

1 ejemplar  
N. 7



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

Estudios sobre los Niveles de Acido 2, 3-Difosfo-  
glicérico (2, 3-DPG) en Conejos Sujetos a un  
Proceso de Anemia Experimental Crónica.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**

**P R E S E N T A :**

**BALTAZAR BECERRIL LUJAN**

MEXICO, D. F.

6334

1979

547

19



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Abreviaturas

2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
kcal	kilocalorias ( $10^3$ calorías)
1,3-DPG	1,3-difosfoglicerato
3-PG	3-fosfoglicerato
DPGM	difosfoglicerato mutasa
3-PGA	gliceraldehido 3-fosfato
2-PG	2-fosfoglicerato
DPGasa	2,3-DPGfosfatasa = 2,3-DPGasa
ATP	adenosin trifosfato o trifosfato de adenosina
$\mu\text{mol}$	micro mol ( $10^{-6}$ mol)
gr	gramo
Hb	hemoglobina
ACD	ácido-citrato-dextrosa, un medio convencional.
ml	mililitro ( $10^{-3}$ litro)
kg	kilogramo ( $10^3$ gramo)
mg	miligramo ( $10^{-3}$ gramo)
P/V	peso a volúmen
M	molaridad
rpm	revoluciones por minuto
G	fuerza de gravedad
PGM	monofosfo glicerato mutasa
P	fosfato inorgánico libre ( $\text{HPO}_4^-$ )
PGK	fosfoglicerato kinasa
GAPD	gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
nm	nanómetro ( $10^{-9}$ metro) = milimicra
NADH	nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NAD <sup>+</sup>	" " " oxidado
Htc	hematocrito
C.C.M.H.	concentración corpuscular media de hemoglobi
+++ ad libitum	a voluntad

**INDICE**

Página

Abreviaturas	iii
INTRODUCCION	1
Historia del descubrimiento del papel del 2,3-DPG como regulador de la función de la hemoglobina	1
Interacción del 2,3-DPG con la hemoglobina	2
Bioquímica del 2,3-DPG	5
Mecanismo de la desviación de la vía glucolítica	7
Importancia fisiológica del 2,3-DPG	9
Importancia clínica del 2,3-DPG	10
Factores que regulan la concentración de 2,3-DPG	11
Objetivos	13
MATERIALES Y METODOS	17
Inducción de la anemia	17
Colecta de la sangre	17
Procesamiento de la sangre	17
Hematocrito	17
Hemoglobina	18
2,3-difosfoglicerato	18
RESULTADOS	20
Hematocrito	20
Hemoglobina	20
Concentración corpuscular media de hemoglobina	21
2,3-DPG/ml. de sangre	21
2,3-DPG/ml. de células	21

2,3-DPG/gr. de hemoglobina	22
Correlación entre la concentración de - 2,3-DPG/gr. de hemoglobina y la concen- tración de hemoglobina circulante	22
Correlación entre la concentración de - 2,3-DPG y de hemoglobina/100 ml. de san- gre	23
Relación molar 2,3-DPG : hemoglobina	23
DISCUSION Y CONCLUSIONES	24
RESUMEN Y ESPECULACIONES	35
FIGURAS Y TABLAS	36
BIBLIOGRAFIA	49

## INTRODUCCION

Los estudios comparativos en los seres vivos, pueden proporcionar valiosa información sobre aspectos filogenéticos, evolutivos, etc.

La Bioquímica Comparada ha hecho importantes contribuciones que han permitido conocer la generalidad de algunos procesos y la particularidad de otros. Desde el punto de vista hematológico, ha permitido conocer una buena parte de las características del tejido sanguíneo en los vertebrados.<sup>9,29,40</sup>

No obstante que se conoce con cierta amplitud la bioquímica de dicho tejido, los aspectos relacionados con la regulación de sus propiedades oxigenadoras, han sido poco estudiados. El compuesto que se piensa controla dichas propiedades en los mamíferos es el 2,3-DPG.<sup>17</sup>

El propósito de este trabajo es estudiar los cambios en los niveles de 2,3-DPG en conejos hechos anémicos por sangrado, esperando que los resultados que arroja esta investigación motiven nuevas investigaciones.

Historia del descubrimiento del papel del 2,3-DPG como regulador de la función de la hemoglobina. Desde antes de 1920 se sabía que la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno era menor en el interior de las células rojas que en solución.<sup>7,48</sup> Este hecho preocupó a los investigadores del campo en aquella época, llevándolos a proponer que debería existir una tercera sustancia que formara parte integrante del complejo oxígeno-hemoglobina.

En 1925 Greenwald encontró altas concentraciones de 2,3-DPG en las células rojas del cerdo.<sup>28</sup> Más tarde en 1941, Rapoport y Guest reportaron que el hombre y otras -

especies de mamíferos también contenían altas concentraciones de este metabolito.<sup>41</sup> Subsecuentemente se han reportado altas concentraciones de este compuesto en otros tantos mamíferos.<sup>9,17,29</sup> En la mayoría de estos animales el 2,3-DPG es el fosfato orgánico más abundante del interior de las células rojas. En algunas especies su concentración - excede el 10 milimolar, esto es, dos veces la del tetrámero de hemoglobina.<sup>17</sup>

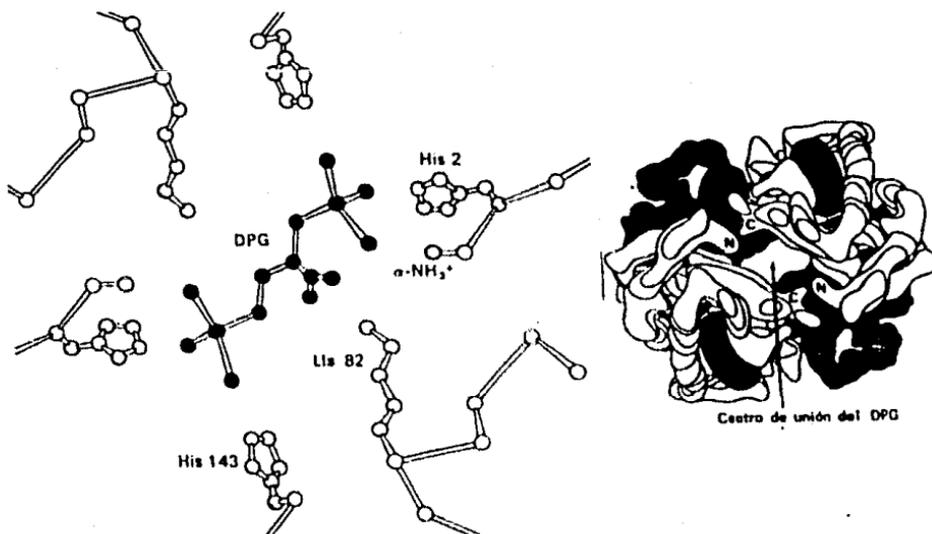
La justificación para la presencia de los altos - niveles de 2,3-DPG, permanecía inexplicable, hasta que en 1967 Benesch y Benesch así como Chanutin y Curnish, reportaron independientemente que la afinidad por el oxígeno - de soluciones diluidas de hemoglobina humana, podía ser - alterada por la adición de 2,3-DPG; sugiriendo que este metabolito servía como un potente regulador de la afinidad - de la hemoglobina por el oxígeno.<sup>10,19</sup>

Un año más tarde, en 1968, tal hallazgo fué confirmado para los eritrocitos intactos por Engel y Duc, quienes observaron un desplazamiento de la curva de disociación de oxígeno, en muestras de sangre en las que redujeron los niveles de 2,3-DPG con yodoacetato (inhibidor de la formación glucolítica del 2,3-DPG).<sup>26</sup>

Interacción del 2,3-DPG con la hemoglobina. En los humanos el 2,3-DPG se une a la desoxihemoglobina en una relación molar de 1:1, es decir, un mol de 2,3-DPG/mol de - tetrameros de hemoglobina.<sup>11,12</sup>

Dada la característica tetramérica de la hemoglobina, se esperarían por lo menos dos centros de unión al - 2,3-DPG, sin embargo sólo se ha demostrado uno. El 2,3-DPG se une a la desoxihemoglobina en el eje de simetría de la cavidad central.<sup>4</sup>

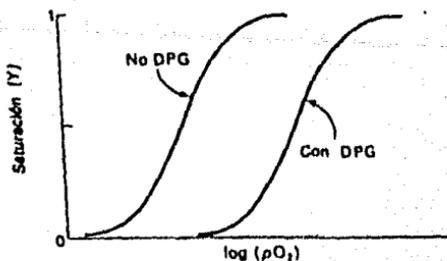
Durante la desoxigenación se forman ocho enlaces salinos que estabilizan la forma tensa (T) de la hemoglobina. La forma tensa presenta la particularidad de favorecer la orientación del grupo alfa amino, la lisina EFG (residuo #82) y la histidina H8 (residuo #143), de cada una de las cadenas beta.<sup>4</sup> La orientación de estos residuos da como resultado la creación de un sitio alostérico para el 2,3-DPG, el cual a pH fisiológico se encuentra cargado negativamente y es estereoquímicamente afín a la constelación de seis grupos positivamente cargados de las dos cadenas beta orientados en la cavidad central. Cuando el 2,3-DPG se inserta en dicha cavidad, se establecen seis enlaces salinos adicionales y de esta manera se estabiliza aún más la forma tensa de la hemoglobina.<sup>4,48</sup>



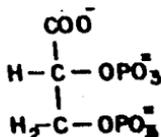
Para que la oxigenación ocurra se tienen que romper los catorce enlaces salinos, proceso que consume 40 kcal/mol, en presencia de 2,3-DPG.

En ausencia de este compuesto, el proceso requiere de únicamente 27 kcal/mol, es decir, cuando la desoxihemoglobina está cargada con 2,3-DPG se necesitan 13 kcal/mol adicionales para pasar de la forma tensa a la forma relajada (R), y así poder oxigenarse. Esto explica la reducción de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, en presencia de 2,3-DPG.<sup>12</sup>

El 2,3-DPG reduce la afinidad de la hemoglobina - por el oxígeno sin modificar ostensiblemente el mecanismo de oxigenación, tal como lo indica el desplazamiento de la curva de disociación de oxígeno (modificación de la posición de la curva), sin perder la forma sigmoidea de dicha curva.<sup>12,48</sup>



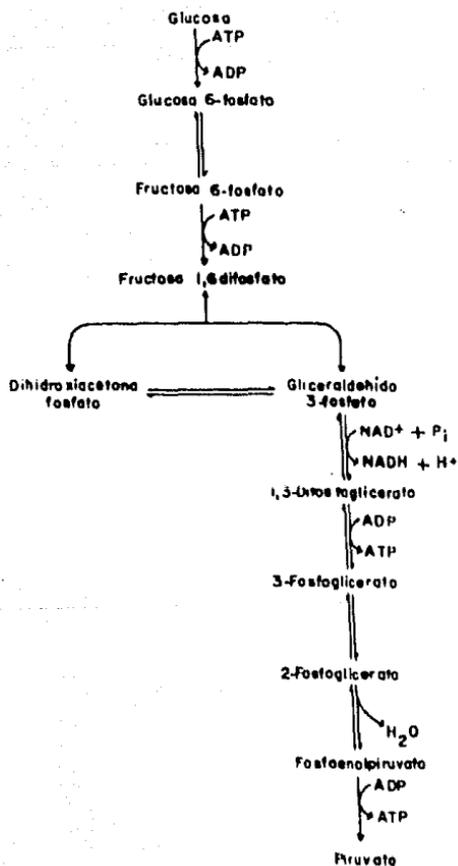
Biología del 2,3-DPG. El ácido 2,3-difosfoglicérico es un derivado del ácido glicérico, que a su vez es un derivado del glicerol. El 2,3-DPG presenta una función carboxilo en el carbono 1 y dos grupos fosfoéster en los carbonos 2 y 3.



