

O METABOLISMO DO ERITRÓCITO*

O eritrócito

Os eritrócitos maduros dos mamíferos são células anucleadas que normalmente circulam por alguns meses apesar de sua limitada capacidade sintéticas e do fato de se expor repetidas vezes a insultos mecânicos e metabólicos. O fato de não possuírem núcleo e outras organelas impossibilita a síntese de ácidos nucléicos ou proteínas. A perda da mitocôndria durante a maturação resulta na perda da capacidade de realizar o Ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa e previne a síntese de novo de heme ou lipídeos nestas células (Figura 1).

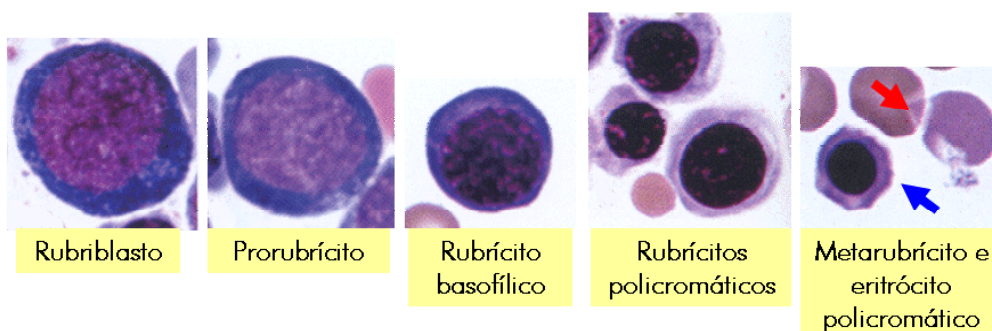


Figura 1. Seqüência de maturação da série eritrocítica na espécie canina (Harvey, 2001).

Os eritrócitos são células únicas que executam funções vitais no organismo. O objetivo primário desta célula é o transporte de hemoglobina (Hb), visto que esta proteína está associada a outras funções como o transporte de oxigênio (O_2), transporte de dióxido de carbono (CO_2) e tamponamento dos íons de hidrogênio (H^+). Estas funções requerem energia sob a forma de ATP (adenina trifosfato).

Embora as demandas metabólicas sejam menores do que as de outras células sangüíneas, os eritrócitos ainda precisam de energia. O ATP é necessário para a manutenção da forma, deformabilidade, fosforilação dos fosfolipídeos e proteínas de membrana, transporte ativo de várias moléculas, síntese parcial de nucleotídeos de purina e pirimidina e síntese de glutathione reduzida (GSH) (Figura 2).

* Seminário apresentado pela aluna Luciana de Almeida Lacerda na disciplina BIOQUIMICA DO TECIDO ANIMAL, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no primeiro semestre de 2005. Professor responsável pela disciplina: Félix H. D. González.

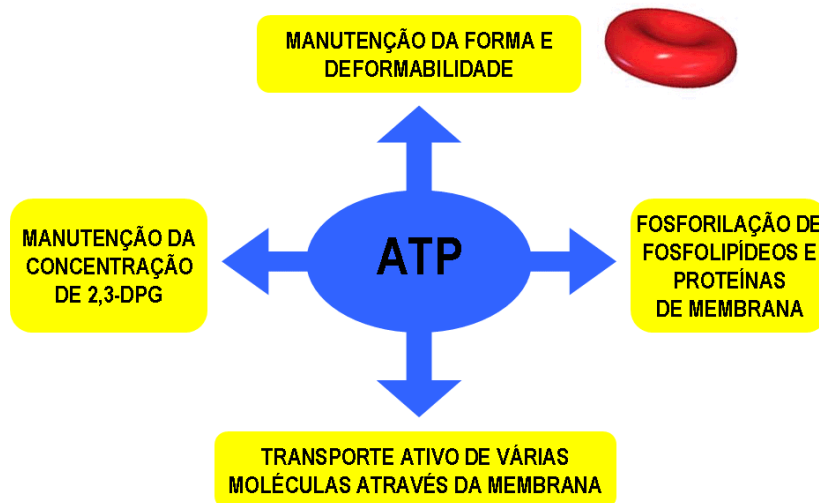


Figura 2. Importância do ATP para o eritrócito.

A hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma proteína composta de grupamentos heme que compõe 95% da proteína total desta célula. Os benefícios de conter hemoglobina dentro das células, ao contrário de livre no plasma, incluem: uma meia-vida maior (a Hb livre no plasma possui uma meia-vida de apenas algumas horas), a capacidade metabólica dos eritrócitos de manter o ferro ligado à Hb em seu estado funcional e a habilidade de controlar a afinidade do oxigênio pela Hb, alterando as concentrações de fosfatos orgânicos (especialmente o 2,3-DPG).

Além disso, a presença de hemoglobina livre no plasma na concentração normalmente encontrada no sangue iria exceder a pressão osmótica muitas vezes mais do que normalmente ocorre pelas proteínas plasmáticas, afetando significativamente o movimento de fluídos entre o sistema vascular e os tecidos.

Forma dos eritrócitos - diferenças entre espécies

Os eritrócitos das espécies de mamíferos domésticos (caninos, felinos, eqüinos, bovinos e ovinos) possuem forma de disco bicôncavo (discócitos). O grau de biconcavidade é maior na espécie canina e menor em felinos e eqüinos. Os eritrócitos dos caprinos geralmente apresentam uma superfície plana ou com uma leve depressão. Outras diferenças na forma dos eritrócitos entre espécies incluem os ovalócitos da família Camelidae, células em foice nos cervos, poiquilócitos em alguns caprinos, células fusiformes na cabra da raça Angorá, e células nucleadas ovais em aves, répteis, anfíbios e peixes, sendo que nestas espécies de vertebrados não-mamíferos o metabolismo destas células é diferenciado (Figura 3).

