

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio Acerca de la Relación Existente entre el
Acido 2,3- Difosfoglicerico (2,3-DPG) y la Hemoglobina
de Conejo.**

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

PEDRO ULISES GUADALUPE OSTOA SALOMA

MEXICO, D. F.

OCT. 1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

I N D I C E

INTRODUCCION.

Antecedentes	1
Distribución de la hemoglobina	5
Estructura y función de la hemoglobina	6
Factores que afectan la afinidad de la	
hemoglobina por el oxígeno	15
Efecto del 2,3-DPG sobre la hemoglobina	16
Factores que afectan la concentración	
de 2,3-DPG	19
Objetivos	20

MATERIALES Y METODOS.

Primera parte

Colecta de la sangre	21
Procesamiento de la sangre	22
Determinación de 2,3-DPG	22
Separación de las células	23
Preparación de frotis	25

Segunda parte

Procesamiento de la sangre	26
Montaje de la columna	26

RESULTADOS Y DISCUSION	26
----------------------------------	----

RESUMEN	46
-------------------	----

BIBLIOGRAFIA	48
------------------------	----

INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES.

Nunca ha sido difícil para la humanidad comprender que la sangre es un tejido precioso para la vida. Mucho antes del inicio de la medicina y la ciencia moderna, debe haberse observado que la sangría continúa daba lugar a la debilidad progresiva y finalmente a la muerte tanto en hombres como en animales. Era como si la vida se saliese con la sangre.

Los pueblos antiguos consideraban que la sangre era literalmente sinónimo de vida. En el Génesis 9:4 Dios dice a Noe: "Empero, carne con su vida que es su sangre no comeréis". Tal parece que en el concepto hebreo la sangre de un animal era la esencia de su vida, ". . . . con su vida que es su sangre. . . ." y que una vez extraída la sangre lo que quedaba del animal era tan inerte que podía por lo tanto comerse impunemente.

Parte de esa actitud mística hacia la sangre persistió entre los europeos. ¿Qué otra cosa podía ser más comprometedor que firmar con una parte de la propia vida cuando lo que estaba en juego era el alma? En el Fausto de Goethe, Mefistófeles dice: "la sangre es un líquido muy especial" lo cual es desde luego cierto aunque no por las razones invocadas por Mefistófeles.¹

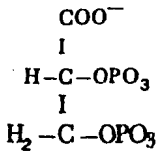
Sin embargo, las propiedades reales de la sangre son mucho más sorprendentes a incluso más asombrosas que las fantasías mitológicas acerca de ella, a pesar de que no es un sinónimo de vida ni determina un carácter o una personalidad.

La sangre es una suspensión de células en un medio líquido —plasma sanguíneo— que contiene iones y proteínas. La sangre circula rápidamente por el sistema vascular y se caracteriza porque mantiene dentro de límites muy estrechos tanto su composición química como sus propiedades físicas. De esta manera la sangre asegura condiciones estables para el funcionamiento de las células del organismo.

A través de la circulación la sangre acarrea las sustancias nutritivas absorbidas por el intestino o producidas por el organismo; arrastra los residuos del metabolismo celular hasta los sistemas de desecho donde son eliminados; transporta leucocitos y anticuerpos con los que participa en la defensa del organismo; lleva las secreciones hormonales de un órgano a otro para regular sus funciones; mantiene el equilibrio acuoso; interviene en la regulación térmica, regula la presión osmótica; regula el equilibrio ácido-base; regula el equilibrio iónico; por su volumen participa en el mantenimiento de la presión arterial; transporta el oxígeno desde los pulmones a los tejidos y lleva de estos al pulmón el exceso de CO₂.²

En el laboratorio de Biología Molecular en la facultad de Ciencias de la UNAM se hacen estudios de hematología relacionados con el metabolismo de hierro. Desde hace varios años el personal del laboratorio ha estado interesado en estudiar el comportamiento del ácido 2,3-Difosfoglicérico, un metabolito que esta presente en los eritrocitos y que regula el flujo de oxígeno a los tejidos.

El ácido 2,3-Difosfoglicérico (2,3-DPG) esta ampliamente distribuido en los seres vivos. Es un derivado del ácido glicérico y este a su vez del glicerol. Es un intermediario de la vía glucolítica que se sintetiza y degrada en el paso de 2,3-DPG a 3 fosfoglicerato (Fig. 1 a y b).



a) Fórmula del 2,3-DPG.

b) Metabolismo de la glucosa a las células rojas. Formación de 2,3-DPG. HK-Hexocinasa GPI-Glucosa fosfato isomerasa PFK-Fosfofructuocinasa, TPI-Triosefosfato isomerasa, GAPDM-Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa PGK-Fosfoglicerato cinasa, LDM-Lactato deshidrogenasa, DPGM-Difosfoglicerato fosfatasa, NP-Nucleosido fosforilasa DHAP-Dihidroxiacetona fosfato, GAP-Gliceraldehido 3 fosfato, DPG-Difosfoglicerato, DGA-Acido fosfoglicérico.

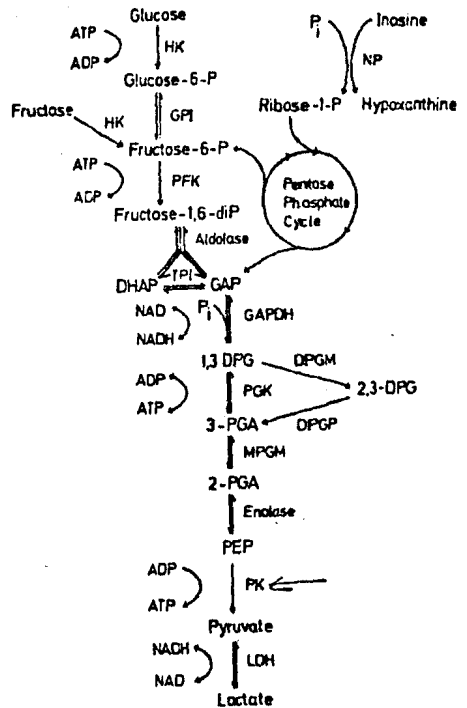


Fig. 1

La primera función del 2,3-DPG en las células vivas, es actuar como cofactor esencial en la reacción catalizada por la fosfoglicerato mutasa (PGM), reacción que se esquematiza en la Fig. 2.

En los últimos 17 años se ha acumulado evidencia de que el 2,3-DPG, tiene otra función fisiológica en los eritrocitos de mamíferos, que contienen a este metabolito en altas concentraciones.

Una función es interactuar con la hemoglobina en la que actúa como un importante regulador alostérico de la función de esta proteína. Otra, es la de influir en enzimas clave de las rutas metabólicas del eritrocito.³

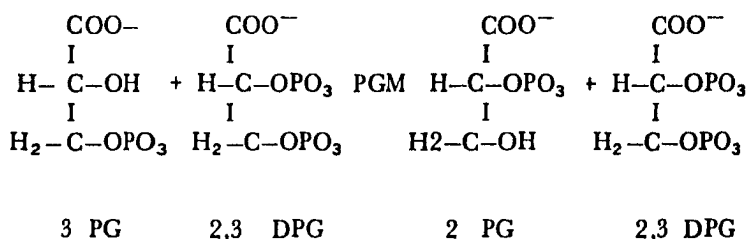


Fig. 2. Reacción catalizada por la fosfoglicerato mutasa (PGM) en la cual, 2,3-DPG es cofactor.
 3 PG—Ac. 3 fosfoglicérico; 2,3-DPG—Ac. 2,3-Difosfoglicérico; 2 PG—Ac. 2 fosfoglicérico.

De los datos que ha obtenido Cárdenas,⁴ se desprende que hay un incremento paulatino del 2,3-DPG en la sangre de conejo a partir del nacimiento hasta los 30 días de edad, a partir del cual se mantiene constante. Se han reportado resultados similares en otros trabajos.^{5,6,7,8,9}

Estos resultados indican que hay un decremento en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno conforme se desarrolla el conejo, lo que sugiere que hay un mecanismo regulador de este proceso.

Se ha dado una explicación, en la cual Jelkman y Bauer⁶ proponen un mecanismo enzimático, que básicamente consiste en la disminución de la actividad de la piruvato cinasa, y que esta disminución provoca el aumento en la concentración de 2,3-DPG que se observa experimentalmente. Esto se debe a que el nivel del ácido 3 fosfoglicérico (3PGA) es gobernado por la piruvato cinasa, el 3-PGA juega un papel en la regulación del 2,3-DPG ya que actúa como cosustrato en la reacción de formación del 2,3-DPG.¹⁰

Este dato nos puede explicar la variación en la concentración de 2,3-DPG pero no nos dice como la piruvato cinasa va disminuyendo su actividad conforme avanza el desarrollo.

Datos de Vázquez¹¹ y Cárdenas⁴ nos indican que aparentemente también hay un cambio poblacional de las células rojas en el conejo que se manifiesta en una disminución del volumen corpuscular medio (MCV) y el diámetro de las células circulantes conforme avanza el desarrollo. Este fenómeno ha sido reportado también por Jelkman y Bauer²². Este recambio poblacional consiste en lo siguiente:

Tanto el volúmen como el diámetro celular de los eritrocitos de conejo recién nacido (día 0) son característicos de la etapa prenatal; en esta etapa como se ha reportado,⁹ la actividad eritropoyética es responsabilidad del hígado y el bazo. Por lo tanto, al nacimiento, el conejo presenta una población celular constituida por células básicamente de origen hepático y de bazo.

En el laboratorio se han obtenido datos acerca de la actividad eritropoyética del conejo en su desarrollo postnatal; se encuentra que la actividad se ve incrementada a partir del día 5 de edad. Esta actividad eritropoyética genera células de un diámetro promedio de $6.6 \mu^3$ y un volúmen de aproximadamente $70 \mu^3$.

