

METABOLISMO ERITROCITÁRIO NO HIPOTIROIDISMO HUMANO, ANTES E DURANTE A TERAPÊUTICA HORMONAL SUBSTITUTIVA DE CURTA DURAÇÃO⁽¹⁾

Carlota Proença, J. P. Barroca, F. Levy Cruz, J. P. Freitas, A. Galvão-Teles, J. Martins e Silva
(com a colaboração técnica de Chim W. San)

Instituto de Química Fisiológica. Faculdade de Medicina de Lisboa. Núcleo de Endocrinologia. Hospital de Santa Maria. Lisboa. Portugal.

RESUMO

Analisou-se a influência exercida pelo tratamento hormonal substitutivo no metabolismo eritrocitário de 16 doentes com hipotiroidismo primário, estudados antes e durante terapêutica com tiroxina. Além da observação hematológica de rotina, determinaram-se as concentrações de 2,3-difosfoglicerato e adenosinotrifosfato eritrocitários, lactato do sangue total, fosfato inorgânico plasmático, valor de P50 *in vivo* da curva de dissociação da oxihemoglobina e actividade das seguintes enzimas eritrocitárias: hexoquinase, fosfofructoquinase, piruvatoquinase, desidrogenase da glicose-6-fosfato e desidrogenase do 6-fosfogliconato. A actividade da desidrogenase da glicose 6-fosfato permaneceu, antes e durante a terapêutica, significativamente abaixo dos valores normais. Pelo contrário, o tratamento foi acompanhado pelo aumento da concentração de 2,3-difosfoglicerato, lactato e valor da P50. A concentração do fosfato inorgânico excedia o normal, antes e durante a terapêutica. Os resultados obtidos sugerem que o aumento do consumo de oxigénio induzido pelas hormonas tiroideias é acompanhado pela estimulação, talvez directa, da síntese do 2,3-difosfoglicerato eritrocitário, contudo insuficiente para satisfazer, através da maior dissociação de oxigénio transportado pela hemoglobina, as exigências metabólicas. Os baixos níveis da actividade da desidrogenase da glicose-6-fosfato talvez possam constituir um sinal característico da doença.

Embora seja conhecida a possibilidade da fixação das hormonas tiroideias às membranas eritrocitárias,¹ continua por esclarecer o significado fisiológico deste fenómeno. As hormonas tiroideias, além de influenciarem a concentração de sódio e zinco intraglobular,² bem como a actividade de algumas enzimas isoladas, tais como a anidrase carbónica,^{3,4} e a ATPase ouabaina-dependente,⁵ afectam o consumo de glicose pelos eritrocitos, tanto *in vivo*^{6,7} como *in vitro*.⁸

Sugeriu-se que a acção das hormonas tiroideias no metabolismo eritrocitário fosse exercida directamente a nível de algumas enzimas da glicólise e via das fosfopentoses.^{7,8}

Nestes estudos, a desidrogenase da glicose-6-fosfato (DG6P) revelou-se a enzima mais sensível aos efeitos das disfunções da tiroideia, com diminuição de actividade no hipotiroidismo⁹ e aumento no hipertiroidismo.^{2, 10, 11}

Outro aspecto consiste na possível influência das hormonas tiroideias no sistema de transporte do oxigénio aos tecidos, através das modificações induzidas na concentração do 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) eritrocitário e alterações consequentes na afinidade da hemoglobina para o oxigénio. De facto, verificou-se que a incubação de hormonas tiroideias com eritrocitos humanos aumentava a concentração do 2,3-DPG eritrocitário, aparentemente por estimulação directa do difosfoglicerato-mutase.^{12, 13} Estes resultados não foram, contudo, confirmados posteriormente.¹⁴⁻¹⁶

Observações em doentes com hipertiroidismo¹⁷ ou medicados com hormonas tiroideias¹⁸ revelaram aumento da concentração do 2,3-DPG eritrocitário e do valor da

⁽¹⁾ Trabalho subsidiado pelo INIC (projecto LMC-10).