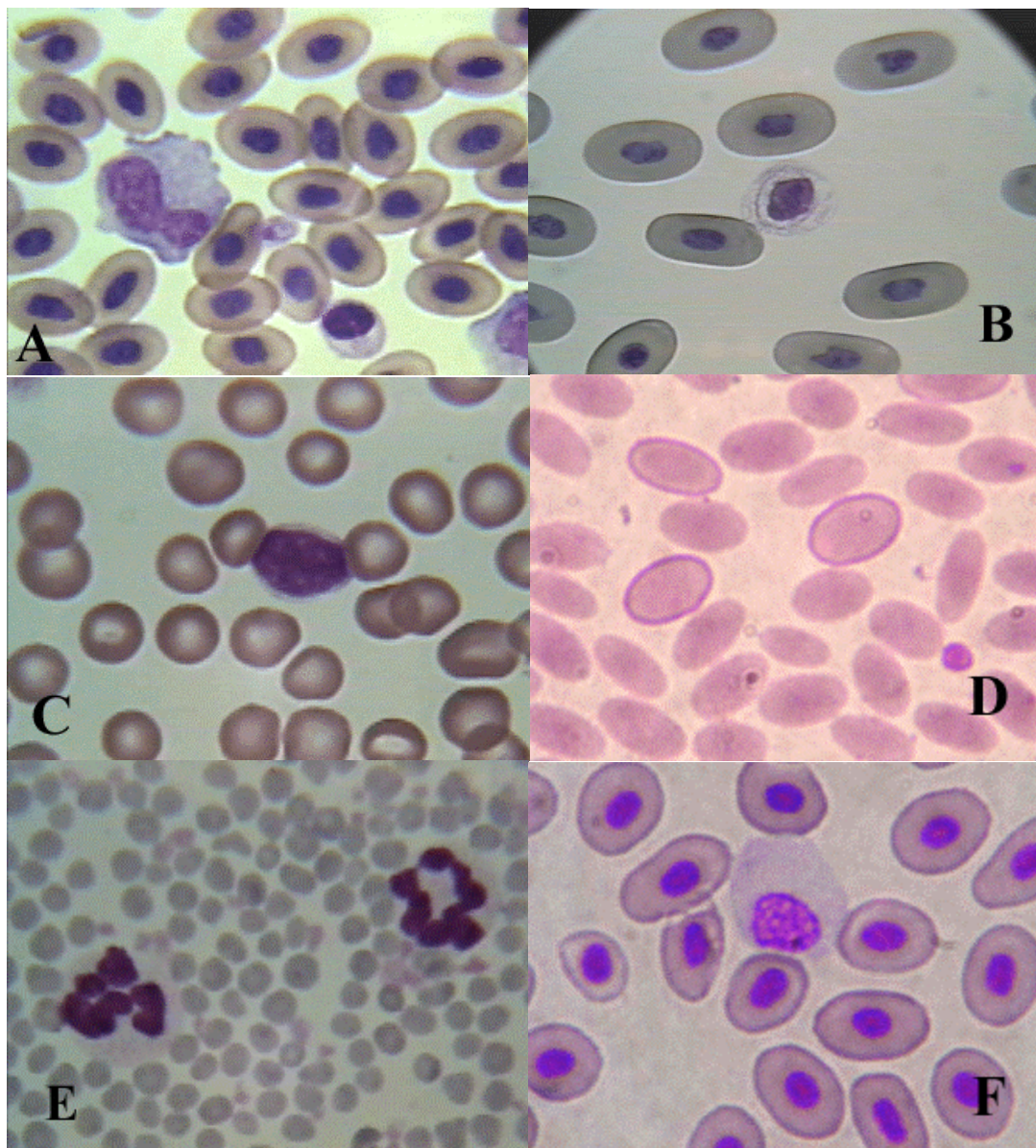


Figura 3. Diferenças na forma dos eritrócitos entre espécies. A) Ave - Frango (Wright/ 1000x); B) Réptil - Cascavel (May-Grünwald/ 1000x); C) Mamífero - Cão (Wright/ 1000x); D) Mamífero - Lhama (Wright/ 1000x); E) Mamífero - Cabra (Panótico/ 1000x); F) Peixe - Jundiá (Wright/ 1000x) (© 2005 Luciana de Almeida Lacerda).

Sobrevida dos eritrócitos na circulação

Estudos comparativos têm demonstrado que a sobrevida do eritrócito está associada a uma série de parâmetros. Atualmente se sabe que a sobrevida do eritrócito varia com a taxa metabólica, que está intimamente ligada à taxa de estresse oxidativo que a célula sofre, e que é inversamente proporcional ao tamanho e à longevidade da espécie (Tabela 1).

Tabela 1. Sobrevida do eritrócito para algumas espécies.

Espécie	Sobrevida do eritrócito (dias)
Cavalo	140 a 145
Vaca	130
Homem	120
Cão	100 a 115
Gato	73
Camundongo	43

(Fonte: Feldman et al., 2000).

As funções do eritrócito

O eritrócito possui diversas funções. As funções de transporte de oxigênio, dióxido de carbono e o tamponamento dos íons de hidrogênio estão interligadas. Cada tetrâmero da Hb pode ligar 4 moléculas de oxigênio quando completamente saturado, por isso o fato da Hb estar contida dentro destas células aumenta cerca de 70 vezes a capacidade de transporte de O₂ quando se compara a quantidade de O₂ que poderia ser transportada se dissolvido no plasma.

Aproximadamente 10% do CO₂ são transportados dissolvidos no sangue, 30% são transportados ligados a grupamentos amina de proteínas, e 60% são transportados na forma de bicarbonato em indivíduos normais. O ácido carbônico é formado quando o CO₂ dissolvido se combina com a H₂O. Esta é uma reação não-enzimática, mas é acelerada pela presença da enzima anidrase carbônica (CA, carbonato desidratase) presente nos eritrócitos. O bicarbonato é formado pela rápida dissociação do ácido carbônico.

A hemoglobina potencializa a formação de bicarbonato através da captação e conseqüente tamponamento de íons hidrogênio, o que desvia o equilíbrio da reação para a direita. Os grupamentos carbamino são formados pela combinação de CO₂ com os grupos terminais das proteínas. A globina da Hb é a proteína de maior importância neste processo.

O transporte de CO₂ dos tecidos para os pulmões como grupamentos carbamino é potencializado devido ao fato de que a desoxihemoglobina se liga duas vezes mais ao CO₂ do que a oxihemoglobina.

A hemoglobina é a proteína tampão de maior importância no sangue devido à sua alta concentração, possui relativamente baixo peso molecular, e possui um grande número de resíduos de histidina com valores de pK_a suficientemente próximos a 7,4 para funcionarem com tampões efetivos. A Hb tem aproximadamente 6 vezes mais capacidade de tamponamento do que as proteínas plasmáticas.

A membrana eritrocitária

A membrana do eritrócito contém aproximadamente quantidades iguais de lipídeos e proteínas. Os lipídeos são fosfolipídeos ou lipídeos neutros, em sua maior parte colesterol não

esterificado, e eles têm papel importante na manutenção da flexibilidade e da deformabilidade celular.

O componente protéico da membrana é representado por diversas proteínas que podem ser divididas em duas porções: proteínas transmembranas (que atravessam a bicamada lipídica) e proteínas interiores (situadas na base da bicamada lipídica).

As principais proteínas transmembranas são a glicoforina A e a proteína banda 3. A glicoforina A possui carboidratos na porção externa da molécula, a presença destes confere carga negativa aos eritrócitos e impede a aglutinação dos mesmos. As glicoforinas (GP) estão relacionadas com os antígenos eritrocitários. A proteína banda 3 está inserida na bicamada lipídica e funciona como canal transportador de ânions e água para a célula. Esta proteína mantém uma ligação importante com as proteínas periféricas ankirina e espectrina, que serve para fixar a membrana ao citoesqueleto.

As proteínas associadas ao citoesqueleto são denominadas de periféricas. Dentre elas estão a espectrina, a actina (banda 5), a ankirina (proteína 2.1), banda ou proteína 4.1, proteína banda 4.2 e a proteína banda 4.9 (Figura 4).

Alterações nos componentes da membrana, lipídeos ou proteínas, podem resultar em mudanças na forma com conseqüente diminuição da resistência aos insultos metabólicos e mecânicos que estas células sofrem constantemente na circulação e aumento da destruição destas células (anemia hemolítica).

Transporte de moléculas

A bicamada lipídica do eritrócito é impermeável à maioria das moléculas, conseqüentemente, várias sistema de proteínas transportadoras de membrana são utilizadas para a movimentação de moléculas para fora e para dentro da célula. A proteína Banda-3 parece funcionar como um poro ou canal aquoso para o transporte de ânions (como o bicarbonato e o cloreto), água, certos não-eletrólitos, e provavelmente alguns cátions.

A bomba de sódio-potássio

As maiores diferenças inter-espécies, e em alguns casos, intra-espécies, estão no transporte de cátions e subseqüentemente nas concentrações intracelulares de sódio (Na^+) e potássio (K^+). As espécies animais com alta concentração (equinos, suínos e alguns ruminantes), possuem um bomba de sódio-potássio ativa que faz a troca do Na^+ intracelular pelo K^+ extracelular com hidrólise de ATP. Algumas espécies possuem altas concentrações de potássio intracelular (HK^+) como alguns ovinos, cabras e búfalos, já a maior parte dos bovinos possui baixo potássio intracelular (LK^+), conseqüentemente, alta concentração de sódio intracelular. Estes eritrócitos LK^+ possuem baixa atividade da bomba de sódio-potássio e alta permeabilidade para o potássio.

Os eritrócitos dos felinos e da maioria dos caninos não possuem atividade da bomba de sódio-potássio e apresentam concentrações de Na^+ e K^+ próximas daquelas definidas por Donnan para o equilíbrio com o plasma. Entretanto, muitos cães japoneses e coreanos clinicamente normais possuem eritrócitos HK^+ , estes cães possuem atividade significativa da bomba de sódio-potássio. Alguns também apresentam aumento do transporte de glutamato, o que resulta em altas concentrações de GSH. Outras vias de transporte de Na^+ e K^+ ocorrem em graus variados em certas espécies.

A bomba de cálcio

O excesso de cálcio (Ca^{2+}) intracelular é deletério ao eritrócito, portanto este é ativamente transportado para fora da célula através de uma bomba (ATPase) dependente de magnésio (Mg^{2+}). A bomba de cálcio é ativada por uma proteína ligante de cálcio (calmodulina).

Transporte de aminoácidos

O transporte de aminoácidos nos eritrócitos garante a síntese de GSH nestas células, além disso, este transporte pode ser responsável pelo efluxo de aminoácidos durante a maturação do reticulócito.