En la medida que estas células van invadiendo el torrente sanguíneo, el MCV lógicamente disminuye hasta alcanzar un valor aproximado de $70 \mu^3$.

Narita. et. al.¹² encuentran que la concentración del 2,3-DPG aumenta durante la diferenciación de las células eritroides en la médula osea. Este aumento se atribuye a un incremento en la actividad de la fosfofructuocinasa y a una disminución en la actividad de la piruvátocinasa conforme maduran las células.

Tomando en cuenta esta información, los propósitos de esta tesis es investigar si el incremento en el 2,3-DPG se debe a la aparición de una nueva población con niveles adultos de 2,3-DPG o si el aumento se debe a un incremento celular de la concentración de 2,3-DPG en las células inicialmente presentes. Para tal efecto se aislaran las 2 poblaciones de eritrocitos existentes en el desarrollo postnatal del conejo. Además nos planteamos determinar si hay una relación entre el tipo de hemoglobina y la concentración de 2,3-DPG. Si esto es verdad entonces la interacción entre el 2,3-DPG y la hemoglobina es de tal manera que la hemoglobina deberá presentar 2 sitios de unión para el 2,3-DPG en lugar de uno como se piensa en la actualidad.

Datos experimentales de Becerril¹³ para 53 especies de mamíferos, nos ha permitido ubicarlos en tres grandes grupos.

1er Grupo.— Abarca a todos los felinos, cérvidos y bóvinos en una relación molar de 2,3-DPG/hemoglobina entre valores cercanos a 0 y 0.2

2do Grupo.— No corresponde a una familia en particular. Los valores de la relación molar oscilan entre 0.7 y 1,8 con una media de 1,3.

3er Grupo.— También se caracteriza por no tener un representante exclusivo de alguna familia en lo particular. Presenta valores de una relación molar que va de 2 a 2.4.

En los mamíferos del primer grupo la interacción de la hemoglobina con el 2,3-DPG es casi nula, es por eso que se observan los niveles de este metabolito muy bajos. La razón de la baja reactividad entre el 2,3-DPG y la hemoglobina en este grupo es que se encuentra bloqueado el sitio de unión para este metabolito en la hemoglobina.¹⁴

En los humanos solamente se ha demostrado un sitio de unión específico del 2,3-DPG a la hemoglobina. El humano presenta una relación molar entre el 2,3-DPG y la hemoglobina de 1 y por tal pertenece al grupo 2. En este grupo la interacción de la hemoglobina con el 2,3-DPG es mucho mayor que la del grupo anterior, pero menor que la que presentan los del grupo 3.

El conejo, que es el organismo empleado en nuestro estudio se encuentra ubicado en el tercer grupo con una relación molar del 2,3-DPG/ hemoglobina de 2 a 1. Se sabe que la hemoglobina de conejo presenta una alta afinidad por el oxígeno y por el 2,3-DPG.

La relación molar del 2,3-DPG/hemoglobina puede alterarse fisiológicamente en el humano, al aumentar la concentración de 2,3-DPG, cuando existen patologías como: "Insuficiencia cardíaca, anemia crónica, enfermedades pulmonares, etc.

En las ovejas que pertenecen al grupo 1 se han reportado¹⁵ incrementos hasta de 800%, aunque en números absolutos, la relación molar inicial del 2,3-DPG/Hgb. es igual a 0.014:1 y se incrementa a 0.112:1.

En el humano, la relación máxima que se ha encontrado es de 3 a 1 con una relación inicial de 1 a 1.

Estos datos nos indican que el aumento en la concentración de 2,3-DPG obedece a la demanda de oxígeno. Sin embargo, resultados de Becerril¹⁵ reportan que la relación del 2,3-DPG/Hgb en el conejo no cambia durante la anemia, además de que tanto la hemoglobina como el 2,3-DPG siguen cinéticas paralelas; atendiendo a estas observaciones parecería ser que la concentración de 2,3-DPG estuviera determinada por la concentración de hemoglobina.

Si la concentración del 2,3-DPG esta en función del tipo de hemoglobina, aquéllos organismos que tienen una relación de 2 a 1 vs 1 a 1 tendrán dos sitios de unión para el 2,3-DPG. Si esto es cierto, los organismos con valores intermedios entre 1 y 2 deberán tener una mezcla de hemoglobina con distintos sitios de unión hacia el 2,3-DPG.

Para comprender mejor estas interrogantes y las respuestas que se han planteado, es necesario conocer más a fondo una de las principales funciones de la sangre, que es la de transportar oxígeno a los tejidos. Esta función la realiza por la presencia en los eritrocitos de la hemoglobina, proteína que se combina fácilmente con el oxígeno.

1.2. DISTRIBUCION DE LA HEMOGLOBINA

La hemoglobina aparece en células tan primitivas como las levaduras, algunas especies Paramecium y muchos invertebrados.

Es común encontrarla en algunos anélidos; algunos nemertinos: en crustaceos tales como Daphnia; en unos pocos insectos; en algunos moluscos y principalmente en los vertebrados.

Incluso en células vegetales, las raíces de ciertas plantas de la familia de las leguminosas, contienen una forma algo diferente de la molécula llamada leghemoglobina.

En la tabla uno podemos ver que la hemoglobina es la más común pero de ninguna manera es el único transportador de oxígeno en los animales.¹⁶

1.3. ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA HEMOGLOBINA

1.3.1. Estructura.— La hemoglobina es una proteína oligomérica de un peso molecular aproximado de 68 000 daltons, es casi esférica con un diámetro de 55 Å. Una molécula de hemoglobina esta compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas: 2 cadenas de tipo alfa de 141 aminoácidos y 2 cadenas de tipo beta de 146 aminoácidos cada una; las cuatro cadenas estan dispuestas en un arreglo tetraédrico. Cada cadena contiene un grupo hemo y estan alejados uno de otro por una distancia de 25 Å. Cada cadena alfa esta en contacto con ambas cadenas beta y en contraste hay poca interacción entre las cadenas beta. Ambas cadenas tienen un 70% de alfa hélice, son similares en su estructura terciaria y es notable que esta estructura terciaria es similar a la de una cadena de mioglobina. Las cadenas alfa contienen 7 y las cadenas beta 8 segmentos helicoidales llamados AB, BC, CD y así sucesivamente. Un segmento no helicoidal llamado NA precede a la primera hélice y otro segmento llamado HC sigue a la última hélice (fig. 3). Así la nomenclatura usada para designar la posición de un aminoácido es la siguiente: por ejemplo Val NA 1 (1) beta en esta notación Val es el nombre del aminoácido, NA es el segmento helicoidal o no helicoidal en donde se encuentra el aminoácido, el primer número corresponde a la posición del residuo a lo largo del segmento y el número en paréntesis da la posición del aminoácido en la secuencia de la cadena y por último la denominación de cadena de que se esta hablando ya sea alfa o beta.¹⁷

<i>Proteína</i>	<i>Grupo prostético metálico</i>	<i>Distribución</i>
(1) Mioglobina	Hierro-hemo	Células musculares ampliamente distribuidas en los animales desde los moluscos al hombre
(2) Hemoglobina	Hierro-hemos	Fluidos circulatorios. Amplia distribución en los animales con excepción de los protocordados y la mayoría de los insectos
(3) Hemocianina	Cobre no ligado a la porfirina	Fluidos circulatorios. Moluscos y Crustáceos
(4) Clorocruorina	Hierro-hemo	Fluidos circulatorios. Algunos anélidos poliquetos
	Hierro-sin porfirinas (no hémico)	Fluidos circulatorios. Algunos anélidos geríferos
	(5) Hemeritrina	

Tabla 1. Ejemplos de diferentes tipos de proteínas respiratorias.³

En el humano las cadenas beta pueden estar sustituidas por cadenas que tienen otra secuencia de aminoácidos en diferentes momentos del desarrollo ontogenético. A estas cadenas se les llama gama, delta y epsilon, las cuales son muy similares a las cadenas beta en cuanto a su composición de aminoácidos. La cadena epsilon se fabrica durante un breve período al comienzo de la vida fetal. La cadena gama reemplaza a la beta durante la mayor parte del desarrollo embrionario pero desaparece después del nacimiento. Durante la vida adulta una pequeña fracción de la hemoglobina circulante contiene cadenas delta en lugar de beta.¹⁸ Este recambio de subunidades de la hemoglobina en los diferentes estados del desarrollo ocurre principalmente en las cadenas de tipo beta. Hay otros organismos que como el conejo no poseen hemoglobina fetal,¹⁹ lo que quiere decir que directamente se da el cambio de hemoglobina embrionaria a hemoglobina definitiva. Es importante considerar esta característica dado que es el conejo el organismo al que se refiere este trabajo.

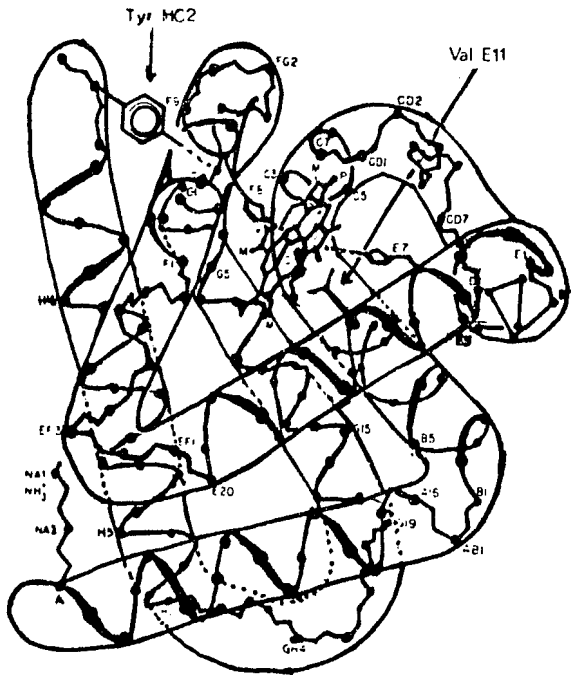


Fig. 3. Subunidad beta de la hemoglobina. La cadena empieza con un grupo amino (NA1) y termina con grupo carboxilo (HC3). Las regiones helicoidales son denotadas de la A a la H y las no helicoidales se les denomina AB, BC, CD etc. La primera porción no helicoidal se le llama NA y a la última HC. El hemo está entre las hélices F y H.