P50. A elevação progressiva do 2,3-DPG verificada em recém-nascidos parecia, também, depender da participação crescente da função tiroideia, durante as primeiras semanas de vida.¹⁹ Por outro lado, a afinidade da hemoglobina para o oxigénio tende a aumentar em doentes com hipotiroidismo.²⁰ Em contraste, outros resultados infirmam que o sistema eritrocitário de transporte do oxigénio, seja, no homem²¹ ou ratos,²² influenciado pelas hormonas tiroideias.

Atendendo às discrepâncias mencionadas, procedemos a um estudo preliminar em 16 doentes com hipotiroidismo primário, antes e durante terapêutica hormonal substitutiva com tiroxina. Pretendemos avaliar a utilidade dos doseamentos dos fosfatos orgânicos eritrocitários, da variação da afinidade da hemoglobina para o oxigénio e da actividade de enzimas reguladoras da glicólise e desidrogenases da via das fosfopentoses.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Doentes com hipotiroidismo primário

Estudaram-se 16 doentes com hipotiroidismo primário, 15 do sexo feminino e um do sexo masculino com idades compreendidas entre 6 e 62 anos (Média=33,8 anos). O hipotiroidismo foi confirmado, em todos os casos, por níveis baixos de T_3 e T_4 e níveis elevados de TSH do soro, medidos por radioimunoensaio. Uma das doentes sofria de diabetes mellitus, não existindo nos outros indivíduos patologia associada.

Estudaram-se todos os 16 doentes antes da terapêutica com tiroxina, em uma ou duas ocasiões (28 determinações) — Grupo I, e avaliaram-se 11 doentes uma a quatro vezes durante a terapêutica com tiroxina, abrangendo períodos de 8 a 30 dias de tratamento (24 determinações) — Grupo II.

Em todos os casos utilizou-se L-tiroxina na dose de 25 a 100 μg diários.

Normais

Os resultados encontrados no grupo de doentes com hipotiroidismo foram comparados com os determinados, nas mesmas condições experimentais, em 42 adultos saudáveis, de ambos os sexos (estudantes de medicina, médicos e pessoal de laboratório), com idade média sensivelmente equivalente à dos doentes estudados.

Análise estatística

Utilizou-se o teste *t* de Student, para a comparação das diferenças entre normais e doentes, com intervalos de confiança a 5%.²³ Expressaram-se todos os resultados como média \pm erro padrão da média.

MÉTODOS

Colheu-se de cada doente 10 ml de sangue venoso periférico, sem estase, com seringa heparinizada. Cerca de 2 ml da amostra de sangue, em anaerobiose, reservaram-se para a determinação da afinidade da hemoglobina para o oxigénio, calculada do valor da P50 *in vivo*.²¹ O valor da P50 *in vivo* indica a pressão parcial do oxigénio (PO₂) que corresponde à saturação de 50% da hemoglobina com o oxigénio, nas condições *in vivo*.

Nestas condições, o valor da P50 (expresso em mmHg) evidencia a influência exercida pela estrutura da hemoglobina, concentração de 2,3-difosfoglicerato, pH, temperatura e dióxido de carbono (efeito independente do pH) na posição da curva de dissociação da oxiemoglobina.

Utilizaram-se cerca de 4 ml de sangue total para a determinação da concentração de hemoglobina (como cianometemoglobina), obtenção do plasma para doseamento do fosfato inorgânico (pelo método de Fiske e Subbarow²⁵) e preparação do hemolisado para determinação da actividade das enzimas eritrocitárias.