2,3 DPG

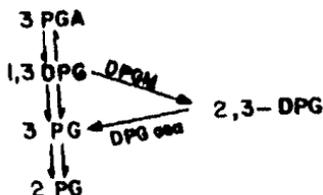
El 2,3-DPG es un intermediario de la vía glucolítica, glucólisis o ruta de Embden-Meyerhof. La vía glucolítica recibe el nombre de ruta de Embden-Meyerhof, debido a que en 1940 fué completamente aclarada gracias a las contribuciones de Gustav Embden y Otto Meyerhof principalmente. Otros investigadores que contribuyeron al esclarecimiento de ésta vía metabólica fueron Carl Neuberg, Jacob Parnus, Otto Warburg, Gerty Cori y Carl Cori.<sup>48</sup>

El 2,3-difosfoglicerato se sintetiza y se degrada como una desviación de la vía glucolítica, en el paso de 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG) a 3-fosfoglicerato (3-PG). Esta desviación fué descubierta en 1950 por S. Rapoport y J. Luebering y por tal motivo a ésta desviación se la conoce con el nombre de Ciclo de Luebering-Rapoport. También se le conoce como Ciclo del fosfoglicerato ó desviación de



Via glucolítica ó ruta de Embden—Meyerhof

la vía glucolítica.<sup>41</sup> Aproximadamente un 20% de la glucólisis se desvía en éste ciclo.<sup>38</sup>

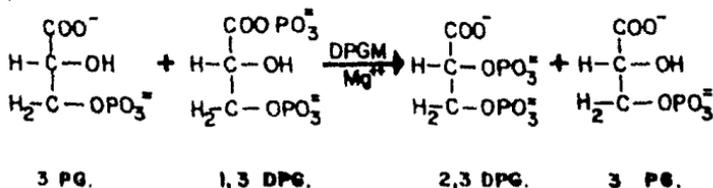


### CICLO DEL FOSFOGLICERATO

#### Mecanismo de la desviación de la vía glucolítica.

Formación de 2,3-DPG a partir de 1,3-DPG. La difosfoglicerato mutasa (DPGM), convierte al 1,3-DPG en 2,3-DPG. Esta reacción de mutasa es interesante porque el 3-fosfoglicerato (3-PG), es un participante obligatorio en este proceso.

La mutasa capta simultáneamente 1,3-DPG y 3-PG. En este complejo ternario se transfiere un grupo fosforilo desde el carbono 1 del 1,3-DPG al carbono 2 del 3-PG.

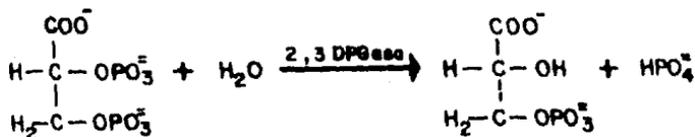


Degradación del 2,3-DPG por la 2,3-DPG fosfatasa.

En esta reacción es donde el 2,3-DPG es hidrolizado a 3-PG regresándose así a la vía glucolítica.

Nótese que en esta desviación al impedirse el paso directo de 1,3-DPG a 3-PG, se está impidiendo también la formación de una molécula de ATP. Desde el punto de vista de la economía celular, el Ciclo del fosfoglicerato parece ir en detrimento de aquella pues se está perdiendo una molécula de ATP.

A pesar de que en esta serie de reacciones se está sacrificando energía, este ciclo está justificado ya que solamente en dicho ciclo es donde se produce el 2,3-DPG, - el cual es un participante obligatorio en la vía glucolítica en el paso de 3-PG a 2-PG. Es muy importante también su participación como regulador de la glucólisis. Un exceso de 2,3-DPG libre inhibe a la hexoquinasa y a la propia enzima que lo sintetiza (DPGM).<sup>42,43</sup>

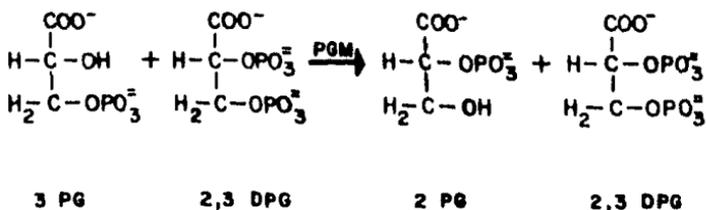


2,3 DPG.

3 PG.

Conversión de 3-PG a 2-PG. Esta es también una reacción de mutasa en la que el 2,3-DPG es un participante obligatorio. En esta reacción la fosfoglicerato mutasa (PGM), capta simultáneamente 3-PG y 2,3-DPG. En el complejo ternario se transfiere un grupo fosforilo desde el carbono 3 del

2,3-DPG hasta el carbono 2 del 3-PG, quedando 2-PG y formándose nuevamente 2,3-DPG a partir del 3-PG.



Importancia fisiológica del 2,3-DPG. El hecho de - que exista una molécula que regule la función de la hemoglobina, disminuyendo la afinidad de ésta por el oxígeno, tiene una gran importancia fisiológica. Observaciones hechas en el hombre y en el carnero indican que este fenómeno constituye un control sensible de la función intracelular de la hemoglobina.<sup>1,32</sup>

Es importante conocer que tan generalmente se encuentra diseminado dicho fenómeno y hasta que punto tiene significados adaptativos.

Solamente en los mamíferos se han detectado altas concentraciones de 2,3-DPG. Otros fosfatos orgánicos pueden jugar el mismo papel que el 2,3-DPG de los mamíferos, en las otras clases de vertebrados. Por ejemplo en los - peces, anfibios y la mayoría de los reptiles, el ATP sirve como regulador de la función de la hemoglobina, mientras que en algunos reptiles y en las aves lo es el inositol pentafofosfato.<sup>17,39,47</sup>

Estudios hechos en el hombre indican que bajo condiciones patológicas caracterizadas por hipoxia tales como enfermedades pulmonares crónicas, enfermedad del corazón - cianótico, insuficiencia cardiaca, anemia falciforme y anemia crónica, los niveles de 2,3-DPG se encuentran incrementados.<sup>5,13,20,24,32</sup>

La concentración de 2,3-DPG en los humanos parece responder a la demanda de oxígeno. En una muestra de individuos normales, se encontró que el nivel de hemoglobina - circulante (presumiblemente es una aproximación de la capacidad oxigenadora de la sangre), y el nivel de 2,3-DPG, - estaban correlacionados negativamente. El mismo fenómeno - se observó en una muestra de pacientes con una variedad de desórdenes clínicos asociados con cambios en la posición - de la curva de disociación de oxígeno.<sup>24,32,37</sup>

En condiciones caracterizadas por anemia severa, - se han reportado incrementos de más de 150% en los niveles de 2,3-DPG, expresados como  $\mu$ moles de 2,3-DPG/ml. de células y hasta de 300% expresados como  $\mu$ moles de 2,3-DPG/gr. de hemoglobina.<sup>20,24</sup>

En condiciones semejantes de anemia en los cerne-  
ros se reportaron incrementos de hasta 800% expresados -  
como  $\mu$ moles de 2,3-DPG/gr. de hemoglobina.<sup>1</sup>

Importancia clínica del 2,3-DPG. La determinación de los niveles de 2,3-DPG en los casos de pacientes con al-  
gún problema de hipoxia es muy importante para determinar la severidad del caso. Por otro lado, durante el almacenamiento de la sangre en ácido-citrato-dextrosa (ACD), los -  
niveles de 2,3-DPG se decrecientan con un incremento concomitante de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, -  
lo cual es de una gran importancia clínica. Si se da a un paciente un gran volúmen de sangre con una alta afinidad -

por el oxígeno, la cantidad de éste cedida a los tejidos - puede ser insuficiente. <sup>21,44,48</sup>

Las células rojas transfundidas que han quedado - completamente vacías de 2,3-DPG, pueden recuperar la mitad de su nivel normal en 24 horas.<sup>50</sup> Si se transfunde sangre exenta de 2,3-DPG, la recuperación del nivel normal puede no ser lo bastante rápida para ser efectiva en un paciente severamente enfermo. Así que lo recomendable es transfundir células con un nivel normal de 2,3-DPG.<sup>48</sup>

La disminución del nivel normal de 2,3-DPG en la - sangre almacenada puede prevenirse si al medio en que se - encuentran las células se le agrega inosina.<sup>33,50</sup> Este nucleósido no cargado puede atravesar la membrana y quedar - convertido en 2,3-DPG mediante la vía colateral de las pentosas fosfato.<sup>48</sup> Una hidrólisis de la inosina en el enlace base-azúcar produce base libre y azúcar libre. Una fosforilación en el carbono 5 de la ribosa libre, genera ribosa-5-fosfato, la cual en presencia de xilulosa 5-fosfato y por efecto de la transcetolasa produce gliceraldehído 3-fosfato y sedoheptulosa 7-fosfato. El gliceraldehído 3-fosfato entra a la glucólisis, la cual en el paso de 1,3-DPG a 3-PG, se desvía para formar el 2,3-DPG.<sup>48</sup>

#### Factores que regulan la concentración de 2,3-DPG.

Bajo condiciones fisiológicas normales, la concentración de 2,3-DPG está controlada por:

1).- La concentración de 2,3-DPG misma. Un mecanismo de retroalimentación negativa inhibe la actividad de la 2,3-DPG mutasa (DPGM). Esta enzima presenta la característica de ser muy sensible a la inhibición por producto, favoreciendo esto la regulación por retroalimentación. Retroalimentación negativa significa que cuando hay un exceso -

de producto, en este caso 2,3-DPG, la enzima se inhibe y - cuando se reducen los niveles de aquel, ésta se activa.<sup>48</sup>

En las células no eritrocíticas el 2,3-DPG funciona como acarreador de un grupo fosforilo en el paso de 3-PG a 2-PG de la vía glucolítica y como regulador de algunas enzimas de la misma, tales como la hexoquinasa y la 2,3-DPG mutasa. Para cumplir con dichos papeles solamente se requieren trazas de 2,3-DPG, es por ello que las células no eritrocíticas poseen cantidades muy pequeñas de 2,3-DPG.<sup>41-43</sup>

En los eritrocitos, el 2,3-DPG también funciona - como acarreador y como regulador, pero además regula en su función a la hemoglobina.

La 2,3-DPG mutasa de los eritrocitos también es - inhibida por producto, sin embargo, en estas células el - 2,3-DPG interactúa con la desoxihemoglobina. Así que para inhibir a la DPGM se requiere que haya un exceso de 2,3-DPG libre. Como la hemoglobina es el compuesto más abundante - de las células rojas y el 2,3-DPG interactúa con ella, para que exista el 2,3-DPG libre, es necesario que haya por lo menos una cantidad igual a la de hemoglobina. Esto explicaría los altos niveles de 2,3-DPG presentes en los - eritrocitos de la mayoría de los mamíferos.<sup>41-43</sup>

2).- Concentración de hidrogeniones (pH). En una - situación de alcalosis, la velocidad de la glucólisis se - encuentra incrementada y la actividad de la 2,3-DPG fosfatasa se encuentra inhibida, siendo el resultado final una acumulación de 2,3-DPG.