Se conoce la secuencia de aminoácidos de las hemoglobinas de más de 20 especies. Al comparar las secuencias se encuentra una considerable variabilidad en la mayoría de las posiciones, sin embargo, hay 9 en la mayoría de las secuencias que se conservan (tabla 2) estas posiciones que se conservan están involucradas en el funcionamiento de la hemoglobina.²⁰

1.3.2. Función.— La capacidad de la hemoglobina para transportar el oxígeno depende de una molécula llamada hemo que constituye su grupo funcional y que se encuentra en la cadena de la hemoglobina.¹⁶

POSICION	AMINOACIDO	FUNCION
F8	His	Histidina proximal. Enlaza al hemo
E7	His	Histidina distal. Cerca del hemo
CD1	Phe	Contacto con el hemo
F4	Leu	Contacto con el hemo
B6	Gly	Permite un estrecho contacto entre helices F y H
C2	Pro	Terminación de la helice
HC2	Tyr	Comunica a las helices F y H
C4	Thr	Incierto
H10	Lys	Incierto

Tabla 2. Lista de aminoácidos conservados en la hemoglobina.²⁰

1.3.2.1. Estructura y características del grupo hemo.— El grupo hemo esta compuesto por una parte orgánica y un átomo de hierro. La parte orgánica, llamada protoporfirina, esta compuesta por cuatro anillos pirrólicos los cuales estan enlazados por el grupo meteno para formar un anillo tetrapirrólico; 4 grupos metilo, 2 vinilo y 2 de ácido propiónico se enlazan al anillo porfirínico (fig. 4). Estos componentes pueden ser arreglados en 15 diferentes formas pero sólo uno de estos isómeros, llamado protoporfirina IX, esta presente en los sistemas biológicos.¹⁶

Cada átomo de hierro se encuentra enlazado al anillo de porfirina por 4 sitios, cada uno de ellos corresponde a un átomo de nitrógeno. El hierro también establece otros dos enlaces, uno con la cadena polipeptídica (invariablemente con el residuo de histidina F8 y el otro con la molécula de O₂. Si no se transporta O₂ el sexto enlace puede ser ocupado por agua.²¹

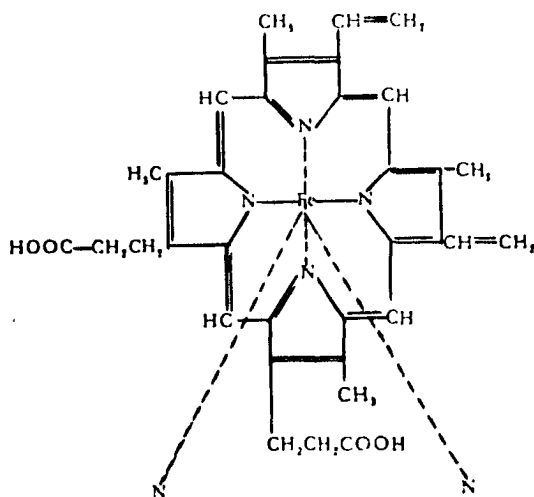


Fig. 4. Estructura química del grupo hemo asociado a cada cadena polipeptídica (subunidad) de la hemoglobina. La estructura ilustra el estado de dicha unidad en la desoxihemoglobina.

El hemo esta embebido en una abertura presente en la cadena polipeptídica cerca de la superficie de la molécula. La interacción molecular del hemo con la proteína es muy compleja, ya que involucra alrededor de 90 contactos de Van der Waals. La mayoría de los residuos de la cadena polipeptídica que estan en contacto con el hemo son invariables, por lo que se puede inferir que las interacciones con el hemo son vitales para su función.²¹

Como la mayoría de los compuestos de hierro, el grupo hemo se combina por sí mismo con el oxígeno tan fuertemente que el enlace una vez formado es difícil de romper, dado que se forma un compuesto intermediario con el que la molécula de oxígeno forma un puente entre los átomos de hierro de los demás hemos. En la hemoglobina los pliegues de la cadena polipeptídica evitan la formación de dicho puente, mediante el aislamiento del hemo en cadenas separadas. Además en la proteína, el hierro esta unido a un átomo de nitrógeno del aminoácido Histidina F8, el cual cede cargas negativas que capacitan al hierro para formar un enlace débil con el oxígeno, de suerte que la reacción con el oxígeno es reversible.²²

1.3.2.2. La asociación de la hemoglobina con el O₂.— La hemoglobina tiene propiedades fascinantes, resultado de su capacidad de combinación con el O₂. Básicamente la molécula funciona absorbiendo O₂ allí donde la presión de este gas es alta y lo desprende, donde la presión es baja. Esto de un modo sencillo explica como el O₂ es transportado desde el pulmon de los vertebrados donde la presión es alta, a las células distantes de los tejidos donde la presión es mucho más baja.

Al analizar la Fig. 3 se observa que tiene una forma de hipérbola rectangular: empinada al principio cuando las moléculas de mioglobina estan saturadas de O₂ y aplanada al final cuando las moléculas no saturadas son tan escasas que solamente las presiones elevadas de O₂ pueden saturarla. Esto significa que el O₂ se combina con la mioglobina a tensiones de oxígeno bastante bajas, pero que también se desprenderá de él, a tensiones ligeramente inferiores. En otras palabras la mioglobina se satura fácilmente pero también fácilmente es capaz de desprenderse de su O₂.^{16,22}

Cuando se asocian 4 monómeros de globina para formar un tetrámero como la hemoglobina, el resultado es totalmente diferente. La curva aciende al principio ligeramente, luego se vuelve más empinada y por último se aplanan aproximadamente a la curva de mioglobina (fig. 5).

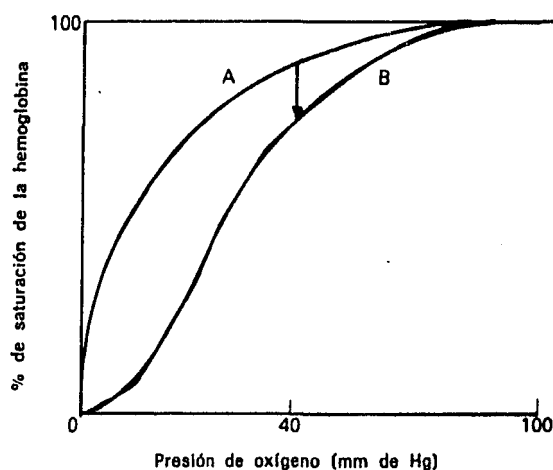


Fig. 5 Curvas de disociación del oxígeno y la hemoglobina de tipo hiperbólico (A) y sigmoide (B). Cuando el pigmento opera a presiones de oxígeno entre 100 y 40 mm de Hg, la flecha representa el aumento de eficiencia de la curva sigmoide.³

Esto significa que la hemoglobina puede enlazar o desprender oxígeno dentro de una amplia gama de tensiones de dicho gas. Este fenómeno sugiere que hay un cierto tipo de comunicación entre los hemos de cada molécula de hemoglobina. Sin embargo, cuando se resolvió finalmente la estructura de la hemoglobina, se encontró que los hemos se hallaban aislados unos de otros sin contacto entre sí; ¿Como podía uno de ellos percibir si los otros hemos se habían combinado con el O_2 ? A la interacción hemo-hemo y su relación con el O_2 se le llama efecto de cooperatividad de la hemoglobina, se tratará a continuación.

1.3.2.2.2. Mecanismo de cooperatividad de la hemoglobina.— En 1938 Félix Haurowitz²² descubrió, que la oxihemoglobina forma cristales diferentes de los de la desoxihemoglobina, como si fueran sustancias químicas diferentes, lo que indica que la hemoglobina cambia su estructura cada vez que capta o libera O_2 .

Monod y Jacob²⁰ por otra parte desarrollaron más adelante su modelo del operón para la regulación de la síntesis protéica. Los elementos genéticos de este modelo son: un gene regulador un gene operador, y una serie de genes estructurales. El gene regulador produce un represor que puede interactuar con el gene operador. Se reconoció que este represor tenía ciertas características en común con la hemoglobina. Ambas moléculas presentan varias subunidades con sus respectivos sitios activos y todos muestran efectos de cooperatividad. Monod y sus colegas sabían que la desoxihemoglobina y la oxihemoglobina tenían estructuras diferentes lo que les hizo sospechar que el represor tuviera dos estructuras también. Postularon que tales estructuras podían distinguirse por la disposición de las subunidades, por su número y fuerza de enlace entre ellas.

Si hay sólo dos estructuras alternativas, la que mostrara menos enlaces y más débiles entre las subunidades, podría desarrollar totalmente su actividad; esta estructura se denominaría R por relajada. La actividad quedaría amortiguada en la estructura con más y más enlaces fuertes entre las subunidades; esta forma se denominó T por tensa. Esta ingeniosa teoría, simplificó la interpretación de los efectos de cooperatividad. El incremento en la afinidad por el O₂ surge no como una interacción directa entre los hemos, sino como cambios desde la estructura T, con baja afinidad, a la estructura R con alta afinidad. Esta transformación debería tener lugar, cuando se enlaza la segunda o la tercera molécula de oxígeno y en la medida en que se rompan los enlaces que mantienen a la estructura T. En otras palabras el mecanismo de cooperatividad de la hemoglobina queda explicado por sus propiedades alostericas.²² ¿Cómo operan estos mecanismos alostéricos? para contestar esta pregunta, es necesario partir del hecho de que la oxihemoglobina y la desoxihemoglobina presentan un arreglo estructural diferente.