Para separar o plasma e preparar o hemolisado, centrifugou-se parte do sangue a 4000 r.p.m durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido foi recentrifugado, sendo o plasma conservado a -15°C por tempo inferior a 30 dias, até se proceder ao doseamento do fosfato inorgânico (expresso em μ moles/ml de plasma). A camada globular foi, em seguida, lavada duas vezes com cerca de 5 volumes de cloreto de sódio a 0,9% e a 4°C, desprezando-se de cada vez o sobrenadante. Preparou-se o hemolisado a 1/20, diluindo 0,2 ml de eritrocitos lavados com 3,8 ml da solução indicada por Beutler.²⁶ Utilizou-se esta mistura, mantida a 4°C em agitação durante 10 minutos, para a determinação, a 37°C, da actividade da hexoquinase, fosfofructoquinase, piruvatoquinase,²⁶ desidrogenase da glicose-6-fosfato e desidrogenase do 6-fosfogliconato.²⁷ Calculou-se a actividade das enzimas eritrocitárias em relação à concentração de hemoglobina (medida como cianometemoglobina) do hemolisado, em UI/g Hb.

O restante sangue total foi, após colheita, imediatamente pipetado (em menos de 30 segundos) para tubos de gelo contendo as soluções desproteinizantes adequadas aos ensaios, nas proporções indicadas (sangue/solução desproteinizante): 1 vol/4 vol de ácido perclórico a 6% (p/p) para o adenosinotri-fosfato, 1 vol/3 vol de ácido tricloroacético a 8% (p/p) para o 2,3-difosfoglicerato e 1 vol/1 vol de ácido perclórico a 7% (p/v) para o lactato. Os tubos com as soluções correspondentes, depois de agitados, foram centrifugados a 4°C durante 10 minutos a 4000 r.p.m.; utilizaram-se os sobrenadantes desproteinizados, para a determinação do 2,3-difosfoglicerato²⁸ adenosinotri-fosfato²⁹ e lactato (método de Hohorst, modificado por Drewer³⁰).

Calcularam-se as concentrações de 2,3-DPG e ATP em μ moles/gHb, sendo o lactato expresso em μ moles/ml de sangue. Determinou-se cada um dos parâmetros em duplicado.

RESULTADOS

Os valores médios dos fosfatos orgânicos eritrocitários (2,3-difosfoglicerato e adenosinotri-fosfato), fosfato inorgânico do plasma, P50 *in vivo* e lactato do sangue total estão representados no Quadro 1. As médias dos valores de ATP nos grupos com hipotiroidismo e no grupo normal não apresentam diferenças significativas entre si. Pelo contrário, a concentração média do 2,3-DPG, quase idêntica entre os normais e doentes do Grupo I, aumentou significativamente com a terapêutica com tiroxina ($p < 0,01$). Observou-se idêntica evolução para a P50 ($p < 0,05$) e lactato ($p < 0,01$). A concentração do fosfato inorgânico no plasma era, em qualquer dos grupos de doentes, significativamente superior ao normal, sobretudo nos indivíduos sujeitos a terapêutica (Quadro 1).

De todas as enzimas estudadas (Quadro 2), apenas a desidrogenase da glicose-6-fosfato apresentou diferenças muito significativas, relativamente ao normal ($p < 0,001$). A actividade da DG6P, subnormal em quase todas as observações efectuadas, elevou-se ligeiramente, mas sem significado estatístico, com a terapêutica específica (Fig. 1). O comportamento das restantes enzimas foi mais heterogêneo, embora, em geral, houvesse um ligeiro aumento de actividade após o tratamento. Exceptua-se a diminuição significativa ($p < 0,02$) induzida pela terapêutica na actividade da fosfofructoquinase, relativamente aos valores observados nos hipotiroideus não tratados.

Quadro 1

Concentrações (média \pm erro padrão da média) do 2,3-difosfoglicerato e adenosinotrisfosfato eritrocitários, lactato do sangue total, fosfato inorgânico plasmático e valor da P50 in vivo, nos doentes com hipotiroidismo, antes (Grupo I) e durante (Grupo II) o tratamento com L-tiroxina e no grupo normal

