

EFEITOS DA TIROIDECTOMIA E ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE L-TIROXINA NAS DESIDROGENASES DA VIA DAS FOSFOPENTOSSES, NOS ERITROCITOS DE RATO

CARLOTA PROENÇA, ANA MACHADO E J. MARTINS-SILVA

Cadeira de Bioquímica. Faculdade de Medicina de Lisboa

RESUMO

Foi estudada a variação temporal da actividade das desidrogenases da glicose 6-fosfato (DG6P) e 6-fosfogluconato (D6-PG) nos eritrocitos de ratos tiroidectomizados (grupo I) ou tratados com L-tiroxina (grupo II). Os animais do grupo I foram observados 1, 4 e 6 semanas após a tiroidectomia cirúrgica. No grupo II consideram-se dois subgrupos (a e b): (a) incluía animais a que se administrou L-tiroxina por via oral (na água *ad libitum*, 250 µg/100 ml), decorrendo a observação entre a 4.^a e a 10.^a semanas de tratamento; em (b) estudou-se o efeito de intoxicação rápida com L-tiroxina (50 µg/100 g peso), administrada 4 dias/semana por via intraperitoneal, durante as primeiras 4 semanas de tratamento. Para qualquer dos lotes e situações estudadas não foram verificadas diferenças significativas na actividade da DG6P, relativamente aos valores dos controlos normais. Apenas em dois períodos intervalados do subgrupo (a) houve aumento significativo na D6-PG, sendo os valores das restantes fases e situações sobreponíveis aos controlos.

Estes resultados sugerem que a via das fosfopentoses nos eritrocitos de rato é menos sensível às hormonas tiroideias que a dos eritrocitos humanos, em situação equivalente de disfunção tiroideia.

SUMMARY

Effects of Thyroidectomy and Repeated Administration of L-Thyroxine on the Dehydrogenases of the Pentose-Phosphate Pathway of Rat Erythrocytes.

The temporal variations in the activity of erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) were studied on thyroidectomized rats (Group I) and upon administration of L-thyroxine to intact rats (Group II).

For experiments on Group I, three periods of observation after total thyroidectomy were selected: 1st, 4th and 6th weeks; Group II was subdivided in two subgroups (a and b): (a) the administration of L-thyroxine was made by oral route, *ad-libitum* (250 µg/100 ml water) and the animals were sacrificed from the 4th to the 10th weeks of experiment; (b) The intoxication was produced by repeated intraperitoneal injections in normal rats of 50µg/100 g weight, 4 days/week, for a minimum of one week and maximum of four weeks.

No significant differences were observed, in each period and experimental conditions, for the G6PD activities; meanwhile, in two intermediate periods of subgroup (a) the 6-PGD activity was increased.

The above results have been discussed with reference to some current mechanism, proposed for the action of thyroid hormones on human red cells, suggesting that the direct oxidative pathway of G6P metabolism on rat erythrocytes is less sensitive to the effects of those hormones.

INTRODUÇÃO

As acções multifacetadas das hormonas tiroideias, observadas em situações de hipotiroidismo ou hipertiroidismo clínico ou experimental, têm vindo a ser explicadas por inúmeros e ainda controversos mecanismos bioquímicos.¹ De facto, aquelas hormonas influenciam tal variedade de sistemas enzimáticos que se torna difícil identificar o centro da sua actuação e separá-lo das reacções adjacentes.¹⁻³

Entre outras acções metabólicas, as hormonas tiroideias exercem efeitos aparentemente antagónicos na síntese dos principais constituintes corporais, na dependência do estado de função tiroideia pré-existente: em concentrações baixas, aquelas hormonas estimulam as actividades sintéticas, verificando-se o inverso na presença de concentrações elevadas.³ Esta discrepância tem sido explicada por eventuais variações no fluxo de energia utilizável, de origem mitocondrial.¹

As desidrogenases são afectadas pelas hormonas tiroideias, sendo em geral inibidas *in vitro* e estimuladas *in vivo*.³ Relativamente às desidrogenases da via das fosfopentoses, verifica-se que a administração parentérica de L-tiroxina a ratos estimulava, para o dobro ou triplo, a actividade específica ou total hepática de ambas as desidrogenases da via;^{4, 5} pelo contrário, a actividade daquelas enzimas não era afectada pela exposição à L-tiroxina, *in vitro*, mesmo em concentrações elevadas (10⁻³M) improváveis *in vivo*.⁴

As particularidades estruturais dos eritrocitos maduros, desprovidos de mitocondrias e respectivas enzimas oxidativas opor-se-ia, em princípio, às hipóteses que condicionam as variações de actividade das desidrogenases da via das fosfopentoses à modulação da síntese proteica e actividade mitocondrial pelas hormonas tiroideias. Todavia, em doentes com disfunção da tiroideia têm sido registadas alterações marcadas na actividade daquelas enzimas eritrocitárias.⁶⁻¹⁰

Em estudo recente,¹¹ pudemos observar diminuição muito significativa na actividade da desidrogenase da glicose 6-fosfato, em eritrócitos de doentes com hipotireoidismo não-tratado; aquela alteração — que não era extensiva à desidrogenase do 6-fosfogliconato nem foi modificada pelo tratamento específico — poderia constituir um sinal característico da afecção. No presente estudo pretende-se analisar os efeitos induzidos em ambas as desidrogenases da via das fosfopentoses nos eritrócitos de ratos, com reprodução experimental de situações equivalentes a hipofunção (por tireoidectomia cirúrgica) ou hiperfunção tiroideia (por administração oral *ad libitum* ou parentérica de L-tiroxina).