En la acidosis sucede lo contrario, es decir, la - glucólisis se decremента y la fosfatasa se activa dando - como resultado una disminución de la concentración de - 2,3-DPG.<sup>5,6,32,37</sup>

3).- Concentración de fosfato inorgánico. En condiciones de hipofosfatemia la concentración de 2,3-DPG es baja y en hiperfosfatemia es alta.<sup>19,22,48</sup>

4).- Influencias hormonales. En condiciones tales como el hipertiroidismo, en las que la velocidad de la glucólisis se encuentra incrementada, se produce una acumulación de 2,3-DPG. Inversamente en el hipotiroidismo hay una concentración reducida de 2,3-DPG.<sup>34</sup>

5).- Deficiencias enzimáticas. Una deficiencia de una enzima de la parte inicial de la vía glucolítica, tal como la hexoquinasa, reduce la concentración de 2,3-DPG ya que la glucólisis se encuentra disminuida.

Si la deficiencia se encuentra en una enzima de la parte final de la vía, tal como la piruvato quinasa, tiene un efecto inverso ya que los metabolitos tanto del ciclo del fosfoglicerato como después de éste, pero antes de la piruvato quinasa, se encontrarán acumulados.<sup>6,34,48</sup>

El 2,3-DPG como ya se mencionó, a pH fisiológico se encuentra cargado negativamente, siendo entonces un anión no penetrante. Un incremento en la concentración de 2,3-DPG, produce una baja del pH intraeritrocítico por efecto del equilibrio de Donnan. Esto disminuye la glucólisis, se activa la 2,3-DPG fosfatasa y así se reduce la concentración de 2,3-DPG. Todo esto parece indicar que la magnitud de cualquier incremento en la concentración de 2,3-DPG está limitado por este mecanismo y por la inhibición por producto de la 2,3-DPG mutasa.<sup>6,34</sup>

Objetivos. De los estudios hechos en humanos y en las ovejas, se puede observar que los niveles de 2,3-DPG guardan una relación inversa con los niveles de hemoglobina circulante.

Dado que se ha demostrado que en la mayoría de los mamíferos el fosfato orgánico más abundante es el 2,3-DPG y que este compuesto reduce la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, sería lógico pensar que un mecanismo general presente en estos animales bajo condiciones de hipoxia (un tipo de hipoxia son las anemias), sería incrementar los niveles de 2,3-DPG, para reducir la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y así aumentar la eficiencia de aquella en la entrega de éste.<sup>17</sup>

Las especies de mamíferos que han sido estudiadas bajo condiciones de anemia, el hombre y las ovejas, responden en la forma propuesta, es decir, aumentan sus niveles de 2,3-DPG cuando el nivel de hemoglobina se decremента (recordar que el nivel de hemoglobina puede considerarse como un criterio para evaluar la capacidad oxigenadora de la sangre).

Por otro lado las ovejas poseen niveles basales de 2,3-DPG muy bajos (0.1  $\mu$ moles de 2,3-DPG/ml. de células rojas),<sup>17</sup> mientras que el hombre tiene un nivel mucho más alto (4.5  $\mu$ moles de 2,3-DPG/ml. de células rojas en promedio).<sup>17,48</sup>

En el presente trabajo se ha tenido interés en estudiar los niveles de 2,3-DPG en conejos sujetos a un proceso de anemia experimental, debido a que presentan una serie de peculiaridades que los hacen muy interesantes:

1).- No presentan recambio de hemoglobina fetal a hemoglobina adulta.<sup>8</sup> En el hombre sí se dá un recambio de hemoglobinas.<sup>49</sup> La hemoglobina fetal humana es intrínsecamente menos afín por el oxígeno que la hemoglobina adulta.<sup>49</sup>

2).- Los niveles de 2,3-DPG se van incrementando desde el momento de nacimiento, hasta aproximadamente la

cuarta semana de edad en que alcanzan los niveles del adulto.<sup>8</sup>

3).- El nivel normal de 2,3-DPG en el adulto es del doble respecto al humano (humano = 15  $\mu$ mol 2,3-DPG/gr. de hemoglobina; conejo = 30  $\mu$ mol 2,3-DPG/gr. de hemoglobina).<sup>8,45,46</sup>

4).- Algunos de los parámetros hematológicos (hemoglobina, hematocrito, número de células rojas, número de células blancas), son semejantes a los del humano.<sup>25,53</sup>

Por lo que respecta a los niveles de 2,3-DPG, el conejo también es muy particular, pues en el feto los niveles de este metabolito son muy bajos respecto al adulto y se mantienen constantes durante el período fetal.<sup>8</sup> Como no hay recambio de hemoglobinas, el mecanismo presente en el feto para oxigenarse, ha de ser mantener bajos los niveles de 2,3-DPG respecto a la madre, para que la hemoglobina fetal tenga una afinidad mayor por el oxígeno que la hemoglobina materna y así sustraer el oxígeno sin dificultad.

En el humano en el que la hemoglobina fetal es intrínsecamente menos afin por el oxígeno que la materna, los niveles de 2,3-DPG son iguales. En este caso la oxigenación fetal se explica porque la hemoglobina del feto interactúa menos con el 2,3-DPG. O sea que a pesar de que la hemoglobina fetal es menos afin por el oxígeno que la materna, a iguales concentraciones de 2,3-DPG, la hemoglobina materna interactúa más con éste, siendo el resultado final una mayor afinidad por el oxígeno en la hemoglobina fetal. En condiciones fisiológicas el feto se oxigena a expensas de la madre debido a que posee una sangre más afin por el oxígeno que la materna.<sup>48,49</sup>

De todo esto se pueden hacer observaciones muy interesantes, que invitan a estudiar en el conejo algunos -

aspectos como los siguientes:

El hecho de que los niveles de 2,3-DPG en el feto sean mucho menores que en el adulto, indicando esto que los mecanismos reguladores de la cantidad de 2,3-DPG puedan ser diferentes a los del adulto.

El incremento de la cantidad de 2,3-DPG desde el momento de nacimiento hasta la cuarta semana de edad en que se alcanzan los niveles del adulto.

La razón por la que el nivel normal de 2,3-DPG sea tan alto en el adulto (2 moles de 2,3-DPG/mol de tetrámeros de hemoglobina).

En este trabajo se ha tenido interés en conocer si el conejo adulto, con un nivel tan alto de 2,3-DPG, responde aumentando los niveles de este metabolito ante un estado de hipoxia como una anemia crónica inducida.

## MATERIALES Y METODOS

Inducción de la anemia. Conejos Nueva Zelanda blancos de 2-3 kg. de peso, alimentados ad libitum con purina, fueron sangrados diariamente por punción cardiaca durante quince días. El volúmen de sangre extraído se determinó en relación al peso inicial (10 ml./kg.). Para lograr que la anemia fuera controlada, los conejos fueron suplementados con hierro,<sup>35</sup> el cual fué suministrado por vía intraperitoneal, cada tercer día en forma de hierro dextrán (IMPERON, Laboratorios Lakeside).<sup>27</sup> La cantidad de hierro aplicada fué determinada a partir de la concentración de hemoglobina por mililitro de sangre obtenida, asumiendo que un gramo de hemoglobina equivale a 3.35 mg. de hierro.<sup>53</sup>

Colecta de la sangre. La sangre fué colectada en jeringas de vidrio, previamente enjuagadas con ácido etilendinitrilo tetracético, sal disódica (Titriplex III, Merck), al 20% P/V (20 gr. EDTA/100 ml. en 0.154 M. NaCl pH 7.3), como anticoagulante.<sup>36,53</sup> Una vez tomada la muestra, las jeringas fueron selladas inmediatamente y sumergidas en un baño de hielo para evitar cambios en la concentración de 2,3-DPG.<sup>24</sup>

Procesamiento de la sangre. De las jeringas sumergidas en el baño de hielo, se tomaron alícuotas para determinar el hematocrito, la hemoglobina y la cantidad de 2,3-DPG.

Hematocrito. El volúmen ocupado por las células empacadas después de centrifugar la sangre, expresado como porcentaje del volúmen total (hematocrito),<sup>34,35</sup> fue determinado en tubos de Wintrobe,<sup>53</sup> en una centrifuga clínica - Adams-Dynac con cabezal de columpio CT-1350 a 2460 rpm -

(1280 x G), por 10 minutos.<sup>51</sup> Esta misma centrifuga fue utilizada en el resto de los métodos que requirieron centrifugación.

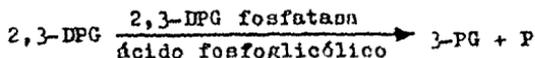
Hemoglobina. La concentración de hemoglobina fue determinada por el método de la cianometahemoglobina.<sup>30,52</sup> Las lecturas fueron hechas en un espectrofotómetro Leiss PMQ II a 540 nm. El coeficiente de extinción milimolar de la cianometahemoglobina a esa longitud de onda se tomó como 44 y el peso molecular usado fue de 66,000.<sup>52,53</sup> El mismo espectrofotómetro fue utilizado en los métodos que requirieron su uso.

2,3-difosfoglicerato. La concentración de 2,3-DPG fue determinada por el método desarrollado por Sigma Chemical Co.,<sup>45,46</sup> usando el estuche de reactivos correspondiente. El método propuesto por Sigma es prácticamente igual al implementado por Keitt.<sup>31</sup>

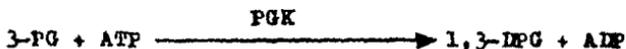
El principio en el que se basa la determinación, es la conversión estequiométrica del 2,3-DPG a gliceraldehído 3-fosfato. En este método se usa ácido fosfoglicólico, para estimular la actividad de la 2,3-DPG fosfatasa siempre presente en fracciones purificadas de monofosfoglicerato mutasa (PGM) de músculo.<sup>42,43</sup>

La serie de reacciones acopladas que permiten el paso de 2,3-difosfoglicerato a gliceraldehído 3-fosfato, y que por ser reacciones de mol a mol, permiten conocer la concentración de 2,3-DPG son las siguientes:

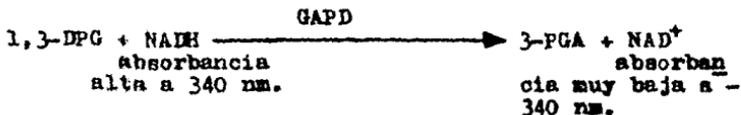
1).- El regreso a la vía glucolítica después de la desviación, es decir, la degradación del 2,3-DPG por la 2,3-DPG fosfatasa.



2).- La reacción en reversa del paso de 1,3-DPG a 3-PG.



3).- La reacción en reversa del paso de 3 fosfo- - gliceraldehido (3-PGA), a 1,3-DPG.



La medición del decremento en absorbancia a 340 nm. causado por la oxidación del NADH a  $\text{NAD}^+$ , refleja la cantidad de 2,3-difosfoglicerato originalmente presente. El coeficiente de extinción milimolar del NADH a 340 nm. es 6.22.

Las determinaciones del 2,3-DPG se hicieron usando pipetas serológicas de los volúmenes adecuados.

Los reactivos se vertieron directamente en cubetas de cuarzo de un centímetro de paso.

Se hicieron de 3 a 6 determinaciones por duplicado de cada uno de los parámetros (hemoglobina, hematocrito y 2,3-DPG).

## RESULTADOS.

Se presentan aquí los resultados de una serie de experimentos en los que se indujo la anemia en conejos Nueva Zelanda blancos, por remoción diaria de un volumen constante de sangre, según se indicó en Materiales y Métodos.

