

SIRM

Estudo do metabolismo eritrocitário



78125 | Carolina Correia

78680 | Luís Rita

78127 | Rui Infante

Lisboa, 11 de Março de 2015

Resumo

Neste primeiro trabalho pretendeu-se, principalmente, compreender o metabolismo eritrocitário e as melhores condições para a ocorrência do mesmo, tais como a temperatura ideal a que ocorre a glicólise e a fermentação láctica, processos estes que transformam a glicose em piruvato e de seguida em lactato, e o conhecimento de métodos de determinação da concentração de glicose e lactato numa amostra de sangue, incubando esta a diferentes temperaturas, recorrendo à desproteinização de soluções que, desnaturando proteínas, conseguem parar determinadas reações e, finalmente, do método espectrofotométrico para a determinação de concentrações de diferentes compostos, através da relação entre a quantidade relativa de radiação absorvida pela amostra e a concentração de um dado composto.

Após a realização deste trabalho, conclui-se que os processos em estudo ocorrem preferencialmente a 37°C (em comparação com 4°C), uma vez que se verificou uma maior concentração de glicose consumida ($[Glicose]_{consumida} = 2,74 \text{ mM}$) e de lactato produzido ($[Lactato]_{produzido} = 4,185 \text{ mM}$) a esta temperatura, obtendo-se uma razão molar ($R_M = \frac{[Lactato]_{produzido}}{[Glicose]_{consumida}}$) aproximadamente igual a 1,53. Sabendo, desde início, que o valor esperado seria R_M ligeiramente menor que 2, calculou-se um erro relativo de 23,5%, concluindo-se que na concretização do método existiram erros experimentais que contribuíram para o desvio verificado.

Introdução teórica

Nesta introdução teórica será feita menção a células, vias metabólicas e processos experimentais que têm relevância para a concretização e compreensão deste trabalho.

Sangue - eritrócitos

O eritrócito é uma das células constituintes do sangue, sendo responsável pelo transporte de O_2 e por uma parte do transporte de CO_2 . São células altamente especializadas, produzidas na eritropoiese, processo no qual perdem o seu núcleo e os restantes organelos, associando-se a uma molécula especializada no transporte de O_2 , a hemoglobina. Por outro lado, apresentam uma forma bicôncava, característica que permite a rápida transferência de oxigénio para fora e dentro da célula.

Glicólise

Para que o eritrócito possa obter energia, este recorre à glicólise. A glicólise ocorre no citoplasma e envolve a oxidação de glicose em piruvato. Este processo encontra-se dividido em três fases: a ativação, clivagem e oxidação, e obtenção de ATP.

Na primeira, utilizam-se duas moléculas de ATP, para ativar a glicose e a transformar em frutose-1,6-bifosfato. Na segunda, esta é clivada e dá origem a dois gliceraldeídos-3-fosfato. Finalmente, através da oxidação destes compostos, ocorre a redução do NAD^+ a NADH. Paralelamente formam-se 4 moléculas de ATP. Assim, são obtido como produtos finais: duas moléculas de ácido pirúvico, duas moléculas de NADH e um rendimento energético de duas moléculas de ATP.

O NADH tem de ser regenerado à forma oxidada, pois as quantidades celulares de NAD^+ são limitadas. Não possuindo mitocôndrias, o eritrócito recorre à fermentação láctica para regenerar NAD^+ .

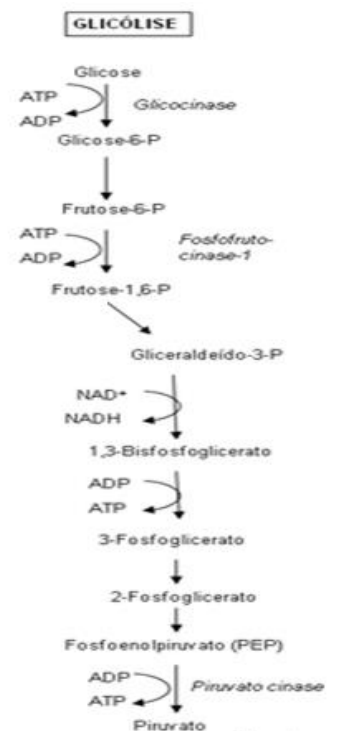


Fig. 1 – Esquema da glicólise.