Transporte de glicose

Os eritrócitos das diferentes espécies variam na permeabilidade à glicose, sendo que o humano é o mais permeável e o suíno o menos permeável. As outras espécies parecem ser intermediárias entre estes dois extremos. O transporte da glicose para dentro do eritrócito ocorre de forma passiva (transportador de glicose tipo 1 – GLUT-1) e não é regulado pela insulina. Os eritrócitos de suínos adultos não possuem um transportador de glicose funcional e por isso possuem habilidade limitada para utilizar a glicose para produção de energia.

Transporte de nucleosídeos

As membranas eritrocitárias da maior parte das espécies possuem um transportador de nucleosídeo. O coelho, o suíno e o humano apresentam significativamente mais captação de adenosina do que outras espécies estudadas. Os eritrócitos caninos apresentam maior captação de adenosina do que os felinos, caprinos, ou bovinos. Já os de eqüinos e da maior parte dos ovinos parecem ser impermeáveis a adenosina. Os eritrócitos dos cães parecem ser impermeáveis à inosina. Os eritrócitos felinos e caninos exibem captação de adenina e incorporação aos nucleotídeos, mas os valores são muito mais baixos do que os de humanos, coelhos e roedores.

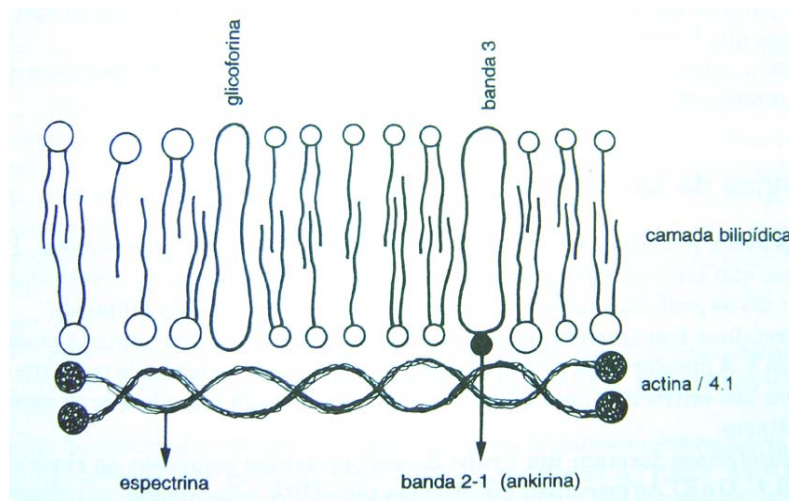


Figura 4. Estrutura simplificada da membrana eritrocitária (Lorenzi, 1999).

Os grupos sangüíneos

Os grupos sangüíneos são definidos por antígenos espécie-específicos presentes na superfície dos eritrócitos. A maior parte dos antígenos é um componente integral de membrana composto por carboidratos complexos associados a proteínas ou lipídeos inseridos na membrana eritrocitária, sendo denominados de glicoproteínas ou glicolipídeos. Entretanto, estes antígenos também podem estar presentes nas plaquetas, nos leucócitos, nos tecidos e em fluídos (soro, saliva) do organismo. Contudo, a especificidade sorológica nestes casos é determinada pela estrutura do carboidrato.

Os antígenos eritrocitários podem variar em imunogenicidade e significado clínico e a detecção e a descrição destes ainda é feita através de testes sorológicos (anticorpos policlonais ou monoclonais). Na medicina veterinária, o significado clínico dos grupos sangüíneos está associado às reações transfusionais e à isoeritrolise neonatal. Os antígenos determinantes dos grupos sangüíneos, por serem marcadores genéticos, podem também ser utilizados para resolver casos de disputa de paternidade, além disso, mesmo que ainda não comprovado, podem estar envolvidos na anemia hemolítica imunomediada e podem servir como marcadores de doenças.

Em humanos existe o sistema de grupos sangüíneos ABO, enquanto que os animais apresentam uma variedade de diferentes sistemas. O conhecimento sobre os tipos sangüíneos de diferentes espécies é de grande importância na medicina veterinária, visto que uma transfusão sangüínea incompatível pode resultar em uma reação transfusional hemolítica severa e até levar o animal à morte, em alguns casos.

Caninos

Os tipos sangüíneos da espécie canina são estudados por diversos grupos de pesquisadores de diferentes países. Nos Estados Unidos os tipos sangüíneos desta espécie são designados pela

sigla DEA (dog erythrocyte antigen – antígeno eritrocitário canino). Atualmente o cão apresenta cinco sistemas de grupos sanguíneos compostos por sete determinantes antigênicos, ou seja, DEAs 1 (subgrupos 1.1, 1.2 e 1.3), 3, 4, 5, 7. Os grupos DEA 6 e DEA 8 foram reconhecidos na Segunda Oficina Internacional em Imunogenética Canina, mas devido à inexistência de anti-soros para estes antígenos e à dificuldade na obtenção destes, tais anti-soros não têm sido estudados.

Felinos

Os tipos sanguíneos dos felinos e as incompatibilidades entre eles, incluindo modo de herança genética, severidade das reações transfusionais, e a incidência de isoeritrolise têm sido estudados durante as últimas duas décadas. O sistema AB de grupos sanguíneos em felinos possui três tipos: A, B e AB, sendo que este último é muito raro. Entretanto, os antígenos de superfície eritrocitária deste sistema são diferentes daqueles do sistema ABO humano.

Outras espécies

Nos eqüinos, 7 sistemas de grupos sanguíneos são reconhecidos internacionalmente (A, B, C, D, K, P, Q, U) que incluem 32 antígenos, devido às várias combinações antigênicas, aproximadamente 400.000 tipos sanguíneos são possíveis, e não existe um doador universal. Os aloantígenos Aa e Qa são extremamente imunogênicos, e a maior parte dos casos de isoeritrolise neonatal são associados aos anticorpos anti-Aa e anti-Qa. Um antígeno encontrado na espécie *Equus asinus* (burro) não foi encontrado em cavalos e é apresentado apenas por burros e mulas.

Nos bovinos, 11 sistemas de grupos sanguíneos são reconhecidos internacionalmente (A, F, J, L, M, Z, R', B, C, S, T'), mas os grupos B e J são os que apresentam maior importância clínica. O grupo B é extremamente complexo, tornando a compatibilidade entre transfusão muito difícil. O antígeno J é um lipídeo que é encontrado nos líquidos corporais e é adsorvido pelo eritrócito, ou seja, não é realmente um antígeno eritrocitário. Os bezerros recém-nascidos não apresentam o antígeno J, mas geralmente o adquirem durante os primeiros 6 meses de vida. Existem variações quanto à quantidade de antígeno J que está presente, alguns bovinos podem ter anticorpos anti-J e, portanto, desenvolvem reações transfusionais quando recebem sangue J-positivo. Vacinas de “origem sanguínea” (algumas vacinas para anaplasmoses e babesioses) podem sensibilizar as vacas aos antígenos eritrocitários, o que pode resultar em uma isoeritrolise neonatal nos bezerros subsequentes.

Nos ovinos, 7 sistemas de grupos sanguíneos são reconhecidos internacionalmente (A, B, C, D, M, R, X). O sistema B nestes animais é análogo ao sistema B dos bovinos, e o sistema R é similar ao sistema J dos bovinos (os antígenos são solúveis e possivelmente adsorvidos ao eritrócito). Os grupos sanguíneos dos caprinos (A, B, C, M, J) são muito similares aos dos

ovinos. Muitos reagentes utilizados para a tipagem de ovinos têm sido utilizados para a tipagem de caprinos.

Nos suínos, 16 sistemas de grupos sanguíneos são reconhecidos internacionalmente (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P). O sistema A está relacionado com J bovino, A humano e E ovino. Os fatores A e O não são componentes intrínsecos da membrana eritrocitária (assim como o J dos bovinos, são antígenos solúveis adsorvidos ao eritrócito após algumas semanas de vida).

Em duas espécies de camelídeos da América do Sul (lhamas e alpacas), 6 fatores e 5 sistemas de grupos sanguíneos foram identificados (A, B, C, D, E, F). Sendo que A e B fazem parte do mesmo sistema denominado A.