De la sangre extraída se determinaron varios parámetros como son hematocrito (Htc., %), hemoglobina (Hb, -- gramos/100 ml. de sangre) y concentración de 2,3-DPG ( $\mu$ moles de 2,3-DPG/ml. de sangre).

Con los valores así obtenidos fue posible conocer otros parámetros como son: concentración corpuscular media de hemoglobina (Hb/Htc, C.C.M.H), concentración de 2,3-DPG en  $\mu$ moles/ml. de células empacadas y concentración de 2,3-DPG en  $\mu$ moles/g. de hemoglobina.

Hematocrito. Este parámetro puede considerarse como un criterio del desarrollo que está siguiendo la anemia. El efecto de la remoción diaria de un volumen constante de sangre sobre el hematocrito se muestra en figura 1, en la cual se puede ver como baja dramáticamente éste en los primeros cinco días. A partir del sexto día se nota una recuperación hasta que a partir del día once tiende a estabilizarse, lográndose esto al final del experimento.

Hemoglobina. La concentración de hemoglobina por mililitro de sangre, es el parámetro más frecuentemente usado como criterio del estado de anemia de un organismo. En la figura 2 se puede ver que también la hemoglobina sufre un decremento alarmante, en los primeros días de sangrado, pero después se amortigua la caída, llegándose a un equilibrio alrededor del día ocho.

Concentración corpuscular media de hemoglobina. La cantidad en gramos de hemoglobina, presentes en 100 ml. de sangre, dividida entre el volúmen que ocupan las células - en esos 100 ml. (hematocrito), nos indica la concentración media de hemoglobina por célula. En la figura 3, puede ver se que el efecto del sangrado diario sobre este parámetro, es un decremento en la concentración intracelular a lo largo del proceso.

En los primeros cinco días el decremento es casi - imperceptible. A partir del sexto día se hace mas notorio y después del décimo día se observa una tendencia hacia - un nuevo equilibrio, el cual se alcanza al final del experimento.

Concentración de 2,3-difosfoglicerato. La concentración de 2,3-DPG, se determinó como ya se mencionó, en relación al volúmen sanguíneo, al volúmen de células empacadas y a la concentración de hemoglobina.

2,3-DPG por mililitro de sangre. En la figura 4 se puede observar que la concentración de 2,3-DPG ( $\mu$ moles/ml. de sangre), sufre un decremento notable en los primeros - cinco días. A partir del sexto día se nota un nuevo equilibrio que se mantiene hasta el final del experimento.

2,3-DPG por mililitro de células. La cantidad en milicromoles de 2,3-DPG presentes en un ml. de sangre dividida entre el volúmen que ocupan las células rojas en ese ml. - (hematocrito), indica la concentración de 2,3-DPG promedio por célula. La figura 5 indica que el efecto neto de - la remoción diaria de un volúmen constante de sangre sobre la concentración intracelular de 2,3-DPG, es un decremento de ésta a lo largo de los días de sangrado. En los -

primeros tres días, se observó un incremento poco apreciable. A partir del cuarto día se nota un franco decremento, hasta que aproximadamente en el noveno día, la tendencia es hacia un nuevo equilibrio, el cual se presenta al final del experimento.

2,3-DPG por gramo de hemoglobina. La cantidad en micromoles de 2,3-DPG presentes en un ml. de sangre, dividida entre la cantidad en gramos de hemoglobina presentes en ese mismo ml., proporciona la concentración de 2,3-DPG por gramo de hemoglobina. La figura 6 muestra esta relación a lo largo del proceso de la anemia. A primera vista no se observa tendencia alguna, por lo que fué necesario aplicarle a los datos una prueba estadística de tendencia (Cox y Stuart, prueba de dos extremos o colas).<sup>18</sup> A un nivel de significancia de 95%, la prueba indica que hay una tendencia a disminuir, pero por haber caído en el límite inferior de significancia, se consideró que la tendencia no era suficientemente significativa.

Correlación entre la concentración de 2,3-DPG por gramo de hemoglobina y el nivel de hemoglobina circulante. Cuando se grafican los valores individuales de la concentración de 2,3-DPG ( $\mu$ moles/gr. Hb), contra la concentración de hemoglobina (gr./100 ml.), según se muestra en la figura 7, se observa que no están correlacionados ( $r = .153$ ). La mayoría de los datos se encuentran muy próximos a los valores iniciales de 2,3-DPG/gr. Hb (30  $\mu$ moles de 2,3-DPG/gramo de hemoglobina). Aún en niveles tan bajos como 5 gr. Hb./100 ml. de sangre, esta tendencia se mantiene.

La relación que guardan éstos parámetros se ve más claramente cuando se grafican en forma de histograma éstos mismos datos (figura 8).

Para construir el histograma se agruparon los valores que caían dentro de una unidad arbitraria de hemoglobina, en este caso un gramo, usando la media de esos valores para graficar la barra correspondiente. Al igual que en la figura 7, en la que se graficaron los valores individuales, se ve en la figura 8 que la concentración de 2,3-DPG/gramo de hemoglobina y el nivel de hemoglobina circulante no están correlacionados, distribuyéndose el valor de las medias muy próximo a 30  $\mu$ moles de 2,3-DPG/g. de Hb., que es la media de los valores iniciales.

Correlación entre la cantidad de 2,3-DPG y de hemoglobina por 100 ml. de sangre. La figura 9 muestra la correlación entre la cantidad de 2,3-DPG/100 ml. de sangre y la correspondiente cantidad de hemoglobina. En esta gráfica - se observa claramente que existe una correlación positiva ( $r= 0.824$ ), entre estos dos parámetros. La gráfica muestra los valores promedio individuales.

Cuando se grafican los valores promedio por día la correlación es casi la unidad ( $r= 0.9907$ ).

Relación molar 2,3-DPG : hemoglobina durante el proceso de anemia. Cuando se calcula el número de micro moles de 2,3-DPG en un ml. de sangre y el número de micro moles de hemoglobina en ese mismo mililitro, se encuentra que durante los quince días de sangrado guardan una relación muy próxima a 2:1, es decir, dos micromoles de 2,3-DPG por micro mol de hemoglobina (tabla 1). Se presentan los valores promedio por día.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

El efecto de la anemia crónica inducida en conejos Nueva Zelanda blancos sobre los parámetros hematológicos - estudiados en este trabajo, excepto los niveles de 2,3-DPG, ya ha sido determinado en trabajos anteriores.<sup>2,35,51</sup> Los resultados obtenidos en esos experimentos permiten explicar el comportamiento seguido por dichos parámetros.

Se ha observado en tales trabajos que el efecto del sangrado diario sobre el número de células rojas/ml. de sangre es un decremento pronunciado de éste, el cual se va amortiguando hasta alcanzar un equilibrio (figura 10, tomada de esos trabajos). Una explicación a este fenómeno se puede dar en base a lo que ocurre al número de células en un organismo normal.

Cada día bajo condiciones normales, un determinado número de células rojas es destruido por el sistema retículo endotelial y ese mismo número es repuesto por los órganos eritropoyéticos, siendo el resultado final un equilibrio dinámico entre el número de células que se destruyen y el que se forman.<sup>53</sup>

Al observar la figura 10, se puede notar que en los primeros días de sangrado, el decremento en el número de células es muy pronunciado y después se va amortiguando -- hasta alcanzar un equilibrio.

La etapa de desequilibrio se puede explicar pensando que bajo condiciones normales, el estímulo que un organismo recibe para producir células rojas, está dado por la mínima destrucción de éstas en cada día. Al extraer un volumen considerable de sangre (10 ml. por kg de peso), y por tanto también un número considerable de células, el estímulo es mucho mayor que el normalmente recibido. La respues-

ta a este estímulo tan grande no es inmediata y tarda varios días en alcanzar su máximo valor.

Dado que el estímulo es constante (diariamente se extrae el mismo volúmen de sangre), la respuesta, una vez alcanzado el máximo nivel de producción de células rojas, se mantendrá constante a su vez.

Por supuesto que el número de células que se extrae en un volúmen constante de sangre va siendo menor cada día conforme progresa la anemia. Cuando el número de células en el volúmen de sangre que se extrae diariamente, es el mismo que la máxima capacidad extra de producción de células rojas, entonces se ha llegado al equilibrio (parte horizontal, fig. 10). A este nuevo equilibrio se le puede denominar anemia estable.

Como el número de células rojas en un mismo organismo determina otros parámetros hematológicos (hemoglobina y hematocrito),<sup>27,53</sup> éstos seguirán una cinética semejante a la del número de células rojas en un proceso de anemia.

A pesar de que según se puede ver en la figura 10, el número de células que se extrae se iguala con el que se produce alrededor del día 7 (empieza el equilibrio), el hematocrito (fig. 1), presenta una fase de recuperación posterior a este equilibrio. Esta recuperación se puede explicar porque también se ha observado, que en respuesta a la inducción de la anemia en los conejos, aparece una nueva población de células rojas.<sup>2,51</sup>

Esta nueva población de células comparada con la normal, presenta células más grandes.<sup>51</sup>

No obstante que el número de células se mantiene constante desde el día 7, las células grandes van reemplazando a las normales y por esto el volúmen ocupado por ellas va siendo mayor. El equilibrio en el hematocrito se-

da cuando la población de células normales ha sido sustituida por la nueva población de células más grandes.

En el equilibrio cuando la población de células -- grandes ha reemplazado a las normales, el incremento de volumen de aquellas respecto a éstas es de 1.6 veces.<sup>51</sup>

Por el hecho de cambiar hacia una población de células de mayor tamaño este tipo de anemia cae dentro de la clasificación de anemias macrocíticas.<sup>53</sup>

Las células más grandes observadas en este tipo de anemia también contienen una cantidad mayor de hemoglobina. En el equilibrio el incremento de ésta respecto a las normales es de 1.2 veces.<sup>51</sup> Es por esto que la fase de recuperación para la hemoglobina (fig. 2), es menos notable que para el hematocrito (fig.1).

Dado que la cantidad neta de hemoglobina se incrementa menos que el volumen, el efecto final de la anemia inducida sobre la concentración intracelular de hemoglobina es una disminución de ésta a lo largo del proceso, hasta alcanzar un nuevo equilibrio cuando las células normales -- han sido reemplazadas por las células más grandes (fig.3).

De los datos obtenidos en trabajos anteriores y de los recopilados en éste, se puede afirmar que el fenómeno de la anemia crónica inducida es completamente reproducible y por tanto que los parámetros estudiados están bien caracterizados.

Una observación muy interesante de los datos obtenidos en este trabajo, es el hecho de que las concentraciones de 2,3-DPG y de hemoglobina por mililitro de sangre, durante el proceso de la anemia, siguen cinéticas paralelas. Esta observación se puede apreciar claramente cuando se comparan las figuras 2 y 4, en las que se muestran las cinéticas seguidas por la hemoglobina y el 2,3-DPG por unidad de volumen sanguíneo, respectivamente. La hemoglobina decrece

notoriamente los primeros cuatro días de sangrado y tiende a estabilizarse desde el quinto día hasta que lo logra alrededor del día ocho. Esta misma trayectoria es seguida — por el 2,3-DPG.

Por lo que respecta a las concentraciones intracelulares de 2,3-DPG (fig.5) y de hemoglobina (fig.3), se nota que igualmente siguen cinéticas paralelas ya que ambos valores disminuyen hasta alcanzar un nuevo equilibrio, el cual se da al final del experimento cuando la nueva población — de células ha reemplazado a las normales.