Em ambas as situações foi determinada nos eritrócitos a actividade da desidrogenase da glicose 6-fosfato (DG6P) e da desidrogenase do 6-fosfogliconato (D6-PG), sendo os resultados comparados com grupos de controlo. Finalmente, são discutidos os mecanismos potencialmente influentes nas alterações verificadas em humanos, face aos resultados observados nas situações experimentais aqui estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e respectiva preparação

Ratos Wistar macho, cedidos pelo Biotério do Centro Gulbenkian de Ciência e alimentados com rações equilibradas (do tipo da Purina Lab Chow) e água *ad libitum*, foram utilizados neste estudo. Os animais, mantidos a temperatura constante (22 °C) e ciclo luminoso uniforme (das 7,00 às 19,00 h, diariamente), foram preparados, injectados e sacrificados em períodos do dia sensivelmente idênticos.

Todos os animais de cada experiência haviam nascido na mesma data e apresentavam pesos equivalentes no início do estudo, completado durante o Inverno. Com esta prática procurou-se evitar as reconhecidas variações na actividade enzimática verificadas em diferentes épocas do ano.⁴

Os animais foram divididos pelos seguintes grupos de experiência:

Grupo I — tireoidectomia cirúrgica

Grupo II — administração de L-tiroxina

Para cada condição experimental foi utilizado um lote de animais de controlo, de peso e idade equivalentes.

Efectuou-se a tireoidectomia em ratos com cerca de 4 semanas de vida, (80-100 g peso) sob anestesia com pentobarbital sódico (0,5 ml, IP) na dose de 3 mg/100 g peso. Para o efeito, praticou-se uma incisão ao longo da linha média, na fase ventral da área da laringe, com exposição da tiroideia; esta glandula foi seguidamente removida em bloco com as glandulas paratiroideias, sendo a incisão encerrada com agrafes. No pós-operatório e durante todo o período de observação, aqueles animais, mantidos nas condições já referidas, receberam um suplemento de lactato de cálcio em solução (1%) na água *ad libitum*, para obviar às consequências da extirpação das paratiroideias. Apenas os ratos que ao fim da 1.^a semana pós-tireoidectomia evidenciavam redução de, pelo menos, 20 a 30% do peso corporal em relação aos controlos, foram utilizados em estudos subsequentes, sendo classificados como *hipotiroideus* (Grupo I).

Para o grupo II seleccionaram-se ratos com 4 semanas (subgrupo a) e 16 semanas de vida (subgrupo b). Os animais do subgrupo a (80-100 g peso) receberam L-tiroxina por via oral, em solução na água (250 µg/100 ml), sendo os do subgrupo b (250-300 g peso) injectados 4 dias/semana com 50 µg/100 g peso de L-tiroxina por via intraperitoneal; a L-tiroxina foi dissolvida em 0,1N NaOH e diluída em soro fisiológico, para pH 7,4; os controlos receberam apenas água

ad libitum por via oral ou solução salina (com 0,1N NaOH, a pH 7,4), IP, respectivamente, até ao fim da experiência. Cada situação foi analisada, em duplicado, em lotes que incluíam, inicialmente, 4-7 animais.

Imediatamente antes do sacrificio registou-se o peso de cada animal e respectiva temperatura rectal.

Determinações enzimáticas

Em períodos determinados colheram-se, por punção cardíaca e sob leve anestesia com eter dietílico, amostras de sangue heparinizado. De cada amostra, centrifugada a 2000 g durante 15 min a 4 °C, removeu-se por aspiração o plasma e película celular sobrenadante; os eritrócitos foram lavados três vezes com solução refrigerada de NaCl a 0,9%, sendo os leucócitos removidos com o sobrenadante por centrifugações sucessivas a 1000 g, 10 min. Após a lavagem, procedeu-se à preparação do hemolisado eritrocitário, livre de estromas. Para o efeito, misturou-se 0,2 ml do sedimento eritrocitário com 3,8 ml da solução hemolisante (solução G de Beutler),¹² em gelo, com agitação intermitente durante 10 min. Por centrifugação daquela mistura a 5000 g, durante 10 min, a 4 °C, foi separado o sobrenadante (correspondente ao hemolisado a 1/20), para a determinação da concentração de hemoglobina (como cianometahemoglobina) e ensaio enzimático.

As actividades da desidrogenase da glicose 6-fosfato (DG6P) e da desidrogenase do 6-fosfogliconato foram determinadas pela redução do NADP, observado espectrofotometricamente pelo aumento a E₃₄₀, a 37 °C, utilizando a glicose 6-fosfato e o 6-fosfogliconato em concentrações equimolares como substractos da reacção (método de Glock e McLean).¹³ As actividades de ambas as enzimas são expressas em relação à concentração de hemoglobina no mesmo hemolisado, como UI/gHb.

Cálculo estatístico

Os resultados obtidos são expressos pela média da actividade enzimática (UI/gHb) ± 1 desvio padrão, recorrendo ao teste *t* de Student para apreciação do significado das diferenças entre os grupos de controlo e de experiência.