O metabolismo dos carboidratos nas hemácias

A glicose é o substrato primário para o requerimento energético dos eritrócitos de todas as espécies, com exceção dos suínos, como já visto anteriormente. Substratos como ribose, frutose, manose, galactose, dihidroxiacetona, gliceraldeído, adenosina, e inosina podem ser metabolizadas até certo ponto, dependendo da espécie.

Uma vez que a glicose entra na célula, ela é fosforilada a glicose 6-fosfato (G6P) pela enzima hexoquinase (HK). A G6P é então metabolizada pela via de Embden-Meyerhof (EMP) ou pela via das pentoses (PPP) (Figura 6).

Via de Embden-Meyerhof (glicólise) e a produção de ATP

Através da via de Embden-Meyerhof, cada molécula de glicose é metabolizada em duas moléculas de lactato e neste processo são geradas duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato). Devido ao fato de que o eritrócito não possui mitocôndria, esta via é a única fonte para a produção de ATP nestas células. As reações catalisadas pela HK, pela fosfofrutoquinase (PFK) e pela piruvato quinase (PK) parecem ser passos taxa-limitantes na glicólise, sendo que a reação da PFK é a mais importante em condições fisiológicas controladas.

A influência do fosfato inorgânico

Com valores de pH fisiológicos, altas concentrações de fosfato inorgânico (P_i) estimulam a glicólise por esta via pela redução da inibição da PFK pelo ATP. Ao contrário deste fato, a glicólise é inibida por deficiência de fosfato de curta duração, principalmente pela redução do P_i intracelular para a gliceraldeído fosfatase desidrogenase (GAPD).

Em um experimento com cães com hipofosfatemia severa por hiperalimentação, observou-se que uma redução da taxa de glicólise resulta em uma redução da concentração de ATP e anemia hemolítica. Anemia hemolítica associada com hipofosfatemia também foi relatada em cães e

gatos diabéticos após tratamento com insulina, em gatos com lipidose hepática e em vacas posparturientes nas quais baixas concentrações de ATP dos eritrócitos foram constatadas.

Coenzima NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo)

Na via de Embden-Meyerhof, a NAD é uma coenzima essencial para a produção de energia no eritrócito e para a formação do lactato na glicólise anaeróbica (Figuras 5 e 6).

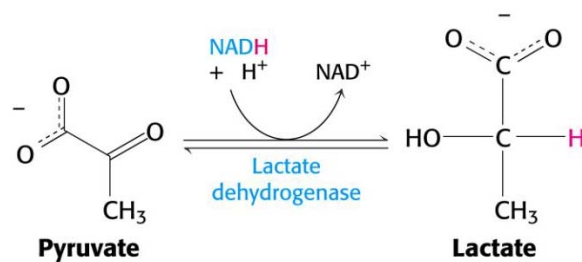


Figura 5. Formação de lactato a partir do piruvato (Karplus, 2005).

Deficiência enzimática

Devido ao fato de que o eritrócito depende unicamente da glicólise anaeróbica para a produção de ATP, deficiências das enzimas envolvidas neste processo podem ter efeitos significantes sobre a sobrevivência do eritrócito. Uma deficiência de PK em cães e gatos resulta em uma moderada a severa anemia hemolítica, a deficiência de PFK em cães leva a uma anemia hemolítica compensada com episódios esporádicos de hemólise intravascular e hemoglobinúria. Cães PFK-deficientes apresentam eritrócitos frágeis à alcalinidade, pois o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) está diminuído nestas células. Os episódios de hemólise intravascular ocorrem quando estes cães aumentam sua taxa respiratória (hiperventilação), o que leva ao aumento do pH sanguíneo.

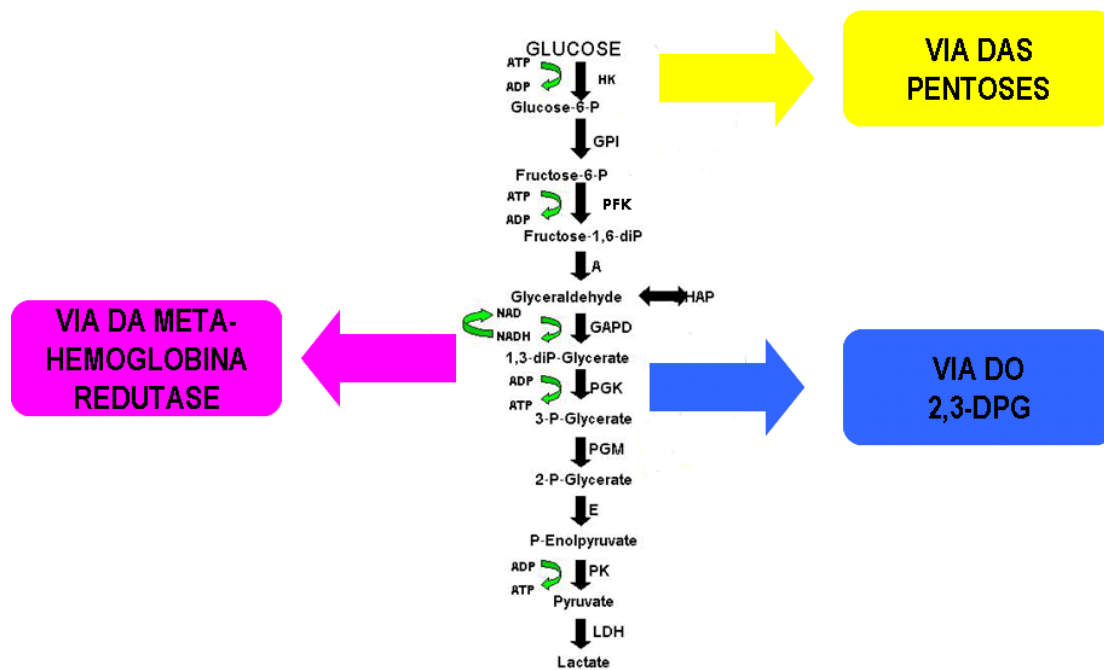


Figura 6. Representação simplificada da Via de Embden-Meyerhof (glicólise) e sua relação com as outras vias metabólicas no eritrócito.

O ciclo de Cori

Ciclo de Cori é o nome dado à reciclagem do lactato produzido na glicólise anaeróbica, o lactato produzido não é utilizado pela célula e através do sangue é transportado até o fígado, único órgão capaz de utilizá-lo para produção de energia (oxidação a CO₂ e H₂O) ou como precursor da glicose no processo de gliconeogênese. Sendo assim, a glicose nova produzida no fígado pode ser utilizada pelas células do organismo novamente (Figura 7).

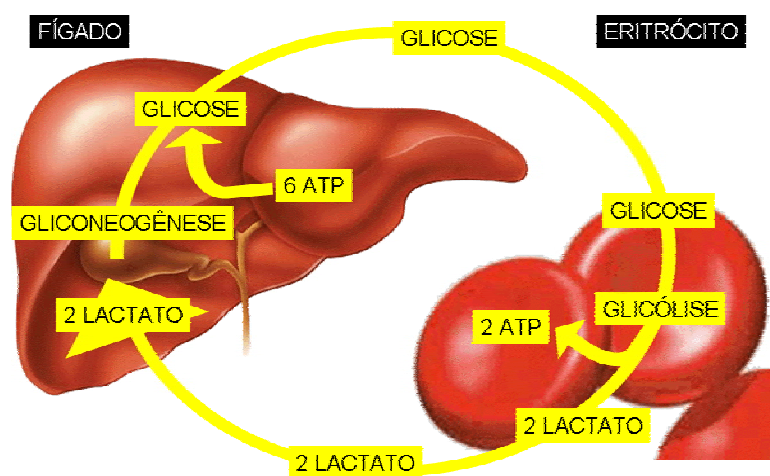


Figura 7. Representação simplificada do ciclo de Cori – destino do lactato produzido pelo eritrócito.