Debido a que la hemoglobina y el 2,3-DPG siguen cinéticas paralelas, la relación entre estos parámetros debe permanecer aproximadamente constante a lo largo del proceso de anemia. Es por esto que la concentración de 2,3-DPG/g de hemoglobina (fig.6), describe aproximadamente una línea — horizontal, indicando esto que la concentración de 2,3-DPG /g. de Hb permanece constante durante la anemia.

El hecho de que la hemoglobina y el 2,3-DPG sigan cinéticas paralelas también indica que guardan una correlación positiva, es decir, en un mismo volumen de sangre cuando disminuye la hemoglobina disminuye el 2,3-DPG y viceversa (fig.9). Igualmente debe suceder que cuando la hemoglobina llegue al equilibrio, haga lo propio el 2,3-DPG. Efectivamente es lo que indican las figuras 2 y 4.

Las cinéticas paralelas seguidas por la hemoglobina y por el 2,3-DPG, indica además que sus relaciones molares deben permanecer aproximadamente constantes e iguales a la inicial. En efecto esto es lo que se observa (tabla 1).

Como la concentración de 2,3-DPG/g. de hemoglobina permanece constante durante el proceso de la anemia — (fig.6), a pesar de que la concentración de hemoglobina — cambia (fig 2), indica que estos parámetros no están corre-

lacionados (fig.7). Como no guardan correlación, no importa como se agrupen los niveles de hemoglobina circulante (fig. 8). Aún para valores tan alarmantemente bajos como 4 g. de Hb/100 ml. (25% del valor inicial), la concentración de 2,3-DPG/g. de hemoglobina no se modifica notablemente (fig. 7).

Del análisis anterior, queda claro que:

1).- La concentración de 2,3-DPG/g de Hb permanece constante durante el proceso de la anemia.

2).- La relación molar de 2,3-DPG a hemoglobina es de 2:1 y permanece constante durante el experimento.

3).- No hay correlación alguna entre grado de anemia y concentración de 2,3-DPG.

4).- No hay una correlación aparente entre concentración de 2,3-DPG y volumen celular.

El hecho de que la relación molar 2,3-DPG:Hb no se modifique explica porqué la concentración de 2,3-DPG/g de Hb describe una trayectoria horizontal durante el proceso de la anemia (fig.6). Atendiendo a estas observaciones pareciera ser que en el conejo la concentración de 2,3-DPG estuviera determinada por la concentración de hemoglobina.

Dar una explicación a estos fenómenos resulta muy-difícil dada la poca información con la que actualmente se cuenta.

Respecto al hecho de que los niveles de 2,3-DPG no se modifican durante el proceso de la anemia inducida por sangrado en los conejos, se podría dar una explicación analizando los datos de la literatura.

Cuando se calcula la relación molar 2,3-DPG-Hb de los mamíferos cuyos valores de estos parámetros están reportados, 9,17,25,29,53 se encuentra que pueden ser ubicados en tres grupos (tabla 2). El primer grupo, que incluye a los que casi no contienen 2,3-DPG, es decir, una relación aproximadamente de 0:1. Un segundo grupo que agrupa a los

que contienen una cantidad moderada, es decir, una relación de 1:1 y por último los que contienen una cantidad grande, en este caso, una relación de 2:1. Hay algunas especies - que presentan relaciones intermedias, pero muy próximas a - cualquiera de las tres anteriores. El primer grupo que incluye a las ovejas, cabras, vacas y gatos, presentan hemoglobinas de baja afinidad por el oxígeno y que no reaccionan fuertemente con el 2,3-DPG. La pérdida de interacción de la hemoglobina con el 2,3-DPG, en el primer grupo, se explica en base a deleciones de un residuo de aminoácido - del extremo amino terminal de las cadenas beta en sus respectivas hemoglobinas; dando como resultado un incremento - en la distancia intramolecular, lo cual impide la formación de los enlaces salinos con el 2,3-DPG que estabilizan la - forma desoxigenada la hemoglobina.<sup>1,17</sup>

El segundo y tercer grupos, incluyen a la mayoría de los mamíferos hasta ahora estudiados, los cuales contienen hemoglobinas con una alta afinidad por el oxígeno, la cual es marcadamente reducida en presencia de 2,3-DPG.<sup>1,17</sup>

El estudio de los niveles de 2,3-DPG durante un proceso de anemia, solamente se ha realizado en los carneros (primer grupo).<sup>1</sup>

En los humanos (segundo grupo), se ha logrado tener información gracias a los estudios clínicos en personas - con diferentes tipos y grados de anemia.<sup>15,20,23,24,32</sup>

En este trabajo se han estudiado los niveles de 2,3-DPG en conejos (tercer grupo), bajo condiciones de anemia - crónica inducida.

Los resultados obtenidos en todos estos trabajos, - indican que la respuesta de los niveles de 2,3-DPG a la anemia es diferente en los tres grupos. En las ovejas, en las que la hemoglobina interactúa muy poco con el 2,3-DPG y en las que los niveles de éste son muy bajos, se reportan in-

crementos de hasta 800% expresados como  $\mu$ moles 2,3-DPG/g de hemoglobina.<sup>1</sup> Estos incrementos se explican tomando en consideración que a pesar de que los niveles de 2,3-DPG en estos animales son muy bajos y que la afinidad de la hemoglobina por el 2,3-DPG es también muy baja, la afinidad no es cero. Por lo tanto ese incremento debe tener algún efecto sobre la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno.<sup>1,17</sup>

En los humanos bajo condiciones semejantes de anemia a la de los carneros, se han encontrado incrementos de 300% expresados como  $\mu$ moles de 2,3-DPG/g de hemoglobina.<sup>20,</sup>

<sup>24</sup> En la especie humana, los incrementos de 2,3-DPG observados en condiciones de hipoxia (exposición a grandes alturas, anemias), tienen significados adaptativos. Bajo estas condiciones el incremento de 2,3-DPG produce un desplazamiento de la curva de disociación de oxígeno a la derecha, indicando esto que la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno se encuentra reducida.<sup>12,15,32</sup>

Bajo condiciones fisiológicas, esto tiene mucha importancia ya que la hemoglobina humana podrá ceder su oxígeno más fácilmente a los tejidos que cuando tiene una afinidad normal.<sup>15</sup>

En el conejo, en el que algunas veces se llegaron a tener concentraciones tan bajas de hemoglobina como 25% del valor inicial, los niveles de 2,3-DPG no se incrementaron. Todo esto parece indicar que la respuesta del 2,3-DPG bajo condiciones de anemia la hace de una manera inversa a la concentración normal de éste presente en los mamíferos.

En el carnero, el cual casi no contiene 2,3-DPG, el incremento es el más grande.

El humano, con una cantidad moderada de 2,3-DPG, da una respuesta que es también moderada comparativamente.

Por último el conejo, con un nivel alto de 2,3-DPG, no presenta incrementos apreciables en los niveles de este compuesto.

En resumen los datos presentados parecen indicar límites en la respuesta del 2,3-DPG a la anemia. En los carneros a pesar de incrementarse el 2,3-DPG hasta 800%, en números absolutos la relación molar inicial 2,3-DPG:Hb es 0.014 : 1 incrementándose hasta 0.112 : 1.<sup>1</sup>

En los humanos la relación molar máxima que se ha detectado es de 3 : 1.<sup>24</sup> Siendo la relación molar inicial de 1 : 1. En los humanos y en los carneros el incremento de 2,3-DPG está sujeto a las condiciones de hipoxia.

En el conejo con una respuesta no apreciable los niveles de 2,3-DPG durante un proceso de anemia parecen estar determinados por la concentración de hemoglobina, guardando una relación constante de 2 : 1.

Los datos hasta aquí presentados aunados a los que se muestran en la tabla 2, exigen dar un punto de vista.

En las especies de mamíferos que presentan una relación molar 2,3-DPG : Hb de casi 0:1, la interacción de la hemoglobina con el 2,3-DPG es casi nula pudiéndose decir que está a punto de desaparecer el sitio alostérico de éste. Los datos obtenidos en los carneros indican que no existe mucha posibilidad de que se pueda inducir algún sitio de unión al 2,3-DPG, durante la anemia ya que la relación molar máxima es de 0.1:1.

En los humanos en los que solamente se ha demostrado un sitio de unión específico del 2,3-DPG a la hemoglobina, y en los que la relación molar normal es de 1:1, los datos de la literatura permiten opinar que durante un estado de anemia se pueden inducir hasta dos sitios de unión del 2,3-DPG a la hemoglobina, ya que se han detectado incrementos hasta de 300% expresados como  $\mu$ moles de 2,3-DPG/g de

hemoglobina, es decir una relación molar de 3:1. En el grupo de mamíferos que presentan una relación molar de 1:1, - tomando como ejemplo al humano, la interacción de la hemoglobina con el 2,3-DPG es mucho mayor que la del grupo anterior, pero menor que los que presentan una relación de 2:1 (conejo).

El conejo con una relación molar 2:1 y que presenta una mayor interacción de la hemoglobina con el 2,3-DPG, podría tener en condiciones normales, dos sitios de unión al 2,3-DPG.

En caso de que la hemoglobina de conejo no tenga - dos sitios de unión al 2,3-DPG, esto indicaría que éste último estaría cumpliendo un papel diferente de los que ya - se han mencionado.

Resulta difícil comprender que de no existir mas - de un sitio de unión al 2,3-DPG, una gran cantidad de éste pueda estar libre en el interior de las células rojas del conejo normal y anémico, así como del humano anémico, y el significado fisiológico que ello pudiera tener. Un exceso de 2,3-DPG inhibe la hexoquinasa, la 2,3-DPG mutasa y baja el pH intraeritrocítico por efecto del equilibrio de Donnan 1,6,34.

De ser cierto que una buena cantidad de 2,3-DPG se encontrara libre, implicaría que la glucólisis en los conejos normales y anémicos así como en los humanos anémicos, se encontraría aumentada, que la 2,3-DPG mutasa fuera más activa que la fosfatasa, ó que la 2,3-DPG mutasa no fuera inhibida por producto.

Es difícil explicar las altas concentraciones de 2,3-DPG en los conejos, en los humanos anémicos y en las - otras especies de mamíferos que tienen una relación molar de 2:1, suponiendo un sólo sitio de unión a aquel. También es difícil explicar el hecho de que en los casos de anemia

severa (25% del nivel inicial de hemoglobina), en los conejos no se incrementen los niveles de ese metabolito. Tal vez el hecho de la aparición de una nueva población de células más grandes en los conejos, tenga algún significado fisiológico en relación con la explicación que se trata de dar a este fenómeno.

Los datos anteriormente presentados nos hacen ver que debemos de tener cuidado de no tratar de extrapolar los resultados obtenidos con el mecanismo de control de la concentración de 2,3-DPG en los humanos, hacia todos los mamíferos.

Resultados complementarios a los de este trabajo, han sido obtenidos por otros investigadores. Durante el proceso de la anemia inducida con fenilhidrazina, asociada con reticulocitosis (10-50% de reticulocitos), en conejos, Brewer y sus colaboradores encontraron muy poco efecto de dicha anemia sobre la curva de disociación de oxígeno, indicando esto, que la afinidad de la hemoglobina por éste, no se modifica durante la anemia en los conejos.<sup>15</sup>

En la anemia inducida por sangrado también se ha observado una reticulocitosis, con un máximo de 35%, que se alcanza el séptimo día de sangrado y después se mantiene aproximadamente constante hasta el final del experimento.<sup>51</sup>

Se sabe que los reticulocitos humanos contienen niveles más bajos de 2,3-DPG que los eritrocitos maduros.<sup>15</sup>

Por otro lado se sabe que los reticulocitos de conejo tienen menos hemoglobina que los eritrocitos.<sup>51</sup>

Como la relación molar 2,3-DPG:Hb no se modificó durante el proceso de la anemia en los conejos hechos anémicos por sangrado, no obstante el 35% de reticulocitos, es muy probable que la relación molar 2,3-DPG:Hb tanto en los reticulocitos como en los eritrocitos, sea la misma.