RESULTADOS

Os resultados dos efeitos induzidos pela tireoidectomia e administração ou ingestão repetida de L-tiroxina na actividade da DG6P e D6-PG eritrocitárias são evidenciados nas Tabelas 1 a 3.

Nos animais com presumível hipotireoidismo experimental efectuaram-se três observações seriadas: 1.^a, 4.^a e 6.^a semanas pós-tireoidectomia. Além da perda de peso médio (Fig. 1), os animais deste grupo revelavam ligeiro decréscimo da temperatura rectal e hipocinésia.

Em nenhum dos períodos houve diferenças significativas na actividade de ambas as enzimas, entre controlos e tireoidectomizados. Na generalidade, as actividades enzimáticas parecem decrescer com o aumento da idade (Tabela 1), sendo significativa ($P < 0,01$) a diferença entre a 1.^a e a 6.^a semana, para ambas as enzimas e situações.

O grupo de animais que recebeu L-tiroxina em solução na água de ingestão foi sacrificado, em lotes, à 4.^a, 5.^a, 6.^a, 8.^a e 10.^a semanas de intoxicação. É de notar que, na generalidade, a actividade de ambas as desidrogenases era mais elevada nos ratos de experiência que nos controlos (Tabela 2); contudo, essas diferenças não eram significativas para a

TABELA 1 Variação temporal da actividade (média e desvio padrão) das desidrogenases da glicose 6-fosfato (DG6P) e 6-fosfogliconato (D6-PG) nos eritrocitos de ratos com tiroidectomia cirúrgica (Grupo I). *p* indica o significado das diferenças entre controlos e «hipotiroideus» (NS = não significativo). Entre parenteses é indicada a dimensão de cada amostra.

Enzimas	Grupos	Períodos de observação (semanas) pós-tiroidectomia			
		1. ^a		4. ^a	6. ^a
DG6P (UI/gHb)	Controlos	32,39 ± 0,86 (7)	— NS —	24,60 ± 1,72 (9)	26,78 ± 1,72 (9)
	Valor de <i>p</i>	NS		NS	NS
	Grupo I	34,41 ± 2,05 (8)	— NS —	28,50 ± 3,82 (7)	25,49 ± 1,27 (9)
				< 0,01	
D6-PG (UI/gHb)	Controlos	10,56 ± 0,92 (7)	— NS —	10,59 ± 0,47 (9)	8,74 ± 0,48 (9)
	Valor de <i>p</i>	NS		NS	NS
	Grupo I	10,58 ± 0,76 (8)	— NS —	9,07 ± 0,58 (7)	8,05 ± 0,33 (9)
				< 0,01	

TABELA 2 Variação temporal da actividade (média e desvio padrão) das desidrogenases da glicose 6-fosfato (DG6P) e 6-fosfogliconato (D6-PG) nos eritrocitos de ratos intoxicados com L-tiroxina (250 µg/100 ml) na água de ingestão (Grupo II, subgrupo a). *p* indica o significado das diferenças relativamente aos controlos (NS = não significativo). Entre parenteses é indicada a dimensão de cada amostra.

Enzimas	Grupos	Duração da intoxicação (semanas)				
		4. ^a	5. ^a	6. ^a	8. ^a	10. ^a
DG6P (UI/gHb)	Controlos	20,35 ± 4,58 (4)	24,00 ± 2,07 (4)	18,68 ± 3,31 (4)	21,47 ± 0,76 (3)	21,68 ± 0,97 (4)
	Valor de <i>p</i>	NS	NS	NS	NS	NS
	II, Subgrupo a	24,99 ± 6,16 (8)	26,52 ± 4,00 (9)	20,29 ± 3,33 (8)	22,73 ± 1,28 (8)	23,73 ± 2,59 (9)
D6-PG (UI/gHb)	Controlos	6,24 ± 0,28 (4)	6,18 ± 0,85 (4)	6,07 ± 0,15 (4)	5,65 ± 0,72 (4)	6,55 ± 0,93 (4)
	Valor de <i>p</i>	NS	< 0,05	< 0,01	NS	NS
	II, Subgrupo a	6,94 ± 2,01 (8)	6,88 ± 0,34 (9)	6,63 ± 0,27 (8)	6,32 ± 0,39 (8)	6,77 ± 0,46 (9)

DG6P; em contrapartida, à 5.^a e 6.^a semanas de observação foram registados aumentos significativos na D6-PG. Durante o período de observação constatou-se progressivo aumento da agitação motora com L-tiroxina.

No segundo grupo de animais tratados com L-tiroxina, foi evidente o efeito tóxico provocado pelas doses adminis-

tradas por via intraperitoneal: perda de peso corporal (Fig. 1), hiperinésia e aumento da temperatura rectal, relativamente aos controlos. Os animais foram repartidos por 4 lotes, sacrificados sucessivamente ao fim de 1, 2, 3 e 4 semanas de intoxicação, não tendo sido verificadas diferenças significativas na actividade das enzimas estudadas (Tabela 3).

TABELA 3 Variação temporal da actividade (média e desvio padrão) das desidrogenases da glicose 6-fosfato (DG6P) e 6-fosfogliconato (D6-PG) nos eritrócitos de ratos intoxicados com L-tiroxina (50 µg/100 g peso) 4 dias/semana, por via intraperitoneal (Grupo II, subgrupo b). *p* indica o significado das diferenças relativamente aos controlos (tratados com igual volume de NaCl, 0,9 %, IP); NS = não significativo. Entre parênteses é indicada a dimensão de cada amostra.