Por los estudios de cristalografía de rayos X, se ha visto que la desoxihemoglobina está constreñida por 8 enlaces salinos (interacciones electrostaticas entre grupos con cargas opuestas) entre las 4 subunidades (fig. 6). Es poco probable que la oxigenación ocurra, a menos que algunos de estos enlaces se rompan, hasta el momento en que el átomo de hierro pueda moverse en el plano del hemo. El número de enlaces salinos que se necesita romper para que una molécula de O₂ se enlace, depende de si previamente una molécula de O₂ se enlazó, es decir, que se necesita romper un mayor número de enlaces para permitir la entrada del primer oxígeno. Dada la alta energía que se requiere para romper los enlaces salinos, la unión del primer oxígeno es energéticamente menos favorable que los demás. El incremento paulatino en la afinidad por el oxígeno produce la curva sigmoidea observada experimentalmente.²⁰ (Fig. 5)

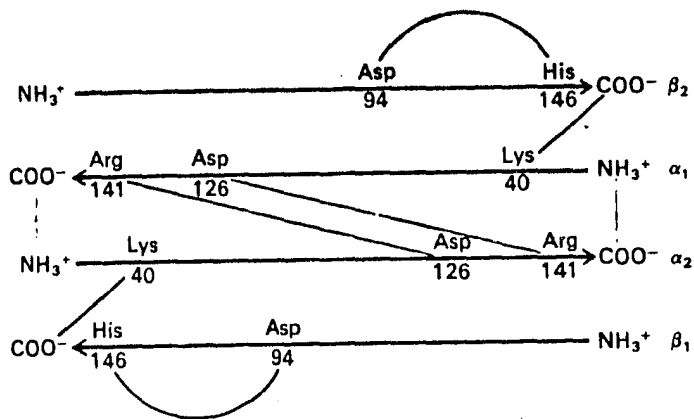


Fig. 6. Esquema que representa los enlaces salinos entre las cadenas de la hemoglobina.²⁰

Por los mismos estudios cristalográficos se ha observado que la oxihemoglobina es más compacta, la distancia entre los átomos de hierro entre las cadenas beta decrece con la oxigenación. Por otra parte el contacto entre las cadenas alfa 1 y beta 2 aparece bastante diferente del de la desoxihemoglobina, esto nos indica que la transición de la forma oxi a la forma desoxi hay un movimiento de las subunidades. Se ha encontrado que el movimiento se induce por cambios en la estructura interna de las subunidades que acompañan al enlace y disociación del oxígeno. Geométricamente este cambio consiste en un movimiento del dímero alfa 1-beta 1 con respecto al dímero alfa 2-beta 2; si un dímero se mantiene fijo el movimiento puede representarse por una rotación de unos 15° (Fig. 7).

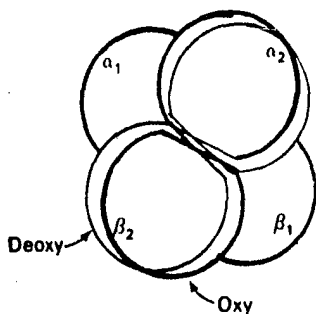


Fig. 7. Esquema que muestra el cambio en la estructura cuaternaria de la hemoglobina al pasar de la forma desoxi a la forma oxi. El par alfa 2-beta 2 gira con respecto al otro par con una rotación de 15° y un desplazamiento de .8 Å.

¿De que manera la combinación del hierro del hemo con el O_2 hace que las subunidades cambien inmediatamente de la estructura T a R?

Se examinará ahora el mecanismo y el posible orden de las etapas que se suceden en la reacción de la hemoglobina con el O_2 .

En la desoxihemoglobina las subunidades alfa presentan al grupo hemo más expuestas mientras que en las subunidades beta no, por lo que es muy probable que las cadenas alfa reaccionen primero con el O_2 . Este argumento no es muy riguroso y en realidad el mecanismo no se ve afectado si el orden de la reacción con el oxígeno se produce al azar.

Se ha visto que en la transición de desoxi a oxihemoglobina hay un movimiento de átomo de hierro hacia el plano de la porfirina; el átomo de hierro está fuertemente enlazado a la histidina F8, por lo que el hierro jala a la histidina con él; el movimiento de la histidina provoca que todo el segmento helicoidal (F) se mueva hacia el centro de la cadena, el movimiento, de la helice expulsa a la tirosina HC2 (140) alfa 1 de su lugar (que estaba entre las helices F y H, fig. 1) esta tirosina arrastra a la arginina HC3 (141) alfa 1 con ella rompe el enlace salino entre la arginina y la valina NA1 (1) alfa 2 y libera protones. El hierro de la cadena alfa 2 reacciona con el oxígeno y se suceden las mismas reacciones que en la cadena alfa 1: el movimiento del hierro hacia el plano del hemo, el movimiento de la helice F, la expulsión de la tirosina y la ruptura del enlace salino entre el carboxilo de la arginina de la cadena alfa 2 con la valina de la cadena alfa 1 y la liberación de protones. Con la ruptura de estos 4 enlaces salinos hay un cambio en el equilibrio alostérico, la magnitud de este cambio es suficiente para favorecer la estructura oxi (R) de la hemoglobina, aunque la posibilidad de este cambio depende de los factores externos tales como el pH, la concentración de CO_2 y de fosfatos orgánicos.

Los contactos alfa 1-beta 2 y alfa 2-beta 1 dan el giro a la forma oxi rompiendo con esto los enlaces salinos entre las lisinas C5 (40) alfa 1 y 2 con las Histidinas HC3 (142) beta 1 y 2 así mismo se rompen los enlaces que tiene el 2,3-DPG entre las subunidades beta. La ruptura de estos enlaces no provoca la liberación de protones (No. 4 Fig. 6).

Hasta este momento se tiene que el hemo y su medioambiente que lo rodea en las cadenas alfa están en conformación oxi, mientras que las cadenas beta están en conformación desoxi. Solamente faltan por romperse los enlaces salinos que hay entre las cadenas beta, la mayoría de los enlaces salinos están rotos por lo que la afinidad por el oxígeno se incrementa.

El átomo de hierro de la cadena beta 1 liga al oxígeno provoca con esto las mismas reacciones que en las cadenas alfa con la excepción de que la tirosina que se expulsa es la tirosina HC2 (145) beta 1 y en su movimiento arrastra a la histidina HC3 (146) beta 1, rompiendo el enlace entre esta histidina y el ácido aspártico FG1 (94) beta 2 y libera protones al medio. El hemo de la cadena beta 2 reacciona con el oxígeno mediante el mismo mecanismo que en la cadena beta 1.²³ Todo el mecanismo se muestra en el diagrama de la figura 8.