Dado que la relación molar 2,3-DPG:Hb podría ser igual en eritrocitos y reticulocitos, la afinidad de la

hemoglobina por el oxígeno debe permanecer invariable durante el proceso de la anemia.

Por lo tanto deben existir otros mecanismos que permitan una oxigenación adecuada en los conejos, sin modificar la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno.

Como se puede notar, el conejo es un organismo excelente para utilizarlo como modelo de estudio de los fenómenos que se han ido mencionando a través de este trabajo.

Así pues, los resultados y puntos de vista aquí presentados, han de considerarse como el punto de partida para desarrollar nuevas investigaciones que ayuden a contestar las preguntas que explícita ó implícitamente aquí se plantean.

## RESUMEN Y ESPECULACIONES

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos de la inducción de la anemia en conejos, por la remoción diaria de un volumen constante de sangre durante quince días. Ante esta inducción, la cantidad de hemoglobina y de 2,3-DPG decrecen rápidamente. En el séptimo día de sangrado, aproximadamente, estos parámetros alcanzan un equilibrio. El paralelismo entre las cinéticas seguidas por dichos parámetros parece indicar que uno determina al otro. En este caso parece ser que la cantidad de hemoglobina determina a la de 2,3-DPG.

Ese mismo paralelismo determina que la concentración de 2,3-DPG/gr. de hemoglobina no cambie durante el proceso de la anemia.

El conejo con una relación molar 2,3-DPG:Hb de 2:1 y una hemoglobina muy afin por el oxígeno, parece poseer una hemoglobina con dos sitios de unión al 2,3-DPG.

El hecho de que la concentración de 2,3-DPG/gr. de hemoglobina no cambie durante la anemia en los conejos, parece indicar la imposibilidad de la inducción de algún otro sitio de unión al 2,3-DPG, a diferencia del humano en el que bajo condiciones de hipoxia se han reportado incrementos de hasta 300%, indicando esto una relación molar 2,3-DPG:Hb de 3:1 y por lo tanto indicando también la posibilidad de inducción de nuevos sitios al 2,3-DPG, bajo condiciones de anemia.

La posibilidad de la existencia de dos sitios de unión al 2,3-DPG en la hemoglobina de conejo deberá ser analizada como continuación de este trabajo.

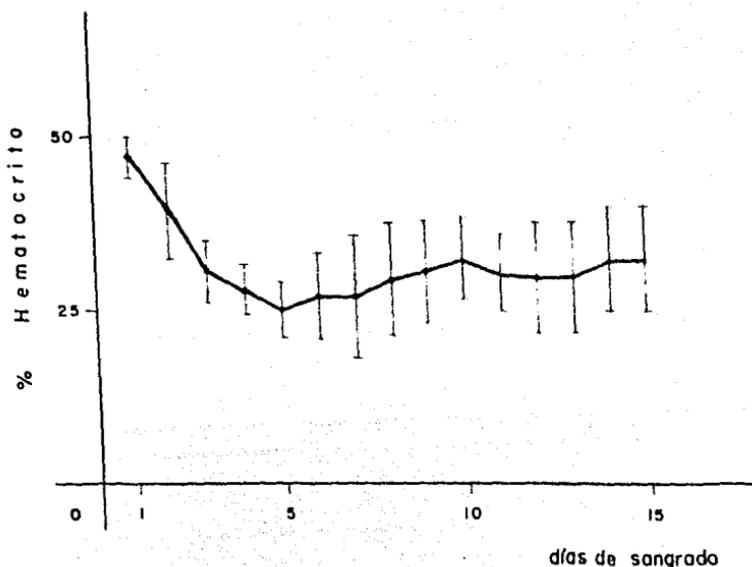


fig 1

Figura 1. Variación de el hematocrito en respuesta a la inducción de anemia por remoción diaria de un volumen constante de sangre. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea sólida une los valores promedio obtenidos de 3-6 determinaciones por duplicado por día.

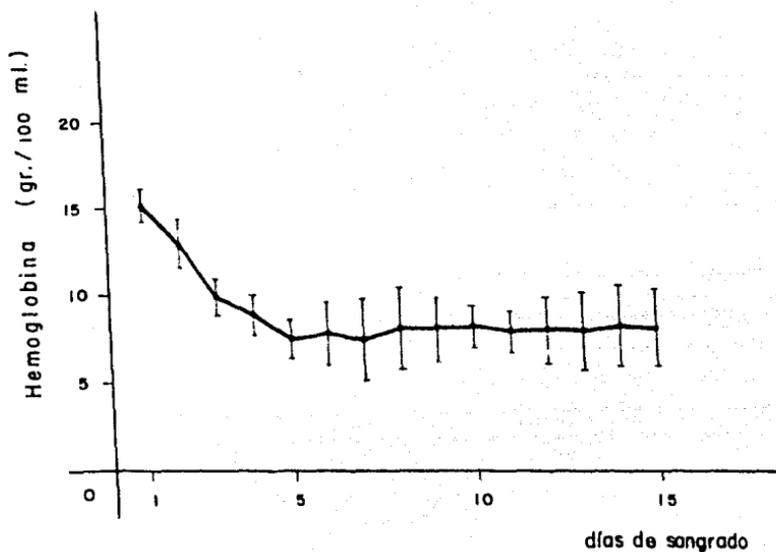


fig. 2

Figura 2. Efecto de la inducción de la anemia por sangrado diario sobre la concentración de hemoglobina por 100 mililitros de sangre. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea sólida une los valores promedio obtenidos de 3-6 determinaciones por duplicado por día.

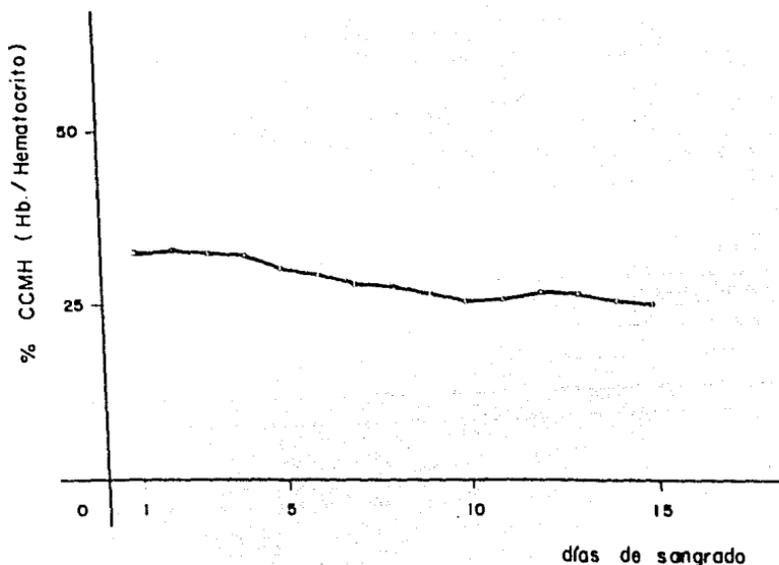


fig. 3

Figura 3. Influencia de la remoción diaria de un -  
 volúmen constante de sangre sobre la concentración intra-  
 celular de hemoglobina. No se muestra desviación estándar,  
 debido a que está graficado el cociente del valor promedio  
 de hemoglobina entre el valor promedio del hematocrito en  
 cada día.

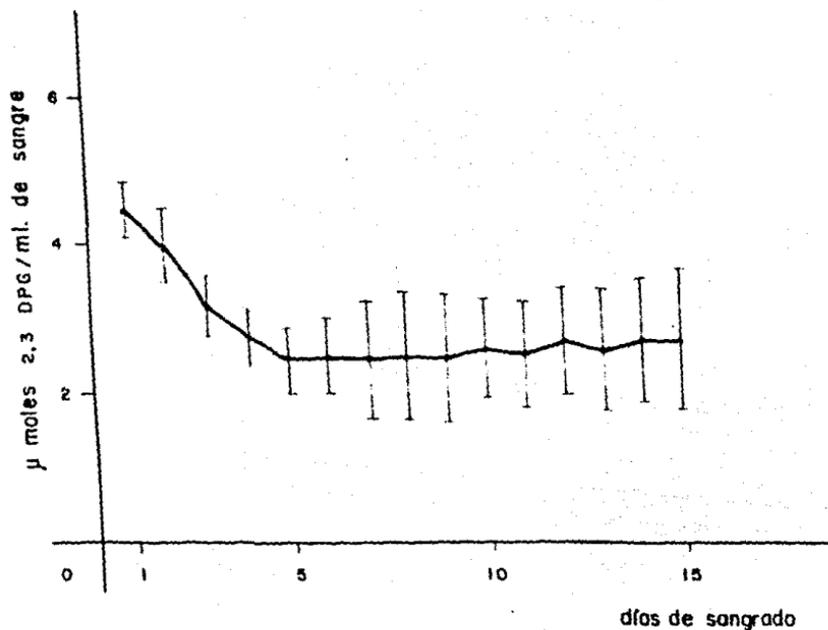


fig 4

Figura 4. Efecto de la anemia inducida sobre la concentración de 2,3-DPG/ml. de sangre. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea sólida une los valores promedio obtenidos de 3-6 determinaciones por duplicado por día.

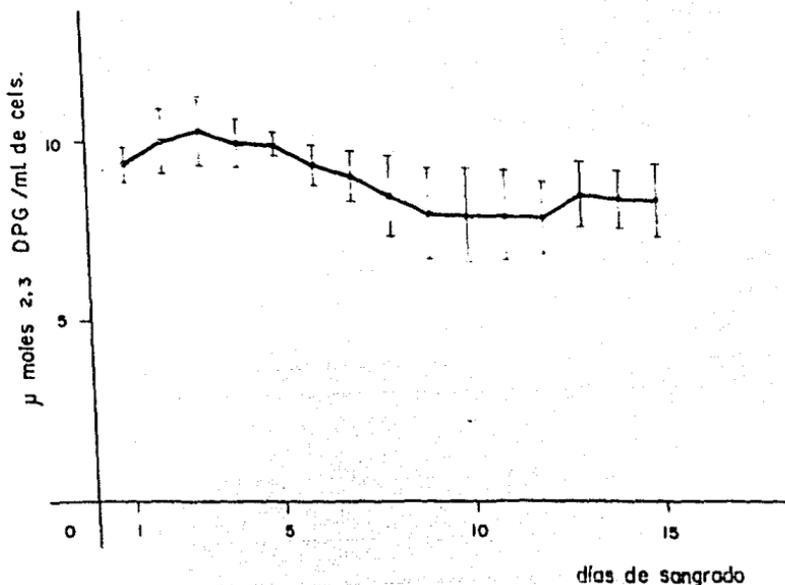


Fig. 5

Figura 5. Variación de la concentración intracelular de 2,3-DPG, en respuesta a la remoción diaria de un volúmen constante de sangre. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea sólida une los valores promedio obtenidos de 3-6 determinaciones por duplicado cada día, de la concentración de 2,3-DPG/ml. de sangre en relación con el hematocrito.