Via do DPG (difosfoglicerato) e a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio

As moléculas de 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG), produzidas pela reação da GAPD, podem ser utilizadas através da reação catalisada pela fosfoglicerato quinase (PGK) na via de Embden-Meyerhof ou podem ser convertidas em 2,3-DPG pela reação catalisada pela difosfoglicerato mutase (DPGM). A degradação do 2,3-DPG a 3-fosfoglicerato (3-PG) é catalisada pela atividade da difosfoglicerato fosfatase (DPGP). A via do DPG (ciclo ou via de Rapoport-Luebering) desvia a glicólise do passo de geração de ATP, consequentemente, nenhum ATP é gerado quando a glicose é metabolizada por esta via (Figura 8).

Os eritrócitos caninos, eqüinos, suínos e humanos normalmente contêm altas concentrações de 2,3-DPG, no entanto, felinos e ruminantes domésticos possuem baixas concentrações. Nos eritrócitos da maior parte das espécies de mamíferos, o 2-3-DPG reduz a afinidade do oxigênio pela hemoglobina. Estudos revelam que devido ao fato de que hemoglobina das espécies com alta concentração de 2-3-DPG possui alta afinidade do oxigênio, o 2,3-DPG é necessário no interior dos eritrócitos destas espécies para a manutenção da afinidade dentro de um intervalo fisiológico.

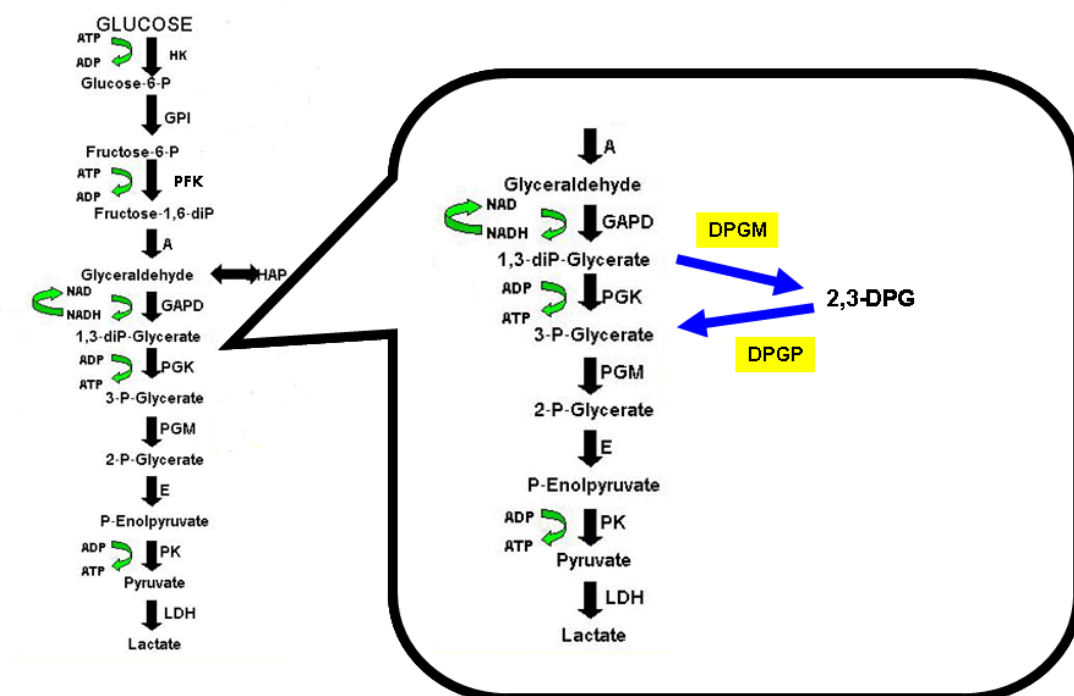


Figura 8. Representação simplificada da via do difosfoglicerato.

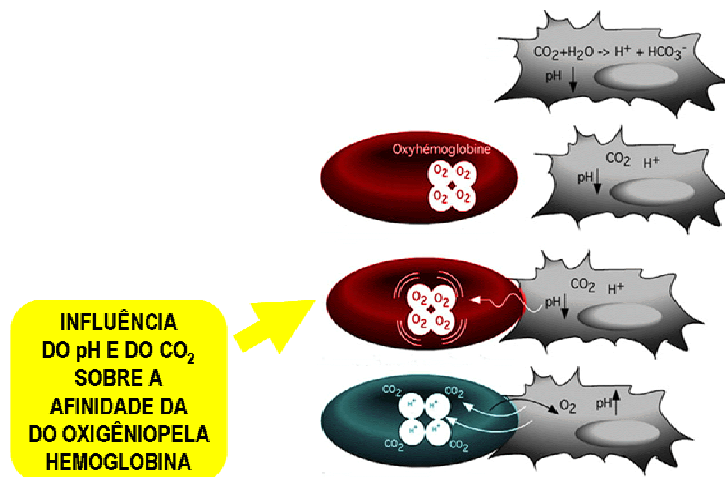


Figura 9. Afinidade do oxigênio pela hemoglobina – influência do pH e do CO₂. (Adaptado de Université de Sherbrooke, 2005).

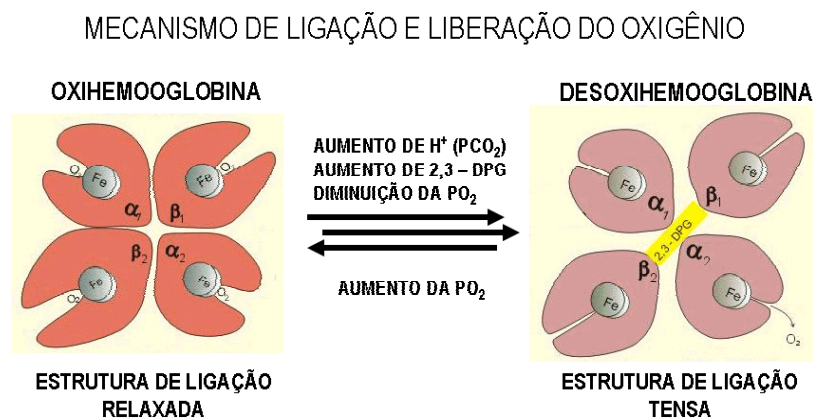


Figura 10. Oxihemoglobina e desoxihemoglobina - ligação e liberação do oxigênio. (Adaptado de Paulev, 2005).

A influência do ATP e do 2,3-DPG na preservação do sangue

O desenvolvimento de meios e soluções de preservação sanguínea possibilitou o armazenamento dos eritrócitos e, conseqüentemente, o trabalho dos bancos de sangue. As maiores preocupações ao desenvolver tais soluções eram a manutenção dos níveis de glicose, adenosina trifosfato (ATP) e 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), ou seja, a manutenção do metabolismo energético eritrocitário através da glicólise. Os eritrócitos possuem funções vitais no organismo como o tamponamento dos íons hidrogênio e o transporte de oxigênio e de dióxido de carbono, mas para a manutenção destas atividades é necessário energia sob a forma de ATP (adenosina trifosfato). A função do 2,3-DPG eritrocitário é se ligar a desoxihemoglobina e facilitar o transporte de oxigênio. Quando ocorre esta ligação, a molécula

de desoxihemoglobina é estabilizada e esta interação a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e permite sua liberação para os tecidos. Portanto, uma diminuição de 2,3-DPG, que ocorre durante o armazenamento do sangue, interfere neste mecanismo, reduzindo a liberação de oxigênio (Figuras 9, 10, 11 e 12).

Em casos críticos, nos quais a liberação de oxigênio aos tecidos seja necessária, pode-se utilizar concentrado de eritrócitos ou sangue total desde que armazenados por um período menor do que duas e quatro semanas, respectivamente (assumindo que a estocagem seja realizada com as seguintes soluções: CPD, CPDA1, Adsol, Nutricel ou Optisol). Este fato não é tão importante em gatos, visto que esta espécie possui normalmente baixos níveis de 2,3-DPG. As soluções mais freqüentemente utilizadas atualmente para o armazenamento de sangue canino e felino são o CPD, CPD2 e o CPDA1.