Enzimas	Grupos	Duração da intoxicação (semanas)			
		1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a
DG6P (UI/gHb)	Controlos	19,29 ± 1,40 (5)	22,06 ± 2,74 (5)	27,15 ± 4,26 (8)	22,05 ± 2,87 (5)
	Valor de <i>p</i>	NS	NS	NS	NS
	II, Subgrupo b	20,07 ± 1,61 (13)	20,36 ± 1,55 (6)	24,62 ± 5,17 (12)	22,20 ± 4,44 (13)
D6-PG (UI/gHb)	Controlos	6,01 ± 0,66 (5)	6,83 ± 0,66 (5)	7,61 ± 0,81 (8)	7,29 ± 0,86 (4)
	Valor de <i>p</i>	NS	NS	NS	NS
	II, Subgrupo b	6,48 ± 0,77 (13)	6,81 ± 1,25 (6)	7,23 ± 0,84 (12)	7,90 ± 0,95 (13)

DISCUSSÃO

A inexistência quase virtual de alterações significativas na actividade de ambas as desidrogenases eritrocitárias da via das fosfopentoses, em que foram induzidos estados equivalentes de hipofunção (Tabela 1) e hiperfunção tiroideia (Tabela 2 e 3), contrasta com observações anteriores, quer em humanos ou experimentais.

Nos estudos em humanos parece haver concordância quanto à influência exercida pelas hormonas tiroideias na via das fosfopentoses e, também, em outras etapas do metabolismo eritrocitário. Enquanto em doentes com hipotiroidismo é notória a diminuição de actividade da DG6P,^{7, 10, 11} bem como da D6-PG⁷ observa-se o inverso no hipertiroidismo, com destaque para a estimulação da DG6P^{8, 9} ou de ambas as desidrogenases,⁶ na sequência da terapêutica específica administrada a indivíduos com hipotiroidismo. Por conseguinte, a actividade enzimática parece ser estimulada pelas hormonas tiroideias e diminuir em situação de hipotiroidismo, o que estaria de acordo com a acção geral exercida *in vitro* por aquelas hormonas nos sistemas enzimáticos intervenientes nas oxidações celulares.¹⁴

Nas células com mitocôndrias (o que não sucede nos eritrócitos circulantes), a L-tiroxina e, muito mais acentuadamente, a L-triiodotironina activam o metabolismo basal, por sua vez reprimido em situações de tiroidectomia experimental.¹ Na sua origem estaria o efeito dissociador na fosforilação oxidativa mitocondrial, produzido pelas hormonas tiroideias, quer *in vivo* ou *in vitro*.¹⁻³ Embora haja razões para admitir que tal tipo de actuação não representa o mecanismo normal de controlo metabólico dependente das hormonas tiroideias, a dissociação da fosforilação oxidativa ou efeitos concomitantes constituem a base de actuação daquelas hormonas, ao aumentarem o consumo de oxigénio e oxidação tecidual de substratos metabólicos.³ Quanto à estimulação da glicólise aeróbia ou anaeróbia pelas hormonas tiroideias, desconhece-se se depende da activação da síntese das enzimas intervenientes ou é secundária ao efeito Pas-

teur, por dissociação da fosforilação oxidativa.¹⁵ Além da glicólise, também a via das fosfopentoses é estimulada pelas hormonas tiroideias, em ratos intoxicados por triiodotironina na água de ingestão.¹⁶ Da mesma forma, ratos tiroidectomizados evidenciam diminuição da actividade da DG6P hepática,^{1, 5} por sua vez aumentada para 2-3 vezes o valor basal nos animais injectados com L-tiroxina.^{4, 5} O atraso de 2 a 3 dias verificado na estimulação da DG6P, relativamente às actividades microssómicas e mitocondriais,¹ sugere que aquelas variações enzimáticas seriam dependentes da acção das hormonas tiroideias na fosforilação oxidativa e incorporação dos aminoácidos nas proteínas. A síntese proteica é, nos sistemas hepatocitários, reduzida para metade em ratos tiroidectomizados, duplicando ou triplicando após a administração de hormonas tiroideias.¹ Todavia, não há concordância quanto ao efeito das hormonas tiroideias na síntese proteica, que se verifica ser estimulada por concentrações baixas de tiroxina, e reprimida com doses superiores; doses tóxicas de tiroxina, *in vivo* ou *in vitro*, diminuem a síntese proteica.¹⁷ Na realidade, algumas das alterações aparentemente contraditórias da tiroxina sobre a síntese proteica resultam de efeitos bifásicos em que, após um aumento, sobrevém depressão marcada.^{17, 18}

Este comportamento estaria de acordo com o efeito anabólico provocado por doses de 5-10 µg diários de L-tiroxina em ratos tiroidectomizados e com o hipermetabolismo proteico induzido pela administração de 50 µg diários daquela hormona, em animais intactos ou tiroidectomizados.¹⁹

Nesta ordem de ideias, poder-se-ia supor que a variação na actividade das desidrogenases eritrocitárias da via das fosfopentoses, registada em doentes com disfunção tiroideia,⁶⁻¹¹ envolvesse mecanismos idênticos aos propostos para as células hepáticas. De certa forma, aquela hipótese seria extensiva às variações observadas nas mesmas situações em outras enzimas eritrocitárias.^{7, 8} Todavia, nem os eritrócitos conservam os sistemas enzimáticos que possibilitam oxidações mitocondriais nem, pela perda do núcleo, estão aptos a assegurar a renovação e eventual aumento da síntese enzimática.