GRUPOS	2,3-DPG (μ moles/gHb)	ATP (μ moles/gHb)	LACTATO (μ moles/ml)	Pi (μ moles/ml)	P50 in vivo (mmHg)
Normal					
X \pm EPM	12,07 \pm 1,23	3,51 \pm 0,61	0,96 \pm 1,13	1,06 \pm 0,03	27,02 \pm 0,66
(n)	(21)	(21)	(27)	(42)	(19)
Hipotiroidismo					
Grupo I					
X \pm EPM	12,84 \pm 0,92	3,71 \pm 0,20	1,10 \pm 0,20	1,18 \pm 0,05**	27,60 \pm 1,41
(n)	(25)	(12)	(21)	(27)	(14)
Grupo II					
X \pm EPM	13,44 \pm 0,99+	3,79 \pm 0,22	1,19 \pm 0,29+	1,24 \pm 0,03#	28,74 \pm 1,48*
(n)	(21)	(12)	(10)	(24)	(10)

O total de observações para cada parâmetro é indicado entre parêntesis (n)

Diferenças significativas entre normais e doentes: * $p < 0,05$; ** $p < 0,025$; + $p < 0,01$; # $p < 0,001$

Quadro 2

Actividade das enzimas eritrocitárias da glicólise — hexoquinase (HK), fosfofructoquinase (PFK), piruvatoquinase (PK) — e da via das fosfopentoses — desidrogenase da glicose-6-fosfato (DG6P) e desidrogenase do 6-fosfogliconato (D6PG) — em indivíduos hipotiroideus sem terapêutica (Grupo I), hipotiroideus em tratamento com L-tiroxina (Grupo II) e normais.

GRUPOS	HK	PFK	PK	DG6P	D6PG
	(UI/gHb)				
Normal					
X \pm EPM	0,44 \pm 0,08	8,72 \pm 2,01	9,78 \pm 1,37	10,72 \pm 1,01	8,86 \pm 0,80
(n)	(13)	(13)	(13)	(25)	(25)
Hipotiroidismo					
Grupo I					
X \pm EPM	0,42 \pm 0,07	9,42 \pm 1,35	10,58 \pm 1,62	7,98 \pm 1,09*	8,36 \pm 0,98
(n)	(16)	(16)	(14)	(21)	(21)
Grupo II					
X \pm EPM	0,48 \pm 0,08	7,16 \pm 0,94+	11,56 \pm 3,27	8,37 \pm 0,99*	8,99 \pm 1,02
(n)	(12)	(12)	(12)	(21)	(21)

O total de observações efectuadas para cada parâmetro é indicado entre parêntesis (n).

Diferenças significativas entre normais e doentes (*) $p < 0,001$ e entre doentes com e sem terapêutica (+) $p < 0,02$.