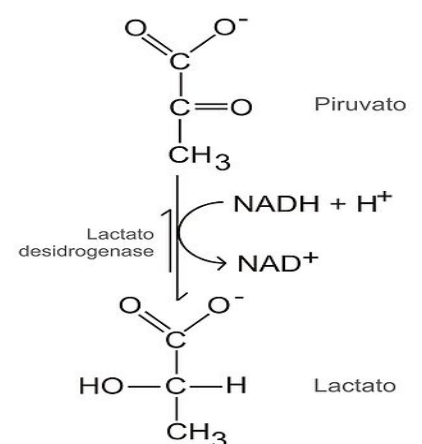


Fig. 2 – Esquema da fermentação láctica.

Fermentação láctica, respiração aeróbia e via das pentoses-fosfato

A fermentação láctica consiste na conversão do piruvato a lactato com a oxidação do NADH a NAD⁺, processo realizado pela lactato-desidrogenase. A partir de uma molécula de glicose se obtém duas de piruvato, assim, a razão molar - razão teórica entre a quantidade de lactato produzido e de glicose consumida, é:

$$R_M = \frac{n^{\circ} \text{ moles de lactato produzido}}{n^{\circ} \text{ de moles de glicose consumida}} = \frac{2}{1} = 2$$

Contudo, nem todo o piruvato passa pela fermentação láctica. Parte pode ser utilizada por outras células sanguíneas, como os leucócitos, para a respiração aeróbia. Nesse caso, quando passa para a mitocôndria, é transformado primeiramente em acetil-CoA, entrando de seguida no ciclo de Krebs. Finalmente, ocorre a fosforilação oxidativa.

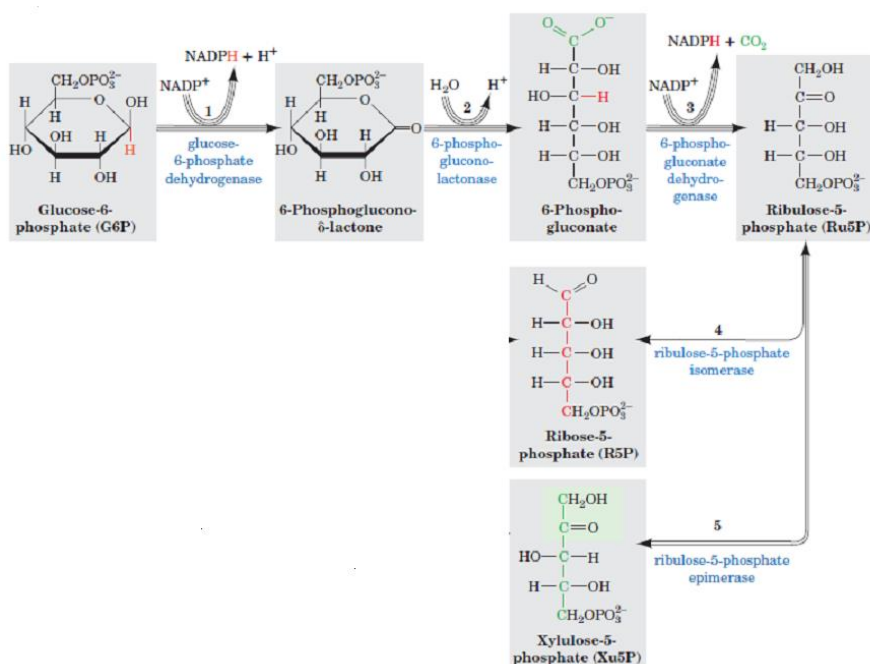


Fig. 3 – Esquema da fase oxidativa da via dos fosfatos de pentose.