Como alternativa, poder-se-ia verificar uma acção directa das hormonas tiroideias nas moléculas enzimáticas, semelhante à proposta para o aumento de 2,3-difosfoglicerato em eritrócitos expostos à L-tiroxina²⁰; todavia, nem a 2,3-difosfoglicerato-mutase parece ser afectada pela L-tiroxina ou L-triiodotironina,^{21, 22} nem as desidrogenases da via das fosfopentoses, nos eritrócitos ou hemolisados, são activadas pela L-tiroxina *in vitro*,⁷ o que também já fora documentado no fígado.⁴ Pelo contrário, Necheles e Beutler²³ defendem que a estimulação *in vitro* da actividade da glicólise eritrocitária pela triiodotironina é consequente a um efeito hormonal específico na via das fosfopentoses.

Outra hipótese basear-se-ia na eventual alteração da permeabilidade da membrana eritrocitária. De facto, os eritrócitos de doentes com hipertiroidismo captam mais rapidamente o ³²P que glóbulos de eutiroides, verificando-se o oposto em doentes com mixedema.²⁴ Modificações na permeabilidade da membrana globular, incidentes na disponibilidade em substractos ou cofactores requeridos pela glicólise e/ou via das fosfopentoses eritrocitárias, poderiam ser consequentes à fixação das hormonas tiroideias nas membranas eritrocitárias.²⁵ Embora a actividade da ATPase-Na⁺, K⁺-dependente seja inferior ao normal nos eritrócitos de doentes com hipertiroidismo, não é, em preparações de membranas eritrocitárias normais, inibida por qualquer das hormonas tiroideias; a discrepancia nos resultados *in vivo* e *in vitro* sugere que as hormonas tiroideias não actuam directamente nas membranas de eritrócitos maduros.²⁶

Estudos clínicos e experimentais revelam que as hormonas tiroideias estimulam a formação dos eritrócitos, embora não esteja estabelecido se aquele efeito é mediado por acção directa nos precursores eritroides ou induzido indirectamente pelo aumento de produção da eritropoietina. Assim, ao passo que observações recentes *in vitro* evidenciam a potenciação da eritropoiese pela exposição dos precursores eritroides às hormonas tiroideias,^{27, 28} trabalhos anteriores haviam demonstrado no hipertiroidismo humano aumento dos níveis circulantes de eritropoietina, a par de eritropoiese acelerada.²⁹ Em parte, estes últimos resultados explicariam as diversas alterações hematológicas habitualmente verificadas no hipertiroidismo,³⁰ nomeadamente o aumento de reticulócitos ou eritrócitos jovens em circulação. Sabendo-se que a actividade enzimática decai progressivamente com o envelhecimento globular,³¹ seria de admitir que a estimulação da eritropoiese, verificada nos hipertiroideus, fosse acompanhada por aumento de eritrócitos jovens em circulação, e por conseguinte, por actividade superior das enzimas eritrocitárias, sucedendo o oposto no hipotiroidismo.

Todavia, nem no hipotiroidismo ou hipertiroidismo humanos foram observadas variações na população eritrocitária que justifiquem alterações na actividade de ambas as desidrogenases, nem a actividade das enzimas-chave da glicólise parece ser afectada no hipotiroidismo.¹¹

Por outro lado, a administração diária de triiodotironina a coelhos é acompanhada por efeitos bifásicos na glicólise eritrocitária: após aumentar nos primeiros dois dias, a actividade glicolítica decai substancialmente, atingindo os níveis mínimos aos 21 dias de tratamento, em paralelo com o desenvolvimento de sinais de tirotoxicose experimental.³² Para este comportamento, semelhante ao observado na síntese proteica hepática com a L-tiroxina,¹⁷ não foi apresentada qualquer proposta de mecanismo de acção o que, aliás, também sucedera a propósito da estimulação da glicólise eritrocitária em animais intoxicados com L-tiroxina.³³

De todos estes trabalhos ressalta a incerteza, ainda existente, sobre os mecanismos de acção das hormonas tiroideias nas enzimas eritrocitárias, nomeadamente em relação