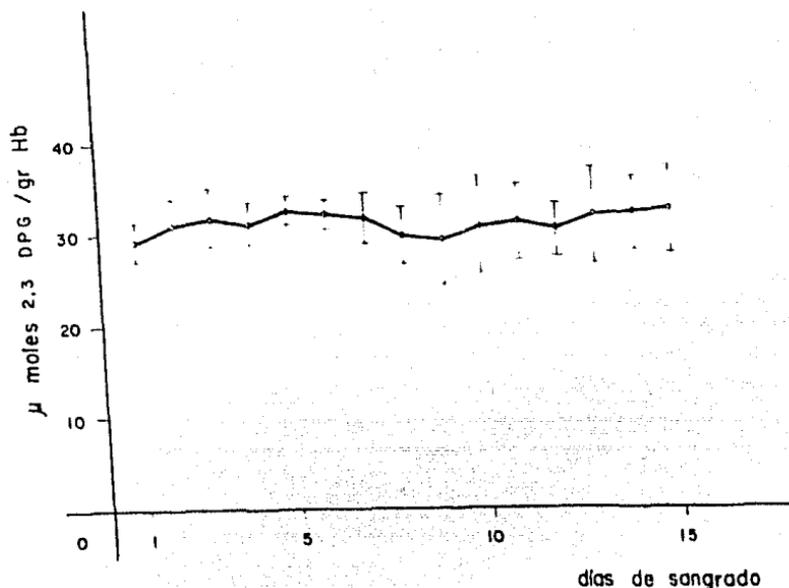


Fig 6

Figura 6. Influencia de la anemia crónica inducida - sobre la concentración de 2,3-DPG/gr. de hemoglobina. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea sólida une los valores promedio obtenidos de 3-6 determinaciones por duplicado cada día, de la concentración de 2,3- - DPG/ml. de sangre en relación con la concentración de hemo- globina.

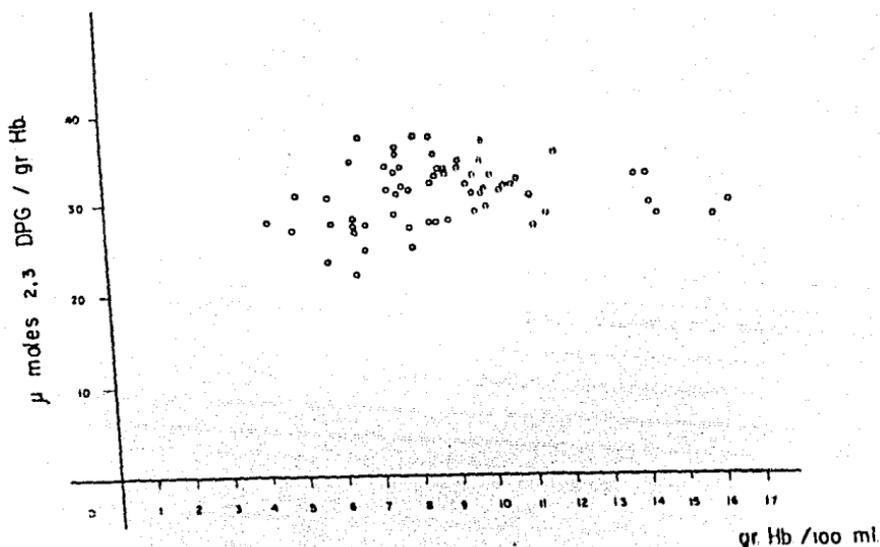


Fig 7

Figura 7. Correlación entre la concentración de 2,3-DPG/gr. de hemoglobina y los niveles de hemoglobina circulante (gr./100 ml. de sangre). Cada círculo representa el promedio de un valor individual. Los valores comprendidos entre 14 y 17 gramos de hemoglobina/100 ml. de sangre, corresponden a los valores iniciales (normales) de 2,3-DPG/gr. de hemoglobina. El índice de correlación para el conjunto de puntos es de 0.153 ( $r = 0.153$ ).

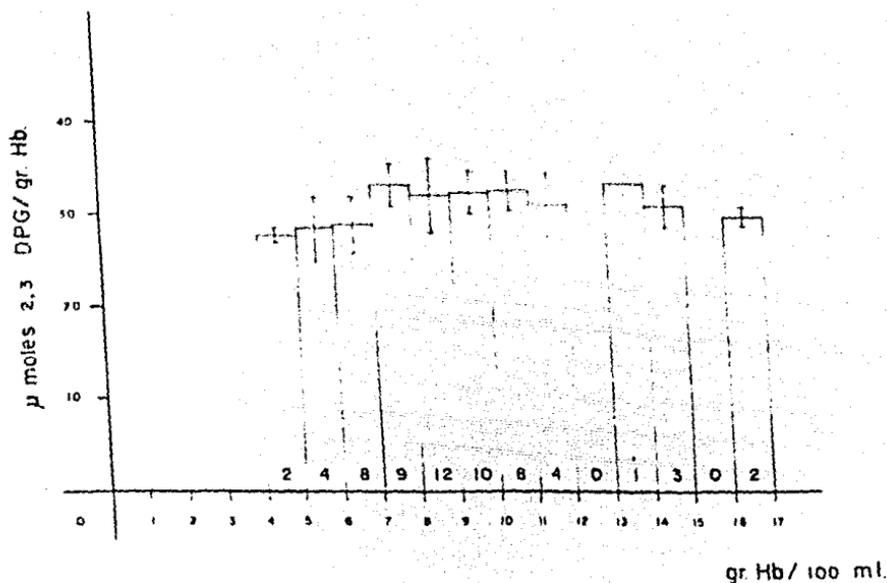
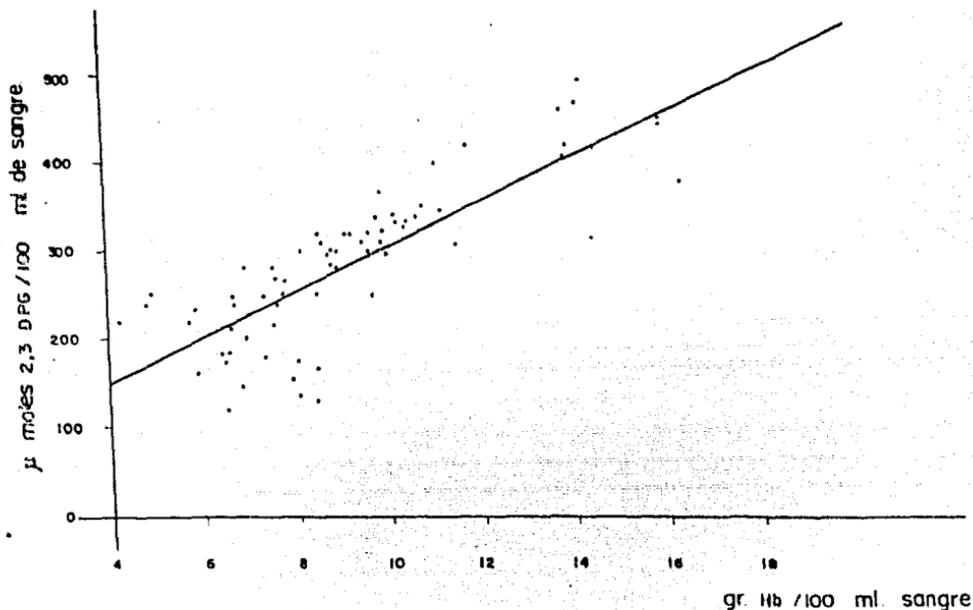


fig 8

Figura 8. Correlación en forma de histograma de la concentración de 2,3-DPG/gr. de hemoglobina y la concentración de ésta. La cifra inserta en cada barra representa el número de valores que cayeron en cada intervalo.



gr. Hb / 100 ml. sangre

Fig. 9

Figura 9. Correlación entre la concentración de 2,3-DPG/100 ml. de sangre y el nivel de hemoglobina circulante (gr./100 ml. de sangre). Cada punto representa el promedio de un valor individual.

El índice de correlación que le corresponde al conjunto de puntos es 0.824 ( $r = 0.824$ ,  $n = 67$ )

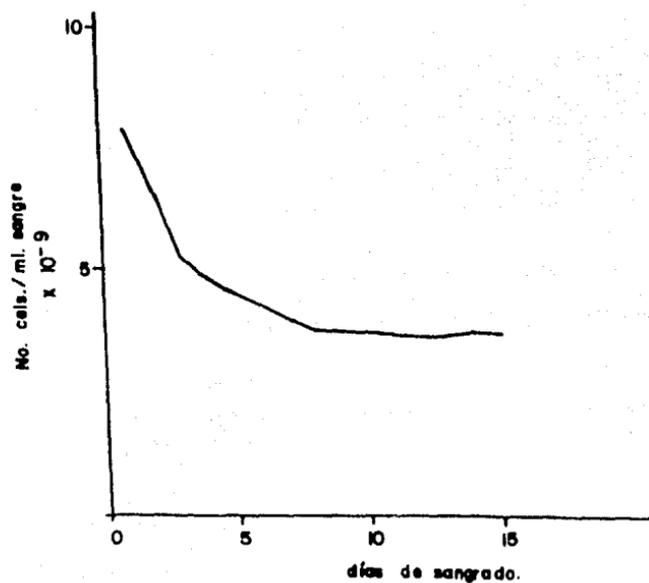


Figura 10. Efecto de la remoción diaria de 30 ml. de sangre sobre el número de células rojas por ml. de la misma, en un conejo de 3 kg. de peso.

Tomada de Valdés López, V.M. (1977).

TABLA 1.- Relación molar 2,3-DPG:hemoglobina durante el proceso de anemia por sangrado en conejos Nueva Zelanda blancos.

Día de sangrado	µmoles de 2,3-DPG/ml. de sangre.	µmoles de hemoglobina/ml. de sangre	µmoles de 2,3-DPG/µmole de hemoglobina
1	4.44	2.31	1.922
2	3.94	1.98	1.990
3	3.13	1.50	2.086
4	2.74	1.34	2.038
5	2.45	1.14	2.149
6	2.48	1.19	2.084
7	2.44	1.15	2.121
8	2.49	1.24	2.008
9	2.46	1.23	2.000
10	2.57	1.26	2.039
11	2.42	1.20	2.016
12	2.38	1.23	1.934
13	2.55	1.21	2.107
14	2.70	1.27	2.125
15	2.70	1.25	2.160

Se muestran los valores promedio de 3-6 determinaciones por duplicado por día.

TABLA 2.- Relación molar 2,3-DPG:Hb de algunas especies de mamíferos normales. Los datos presentados en ésta tabla han sido calculados a partir de la concentración milimolar de 2,3-DPG, hemoglobina y hematocrito recopilados en 9,17,25, 29,39 y 53. Debido a la diversidad de las fuentes de datos, éstos han de considerarse como aproximados.