Por outro lado, nem toda a glicose origina piruvato: na primeira reação da glicólise, forma-se glucose-6-fosfato, a partir de glicose. A glucose-6-fosfato é utilizada numa via metabólica de elevada importância para os eritrócitos: a via das pentoses-fosfato.

Esta via permite que haja produção de poder redutor sob a forma de NADPH, síntese de pentoses e o catabolismo de pentoses provenientes da alimentação. A via pode ser dividida em duas fases: fase oxidativa irreversível e a fase não oxidativa de interconversões reversíveis. Na primeira, a glucose-6-fosfato transforma-se em ribose-5-fosfato havendo produção de NADPH.

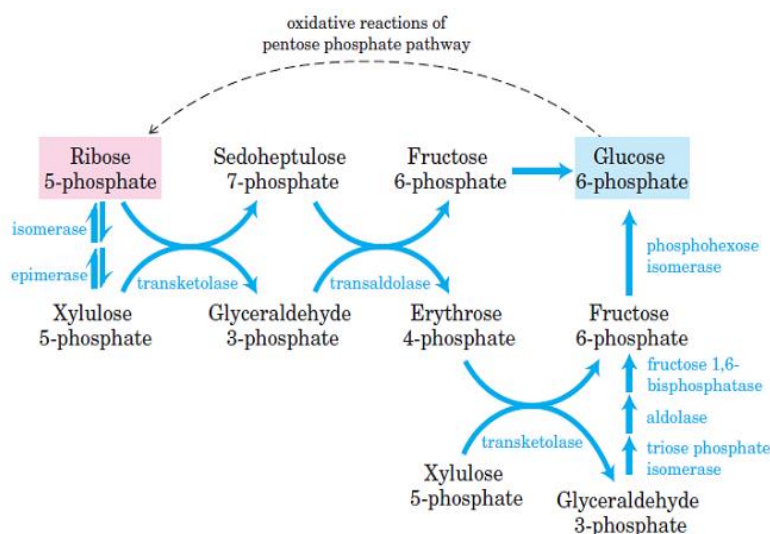


Fig. 4 – Esquema da fase não oxidativa da via dos fosfatos de pentose.

Na segunda, ocorrem interconversões reversíveis de fosfatos de oses, permitindo a obtenção de glicose 6-fosfato. Consequentemente, sintetiza-se mais ribose-5-fosfato e, assim, mais NADPH.

O NADPH é uma co-enzima que participa na redução do glutatião. O glutatião evita a danificação de constituintes celulares, prevenindo a formação de espécies reativas de O_2 , salientando-se assim a sua grande importância no eritrócito, que está constantemente exposto ao oxigênio e às suas espécies reativas.

Espectrofotometria e Lei de Lambert-Beer

Os espectrofotômetros avaliam a absorvância de um material. Esta é uma propriedade que mede a capacidade dele absorver radiação com uma frequência específica, baseando-se no princípio que muitas espécies têm de absorver radiação visível e ultravioleta.

Para medir a absorvância, a amostra é colocada no interior de um recipiente com duas faces transparentes, uma *cuvette*, no interior do espectrofotômetro. Para um determinado comprimento de onda, vai ser emitida luz, com uma certa intensidade I_0 , que passará através da *cuvette*. Visto que parte da radiação é absorvida pela amostra teremos depois uma intensidade I menor, que será posteriormente percebida pelo detetor do espectrofotômetro. Assim, a absorvância é dada por:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

De seguida, utilizando a lei de Lambert-Beer é possível obter a concentração da amostra. Esta dita que a absorvância de uma amostra é diretamente proporcional à concentração da amostra, segundo a seguinte equação:

$$A = \alpha l c$$

Em que α é o coeficiente de extinção molar ($\text{mol}^{-1}\text{L}^{-1}\text{cm}^{-1}$), l é o comprimento da *cuvette* onde está colocada a amostra e c é a concentração da mesma.