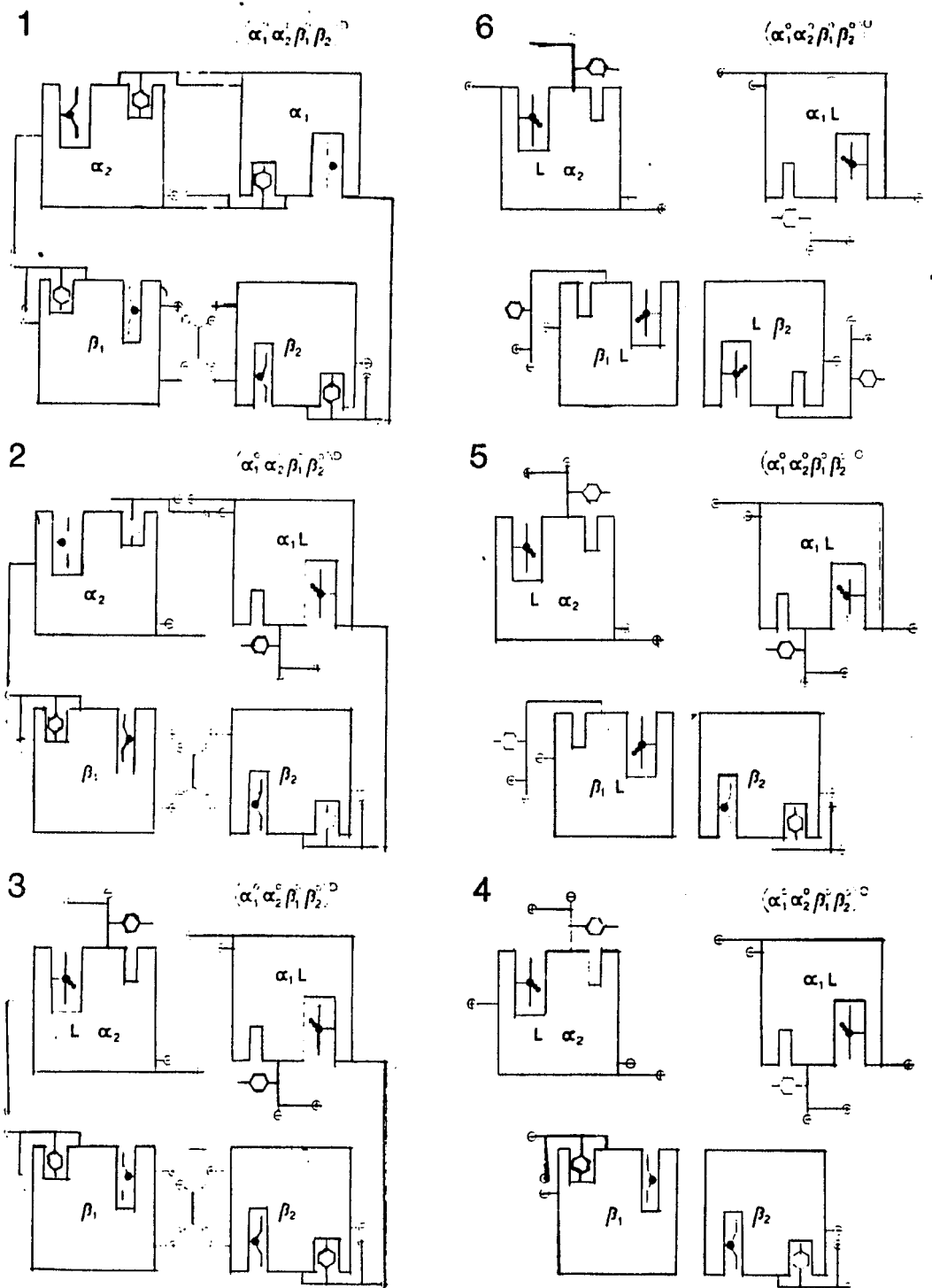


Fig. 8. Secuencia esquemática de las etapas que se suceden en la reacción de la hemoglobina con el oxígeno. 1. Desoxihemoglobina con todos sus enlaces salinos intactos y con una molécula de 2,3-DPG acoplada entre las cadenas beta. En las etapas 1-2 y 2-3 las cadenas alfa son oxigenadas, la **tirosina** es expulsada de su lugar y se rompen los enlaces salinos. Entre las cadenas alfa. En la etapa 3-4 la estructura cuaternaria da el giro a la forma oxi acompañado por la expulsión de 2,3-DPG y la ruptura de los enlaces entre las cadenas alfa-beta. La etapa 4-5 y 5-6 muestran la oxigenación de las cadenas beta, provocando la **ruptura** de sus respectivos enlaces salinos.

De esta manera la hemoglobina obtiene la propiedad de transportar oxígeno a los tejidos. Sin embargo, como ya se mencionó, hay factores externos como el pH, la concentración de CO_2 , la concentración de fosfatos orgánicos que afectan al proceso.

1.4. FACTORES QUE AFECTAN LA AFINIDAD DE LA HEMOGLOBINA POR EL OXIGENO.

1.4.1. La naturaleza del polipéptido globina.— La mayoría de las hemoglobinas de los vertebrados son tetrámeros que poseen al menos dos tipos diferentes de subunidades, siendo esta complejidad de las subunidades es la responsable de la mayoría de las propiedades alostéricas de la hemoglobina. Los tetrámeros compuestos por un solo tipo de subunidad poseen poco alosterismo y tienen una curva de disociación esencialmente hiperbólica. Es posible sintetizar varias hemoglobinas distintas al mismo tiempo o en momentos diferentes; así, la mayoría de los vertebrados disponen de diferentes tetrámeros de hemoglobina con diferentes propiedades, según su estado de desarrollo. Estos diferentes estados pueden coexistir en los glóbulos rojos del individuo adulto. Esto le proporciona la capacidad potencial de poder respirar eficientemente en una amplia gama de condiciones ambientales.¹⁶

1.4.2. Efecto del pH.— Un modular de la función de la hemoglobina es la concentración de iones hidrógeno de la célula. Al efecto que produce esta concentración, sobre la afinidad O_2 —hemoglobina se le conoce como efecto Bohr. En la mayoría de los vertebrados existe una relación directa: una reducción en el pH conduce a una reducción en la afinidad por el O_2 .¹⁶ (fig. 9)

El CO_2 liberado por los tejidos en la respiración es demasiado insoluble para ser transportado como tal, pero se puede volver más soluble al combinarlo con agua para formar el ion bicarbonato y un protón. La reacción química se escribe así:



la desoxihemoglobina actúa como un amortiguador, captando los protones y desplaza el equilibrio hacia la formación de bicarbonato soluble. En los pulmones ocurre el proceso inverso, allí al unirse el oxígeno a la hemoglobina los protones son expulsados y conducen al CO_2 fuera de la solución de suerte que este puede ser expirado. Un incremento en la concentración de CO_2 en un tejido de vertebrado lleva a una reducción en el pH y por lo tanto a una disminución en la afinidad de la hemoglobina por el O_2 .

1.4.3. Efecto de la temperatura.— La reacción oxígeno hemoglobina también se ve afectada por la temperatura. Se observa que al aumentar la temperatura, también aumenta la presión de oxígeno para saturar a la hemoglobina, lo que significa que a temperaturas elevadas la hemoglobina encontrara mayores dificultades para adquirir O_2

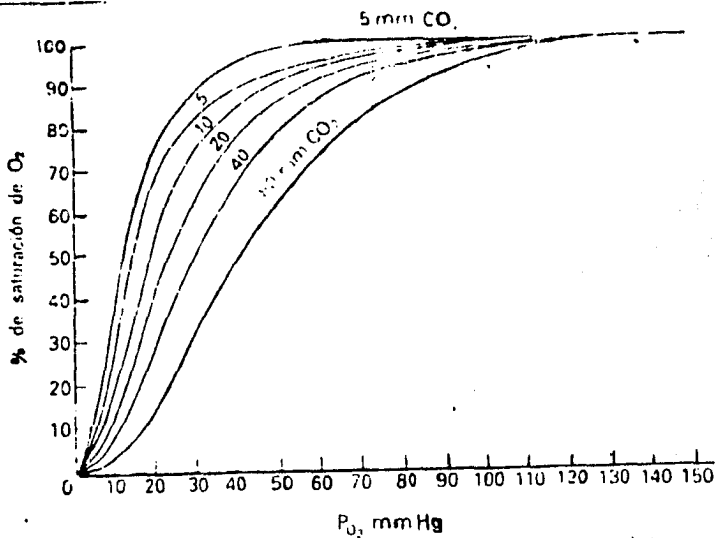


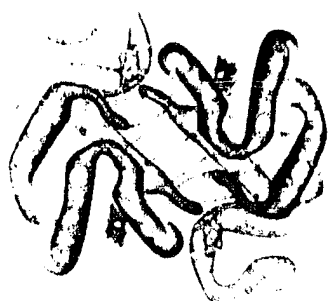
Fig. 9 Reproducción del gráfico original de Bohr, Hasselbalch y Krogh (1904) demostrando el efecto de la P_{CO_2} sobre la afinidad por el O_2 de la sangre humana (efecto Bohr). Ordenadas: Porcentaje de saturación de O_2 , abscisas P_{O_2} ; temperatura: $37^\circ C$.²⁰

1.4.4. Efecto de fosfatos orgánicos.— Los niveles de algunos metabolitos en el interior del eritrocito tales como ATP, GTP, UTP, 2,3-DPG pueden afectar la afinidad de la hemoglobina- O_2 . En los mamíferos el modulador de la afinidad O_2 -hemoglobina es el 2,3-DPG.

1.5. EFECTO DEL 2,3-DPG SOBRE LA HEMOGLOBINA

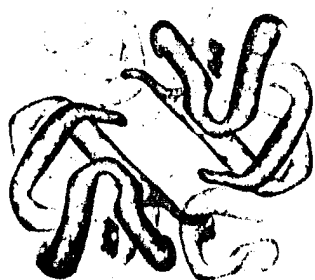
1.5.1. Interacción del 2,3-DPG con la hemoglobina.— Durante la desoxigenación de la hemoglobina se forman 8 enlaces salinos que estabilizan la forma tensa de ésta; cuando el 2,3-DPG se inserta, se establecen 6 enlaces adicionales y de esta manera se estabiliza aún más la forma tensa.

En la estructura T las dos cadenas beta se hallan muy separadas y el vacío que media entre ellas es recubierto por aminoácidos que llevan cargas positivas, estos aminoácidos son: Val NA1(1), Lys EF6(82) y His H8(146) de cada una de las cadenas beta. Este espacio está "hecho a medida" para que albergue a la molécula de 2,3-DPG y compense sus cargas negativas. En la transición de T a R la abertura se estrecha y el 2,3-DPG tiene que salir.²² (fig. 10)

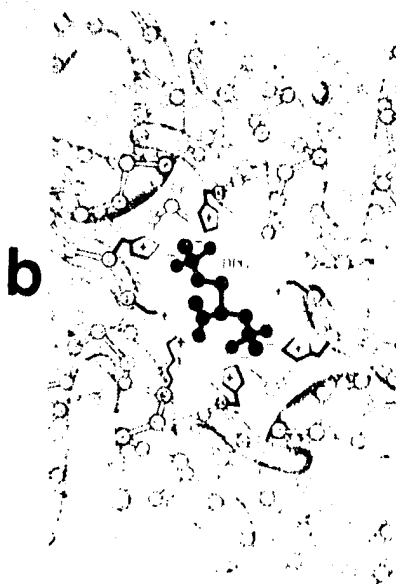


a

Oxi hemoglobino



Desoxihemoglobino

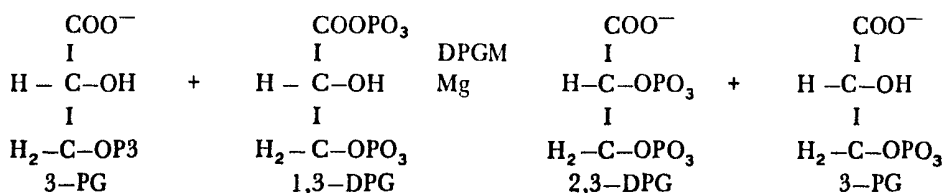


b

Fig. 10 a) Cambio conformacional que sufre la hemoglobina al pasar de la forma oxi a la forma desoxi. Se nota que hay un ensanchamiento de la cavidad central entre las cadenas beta. b) Amplificación de la cavidad central entre las cadenas beta en la desoxihemoglobina. Se observa el sitio de unión para el 2,3-DPG y los aminoácidos que intervienen en dicha unión.²⁴

Para que la oxigenación ocurra se tienen que romper 14 enlaces salinos, en la presencia de 2,3-DPG, proceso que consume 40 Kcal/mol en ausencia de esta molécula el proceso requiere únicamente 27 Kcal/mol. Esto explica la reducción de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en la presencia de 2,3-DPG.²⁵ El 2,3-DPG reduce la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno sin modificar ostensiblemente el mecanismo de la oxigenación.^{25,20}

1.5.2. Mecanismo de formación del 2,3-DPG a partir de 1,3-DPG.— La difosfoglicerato mutasa (DPGM) convierte el 1,3-DPG en 2,3-DPG. La mutasa capta simultáneamente 1,3-DPG y 3-PG, en este complejo terciario se transfiere un grupo fosfórico desde el carbono 1 del 1,3-DPG al carbono 2 del 3-PG.