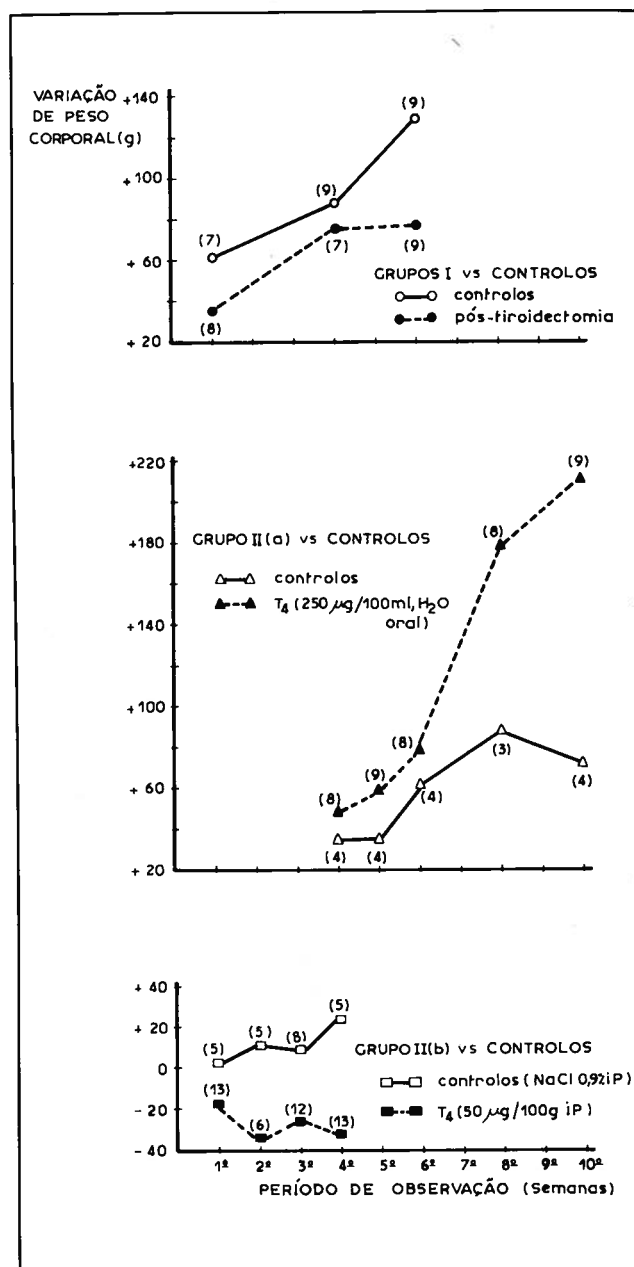


Figura 1 Variação do peso corporal durante o período de observação em ratos tiroidectomizados ou que receberam L-tiroxina por via oral, *ad libitum*, (250 µg/100 ml água) ou administração parentérica (50 µg/100 g peso, IP).

com a actividade das desidrogenases da via das fosfopentoses em situações de disfunção tiroideia. De facto, a actividade da DG6P eritrocitária é, em humanos, independente da concentração das hormonas tiroideias em circulação⁹ o que, mais uma vez, sugere a participação de mecanismos de acção indirecta ainda desconhecidos. Por sua vez, grande parte da informação disponível relativa ao metabolismo eritrocitário provém de estudos em humanos.

Não são de nosso conhecimento trabalhos anteriores semelhantes ao que aqui apresentamos. Assim, torna-se difícil avaliar as discrepâncias notadas, relativamente aos resultados em doentes, sem um conhecimento prévio do metabolismo da glicose nos eritrócitos de ratos.

Foi verificado que os eritrócitos de outras espécies animais, incluindo o homem, metabolizavam quantidades idênticas de glicose através da via das fosfopentoses,³⁴ embora a actividade de algumas enzimas, associadas directa ou indirectamente aquela via, revelassem diferenças substanciais de espécie para espécie.³⁵ As variações observadas no consumo da glicose pelos eritrócitos seriam aparentemente devidas a diferenças próprias de cada espécie na utilização glicolítica daquele nutriente, fundamentadas em particularidades estruturais ou funcionais dos eritrócitos.³⁴

Relativamente ao presente trabalho, não são de excluir diferenças próprias da espécie estudada, que justifiquem a ausência clara de variações na actividade de ambas as desidrogenases ou condicionem a importância funcional da via das fosfopentoses. A favor desta hipótese estariam os valores determinados para a actividade de ambas as enzimas, muito superior aos registados em humanos.¹² Na sua origem encontrar-se-iam factores intra-globulares influentes na actividade das enzimas que metabolizam a glicose; pela metodologia utilizada, em condições óptimas ou quase fisiológicas, a actividade de cada uma dessas enzimas excede largamente a capacidade eritrocitária de utilização da glicose.³⁶

É admissível que em condições anormais de eventual agressão oxidativa, directa ou indirecta, pelas hormonas tiroideias, sobrevenham diferenças de sensibilidade nas enzimas eritrocitárias, nomeadamente na via das fosfopentoses. Esta via metabólica pela qual são utilizados cerca de 3-11 % da glicose eritrocitária em condições fisiológicas, desempenha uma acção importante na conservação dos componentes oxidáveis dos eritrócitos no estado reduzido, através da regeneração constante de NADPH, subsequente à actividade da DG6P e D6-PG.³⁸ Entre outros factores potencialmente oxidantes, na dependência das hormonas tiroideias, poder-se-ia considerar a elevação de temperatura, que se demonstrou influente na actividade da via das fosfopentoses.³⁹ São conhecidas as flutuações térmicas que acompanham as disfunções da tiroideia, em humanos⁴⁰ e experimentais,⁴¹ também constatadas no presente estudo. Assim, ou a actividade da via das fosfopentoses aumenta com a temperatura, por acção directa nas respectivas enzimas, ou a elevação de temperatura estimula, por si, reacções oxidativas intra-eritrocitárias; neste caso, o incremento na actividade da via das fosfopentoses representaria uma resposta à agressão oxidativa, que poderia explicar, por ex., a hemólise registada em doentes com deficiência em DG6P.⁴² O significado do esporádico aumento na actividade de D6-PG, nos animais tratados com L-tiroxina por via oral (Tabela 2), é também desconhecido, embora confirme a observação no fígado de ratos injectados com L-tiroxina, em que a variação na actividade de D6-PG se revelou independente da DG6P.⁵