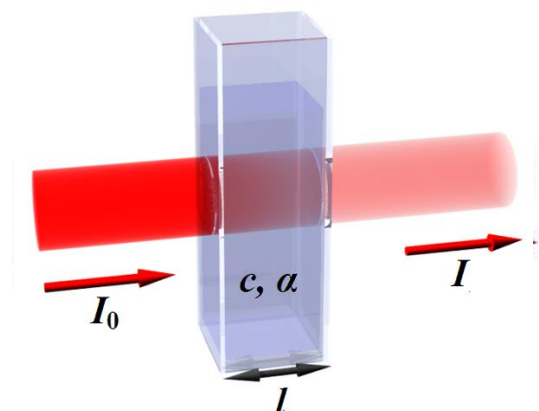


Fig. 5 – Esquema representativo da absorvância de uma substância de concentração c e coeficiente de extinção molar α .

Procedimento Experimental

FASE 1

O primeiro passo da experiência consistiu em separar uma amostra de sangue em 3 porções, com finalidades distintas. Ao contrário da t_0 que seguiu diretamente para o procedimento de desproteinização, as outras 2 foram incubadas a temperaturas diferentes ($t'_{60} - 4^\circ\text{C}$; $t_{60} - 37^\circ\text{C}$). A realização deste passo permitirá, mais tarde, estudar a evolução das concentrações de lactato e glicose, a diferentes temperaturas, nas respetivas amostras de sangue (por outras palavras, metabolismo eritrocitário). O período de incubação prolongou-se por cerca de 60 minutos.

Obtenção de desproteinizados para determinação da concentração de glicose

Após a incubação, foram criadas mais duas soluções: “Branco” e “Padrão”. A primeira terá como objetivo a posterior calibração do espectrofotómetro e a segunda utilizar-se-á como ponto de referência dos valores que se obterão mais à frente (os valores das absorvâncias desta solução permitirão calcular, mais tarde, as concentrações de glicose nas amostras). A grande importância da amostra “Padrão” reside no facto de se conhecer a concentração de glicose e, portanto, permitir estabelecer uma relação concentração/absorvância. O método de conceção do “Branco” prendeu-se exclusivamente à adição de 1000 μL de H_2O destilada a um *ependorf*, por outro lado, a solução “Padrão” obteve-se adicionando uma quantidade ligeiramente inferior de água (900 μL) e 100 μL de uma solução padrão de glicose.

Às restantes soluções (G_0 , G_{60} e G'_{60}) que continham as amostras de sangue, também se adicionou água destilada com o intuito de causar a hemólise (lise celular) e, assim, se diluir a hemoglobina.

As amostras de sangue previamente preparadas serão alvo de algumas modificações ao seu nível físico-químico, nomeadamente: adicionar-se-á uma base forte que causará a desnaturação das proteínas presentes (500 μL de Hidróxido de Bário) e um outro composto químico que fará com que as mesmas precipitem (500 μL de Sulfato de Zinco). Com intuito de homogeneizar as soluções anteriores, utilizou-se o vórtex. De seguida, procedeu-se à centrifugação destes compostos, para tornar viável a extração do sobrenadante, presente à superfície de cada uma das soluções, para um novo *ependorf* de 1,5 mL. Por fim, guardaram-se as amostras desproteinizadas e as soluções “Padrão” e “Branco”. Estas desproteinizações foram vitais, uma vez que permitiram que os níveis de glicose se mantivessem os mesmos até à aula seguinte (os eritrócitos presentes no sangue são uma das principais responsáveis pela

alteração destes valores, assim sendo, o método descrito incidiu essencialmente em removê-las do meio).

Obtenção de desproteinizados para determinação da concentração de lactato

Paralelamente, prepararam-se outras 3 soluções, agora com o intuito de registar as concentrações finais de lactato. Para tal transferiu-se cerca de 500 µL de sangue de cada um dos tubos (t_0 , t_{60} e t'_{60}) para outros 3 *ependorfs* de 1,5 mL. Nesta fase, adicionou-se 500 µL de um ácido muito forte (ácido perclórico) a cada uma das soluções, de modo a que as proteínas presentes nas mesmas desnaturassem e precipitassem no fundo do *ependorf*. Uma vez mais, homogeneizaram-se os tubos no vórtex para de seguida proceder à centrifugação do conteúdo presente nos mesmos. Este processo é necessário para, posteriormente, se remover 400 µL do sobrenadante para outros 3 tubos de *ependorf*. Cujo destino final foi, inevitavelmente, o seu armazenamento até à aula seguinte (amostras guardadas a -20°C). A intenção da desnaturação das amostras é a mesma que anteriormente, com exceção de que agora se pretende que sejam os níveis de lactato a permanecerem imutáveis.