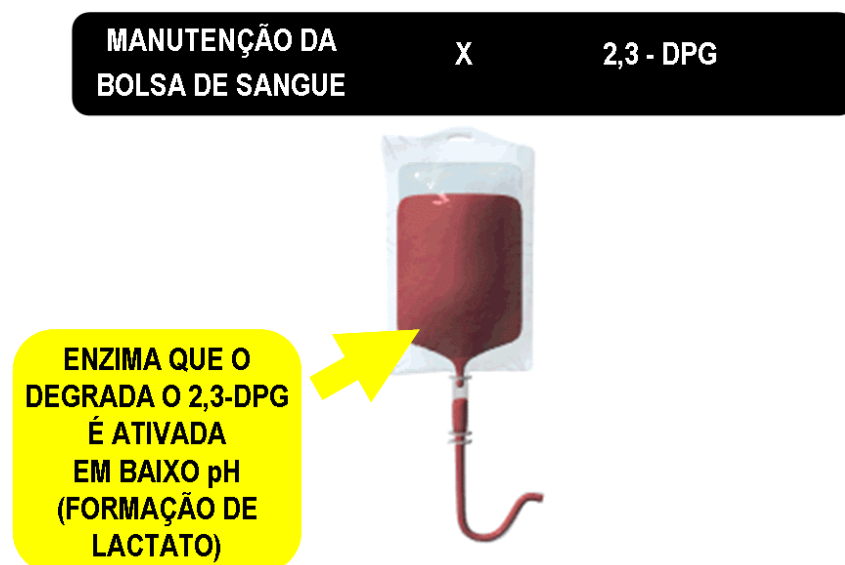


Figura 11. A manutenção da bolsa de sangue versus a concentração de 2,3-DPG.

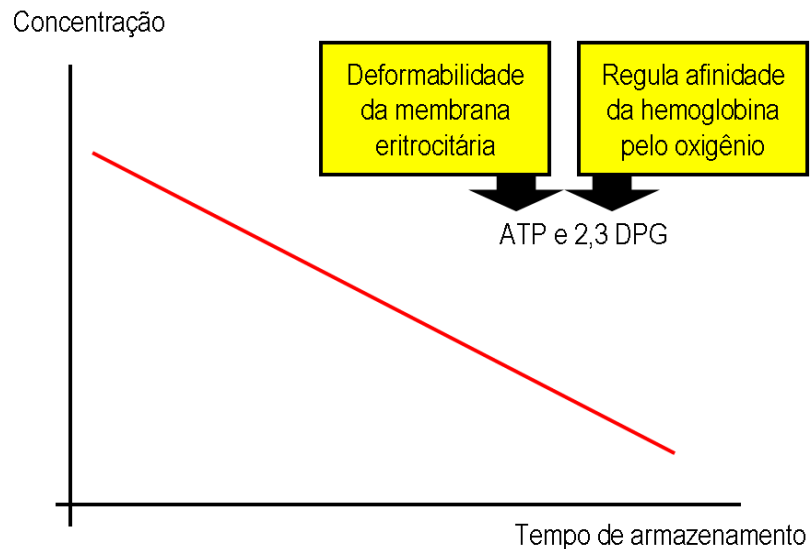


Figura 12. Representação do que ocorre, geralmente, com as concentrações de 2,3-DPG e ATP durante o armazenamento de sangue.

Via das pentoses-fosfato (PPP) e a proteção contra oxidantes

Normalmente apenas uma porção (5 a 13%) da glicose metabolizada pelos eritrócitos é destinada para a via das pentoses (Figura 13), mas isto pode ser acelerado significativamente por oxidantes.

Os eritrócitos circulantes são expostos a oxidantes endógenos, incluindo o superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Como resultado, o dano causado por estes oxidantes podem desempenhar um papel importante no envelhecimento natural e na remoção de células da circulação pelos fagócitos mononucleares.

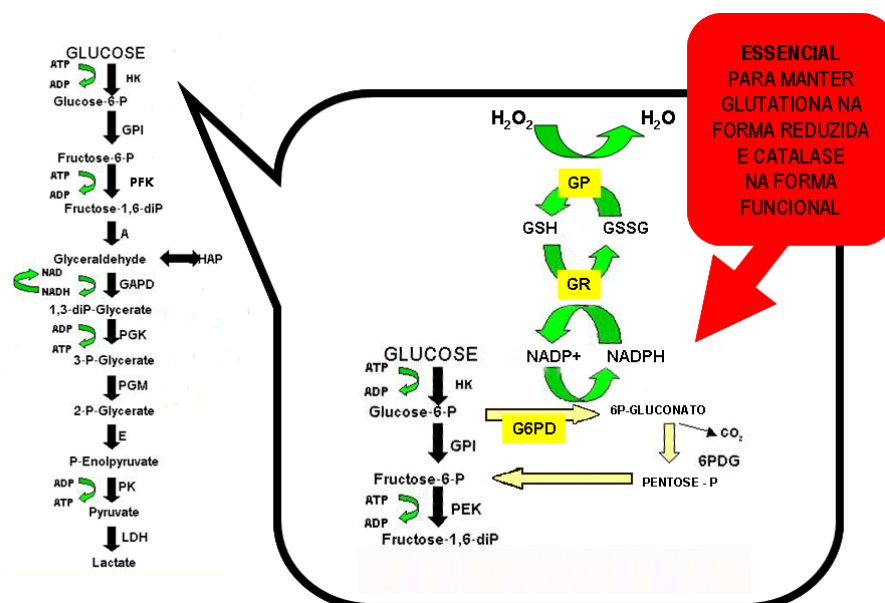


Figura 13. Representação simplificada da via das pentoses-fosfato.

Superóxido desmutase

A superóxido desmutase (SOD) é uma enzima que tem como cofatores o zinco (Zn) e o cobre (Cu) e que catalisa a desmutação de duas moléculas de O_2^- em H_2O_2 e O_2 (Figura 14). A importância da SOD como uma defesa contra oxidantes não está muito esclarecida. Embora geralmente se considere protetora, a SOD pode aumentar significativamente o dano oxidativo em condições em que o catabolismo do H_2O_2 está comprometido.

Presume-se que indivíduos portadores de Síndrome de Down (doença cromossômica que consiste na presença e expressão de três cópias de genes localizados no cromossomo 21) apresentam duplicação da região onde se localiza o gene que codifica a superóxido dismutase-1 (SOD-1). Estudos revelaram que estes indivíduos apresentam atividade desta enzima aumentada em 50% em diferentes tipos de células – eritrócitos, leucócitos, plaquetas e fibroblastos. O aumento da atividade enzimática resulta em um quadro de agressão endógena constante, devido à aceleração da reação de formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ao desequilíbrio entre a atividade da SOD-1 e da glutathiona peroxidase (GSH-Px), com a conseqüente oxidação dos grupos sulfídricos e a peroxidação dos lipídios insaturados causando dano celular. Estes pacientes trissômicos geralmente possuem algumas características como envelhecimento precoce, dano cerebral e modificações bioquímicas que são secundárias ao dano oxidativo dentro da célula.

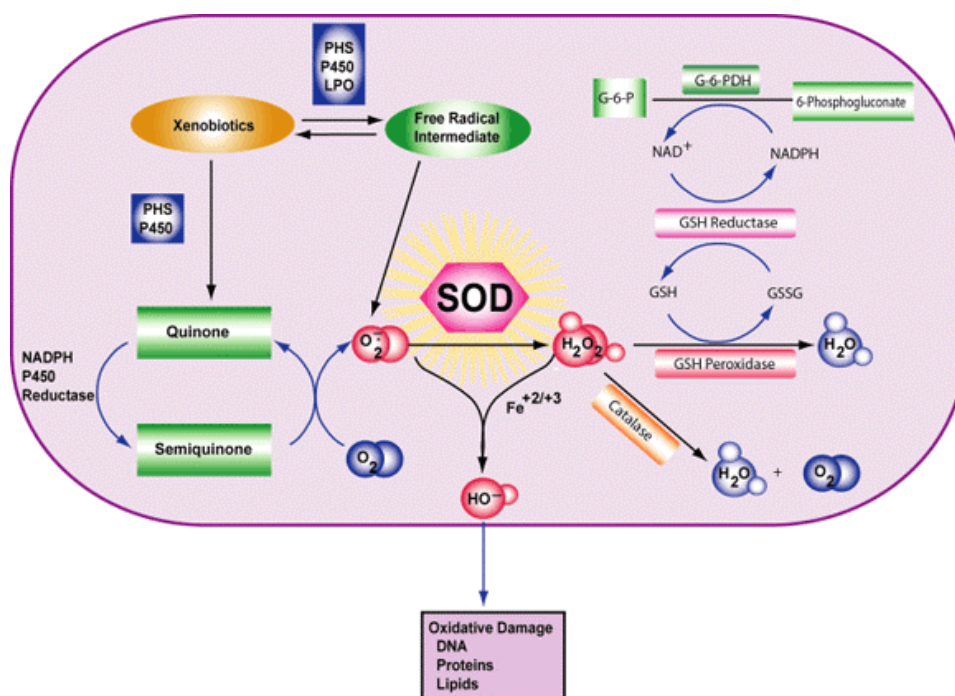


Figura 14. Interligação das funções das enzimas superóxido desmutase, catalase e glutathiona peroxidase (© 2005 Sigma-Aldrich Co.).