1.5.3.2. Mecanismo de degradación de 2,3-DPG por la 2,3-DPGasa. En esta reacción es donde el 2,3-DPG es hidrolizado a 3-PG y regresa así a la vida glucolítica. A pesar de que por esta serie de reacciones no se sintetiza ATP, este ciclo está justificado ya que solamente en dicho ciclo es donde se produce 2,3-DPG, el cual es un participante obligatorio en la vida glucolítica, específicamente en el paso de 3-PG a 2-PG.



A esta desviación —para la síntesis y degradación de 2,3-DPG— se le conoce como ciclo del fosfoglicerato,²⁶ en el que se desvía aproximadamente el 20% de la glucólisis.²⁷

1.6. FACTORES QUE AFECTAN LA CONCENTRACION DE 2,3-DPG.

1.6.1. La concentración de 2,3-DPG misma.— La DPGM es una enzima muy sensible a la inhibición por producto, esto quiere decir que cuando hay un exceso de producto, en este caso el 2,3-DPG, la enzima se inhibe y cuando se reducen los niveles de aquél está se activa.⁴

Como ya se indicó el 2,3-DPG funciona como un acarreador de un grupo fosforilo en el paso de 3-PG a 2-PG; para cumplir dicha función solamente se requieren cantidades traza de 2,3-DPG parece que, es por ello que las células no eritrocíticas poseen poco 2,3-DPG.^{26,28,29}

En los eritrocitos, dado que el 2,3-DPG interactúa con la desoxihemoglobina; para inhibir a la DPGM se requiere que haya un exceso de 2,3-DPG libre y para que esto suceda es necesario que haya una cantidad igual a la de la hemoglobina. Esto explicaría los altos niveles de 2,3-DPG presentes en los eritrocitos de la mayoría de los mamíferos.^{26,28,29}

1.6.2. El pH.— En una situación de alcalosis, la velocidad de la glucólisis se ve incrementada y la actividad de la 2,3-DPGasa se encuentra inhibida, el resultado final es una acumulación de 2,3-DPG. En la acidosis sucede lo contrario lo que resulta en una disminución de 2,3-DPG.³⁰

1.6.3. La concentración de Fósforo.— En condiciones de Hipofosfatemia la concentración de 2,3-DPG es baja y en condiciones de hiperfosfatemia es alta.^{16,31}

1.6.4. Actividad hormonal.— En condiciones de hipertiroidismo la velocidad de la glucólisis se incrementa y se acumula 2,3-DPG; en el hipotiroidismo sucede lo contrario.³²

1.6.5. Deficiencias enzimáticas.— Las deficiencias en la actividad de la hexoquinasa, por ejemplo, reduce la glucólisis y con esto la concentración de 2,3-DPG. Si la deficiencia se localiza en la piruvatocinasa, se acumularan los productos formados antes de este paso y por lo tanto el 2,3-DPG.^{16,32}

Todo esto nos indica que la concentración de 2,3--DPG esta regulada por varios factores por lo que es difícil encontrarlo en exceso.

1.7. OBJETIVOS.

Los objetivos de este trabajo por una parte es aislar a las dos poblaciones de eritrocitos que existen en el desarrollo postnatal del conejo, con la finalidad de demostrar la hipótesis de que es el recambio de poblaciones el mecanismo regulador de la concentración de 2,3--DPG durante el desarrollo postnatal del conejo.

Jelkman y Bauer⁹ han mostrado que durante el desarrollo intrauterino de los conejos, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno se incrementa y que este incremento se acompaña por una caída en la concentración de 2,3--DPG hasta un valor de 0.2 Mol./ml.

Estos mismos autores pero en otro estudio⁶ encuentran que durante el desarrollo postnatal la actividad de la piruvatocinasa decrece después del nacimiento. Este cambio fue paralelo a un incremento en la concentración de 2,3--DPG.

Estos resultados aclaran el problema del cambio en la concentración de 2,3--DPG, pero, ¿Cómo se da el cambio en la actividad enzimática?

Narita, et al.¹² encuentra que la concentración de 2,3--DPG aumenta durante la diferenciación de las células eritroides en una relación lineal con la concentración de hemoglobina. La acumulación de 2,3--DPG se atribuyó a un incremento en la actividad de la fosfofructuocinasa y a una disminución en la actividad de la piruvatocinasa conforme maduran las células, desde estados policromatofilos a reticulocitos.

En el conejo como ya se indicó no hay un recambio de hemoglobinas, sin embargo, si presenta un recambio en las células rojas circulantes. Resultados en el laboratorio^{4,11} muestran que en el día 1 de edad el conejo presenta un Volumen Corpuscular Medio (MCV) de $101 \mu^3$ provenientes seguramente de hígado. Conforme avanza el desarrollo van apareciendo células de MCV menor ($70 \mu^3$) provenientes de médula.

Al considerar estos datos se propone que la combinación en la sangre periférica de estas dos poblaciones celulares de distinto origen una de hígado y otra de médula determinan la concentración de 2,3--DPG para cada día de desarrollo; el aumento en el número de células que provienen de médula provocaran paulatinamente un aumento en la concentración de 2,3--DPG que se observa experimentalmente.

No se quiere decir que el recambio de poblaciones "per se" provoca el aumento de 2,3-DPG. Este aumento se produce en última instancia por la disminución en la actividad de la piruvatocinasa de las células eritroides en su madurez., pero tampoco se piensa, como lo considera Jelkman,⁹ que la actividad de la piruvatocinasa medida en las células de conejo en estado fetal disminuya conforme avanza el desarrollo del conejo, pues, la actividad enzimática medida en conejos recién nacidos y en conejos adultos corresponde a isoenzimas de la piruvatocinasa de origen diferente: La piruvatocinasa presente en los eritrocitos fetales, con una actividad elevada, proviene del hígado, mientras que la piruvatocinasa de los eritrocitos de un conejo adulto tiene una baja actividad y proviene de la médula ósea.

Es por estas razones por lo que se propone que el recambio de poblaciones puede regular la concentración de 2,3-DPG durante el desarrollo postnatal del conejo.

Por otra parte este trabajo trata de demostrar que la interacción entre el 2,3-DPG y la hemoglobina es de tal manera que la hemoglobina deberá presentar 2 sitios de unión para el 2,3-DPG en lugar de uno como se supone en la actualidad.

Resultados en el laboratorio¹⁵ reportan que la relación molar de 2 a 1 entre el 2,3-DPG y la hemoglobina no cambian durante la anemia y que tanto la hemoglobina como el 2,3-DPG siguen cinéticas paralelas como si la concentración de 2,3-DPG estuviera determinada por la hemoglobina. Es por eso que consideramos que la concentración de 2,3-DPG está en función del tipo de hemoglobina.

MATERIALES Y METODOS

La primera parte de esta sección se refiere al procedimiento que se siguió para la separación de los eritrocitos en el período postnatal del conejo; la determinación del 2,3-DPG y la hemoglobina en dicho período.

La segunda parte se refiere al procedimiento empleado para cuantificar la cantidad de 2,3-DPG unido a la hemoglobina de conejo adulto.

SEPARACION DE LOS ERITROCITOS EN EL PERIODO POSTNATAL DEL CONEJO

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda blancos nacidos y criados en el bioterio de la Facultad de Ciencias UNAM. Las edades de los conejos que se utilizaron fueron: Recién nacido, 1, 4, 15, 20 y 30 días de edad.

2.1. COLECTA DE LA SANGRE.— Un conejo de cada edad fue sangrado por punción cardíaca con jeringas desechables previamente enjuagadas con ácido etilendinitrotetracético sal disódica (Tritriplex III Merck) al 20% p/v (20 gr de EDTA/100 ml de sol. Salina .9% pH = 7.4) como anticoagulante.³³ La sangre se pasó a un tubo de ensaye que inmediatamente se sumergió en hielo para evitar cambios en la concentración de 2,3-DPG.³⁴ El volumen de sangre obtenido fue de 2 ml para los conejos: recién nacido, 1, 4 días y para los demás fue de 4 ml.

2.2. PROCESAMIENTO DE LA SANGRE.— De la sangre extraída se tomaron 2 alícuotas: una para medir la concentración de 2,3-DPG y la otra para determinar parámetros hematológicos y para hacer frotis de sangre total. Los parámetros hematológicos fueron: número de células rojas (RBC), hematocrito (4ct.), el Volumen Corpuscular Medio (MCV) y la concentración de hemoglobina en sangre; fueron medidos en un contador de células Coulter Counter modelo ZF con equipo accesorio (MHR Computer, Hemoglobinómetro y Dilutor).