FASE 2

Determinação da concentração de glicose

Apenas nesta segunda aula prática se atingiram os objetivos propostos desde início. Graças a uma “Mistura de reação” foi possível realizar 2 reações químicas importantíssimas para a determinação da glicose presente nas amostras. A importância destas transformações, tem por base o facto de não se determinar a concentração de glicose diretamente, mas sim a de quinoneimina (produto final desta cadeia de 2 reações - Fig. 6). A adição deste composto também se verificou nas outras 2 soluções de “Branco” e “Padrão”. Feito isto, agitaram-se os tubos por inversão (de modo a homogeneizar as soluções presentes nos mesmos).

Por fim, incubaram-se as amostras a 37°C durante 10 minutos e

aguardou-se que as enzimas adicionadas anteriormente (glicose oxidase e peroxidase) catalisassem as 2 reações fundamentais de formação de quinoneimina. O último passo consistiu, naturalmente, na medição das absorvâncias de cada uma das amostras, utilizando

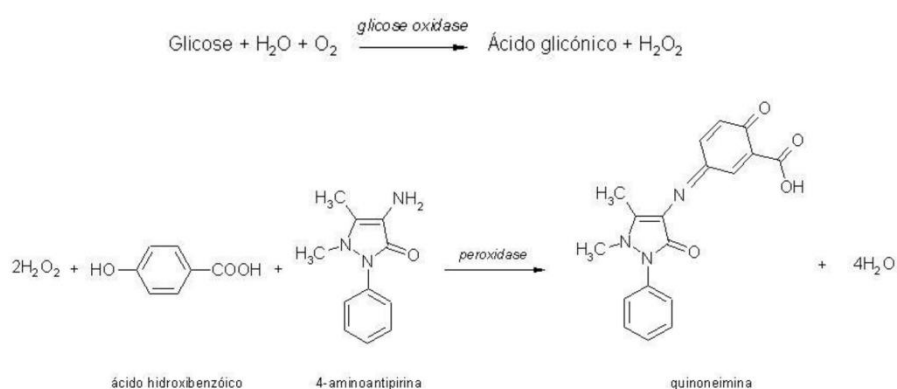


Fig. 6 – Conjunto de reações que conduzem à produção de quinoneimina, a partir de uma molécula de glicose.

como fator de calibração a solução “Branco” preparada inicialmente (este processo foi realizado no espectrofotómetro). Antes de se proceder às respetivas leituras, teve de se transferir as soluções de interesse para o interior de 4 *cuvettes* diferentes e, agora sim, ligar o aparelho e dar início ao procedimento (um dos cuidados a ter neste ponto foi assegurar que as 2 faces translúcidas das *cuvettes* estavam numa posição que permitia a passagem do feixe de radiação a partir das mesmas. Uma vez com os dados das absorvâncias disponíveis tornou-se possível calcular a concentração de glicose em cada uma das amostras, recorrendo à seguinte fórmula:

$$[Glicose] = \frac{Abs_{amostra}}{Abs_{padrão}} * 100 \text{ (mg/dL)}$$

Representando o valor 100, a concentração da solução “Padrão” – a tal solução de referência que se mencionou anteriormente.

Determinação da concentração de lactato

Paralelamente ao procedimento anterior, procedeu-se à preparação das amostras para a determinação da concentração de lactato. Tal como anteriormente, não se determinou diretamente a concentração do substrato de interesse, mas sim de um outro produto de reação – NADH (Fig. 7).