A coenzima reduzida NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato)

A NADPH é gerada na via das pentoses é essencial na proteção contra oxidantes. Ela é necessária na manutenção da glutathione em seu estado reduzido e da catalase em sua forma funcional. Defeitos nesta via podem tornar os eritrócitos suscetíveis a danos oxidativos endógenos ou exógenos.

Deficiência de G6PD (glicose 6-fosfato desidrogenase)

A G6P desidrogenase é a enzima de controle desta via. Uma anemia hemolítica persistente foi descrita em cavalos da raça Saddlebred colt americano com menos de 1% da atividade normal da G6P.

A importância da GSH (glutathione reduzida)

A glutathione (ou glutathione) é um tripeptídeo composto de ácido glutâmico (glutamato), cisteína e glicina que é sintetizado nos eritrócitos dos animais por reações que requerem duas moléculas de ATP. A GSH possui um grupo sulfidril altamente reativo (facilmente oxidável) que, como outros tióis, pode agir como um receptor não-enzimático de radical livre para neutralizar o dano oxidativo.

A deficiência de GSH pode ocorrer em alguns ovinos devido à deficiência de gama-glutamylcisteína sintetase (a primeira enzima envolvida na síntese de GSH) ou devido à deficiência do transportador de aminoácidos responsável pelo transporte da cisteína para dentro dos eritrócitos, consequentemente, limitando a entrada de cisteína e restringindo a síntese de GSH.

A glutathione peroxidase (GPx) catalisa a conversão de H_2O_2 em H_2O e participa na destruição de peróxidos orgânicos (Figuras 12 e 13). Em resposta à glutathione reduzida (GSSG) produzida por estas reações, o eritrócito aumenta o metabolismo da via das pentoses para gerar mais NADPH necessário para a regeneração da GSH através da reação catalisada pela glutathione redutase dependente de FAD (flavina adenina dinucleotídeo). A oxidação seletiva de um tiol renovável limita irreversivelmente o dano a proteínas e lipídeos eritrocitários, que poderiam ocorrer se não houvesse esse sistema antioxidante. O selênio (Se) é um cofator essencial para a GPx, sendo incorporado na enzima assim que ela é formada, consequentemente, a deficiência de Se pode resultar na deficiência de GPx, o que pode levar a um aumento da sensibilidade do eritrócito a danos causados por certos oxidantes, como já foi relatado em bovinos.

Catalase

A catalase é uma enzima que contém heme em sua estrutura e também destrói o H_2O_2 por conversão a H_2O e O_2 (Figura 14). Estudos *in vitro* demonstraram que a catalase é de maior importância que a GPx na defesa dos eritrócitos humanos contra reações geradoras de H_2O_2 .

Com exceção dos cães, os eritrócitos de mamíferos geralmente apresentam alta atividade da catalase. A catalase está associada metabolicamente à via das pentoses, pois o NADPH está fortemente ligado à catalase. A ligação do NADPH previne e reverte a acumulação da forma inativa da catalase que é gerada quando esta é exposta ao H_2O_2 .

Vitamina E

A vitamina E (alfa-tocoferol) é uma vitamina lipossolúvel que age como um “caçador” de radicais livres dentro da membrana. A deficiência de vitamina E aumenta a suscetibilidade do eritrócito à hemólise peroxidativa. Estudos indicam que a GSH e o ácido ascórbico estão envolvidos na regeneração da vitamina E oxidada.

Formação de corpúsculos de Heinz

A membrana do eritrócito contém grande número de grupos sulfidrilas e os agentes oxidantes, quando ultrapassar a capacidade metabólica do eritrócito, podem converter estes grupos tióis (R-SH) em componentes dissulfeto (R-SSG), levando à desnaturação das proteínas da membrana. Neste processo, pode ocorrer lesão intracelular, com oxidação da hemoglobina (Hb) à Meta-Hb, a formação de metahemoglobina (a via da metahemoglobina redutase é descrita a seguir) dentro do eritrócito causa agregação protéica e a desnaturação com a formação do corpúsculo de Heinz. A formação destes corpúsculos reduz a deformabilidade do eritrócito e ainda faz com que sejam reconhecidos pelo sistema fagocítico mononuclear, sendo assim os eritrócitos passam a ser retirados da circulação principalmente pelo baço e pelo fígado (hemólise extravascular). A hemoglobina da família Felidae é ainda mais instável e suscetível à oxidação pelo fato de apresentar oito grupos sulfidrilas, as outras espécies apresentam geralmente dois.

Vários são os oxidantes que podem levar à formação de corpúsculos de Heinz. Em gatos: acetaminofen (paracetamol), azul de metileno, propileno glicol, fenazopiridina, cebola, propofol, diabetes melitus, hipertireoidismo e linfoma maligno. Em cães: cebola, acetaminofen (paracetamol), zinco, benzocaína, naftaleno, vitamina K. Em bovinos e ovinos: plantas da espécie *Brassica* sp., cebola. Em eqüinos: folhas secas da espécie *Acer rubrum*, cebolas, fenotiazina e linfoma.

Via da metahemoglobina (Meta-Hb) redutase

A metahemoglobina (MetaHb) se difere da hemoglobina (Hb) pelo fato de que a metade do ferro dos grupos heme está oxidada ao estado férrico (+3), o qual não pode se ligar ao oxigênio, ou seja, a MetaHb é a forma não funcional da Hb. Diariamente, em animais normais, uma pequena parte (aproximadamente 3%) da hemoglobina contida nos eritrócitos sofre oxidação e é transformada em metahemoglobina (Figura 15), entretanto, geralmente indivíduos normais

possuem no máximo 1% de meta-Hb no eritrócito, pois esta está constantemente sendo reduzida à hemoglobina pela reação catalisada pela enzima metahemoglobina redutase dependente de NADH (ou citocromo-b5-redutase), que está presente nos eritrócitos e que requer FAD (flavina adenina dinucleotídeo) como cofator. Os níveis de metahemoglobina estão significativamente aumentados na presença de compostos oxidativos. Uma deficiência da enzima Meta-Hb redutase resulta em metahemoglobinemia persistente em cães e gatos com sinais clínicos mínimos ou ausência destes.

O uso terapêutico do azul de metileno

O azul de metileno (MB) é utilizado no tratamento de metahemoglobinemia tóxica, pois ele causa uma redução da Meta-Hb mais rápida do que a que ocorre através da lenta reação da Meta-Hb redutase dependente de NADH. O MB é reduzido a leucometileno (LMB), pela atividade da diaforase dependente de NADPH, e este reage espontaneamente com a Meta-Hb, reduzindo esta à hemoglobina e regenerando o MB.