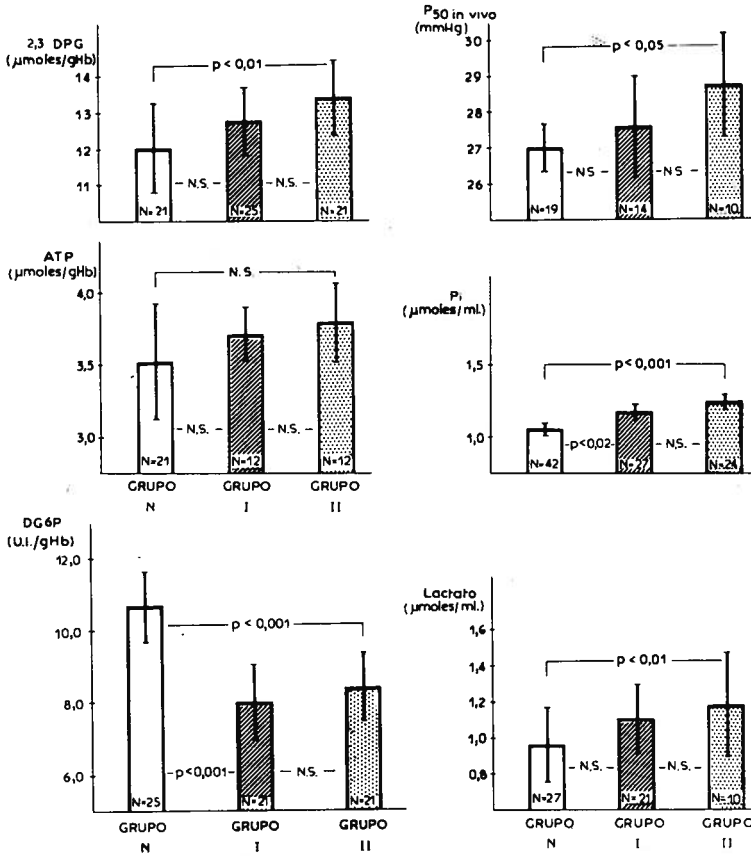


Fig. 1 — Comparação dos valores médios (média ± erro padrão da média) do lactato no sangue total, fosfato inorgânico plasmático (Pi), concentração eritrocitária do 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e adenosinotriposfato (ATP), valor da P50 in vivo e desidrogenase da glicose 6-fosfato eritrocitária (DG6P) em normais (Grupo I) e hipotiroideus com terapêutica substitutiva (Grupo II). N indica o número de observações efectuadas em cada grupo.

DISCUSSÃO

Gahlenbeck e Bartels,³¹ ao verificarem que a administração de triiodotironina a homens e ratos eutiroideus provocava diminuição da afinidade da hemoglobina para o oxigénio, atribuíram este aumento da P50 à estimulação do consumo de oxigénio próprio do hipertiroidismo induzido. Desde então, têm surgido várias tentativas para relacionar a produção do 2,3-DPG e valores da P50 com as exigências tecidulares em oxigénio,^{17, 20} reduzidas no hipotiroidismo e aumentadas no hipertiroidismo.³² Esta interrelação não está confirmada, pois que a generalidade dos trabalhos não inclui, entre os parâmetros estudados, a determinação do consumo de oxigénio tecidual.

Entretanto, observações efectuadas em doentes cujas disfunções da tiroideia deveriam coexistir com variações marcadas do consumo de oxigénio, não demonstraram alterações evidentes da concentração do 2,3-DPG eritrocitário e P50,^{2, 21, 33} ao contrário de outros estudos,^{17, 20} entre os quais se inclui o presente trabalho.

Ainda que não existam variações da concentração do 2,3-DPG ou P50 diferentes do normal nos hipotiroideus não tratados, observaram-se aumentos significativos dos valores daqueles parâmetros durante o tratamento substitutivo, de curta duração (Quadro 1).

O ATP não apresentou variações significativas, embora, tal como os valores de 2,3-DPG, P50, lactato e fosfato inorgânico, tendesse a elevar-se mais nos hipotiroideos tratados que nos não tratados (Fig. 1).

É um facto assente que a posição da curva de dissociação da oxiemoglobina do sangue humano é afectada, entre outros factores, pelas concentrações do 2,3-DPG e ATP intraglobular.^{34,35} A fixação reversível daqueles fosfatos orgânicos à hemoglobina induz um desvio da curva de dissociação para a direita, o que, traduzindo a diminuição da afinidade da hemoglobina para o oxigénio, deverá facilitar a oxigenação tecidular. Todavia, o efeito alostérico mediado pelo 2,3-DPG no valor da P50 tem importância fisiológica mais marcada que o efeito da ATP. Na realidade, de todos os fosfatos orgânicos eritrocitários, o 2,3-DPG representa cerca de $\frac{1}{3}$ do total, sendo a fracção restante constituída quase exclusivamente pelo ATP. A inexistência de variações do ATP, ao contrário do verificado para o 2,3-DPG no presente trabalho, sugere o envolvimento deste metabolito na modificação da P50, embora não fossem observadas correlações entre ambos os parâmetros. Esta discrepância poderá ser devida às condições de determinação da P50 *in vivo*, que, ao contrário da P50 *standard* é condicionada pelos valores reais de pH, PCO₂ e temperatura corporal.

Supondo que o aumento da P50, verificado com a terapêutica substitutiva, favorece a oxigenação tecidular, não deixa de ser estranho que os níveis mais elevados de lactato em circulação tenham sido observados naquele grupo de doentes. Considerando, todavia, a reconhecida estimulação do consumo de oxigénio induzido pelas hormonas tiroideias, a par do discreto, embora significativo, aumento da P50 *in vivo*, é de admitir que as exigências metabólicas nos doentes tratados não sejam integralmente satisfeitas, pelo menos no período de observação.