2.2.1. Parámetros hematológicos MCV y Hct.— El contador de células modelo ZF es un contador electrónico de partículas cuyo principio es el siguiente: las partículas o células suspendidas en un electrolito pueden ser cuantificadas y medidas al pasar a través de un orificio por el cual fluye una corriente. Estas partículas al pasar cambian la resistencia de la corriente que fluye a través de la apertura; a este cambio en la resistencia le corresponde un cambio en el voltaje; estos cambios de voltaje producen pulsos que son registrados por la computadora; la magnitud del cambio en el voltaje es directamente proporcional al volumen de la partícula o célula, esto hace que la computadora determine el volumen celular promedio (MCV). Como siempre a través de apertura para el mismo volumen de muestra (0.5 ml) cada cambio en el voltaje o pulso se cuenta y con ello el número de partículas o células en suspensión en este caso eritrocitos (RBC); al momento en que termina de pasar el volumen, la cuenta termina, lo que hace que a la computadora determine el hematocrito, esto lo hace la multiplicar la cuenta de partículas por el volumen celular promedio.³⁵

2.2.2. Número de células rojas.— Para el conteo de células rojas se utilizó el dilutor, para preparar la dilución en la proporción de 1: 50,000 que se recomienda para las células rojas. Los resultados son expresados en millones de células por mm^3 de sangre.

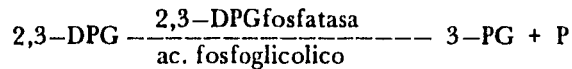
2.2.3. Determinación de hemoglobina.— Para la determinación de hemoglobina se utilizó el hemoglobinómetro Coulter, que no es más que un espectrofotómetro calibrado a 540 nm. La concentración de hemoglobina se expresa en gr/100 ml.

2.3. DETERMINACION DE 2,3-DPG.

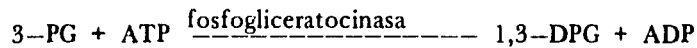
La concentración de 2,3-DPG fue determinada por el método comercializado por SIGMA CHEMICAL Co.³⁶ se uso el estuche de reactivos correspondientes. Este método fue modificado para muestras de baja concentración de 2,3-DPG cuando se requirió. El método modificado emplea 0.1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 60% en .9 ml de la muestra por lo demás se mantuvo igual.

El principio en el que se basa la determinación, es la estequiometría de 2,3-DPG a gliceraldehído 3 fosfato. En este método se utiliza el ácido fosfoglicólico para estimular la actividad de la 2,3-DPG fosfatasa que en estas condiciones efectúa la difosfoglicerato mutasa.^{3,28,29,37} La serie de reacciones acopladas, que permite el paso del 2,3-DPG a 3-PGA y que por ser reacciones de mol a mol permiten conocer la concentración de 2,3-DPG, son las siguientes:

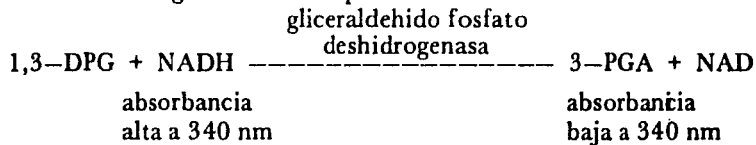
- 1) La degradación de 2,3-DPG por la 2,3-DPG fosfatasa convirtiéndolo a 3 fosfoglicerato. Aquí se requiere la presencia de ácido fosfoglicólico como cofactor enzimático.



- 2) La conversión del 3-PG de la primera reacción a 1,3-DPG por medio de la fosfogliceratocinasa en presencia de ATP



- 3) La conversión del 1,3-DPG a gliceraldehido 3 fosfato por medio de la enzima Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa. En este paso el NADH es oxidado.



La medición en el decremento en la absorbancia a 340 nm que causa la oxidación del NADH refleja la cantidad de 2,3-DPG presente.

2.4. SEPARACION DE LAS CELULAS

La sangre se depositó en un tubo 'Kolmer' (fig. 11) y se ccentrifugó a 1200 rpm durante 10 min, en una centrifuga clínica Adams-Dynac, con cabezal de columpio CT-1350 a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular fue dividido en cinco fracciones iguales. La primera fracción correspondio a la parte superior del paquetw celular y la última fracción a la parte inferior del paquete celular (fig. 12). Cada fracción se depositó en un nuevo tubo "Kolmer" por medio de una pipeta Pasteur.

Cuando se centrifuga, las células menos densas se encuentran en la parte superior y las más densas en la parte inferior. De esta manera, en el primer fraccionamiento, la fracción 1 tendrá —si hubiéra diferencias en la densidad de las células— una población celular menos densa que la fracción celular 5.

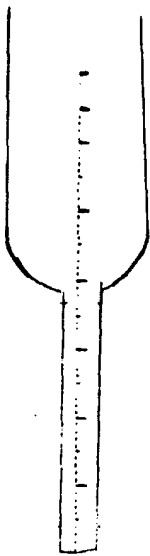


Fig. 11 Forma de un tubo Kolmer

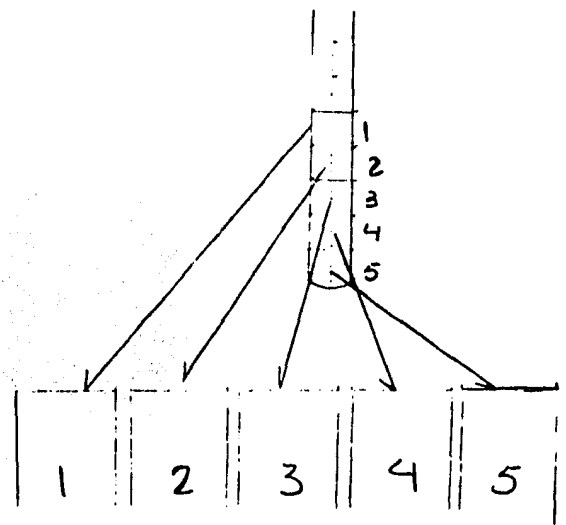


Fig. 12 División del paquete celular en 5 fracciones y distribución de estas en un nuevo tubo Kolmer.

Así en la primera centrifugación se obtuvo ya una separación aunque ligera. Para afinar la separación al tomar en cuenta que algunas células de menor densidad no alcanzaron a migrar a la parte superior en la centrifugación y las más densas no están totalmente en la parte inferior, se procedió de la siguiente manera: al tener las primeras cinco fracciones, el paquete celular se resuspendió en cada fracción con solución salina al 9% y se centrifugó a 1200 RPM durante 10 min. se desechó el sobrenadante de cada fracción. De la fracción 1 se tomó la mitad superior del volumen de células empacadas y este volumen se pasó a un nuevo tubo Kolmer. De la fracción 2 se tomó la mitad superior de su volumen y se pasó este a la fracción 1, de la fracción 3 se tomó la primera mitad de su volumen y se pasó a la fracción 2 y así sucesivamente (fig. 13). Al final se obtuvieron 6 fracciones, la primera y la última con la mitad del volumen de las demás fracciones (fig. 14). Estas nuevas fracciones excepto la primera y la última se resuspendieron con solución salina al 9% y se centrifugó a 1,200 rpm durante 10 min. Se desechó la solución salina de cada fracción y ahora de la fracción 1 se tomó la mitad superior de su volumen y se pasó al nuevo tubo Kolmer que ya tenía una mitad del volumen del tubo 1; de la fracción 2 se pasó la mitad superior de su volumen y se pasó a la fracción 1 y así sucesivamente. Al final se obtuvieron 5 fracciones con el mismo volumen todas y un tubo vacío (fig. 15).

A este procedimiento de tener 5 fracciones pasar a 6 y regresar a 5 se le llamó un paso. Con la sangre de conejo de cada día se hicieron dos pasos.

Al final del segundo paso a cada fracción se le midió: el número de células rojas, de células blancas, la concentración de hemoglobina por unidad de volumen, la concentración de 2,3-DPG y se hicieron frotis de cada fracción.

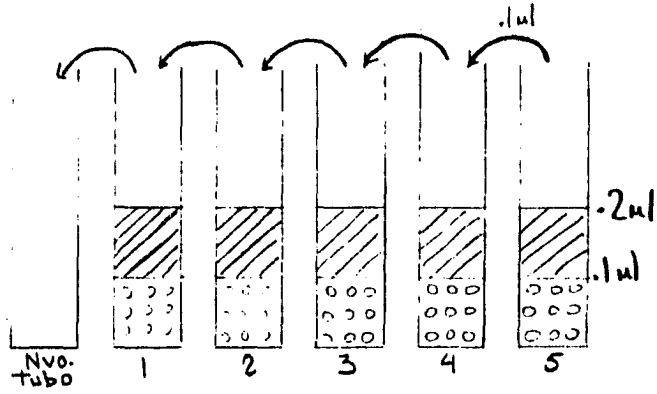


Fig. 13. 5 fracciones con 0.2 ml de células empacadas cada una. Se pasa 0.1 ml. de un tubo a otro (la mitad superior del volumen celular). Al final quedan 6 tubos: el 1° y el 6° con la mitad del volumen de los demás.

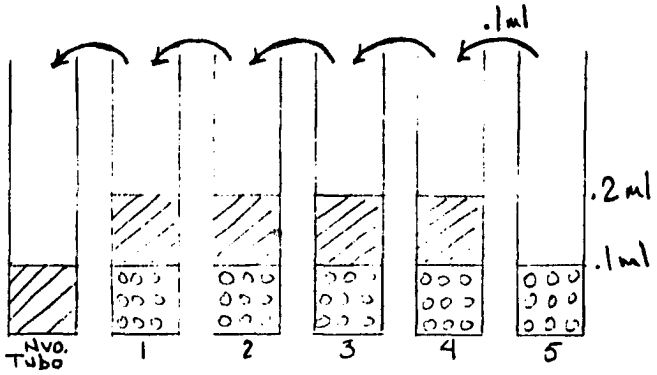


Fig. 14. 6 fracciones obtenidas del paso anterior. Ahora se pasa 0.1 ml de un tubo a otro (la mitad superior del volumen celular).