Acessoriamente, poderia suceder que o período de duração das experiências fosse insuficiente para detectar variações na actividade enzimática, sobreponíveis às observadas em humanos. Todavia, esta hipótese parece inaceitável pois que, em experiências paralelas com metodologia semelhante, foram obtidas variações significativas na concentração de diversos metabolitos eritrocitários, afinidade da hemoglobina para o oxigénio⁴³ e consumo de oxigénio pelas mitocôndrias hepáticas.⁴⁴

Em conclusão, o comportamento das desidrogenases da via das fosfopentoses em eritrócitos de ratos parece ser diferente dos eritrócitos humanos, em situações equivalentes de

hipo-ou hipertiroidismo. Estudos subsequentes neste sistema experimental talvez possam esclarecer o mecanismo de acção das hormonas tiroideias nas enzimas eritrocitárias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração do Sr. Dr. João Pedro Freitas na elaboração da análise estatística, e apoio laboratorial prestado pelo Sr. Chim W. San; expressam o seu reconhecimento ao Sr. João Romão, pela ajuda conferida na preparação e manutenção dos animais de experiência, bem como as facilidades e apoio recebidos da Direcção do Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência.

Este trabalho foi parcialmente subsidiado pelo INIC (MbL2) e Serviço de Ciência da Fundação Calouste Gulbenkian.

BIBLIOGRAFIA

1. TATA, J. R.; ERNSTER, L.; LINDBERG, O.; ARRHENIUS, E.; PEDERSEN, S. e HEDMAN, R.: The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem. J.* 1963; 86: 408.
2. MARTIUS, C.: The mechanisms of action of thyroid hormones. *Acta Endocrinol.* 1958; 28 (supl. 38): 27.
3. HOCH, F. L.: Biochemical actions of thyroid hormones. *Physiol. Rev.* 1962; 42: 605.
4. GLOCK, G. E. e MCLEAN, P.: A preliminary investigation of the hormonal control of the hexose monophosphate oxidative pathway. *Biochem. J.* 1955; 61: 390.
5. HUGGINS, C. e YAO, F. O.: Influence of hormones on liver. I. Effects of steroids and thyroxine on pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *J. Exp. Med.* 1959; 110: 889.
6. KONTTINEN, A. e VIHHERKOSKI, M.: Blood transketolase and erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in thyrotoxicosis. *Clin. Chim. Acta* 1968; 22: 145.
7. BUTENANDT, O.: Erythrocytic enzyme activities in hypothyroid children. *Acta Haemat.* 1972; 47: 335.
8. GOEBEL, K. M.; GOEBEL, F. D.; NEITZERT, A.; HAUSMANN, L. e SCHNEIDER, J.: Adaption of red cell enzymes and intermediates in metabolic disorders. *Enzyme* 1975; 19: 201.
9. SWAMINATHAN, R.; SEGALL, N. H.; CHAPMAN, C.; MORGAN, D. B.: Red-blood-cell composition in thyroid disease. *Lancet* 1976; II: 1382.
10. KHERCHI, F. Z.; HENNI, T.; RICHARD, F. e COLONNA, P.: La glucose-6-phosphate déshydrogenase (G-6PD) érythrocytaire dans les dysthyroïdies. *Nouv. Presse Méd.* 1976; 5: 718.
11. PROENÇA, C.; BARROCA, J. P.; LEVY-CRUZ, F.; FREITAS, J. P.; GALVÃO-TELES A. e MARTINS-SILVA, J.: Metabolismo eritrocitário no hipotiroidismo humano, antes e durante a terapêutica hormonal substitutiva de curta duração. *Acta Méd. Port.* 1980; 2: 213.
12. BEUTLER, E.: «Red Cell Metabolism — A Manual of Biochemical Methods» Grune e Stratton, N. Y., 1971.
13. GLOCK, G. E. e MCLEAN, P.: Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.* 1953; 55: 400.
14. BARKER, S. B.: Mechanisms of action of the thyroid hormones. *Physiol. Rev.* 1951; 31: 205.
15. CEREIJO-SANTALO, R.; DINELLA, R.; PARCK, C. R. e PARK, J. H.: The effect of analogues of thyroxine on the glycolysis and oxygen uptake of ascites tumor cells. *Endocrinology* 1963; 69: 422.