Nesta fase prepararam-se 5 soluções distintas L-Lactato + NAD⁺ $\xrightarrow{\text{lactatodesidrogenase}}$ Piruvato + NADH + H⁺
– “Branco”, “Controlo do método” e 3 amostras

Fig. 7 – Reação de formação de NADH.

contendo os desproteinizados: L₀, L₆₀ e L’₆₀. O objetivo do “Controlo do método” nesta fase, tem por base a síntese de uma solução que permitirá retirar conclusões acerca do funcionamento do método descrito.

A preparação do “Branco” consistiu simplesmente na adição de tampão hidrazina, água destilada, ácido perclórico e NAD⁺ a um *ependorf*. O “Controlo do método” foi preparado de um modo mais ou menos semelhante ao anterior, no entanto, não se adicionou água destilada e juntou-se solução padrão de L-lactato.

As amostras L₀, L₆₀ e L’₆₀ foram elaboradas recorrendo apenas ao tampão hidrazina, aos desproteinizados e ao NAD⁺. O tampão hidrazina tem um papel fundamental, na medida em que impede que o piruvato posteriormente formado volte a reagir com o NADH para formar lactato, ajudando assim a garantir que todo o lactato é convertido em piruvato.

Finalmente, procedeu-se à leitura das absorvâncias de cada uma das amostras anteriores, contra o branco, ao comprimento de onda de 340 nm (Abs₁). Feito isto, foi necessário recolher

as amostras para novos tubos de *ependorf* e agora adicionar 10,8 µL de uma enzima que catalisará a reação de lactato em piruvato (lactato desidrogenase - LDH), com uma consequente produção de NADH. Uma vez terminado isto, incubaram-se as amostras por 30 minutos a 37°C (temperatura ótima de ação desta enzima, permitiu minimizar o tempo de espera, sem comprometer a ação da mesma) e procedeu-se novamente à leitura das absorvâncias de cada uma (Abs₂).

Recolheram-se os dados obtidos, e a partir das seguintes fórmulas obtiveram-se as concentrações de lactato do “Controlo do Método” e das amostras, respetivamente:

$$[Lactato] = 7,5 \times \Delta Abs \text{ (mM)}$$

$$[Lactato] = 6,94 \times \Delta Abs \text{ (mM)}$$

Resultados

Glicose

Absorvância de cada uma das soluções contra o “Branco”:

I	Branco	Padrão	G ₀	G ₆₀	G' ₆₀
Abs	0,000	0,150	0,119	0,045	0,098

Cálculo da concentração de glicose em cada solução:

$$[Glicose] = \frac{Abs_{amostra}}{Abs_{padrão}} \times 100 \text{ (mg/dL)}$$

II	Branco	Padrão	G ₀	G ₆₀	G' ₆₀
[Glicose] (mg/dL)	0,000	100	79,3	30,0	65,3

Cálculo da concentração de glicose consumida a diferentes temperaturas:

$$[Glicose Consumida]_{4^{\circ}C} = [G_0] - [G'_{60}] \text{ (mg/dL)}$$

$$[Glicose Consumida]_{37^{\circ}C} = [G_0] - [G_{60}] \text{ (mg/dL)}$$

III	Temperatura (°C)	[Glicose Consumida] (mg/dL)
	4	14
	37	49,3

Lactato

Absorvância de cada uma das soluções contra o “Branco” (antes de se adicionar LDH):

IV	Branco	Controlo	L_0	L_{60}	L'_{60}
Abs ₁	0,000	0,009	0,064	0,060	0,066

Absorvância de cada uma das soluções contra o “Branco” (depois de se adicionar LDH):

V	Branco	Controlo	L_0	L_{60}	L'_{60}
Abs ₂	0,000	0,592	0,191	0,790	0,245

Cálculo da concentração de lactato presente em cada solução:

$$[Lactato] = 7,5 \times \Delta Abs \text{ (mM)} - \text{“Controlo do método”}$$

$$[Lactato] = 6,94 \times \Delta Abs \text{ (mM)} - \text{Amostras } (L_0, L_{60}, L'_{60})$$