O sistema de transporte de oxigénio aos tecidos é influenciado não só pela afinidade da hemoglobina para o oxigénio, mas também por mecanismos mais gerais, como a função pulmonar, fluxo sanguíneo e concentração de hemoglobina.³⁶ A função tiroideia, além de condicionar, em conjunto com a temperatura, o consumo tecidular de oxigénio^{32,37} também afecta directamente a contractibilidade ventricular.³⁸ Assim, talvez, numa primeira fase de terapêutica com tiroxina, ou em alguns doentes com reserva cardíaca limitada, sobrevenham elevações de 2,3-DPG e P-50, no entanto insuficientes para reequilibrar o fornecimento de oxigénio com o acréscimo das exigências tecidulares. O predomínio transitório do metabolismo anaeróbico e/ou variação do estado redox celular nestas condições, poderiam explicar o aumento de concentração do lactato em circulação, conforme foi observado.

A elevação do 2,3-DPG nos hipotiroideos tratados talvez seja resultante da acção directa da tiroxina no metabolismo eritrocitário, de acordo com os trabalhos anteriores.^{12,14,17,19} A inexistência de variações estudadas (Quadro 2) sugere que o efeito da tiroxina incide essencialmente na via de Rapoport-Luebering, com repercussões imediatas na afinidade da hemoglobina para o oxigénio.

A existência de níveis significativamente subnormais na actividade da DG6P confirma a acção exercida pela tiroxina na via das fosfopentoses por mecanismos ainda desconhecidos.^{2,8-11} De facto, a actividade da DG6P não parece relacionada com a concentração de hormonas tiroideias em circulação.² Por outro lado, parece ser de excluir a acção directa daquelas hormonas nas moléculas enzimáticas.⁹

Admitimos, através dos resultados obtidos, que a determinação da actividade da DG6P possa constituir um índice da função tiroideia, nomeadamente quando se observam valores subnormais característicos do hipotiroidismo. Nestes casos, o aumento da actividade da DG6P e, em fases mais precoces, a elevação da concentração do 2,3-DPG e nível de P50, permitiram avaliar o grau de melhoria clínica registada, sobretudo se se tomar em conta a curta duração do tratamento (8 a 30 dias) e a baixa dose de tiroxina administrada.

ABREVIATURAS

Hb: Hemoglobina
 Ht: Hematócito
 CMHG: Concentração média de hemoglobina globular
 Pi: Fosfato inorgânico plasmático
 2,3-DPG: 2,3-difosfoglicerato
 ATP: Adenosinotrifosfato
 P50 *in vivo*: Pressão parcial do oxigênio em que, nas condições *in vivo*, 50% da hemoglobina se encontra saturada.
 HK: Hexoquinase
 PFK: Fosfofructoquinase
 PK: piruvatoquinase
 DG6P: Desidrogenase da glicose-6-fosfato
 D6PG: Desidrogenase do 6-fosfogliconato

SUMMARY

RED BLOOD CELL METABOLISM IN HUMAN HYPOTHYROIDISM BEFORE AND DURING THE COURSE OF SHORT-DURATION REPLACEMENT HORMONAL THERAPY

The effect of replacement hormonal therapy in the erythrocyte metabolism was evaluated in 16 patients with primary hypothyroidism, both before and during the course of thyroid therapy. Besides the routine haematological determinations, erythrocyte concentration of 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate, whole blood lactate, serum inorganic phosphate and adenosine triphosphate, and *in vivo* value of P50 of oxyhaemoglobin dissociation curve were evaluated as well as the activity of the following erythrocyte enzymes: hexokinase, phosphofructokinase, pyruvate-kinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and 6-phosphoglyconate dehydrogenase. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase remained, before and during the therapy, significantly below normal range. Contrariwise, therapy was paralleled by an increase in the concentration of 2,3-diphosphoglycerate, lactate and values of P50. The concentration of inorganic phosphate exceeded normal values both before and during therapy. The results obtained suggest that the increased oxygen consumption induced by thyroid hormones may be ascribed to direct stimulation of erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate, although not enough to meet, through an increased dissociation of haemoglobin-bound oxygen, the metabolic needs. The low levels of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity may perhaps be regarded as a characteristic sign of the disease.