Nombre común	Nombre científico	$\mu\text{moles}$ 2,3-DPG/ ml.sangre	$\mu\text{moles}$ Hb/ml. sangre	Relación molar 2,3- DPG/Hb
Cabra	<u>Capra hircus</u>	0.029	1.680	0.017:1
Ciervo	<u>Odocoileus virginianus</u>	0.041	2.100	0.019:1
Vaca	<u>Bos taurus</u>	0.040	2.050	0.020:1
Oveja	<u>Ovis aries</u>	0.038	1.818	0.020:1
Gato	<u>Felis catus</u>	0.253	1.893	0.133:1
Guanaco	<u>Lama guanicoe</u>	1.330	2.272	0.586:1
Capuchino cara blanca	<u>Cebus albifrons</u>	1.720	2.180	0.800:1
Llaca	<u>Lama glama</u>	1.961	2.260	0.870:1
Mono ardilla	<u>Saimiri sciureus</u>	1.848	2.000	0.924:1
Zarigüeya	<u>Didelphis marsupialis</u>	2.142	2.272	0.945:1
Hombre	<u>Homo sapiens</u>	2.256	2.270	0.997:1
Jámster	<u>Mesocricetus auratus</u>	2.622	2.240	1.170:1
Mono rhesus	<u>Macaca mulatta</u>	2.184	1.864	1.170:1
Caballo	<u>Equus caballus</u>	2.430	1.970	1.233:1
Zorrillo rayado	<u>Mephitis mephitis</u>	2.880	2.290	1.257:1
Cuyo	<u>Cavia porcellus</u>	2.623	2.030	1.292:1
Ferreo	<u>Canis familiaris</u>	3.243	2.500	1.300:1

TABLA 2 (Continuación)

Martucha	<u>Potos flavus</u>	2.268	1.651	1.374:1
Eurón	<u>Mustela putorius</u>	3.213	2.300	1.397:1
Gálago de cola gruesa	<u>Galago crassicaudata</u>	3.400	2.015	1.687:1
Marmota	<u>Marmota monax</u>	3.600	2.100	1.714:1
Rata de laboratorio	<u>Rattus norvegicus</u>	3.960	2.300	1.722:1
Jerbillo	<u>Gerbillus gerbillus</u>	4.042	2.270	1.800:1
Mono lanudo	<u>Lagothrix lagothricha</u>	3.230	1.727	1.870:1
Conejo	<u>Oryctolagus cuniculus</u>	4.440	2.280	1.950:1
Cerdo	<u>Sus scrofa</u>	4.800	2.320	2.070:1
Mono búho	<u>Aotus trivirgatus</u>	4.788	2.160	2.210:1
Ratón común	<u>Mus musculus</u>	4.770	2.150	2.220:1

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Agar, M.S., Harley, J.D., Gruca, M.A. and Roberts, J.: Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate in anaemic sheep.-- *Specialia* 15 (2):275, 1977.
- 2.- Alba Lois L., Valdés López, V.M., Becerril Iraján, B., Mainero del Paso, A. y Martínez Medellín, J.: Estudios sobre el proceso de formación de reticulocitos en conejos-anémicos. XI Reunión Nal. Soc. Mex. Bioq. Mazatlán, Sin.-- México. Oct. 31 - nov. 4, 1976.
- 3.- Albert, S.M., Jain, S.C., Shibuya, J. and Albert-C.A.: The Hematocrit in clinical practice. Charles C. Thomas, Ed. Springfield, 1965.
- 4.- Arnone, A.: X ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. *Nature* - 237:146, 1972.
- 5.- Astrup, P.: Dependence of oxyhemoglobin dissociation and intraerythrocytic 2,3-DPG on acid-base status of blood. In; *Red Cell Metabolism and Function*. Advan Exp -- Med. Biol. G.J. Brewer, Ed. Plenum Press. New York N.Y., 1970.
- 6.- Badwey, J.A. and Westhead, E.W.: Hysteretic response of human erythrocyte pyruvate kinase to phosphoenolpyruvate. *J. Biol. Chem.* 251 (18):5600, 1976.
- 7.- Barcroft, J. (Citado en 48) ;Anoxaemia. Presidential Address, *Lancet* 199:485, 1920.
- 8.- Bard, H. And Shapiro M.: Perinatal changes of 2,3 diphosphoglycerate and oxygen affinity in mammals not having fetal type hemoglobins. (In press, *Pediat. Res.*).
- 9.- Bartlett, G.R.: Patterns of phosphate compounds - in red blood cells of man and animals. *Advan. Exp. Med. - Biol.* 6:245. 1970.

10.- Benesch, R. and Benesch, R.E.: The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 26 (2):162. 1967.

11.- Benesch, R., Benesch, R.E. and Yu, G.I.: Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 59:526, 1968.

12.- Benesch, R. and Benesch, R.E.: The reaction between diphosphoglycerate and hemoglobin. *Fed. Procc.* 29 (3): 1101, 1970.

13.- Brain, M.C. and Cart, R.T.: Hemoglobin and red cell structure and function. (G.J. Brewer, Ed). Plenum - press. Nw York, N.Y., 1972.

14.- Brewer, G.J., Eaton, J.W. and Grover, R.: Studies of red cell glycolysis and interactions with carbon monoxide, smoking, and altitude. *Advan. Exp. Med. Biol.* 6:95, - 1970.

15.- Brewer, G.J. and Eaton, J.W.: Erythrocyte Metabolism: Interaction With oxygen transport. *Science* 171:1205, 1971.

16.- Brewer, G.J.: General red cell metabolism. The - Red Blood Cell. Douglas MacN. Surgenor, Ed. Academic Press New York, N. Y., 1974.

17.- Bunn, H.F., Seal, U.S. and Scott, A.F.: The role of 2,3-diphosphoglycerate in mediating hemoglobin function of mammalian red cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 241:498, 174.

18.- Conover, Jay William. Practical nonparametric -- statistics. Willey International Editions. New York 1965.

19.- Chanutin, A. and Curnish, R.R.: Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 121:196, 1967.

20.- Charache, S., Grisolia, S., Fiedler, A. J. and -

Hellegers, A.E.: Effect of 2,3-diphosphoglycerate on oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. J. Clin. Invest 49:806, 1970.

21.- Dawson, R.B. Jr: The hemoglobin function of -- blood stored at 4<sup>0</sup>C. Advan. Exp. Med. Bio. 6:305, 1970.

22.- Dahm, J., Deuticke, B. and Guerlach, E.: Metabolism of 2,3; diphosphoglycerate and glycolysis in human red blood cells under the influence of dipyridamole and inorganic sulphur compounds. Biochem. Biophys. Acta. 170: 452, 1968.

23.- Eaton, J.W. and Brewer, G.J.: The relationship between red cell 2,3-diphosphoglycerate and levels of hemoglobin in the human. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 61:756, 1968.

24.- Eaton, J.W., Brewer, G.J., Schultz, J. and Sing, C.: Variation in 2,3-diphosphoglycerate and ATP levels in human erythrocytes and effects on oxygen transport. Advan. Exp. Med. Biol. 6:21, 1970.

25.- Eduard, M.C. Jr. and Norman, A.H.: Handbook of - Laboratory Animal Science. Vol. III, CRC Press Inc. Cleveland Ohio, 1976.

26.- Engel, K. and Duc. G.: Effect of iodoacetate and Fluoride on the position of the hemoglobin oxygen dissociation curve of human whole blood. Nature 219:936, 1968.

27.- Fairbanks, V.F. and Beutler, E.: Iron Metabolism. - - In: Williams, W.J., Beutler, R.; Erslev, A.J. and - Rundles, R.W. Eds. HEMATOLOGY. Mc.Graw Hill Book Co. New York, 1972.

28.- Grenvold, I.: A new type of phosphoric acid compound isolated from blood, with some remarks on the effect of substitution on the rotation of 1;glyceric acid. J. - Biol. Chem. 63:339. 1925.

29.- Harkness, D.R., Ponce, J. and Grayson, B.: Comparative study of the phosphoglyceric acid cycle in mammalian erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 28:129, 1969.

30.- International committee for the standardization in hematology of the european society of hematology.: Recommendations and requirements for haemoglobinometry in human blood. *Nature* 206:119, 1963.

31.- Keitt, A.S.: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide; linked analysis of 2,3-diphosphoglyceric acid: - Spectrophotometric and Fluorometric procedures. *J. Lab. Clin. Med.* 77 (3):470, 1971.

32.- Lenfant, C., Torrance, J.D., Woodson, R.D., Jacobs, P. and Finch, C.A.: Role of organic phosphates in the adaptation of man to hypoxia. *Fed. Procc.* 29 (3):1115, 1970.

33.- Loos, J.A. and Prins, H.: Application of a mechanized method for the determination of different glycolytic intermediates in the routine quality control of red cells. *Advan. Exp. Med. Bio.* 6:277, 1970.

34.- MacDonald, R.: Red cell 2,3- diphosphoglycerate- and oxygen affinity (Review article). *Anaesthesia* 32:544, 1977.

35.- Martínez, M.J., Valdés, L.V.M. y Franco, B.M. - Estudios sobre la formación de la sangre en conejos flebotomizados. X Reunión Na. Soc. Mex. Bioq., A.C. Mérida, - Yucatán. Noviembre, 1974.

36.- Miale, Y.B.: Laboratory Medicine Hematology. 4th. ed. The C.V. Mosby Co. Saint Louis, 1972.

37.- Minakami, S., Tomoda, A. and Tsuda, S.: Effect of intracellular pH (pHi) change on red cell glycolysis. - Progress in clinical and biological research. Erythrocyte structure and function. Brewer, G.J. Ed. Alan R. Liss Inc. New York, N.Y., 1975.

38.- Mousen, G. and Vestergaard, B.B.: Human erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate metabolism. Arch. Biochem. Biophys. 190 (1):67, 1978.

39.- Petschow, D., Würdinger, R.B., Duhm, J. Braunitzer, G. and Bauer, C.: Causes of high blood O<sub>2</sub> affinity of animals living at high altitude. J. Appl Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol. 42 (2):139, 1977.

40.- Rapoport, S. and Guest, G.M.: Distribution of -- acid soluble phosphorus in the blood of various vertebrates. J. Biol. Chem. 138:269, 1941.

41.- Rapoport, S. and Luebering, J. The formation of - 2,3-diphosphoglycerate in rabbit erythrocytes; the existence of a diphosphoglycerate mutase. J. Biol. Chem. 183:507, 1950.

42.- Rose, Z.B.: The purification and properties of - diphosphoglycerate mutase from human erythrocytes. J. Biol. Chem. 243:4810, 1968.

43.- Rose, Z.B.: Enzymes controlling 2,3-diphosphoglycerate in human erythrocytes. Fed. Procc. 29 (3):1105, 1970.

44.- Shields, E. Ch., Kaplan, H. and Dawson, R.: Biological alterations occurring during red cell preservation. Advan. Exp. Med. Biol. 6:257, 1970.

45.- Sigma Technical Bulletin No. 35 UV, 1971.

46.- Sigma Technical Bulletin No. 35 UV, 1974.

47.- Steward, J.H. and Tate, E.M.: Gel Chromatography of inositol pentaphosphate complex. J. Chromatography. 45: 400, 1969.

48.- Stryer, L. BIOQUIMICA. Editorial Reverté, S.A. - Caracas Venezuela, 1976. (Cap. 4, 12, 15).

49.- Tyuma, I. and Shimizu, K. Effect of organic phosphates in the difference in oxygen affinity between fetal

and adult human hemoglobin. Fed, Procc. 29 (3):1112, 1970.

50.- Valeri, C. and Fortier, N. Red cell 2,3-DPG, ATP, and Creatine levels in preserved cells and in patients -- with red cell mass deficits or with cardiopulmonary insufficiency. Advan. Exp. Med. Biol. 6:289, 1970.

51.- Valdés López, V.M.: Estudios sobre la dinámica de formación de la sangre en conejos hechos anémicos por sangrado. Tesis de Licenciatura UNAM. México. 1977.

52.- van Assendelft, O.W.: Photometry and the standardized method for the determination of hemoglobin. Schuiz. Med. Wschr. 101:1649, 1965.

53.- Wintrobe, M.M., Lee, G.R., Boggs, D.R., Bithell, T.C., Athens, J. W. and Forester. S. : CLINICAL HEMATOLOGY 7th. ed. Lee and Febiger. Philadelphia, 1974.