellular pH. *Biochim Biophys Acta* 1976; 428: 193.
- RAPOPORT J., BERGER H., ELSNER R., RAPOPORT S. pH-dependent changes of 2,3-diphosphoglycerate in human red cell during transitorial and steady sates *in vitro*. *Eur J Biochem* 1977; 73: 421.
- RIJKSEN G., STAAL G.E.J. Purification and some properties of human erythrocyte hexokinase. *Biophys Acta* 1976; 445: 330.
- ROSE I.A., O'CONNELL E.L. The role of glucose 6-phosphate in the regulation of glucose metabolism in human erythrocyte *J Biol Chem* 1964; 239: 12.
- ROSE I.A., WARMS J.V.B. Control of red cell glycolysis. *J Biol Chem* 1970; 245: 4009.
- STOCCHI V., MAGNANI M., CANESTRARI F., DACHA M., FORNAINI G. Multiple forms of human red blood cell hexokinase. Preparation characterization and age dependence. *J Biol Chem* 1982; 257: 2357.
- TRAVIS S.F., SUGERMAN H.J., RUBERG R.L., BUDRIAK S.J., DELIVORIA-PAPADOPULOS M., MILLER L.D., OSKI F.A. Alterations of red cell glycosylate intermediates and oxygen transport as a consequence of hypophosphatemia in patients receiving intravenous hyperalimentation. *N Engl J Med* 1971; 285: 763.
- VALERI C.R. Drugs, hormones and the red cell. In: «The Red Blood Cell». vol II, 2ª ed D N Surgenor (ed) Acad Press New York 1975; pg 1303.
- WILBRANDT W., FREI S., ROSENBERG T. The kinetics of glucose transport through the human red cell membrane. *Exp Cell Res* 1956; 11: 59.
- ZIPURSKY A., STEPHENS M., BROWN E.J., LARSEN P. Sulfhydryl groups of the erythrocyte membrane and their relation to glycolysis and drug induced hemolytic. *J Clin Invest* 1974; 53: 805.