BIBLIOGRAFIA

- 1 SCHWARTZ HL, CARTER AC, SINGH SP, KYDD DM, COSTANZO RR Jr: Relationship of red blood cell ¹³¹I-L-triiodothyronin binding coefficient and red cell maturation. III. Binding to mature erythrocyte and reticulocyte cell membranes. *Endocrinology* 1968; 82: 569.
- 2 SWAMINATHAN R, SEGALL DH, CHAPMAN C, MORGAN DP: Red-blood-cell composition in thyroid disease. *Lancet* 1976; 2: 1382.
- 3 STER RH, TASHIAN RE: Thyroid status and carbonic anhydrase levels in mouse erythrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976; 153: 143.
- 4 KONDO T, TANIGUCHI N, ISHIKAWA N, IDE H, TAKAKUWA E, MURAO M: Effect of thyroid hormone on the levels of erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes and 2,3-diphosphoglycerate in rabbits. *Metabolism* 1978;27: 599.
- 5 COLE CH, WADDELL RW: Alteration in intracellular sodium concentration and ouabain-sensitive ATPase in erythrocytes from hyperthyroid patients. *J Clin Endocr Metab* 1976; 42: 1056.
- 6 MACHO L: The effect of thyroid hormone on the glycolytic activity of blood. *Clin Chim Acta* 1957; 2: 345.
- 7 SPIRO MJ, BALL EG: A comparison of the pathways of glucose catabolism in the normal and hyperthyroid rat. *J. Biol Chem* 1958; 231: 31.
- 8 NECHELES T, BEUTLER E: The effect of triiodothyronine on the oxidative metabolism of erythrocytes. I. Cellular studies. *J Clin Invest* 1959; 38: 788.
- 9 BUTENANDT O: Erythrocyte enzyme activities in hypothyroid children. *Acta Haem* 1972; 47: 335.
- 10 KONTTINEN A, VIHERRKOSKI M: Blood transketolase and erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in thyrotoxicosis. *Clin Chim Acta* 1968; 22: 145.