16. SPIRO, M. J. e BALL, E. G.: A comparison of the pathways of glucose catabolism in the normal hyperthyroid rat. *J. Biol. Chem.* 1958; 23: 31.
17. SOKOLOFF, L. e KAUFMAN, S.: Effect of thyroxine on amino acid incorporation into proteins. *Science* 1959; 129: 569.
18. STERNHEIMER, R.: The effect of a single injection of thyroxine on carbohydrates, protein and growth in the rat liver. *Endocrinology* 1939; 25: 889.
19. RUPP, J.; PASCHKIS, K. E. e CANTAROW, A.: Influence of thyroxine on protein metabolism. *Endocrinology* 1949; 44: 449.
20. SNYDER, L. M.; NERI, L.L.; CHUNG, S. K.; MOLENARI, P. F. e REDDY, W. F.: The variation of glucose metabolism in human erythrocytes in the presence of L-thyroxine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1971; 138: 1.
21. TORRANCE, J. D.: Diphosphoglycerate-mutase assay: the effect of pyruvate, lactate dehydrogenase and thyroid hormone on the assay. *Clin. Chim. Acta* 1974; 50: 103.
22. CZERNIK, A. J.; PSYCHOYOS, S. e CASH, W. D.: Failure of thyroid hormones to enhance the activity of diphosphoglycerate mutase. *Endocrinology* 1974; 95: 508.
23. NECHELES, T. e BEUTLER, E.: The effect of triiodothyronine in the oxidative metabolism of erythrocyte. I — Cellular studies. *J. Clin. Invest.* 1959; 38: 788.
24. ERMANS, A. M.: Étude de la vitesse de sortie de phosphore radioactif des globules rouges en rapport avec l'activité thyroïdienne chez l'homme. *Helv. Med. Acta* 1957; 24: 201.
25. SCHWARTZ, H. L.; CARTER, A. C.; SINGH, S. P.; KYDD, D. M. e CONSTANZO, R. R.; JR.: Relationship of red blood cell 131 I-L-triiodothyronine binding coefficient and cell maturation. III. Binding to mature erythrocyte and reticulocyte cell membranes. *Endocrinology* 1968; 82: 569.
26. COLE, C. H. e WADDELL, R. W.: Alteration in intracellular sodium concentration and ouabain-sensitive ATPase in erythrocytes from hyperthyroid patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1976; 42: 1056.
27. GOLDE, D. W.; BERSCH, N.; CHOPRA, I. J. e CLINE, M. J.: Thyroid hormones stimulate erythropoiesis. *Brit. J. Haematol.* 1977; 37: 173.
28. POPOVIC, W. J.; BROWN, J. E. e ADAMSON, J. W.: Modulation of in vitro erythropoiesis. Studies with euthyroid and hypothyroid dogs. *J. Clin. Invest.* 1979; 64: 56.
29. DAS, K. C.; MUKHERJEE, M.; SARKAR, T. K.; DASH, R. J. e RASTOGI, G. K.: Erythropoiesis and erythropoietin in hypo-and hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1975; 40: 211.
30. FEIN, H. G. e RIVLIN, R. S.: Anemia in thyroid disease. *Med. Clin. Nth. Amer.* 1975; 59: 1133.
31. SARS, M. P.; VORSANGER, D. e SPEAR, P. B.: Enzyme activity as an indicator of red cell age. *Clin. Chim. Acta* 1964; 10: 21.
32. CALESNICK, B.; ALTARELLI, V. R. e SPIRITES, M. A.: Decrease in aerobic glycolysis of erythrocytes following the continuous administration of L-triiodothyronine. *Endocrinology* 1960; 66: 517.
33. MACHO, P.: The effect of thyroid hormones on the glycolytic activity of blood. *Clin. Chim. Acta* 1957; 2: 345.
34. HARVEY, J. W. e KANEKO, J. J.: Glucose metabolism of mammalian erythrocytes. *J. Cell. Physiol* 1976; 89: 219.
35. HARVEY, J. W. e KANEKO, J. J.: Erythrocyte enzyme activities and glutathione levels of horse, rat, dog and man. *Comp. Biochem. Biophys.* 1975; 52B: 507.
36. SRIVASTAVA, J. W. e BEUTLER, E.: The effect of normal red cell constituents on the activities of red cell enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1972; 148: 249.
37. YUNIS, J. J. e YASHEMINEH, W. G.: Glucose metabolism in human erythrocytes. In «Biochemical Methods in Red Cell Genetics» J. J. Yunis (ed). *Acad. Press, N. Y.* 1969; Pag. 1.
38. EATON, J. W. e BREWER, G. J.: Pentose phosphate metabolism. In «The Red Blood Cell» vol. I, 2.^a ed., D. MacSurgenor (ed). *Acad. Press, N. Y.* 1974; pag. 435.
39. DAVIDSON, W. D. e TANAKA, K. R.: Factors affecting pentose phosphate pathway activity in human red cells. *Brit. J. Haematol.* 1972; 23: 371.
40. EDELMAN, I. S.: Thyroid thermogenesis. *N. Engl. J. Med.* 1974; 290: 1303.
41. DENCKLA, W. D.: Minimal O₂ consumption as an index of thyroid status: standardization of method. *Endocrinology* 1973; 93: 61.
42. BURKA, E. R.; WEAVER, Z. III e MARKS, P. A.: Clinical spectrum of hemolytic anemia associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Ann. Int. Med.* 1966; 64: 817.
43. BARROCA, J. P.; FREITAS, J. P. e MARTINS-SILVA, J.: Efeitos da L-tiroxina na concentração de 2,3-difosfoglicerato eritrocitário e afinidade da hemoglobina para o oxigênio, em ratos Wistar. Comun. ao 1.^o Congr. Luso-Espanhol de Bioq., Coimbra, 1980.
44. PROENÇA, C. P. e MARTINS-SILVA, J.: Influência da levotiroxina na respiração mitocondrial e actividade da L- α -glicerofosfato desidrogenase no fígado de ratos. Comun. ao 1.^a Congr. Luso-Espanhol de Bioq., Coimbra, 1980.

Pedido de separatas: Carlota Proença
Cadeira de Bioquímica
Faculdade de Medicina de Lisboa
1600 Lisboa - Portugal