VI	Branco	Controlo	L_0	L_{60}	L'_{60}
[Lactato] (mM)	0,000	4,373	0,881	5,066	1,242

Cálculo da concentração de lactato produzida:

$$[Lactato \text{ Produzido}]_{4^\circ C} = [L'_{60}] - [L_0] \text{ (mM)}$$

$$[Lactato \text{ Produzido}]_{37^\circ C} = [L_{60}] - [L_0] \text{ (mM)}$$

VII	Temperatura (°C)	[Lactato Produzido] (mM)
	4	0,361
	37	4,185

R_M

Razão molar entre a concentração de lactato produzida e a concentração de glicose consumida a 37 °C.

$$[Glicose\ Cons.]_{37^{\circ}C} = 49,3\text{ mg/dL}$$

Mudança de unidades:

$$1\text{ dL} = 0,1\text{ L}$$

$$0,1\text{ L} = 0,1\text{ dm}^3$$

Existem 0,0493 g de glicose em 0,1 dm³.

$$\frac{1}{0,1} * 0,0493 = 0,493\text{ g}$$

Existem 0,493 g de glicose em 1 dm³ deste composto.

$$1\text{ mol (Glicose)} \approx 180\text{ g}$$

$$\frac{0,493}{180} \approx 0,00274\text{ mol/dm}^3 = 2,74\text{ mmol/dm}^3 = 2,74\text{ mM}$$

Cálculo da razão molar:

$$R_{Molar} = \frac{[Lactato\ Prod.]_{37^{\circ}C}}{[Glicose\ Cons.]_{37^{\circ}C}} \approx 1,53$$

Massas molares teóricas e aproximadas de cada elemento.⁸

Glicose - C₆H₁₂O₆

C – 12 g/mol

H – 1 g/mol

O – 16 g/mol

Discussão e Conclusões

A partir dos resultados obtidos, é possível estudar tanto o efeito do tempo de incubação como o efeito da temperatura no metabolismo eritrocitário.

Como se constatou, a amostra t_0 não foi submetida à incubação e a sua desproteinização (processo de remoção de proteínas, como a hemoglobina dos eritrócitos e as enzimas envolvidas na glicólise – por exemplo, a glicocinase) foi imediata. Deste modo, o metabolismo “para”, isto é, deixa de ocorrer glicólise (transformação de glicose em piruvato) e, conseqüentemente, fermentação láctica (conversão de piruvato em lactato). Ou seja, em t_0 não existiu tempo suficiente para que pudessem ocorrer estes processos e a glicose não se converteu em lactato.

Assim, como era de esperar, verificou-se que a amostra de sangue que continha maior concentração de glicose era a G_0 (79,3 mg/dL) e, simultaneamente, a solução L_0 era a que possuía menor concentração de lactato (0,881 mM).

Por outro lado, contrariamente a t_0 , as amostras t_{60} e t'_{60} foram incubadas, respetivamente, num banho de água a 37°C e no frigorífico a 4°C. Esta diferença de temperaturas levou a resultados distintos nas concentrações de glicose e lactato, os quais nos permitiram averiguar qual das temperaturas era a mais favorável para a ocorrência do metabolismo da glicose.

Desta forma, o valor para a concentração de glicose em G'_{60} (65,3 mg/dL) foi maior do que em G_{60} (30,0 mg/dL) e, por outro lado, a concentração de lactato em L_{60} (5,066 mM) foi maior do que em L'_{60} (1,242 mM).

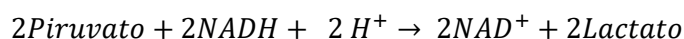
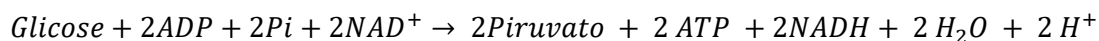
A obtenção de tais valores, levaram então a concluir que o metabolismo eritrocitário é favorecido por temperaturas mais altas: em t_{60} , ao ocorrer uma maior transformação de glicose em piruvato, maior é a atividade de LDH, e maior é a conversão de piruvato em lactato. Logo, esta amostra tem maior concentração de lactato e menor de glicose.