- 11 GOEBEL KM, GOEBEL FD, NEIZERT A, HAUSMANN L, SCHNEIDER J: Adaptation of red cell enzymes and intermediates in metabolic disorders. *Enzyme* 1975; 19: 201.
- 12 SNYDER LM, REDDY WJ: Mechanism of action of thyroid hormones on erythrocyte 2,3-diphosphoglyceric acid synthesis. *J Clin Invest* 1970; 49: 1993.
- 13 SNYDER LM, NERI LL, CHUNG SK, MOLINARI PF, REDDY WF: The variation of glucose metabolism in human erythrocytes in the presence of L-thyroxine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 138: 1.
- 14 DUHM J, GERLACH E: On the mechanisms of the hypoxia-induced increase of 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes. *Pflugers Arch* 1971; 326: 254.
- 15 TORRANCE JD: Diphosphoglycerate mutase assay; the effect of pyruvate, lactate dehydrogenase and thyroid hormone in the assay. *Clin Chim Acta* 1974; 50: 103.
- 16 CZERNICK AJ, PSYCHOYOS S, CASH WD: Failure of thyroid hormones to enhance the activity of diphosphoglycerate mutase. *Endocrinology* 1974; 96: 508.
- 17 MILLER LD, SUGARMAN HJ, MILLER WW, DELIVORIA-PAPADOPOULOS M, DIACO JF, GOTTLIEB AJ, OSKI FA: Increased peripheral oxygen delivery in thyrotoxicosis: role of red cell 2,3-diphosphoglycerate. *Ann Surg* 1970; 122: 1051.
- 18 RODRIGUEZ JM, SHAHIDI NT: Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate in adaptative red-cell-volume deficiency. *N Engl J Med* 1971; 285: 479.
- 19 VERSMOLD H, HORN K, WINDTHORST H, RIEGEL KP: The rapid postnatal increase of red cell 2,3-diphosphoglycerate in relation to plasma thyroxine. *Resp Physiol* 1973; 18: 26.
- 20 GROSS HJ, FARMER BB: Reduction-oxidation potential of blood determined by oxygen releasing factor in thyroid disorders. *Nature* 1969; 222: 875.
- 21 ZAROULIS CG, KOURIDES IA, VALERI CR: Red cell 2,3-diphosphoglycerate and oxygen affinity of hemoglobin in patients with thyroid disorders. *Blood* 1978; 52: 181.
- 22 DUHM J, DEUTICKE B, GERLACH E: Beeinflusst triiodothyronin der 2,3-Diphosphoglycerat Gehalt von Erythrocyten? *Naturwissenschaften* 1969; 56: 329.
- 23 SCHWARTZ D, LAZAR P: Éléments de Statistique Medicale et Biologique, Flammarion Medicine — Sciences, Paris, 1975.
- 24 LICHTMAN MA, MURPHY M, POGAL M: The use of a single venous blood sample to assess oxygen binding to haemoglobin. *Brit J Haematol* 1976; 32: 89.
- 25 FISKE CH, SUBBAROW Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925; 66: 375.
- 26 BEUTLER E: Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods, Grune & Stratton, New York, 1971.
- 27 GLOCK CE, MCLEAN P: Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate of rat liver. *Biochem J* 1953; 55: 400.
- 28 ROSE Z, LIEBOWITZ J: Direct determination of 2,3-diphosphoglycerate. *Anal Biochem* 1970; 35: 177.
- 29 LAMPRECHT W, TRAUTSCHOLD I: Determination of adenosine-5'-phosphate with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In «Methods of Enzymatic Analysis», vol 4, H. U. Bergmeyer (ed), Acad Press Inc New York, 1974, p. 2101.
- 30 DREWIER PA: Carbohydrate derivatives and metabolites. In «Clinical Chemistry. Principles and Technics» R. J. Henry, D. C. Cannon e J. W. Winkelman (eds), 2.ª ed. Harper Row Publ, Hagerston, Maryland, 1974, p. 1328.
- 31 GAHLENBECK H, BARTELS H: Veränderungen der sauerstoffbindungskurven des Blutes bei hyperthyreosen und nach Gabe von triiodothyronin bei Gesunden und bei Ratten. *Klin Wschr* 1968; 66: 547.
- 32 STERLING K: Thyroid hormone action at the cell level. *N Engl J Med* 1979; 300: 117.
- 33 CORRIGAN K, GOLDMAN A, POLLETT R, GARMS P: Hemoglobin for oxygen in hypothyroidism. *Clin Res* 1977; 25: 12A.
- 34 BENESCH R, BENESCH RE: The effect of organic phosphate from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 26: 162.
- 35 CHANUTIN A, CURNISH RR: Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch Biochem* 1967; 121: 96.
- 36 FINCH CA, LENFANT C: Oxygen transport in man. *N Engl J Med* 1972; 286: 407.
- 37 STERLING K, MILCH PO, BRENNER MA, LAZARUS JH: Thyroid hormone action: the mitochondrial pathway. *Science* 1977; 197: 966.
- 38 CROWLEY WF, RIDGWAY EC, BOUGH EW, FRANCIS GS, DANIELS GH, KOURIDES IA, MYERS GS, MALOOF F: Non-invasive evaluation of cardiac function in hypothyroidism. Response to gradual thyroxine replacement. *N Engl J Med* 1977; 296: 1.

Pedido de separatas: Carlota Proença
 Instituto de Química Fisiológica
 Faculdade de Medicina de Lisboa
 Hospital de Santa Maria
 1600 Lisboa - Portugal