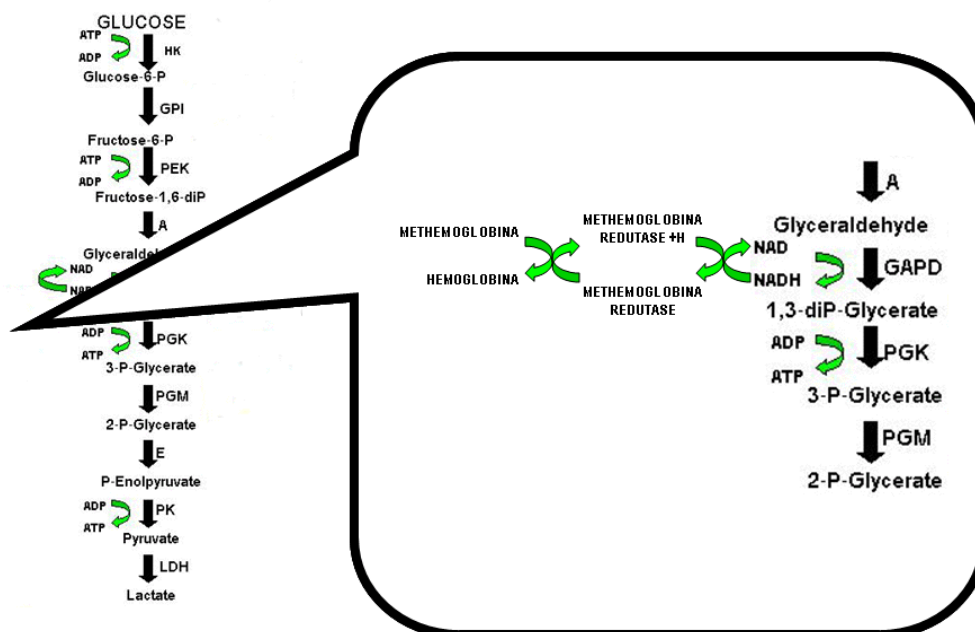


Figura 15. Representação simplificada da via da metahemoglobina redutase.

Causas de metahemoglobinemia

Existem diversas causas para o aumento da formação de metahemoglobina, e a metahemoglobinemia ocorre quando a formação excede a capacidade do eritrócito de realizar o processo de redução.

Quando os animais consomem água contaminada ou plantas com altas concentrações de nitratos, as bactérias do rúmen reduzem estes compostos em nitritos. Os nitritos quando

absorvidos oxidam o íon ferro da hemoglobina transformando-a em metahemoglobina, visto que a MetaHb não se liga ao oxigênio, ocorre anóxia celular. A formação de MetaHb também já foi descrita em gatos por ingestão de cebola (*Allium cepa*)

A coenzima FAD (flavina adenina dinucleotídeo) está envolvida com duas principais enzimas do metabolismo eritrocitário (Figura 16): a enzima citocromo-b5 redutase (Cb5R), também conhecida como metahemoglobina redutase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), que requer a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como um cofator e a enzima glutatona redutase depende de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAPH) e FAD. Um grupo de pesquisadores relatou a deficiência de FAD devido, a um defeito no metabolismo da riboflavina em um equino. Tal deficiência resulta em diminuição da atividade das duas enzimas (Cb5R e GR) e conseqüente metahemoglobinemia, e presença de excentrócitos no sangue periférico (Harvey et al., 2003).

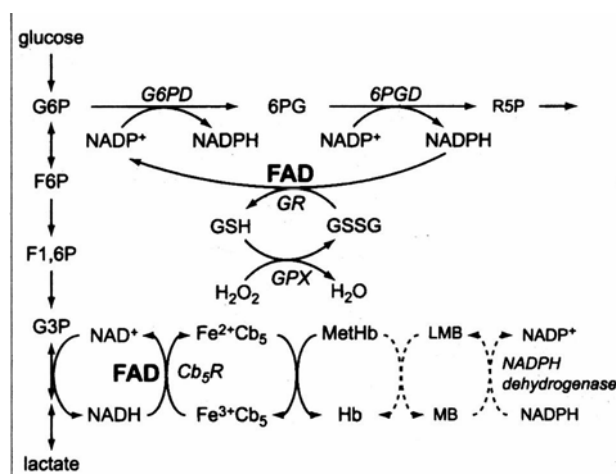


Figura 16. O papel da coenzima FAD no metabolismo do eritrócito (Harvey et al., 2003).

Outras patologias associadas ao metabolismo do eritrócito

O cianeto e o monóxido de carbono são inibidores da fosforilação oxidativa nos tecidos. O cianeto se liga à forma férrica do citocromo oxidase nos tecidos (anóxia citotóxica), enquanto o monóxido de carbono liga-se à forma ferrosa na hemoglobina (hipóxia tissular). A ação inibidora do cianeto é muito potente, enquanto a principal toxicidade do monóxido de carbono reside na sua afinidade pelo ferro da hemoglobina.

Sabendo que os animais (incluindo humanos) possuem muitas moléculas de hemoglobina, é necessário inalar uma quantidade muito grande de monóxido de carbono para morrer. Estes mesmos organismos, contudo, possuem comparativamente poucas moléculas de citocromo oxidase nos tecidos. Consequentemente, uma exposição limitada ao cianeto pode ser letal.

Os cianetos são encontrados em plantas, fertilizantes, rodenticidas e outros produtos. O sorgo, o milho e o trevo branco são exemplos de plantas cianogênicas. Os glicosídeos cianogênicos presentes nestas plantas, sob a ação de ácidos ou enzimas liberadas pela ruptura da estrutura celular, sofrem hidrólise e liberam acetona, açúcar e ácido cianídrico (HCN), e este inibe a atividade das enzimas da cadeia respiratória dos seres vivos.

Referências bibliográficas

- ABRAMS-OGG, A. C. G. Practical Blood Transfusion. In: DAY, M.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J. **Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine**. 1 ed. Hampshire: British Small Animal Veterinary Association, 2000. Cap.2, p.263-303.
- AGUILAR-DA-SILVA, R. H.; MORAES, T. P.; MORAES, G. Implications of the oxidative stress on the erythrocyte metabolism of Down Syndrome individuals. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.25, n.4, p. 231-237, 2003.
- CAPRETTE, D. R. **Blood Components and the Mammalian Erythrocyte**. Disponível em: <<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/rbc.html>>. Acesso em: 20/04/2005.
- DA-SILVA, C. A.; GONCALVES, A. A. Partial recovery of erythrocyte glycogen in diabetic rats treated with phenobarbital. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, n.5, p.657-6, 1997.
- FELDMAN, B.F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.
- FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; LANGOHR, I.; BARROS, C. S. L. Intoxicação experimental por cebola, *Allium cepa* (Liliaceae), em gatos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.2, p.79-84, 2002.
- HARVEY, J. W. **Atlas of Veterinary Hematology. Blood and Bone Marrow of Domestic Animals**. Philadelphia: WB Saunders, 2001. 228p.
- HARVEY, J. W. The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. San Diego: Academic Press USA, 1997. Cap.7, p.157-203.
- HARVEY, J. W.; STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A.; JOHNSON, P. J.; DONALD, J. J.; CHANDLER, C. J. Methemoglobinemia and eccentrocytosis in equine erythrocyte flavin adenine dinucleotide deficiency. **Veterinary Pathology**, v.40, n.6, p.632-42, 2003.
- HOLMES, R. Blood groups of cats. **Journal of Physiology**, v.111, p.61, 1950.
- JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.
- LORENZI, T. F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. 641p.
- NOVAIS, A. A. **Prevalência dos antígenos eritrocitários caninos em cães domésticos e investigação dos parâmetros hematológicos e da ocorrência de antígenos eritrocitários em lobos-guará e cachorros-do-mato**. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Campus de Jaboticabal, 2003.
- PAULEV, P. E. **Chapter 8: Cardiovascular Physiology & Disorders (Textbook in Medical Physiology And Pathophysiology: Essentials and clinical problems)**. Disponível em: <http://www.mfi.ku.dk/ppaulev/chapter8/chapter_8.htm>. Acesso em: 20/04/2005.
- PRICE, G. S.; ARMSTRONG, P. J.; MCLEOD, D. A.; et al. Evaluation of citrate-phosphate-dextrose-adenine as a storage medium for packed canine erythrocytes. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.2, p.126-132, 1988.
- SIGMA ALDRICH CORPORATION. **Superoxide Dismutase (SOD) and Oxidative Stress**. Disponível em:

<http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Cell_Signaling_Enzymes/Superoxide_Dismutase.html>. Acesso em: 20/04/2005.

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE. **BCM-514: Biochimie des protéines**. Disponível em: <<http://www.callisto.si.usherb.ca/~bcm514/2d.html>>. Acesso em: 20/04/2005.

KARPLUS, P. A. **General Biochemistry BB 450/550: Glycolysis & Gluconeogenesis Notes**. Disponível em: < <http://oregonstate.edu/instruction/bb450/lecturenoteskevin/glycolysisnotes.html>>. Acesso em: 20/04/2005.