Esta primeira conclusão já seria de esperar, pois para além da temperatura corporal humana ser de aproximadamente 37°C, esta é também a temperatura ótima de atuação de enzimas, como as da glicólise, favorecendo assim esta via metabólica. Por outro lado, pode-se verificar que as temperaturas baixas constituem um “inibidor enzimático”.

Em suma, os resultados obtidos estão de acordo com o que era expectável, pois quanto mais tempo as células tiverem para consumir glicose (assumindo que esta está

inicialmente presente na mesma quantidade em todas as amostras) e quanto mais favorável for a temperatura do meio onde se encontram, maior será a concentração de lactato presente nas soluções.

Relativamente à razão molar entre a concentração de lactato produzida e a concentração de glicose consumida, esta foi de 1,53.



Tal como se pode ver pela estequiometria das reações, a razão molar ideal seria de 2, uma vez que, por cada molécula de glicose, são produzidas duas de lactato. Contudo, o valor que se obteve foi inferior a 2 e com um erro relativo de 23,5%, o que nos indica, à partida, que nem toda a glicose se transformou em lactato.

$$E_r(\%) = \frac{|\text{Valor teórico} - \text{Valor obtido}|}{|\text{Valor teórico}|} * 100 = \frac{2 - 1,53}{2} * 100 = 23,5\%$$

No entanto, estes valores podem ser justificados por diversas razões, sendo uma delas a existência de erros sistemáticos ao longo do procedimento devido, por exemplo, à inexperiência na pipetagem com micropipetas (diluições, perdas, contaminação das amostras ou dificuldade em acertar nas unidades de medição), à medição incorreta dos resultados (erros de leitura no espectrofotómetro), à má calibração das micropipetas, ou até mesmo à influência das condições do meio (pH e temperatura).

Para além disso, existem ainda outras causas para a diminuição da formação de lactato que fazem com que a razão molar seja, naturalmente, inferior a 2. Em primeiro lugar, é importante salientar que nem todo o piruvato vai para a fermentação láctica: pode também ser utilizado pelos leucócitos na respiração aeróbia.

Por outro lado, os eritrócitos possuem três vias diferentes alternativas à glicólise: a via dos fosfatos de pentose (para a qual é direccionada a glicose-6-fosfato em excesso); pode ocorrer a conversão do 1,3-difosfoglicerato em 2,3-difosfoglicerato (pela Bifosfoglicerato mutase); a meta-hemoglobina redutase pode converter a meta-hemoglobina em hemoglobina com consumo de NADH (inibindo a fermentação láctica).

Por último, deve-se também ter em conta o facto de que as reações químicas ocorridas podem não ter sido completas ou podem ter tomado parcialmente o sentido inverso, para além de não terem ocorrido nas condições ótimas de ação enzimática.

Assim, uma das alterações que se poderia ter feito no protocolo de modo a obter uma razão molar mais próxima do valor teórico passa, essencialmente, pelo prolongamento do tempo de incubação, uma vez que desta forma se tornaria mais provável que as reações fossem completas.

Bibliografia

Figuras

1 - <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Glicolise-gliconeogenese.png>

2 -

http://pt.wikipedia.org/i/Ficheiro:Esquema_Fermenta%C3%A7%C3%A3o_l%C3%A1ctica1.jpg

3 - <http://spdbv.vital-it.ch/TheMolecularLevel/LearnStrats/Images/PPPWay.gif>

4 - <http://www.studydroid.com/imageCards/0m/mv/card-23821370-front.jpg>

5 - http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/b/bf/Beer_lambert1.png

6 - Guia de laboratório (1ª e 2ª Aula Prática)

7 - Guia de laboratório (1ª e 2ª Aula Prática)

Dados

8 - <http://www.tabelaperiodicacompleta.com/wp-content/uploads/2011/12/tabela-periodica-completa.png>