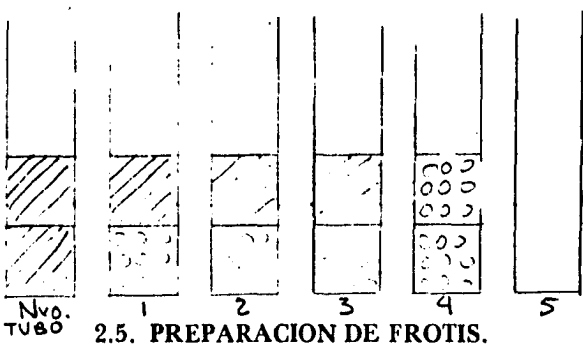


Fig. 15. 5 fracciones que se obtienen del paso anterior todas las fracciones tienen .2 ml de células empacadas. Nos queda además un tubo vacío.

2.5. PREPARACION DE FROTIS.

Se disolvió 1 gr de azul de cresilo brillante en 100 ml de una solución que contiene NaCl 0.9% y 4 gr de Citrato de Sodio. Se colocó en un papel encerado una gota de muestra de sangre y una gota del reactivo anterior, se mezcla con un capilar y se deja que la muestra suba dentro de él. Después de incubar 20 min en cámara húmeda se dejar bajar el contenido del capilar y una vez mezclado se pone una gota encima de un cubreobjetos sobre el cual se desliza otro y se deja secar. Finalmente se acomodan sobre un portaobjetos fijándolos con aceite de inmersión.

DETERMINACION DE 2,3-DPG UNIDO A HEMOGLOBINA

Un conejo adulto Nueva Zelanda blanco fue sangrado por punción cardíaca; el volumen obtenido fue de 10 ml.

2.6. PROCESAMIENTO DE LA SANGRE.

Se tomaron alícuotas para determinar hemoglobina y 2,3-DPG como fue descrito en la primera parte. El resto de la sangre se centrifugó en una centrifuga Beckman modelo TJ-6 refrigerada con cabezal de columpio a 2600 rpm por 15 min a 4°C. Se desechó el plasma y el paquete celular se hemolizó con un amortiguador de malonatos 0.05 M. A pH 6. El hemolizado se centrifugó a 2,600 rpm por 30 min a 4°C, se tomó el sobrenadante. De este se tomaron alícuotas para medir el 2,3-DPG y la hemoglobina. Se pasaron 10 ml del sobrenadante por una columna de exclusión molecular empaquetada con Sephadex G-50 equilibrada con el mismo amortiguador.

2.7. MONTAJE DE LA COLUMNA.

Se utilizó una columna de 1 por 150 cm. empacada con Sephadex G-50 (Pharmacia) previamente hidratada con el amortiguador de malonatos .05 M pH 6. La columna se equilibró con el amortiguador a un flujo de 2 ml por min por medio de una bomba peristáltica LKB. Cada fracción fue de 2 ml. El procedimiento se hizo a 4°C.

De las fracciones obtenidas se midió el 2,3-DPG y la hemoglobina se determinó por su absorbancia a 414 nm usando un espectrofotómetro Zeiss PMO II. El mismo espectrofotómetro fue utilizado en los métodos que requirieron su uso.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como puede observarse en la figura 16, la concentración de 2,3-DPG presente en la sangre de conejo, se eleva desde valores de 1.22 Mol/ml de sangre al momento del nacimiento, hasta alcanzar una concentración de 4 Mol/ml a los 30 días de edad. Este último valor representa el propio para un conejo adulto ya que no se modifica a partir de esa fecha.

DIA	2,3-DPG (Mol/ml)	Hgb (Mol/ml)	Rel. Mol 2,3-DPG/Hgb	# RBC X 10 ⁶ ml sangre	MCV
0	.154	1.22	.126	2.4	118
1	.2	1.48	.135	3.01	103
4	.739	1.84	.4	3.85	100
15	2.2	2.1	1.04	5.54	85
20	2.8	2	1.4	5.59	79
30	3.7	1.8	2.05	5.8	70

Tabla 4. Parámetros hematológicos obtenidos para el conejo, en diferentes días de su desarrollo postnatal.

Estos datos se expresan gráficamente en las figuras 16-21

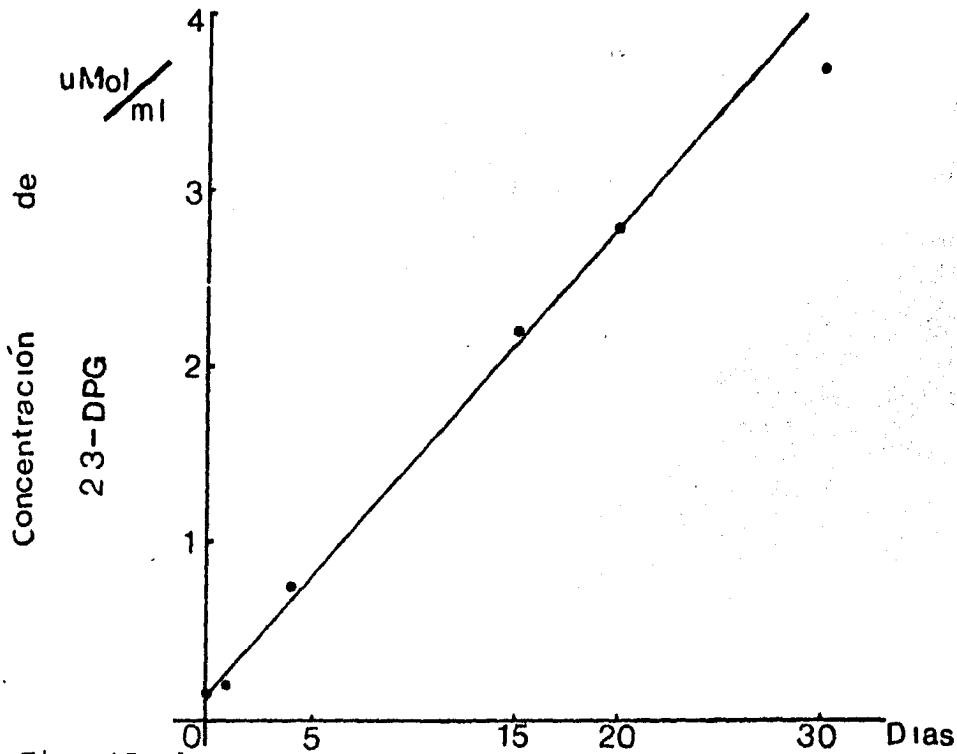


Fig. 16 Concentración de 2,3-DPG a diferentes días del desarrollo postnatal del conejo. (coef. de corr. = .99)

El incremento en la concentración de 2,3-DPG del día 0 al 20 es linear con un coeficiente de correlación 0.99. A pesar de que los datos obtenidos representan una sola muestra por cada día señalado, debe mencionarse que estos valores se corresponden totalmente con los reportados en la literatura,^{5,6,7,8} y siguen la misma cinética a la ya observada por Cárdenas⁴. La tabla 3 nos muestra la gran concordancia existente entre los valores encontrados por los diversos autores, con la excepción de aquéllos reportados para el día 4 y 30 por Bard y Shapiro.⁵

El incremento en la concentración del 2,3-DPG sanguíneo durante el desarrollo postnatal del conejo, implica que en el animal adulto la hemoglobina muestra una menor afinidad por el oxígeno que en la etapa fetal. Esto es perfectamente comprensible desde el punto de vista fisiológico ya que existe un flujo positivo de oxígeno de la sangre de la madre hacia el producto.

Paralelamente al aumento en la concentración de 2,3-DPG se observa que hay una disminución del volúmen corpuscular medio (MCV) de las células rojas (fig. 17).

Para el día que se llamó cero, el momento del nacimiento, los conejos tienen un MCV de $118 \mu^3$ y conforme avanza el desarrollo aparecen células de menor volúmen que provocan el desplazamiento del MCV hacia un valor final para el día 30 de aproximadamente $70 \mu^3$.

El decremento en el MCV de los eritrocitos circulantes durante los primeros 30 días de desarrollo postnatal del conejo, corresponde con mínimas diferencias con aquéllos encontrados por Cárdenas⁴ y con los reportados por Vázquez.¹¹ Debe indicarse, sin embargo, que los datos reportados en el presente trabajo fueron obtenidos directamente del Contador de Células mientras que los de los trabajos previos se determinaron a partir del hematocrito obtenido y del número de células presentes en el volúmen sanguíneo correspondiente.

Este cambio en el MCV es debido al remplazo de una población homogénea de $118 \mu^3$ de volúmen, presente en el momento del nacimiento por otra que paulatinamente lo sustituye, la cual presenta un volúmen celular de $70 \mu^3$. Esta población de células de un volúmen menor se vuelve homogénea en la sangre hacia el día 20 y 30 después del nacimiento.

Los cambios descritos anteriormente son ilustrados a través de una secuencia fotográfica de los frotis sanguíneos de los diferentes días muestreados (fig. 18).

La población celular inicial probablemente tiene su origen en una eritropoyésis con sitio en el hígado, según se desprende de los datos de Jelkman y colaboradores.⁹ Debe señalarse aquí que las células de $8,8 \mu$ de diámetro mencionadas en el trabajo anterior corresponden a las células de $118 \mu^3$ de volúmen de acuerdo con el estudio de Vázquez.¹¹

Otro dato que refuerza el origen hepático de las células rojas presentes al momento del nacimiento; es la carencia de eritropoyesis en la médula osea de los huesos largos del conejo al día 1 de vida (Mayani³⁸). Para este día se reportaron en médula un MCV de $144 \mu^3$, el porcentaje de normoblastos es del 7% y el de las células rojas del 80%.

La población sanguínea de volumen menor en cambio debe considerarse de origen medular, ya que se observa una gran proliferación de las de la médula osea en los días subsiguientes al nacimiento. Este incremento en la eritropoyesis durante los primeros días se registra también en la sangre circulante a través de la aparición de reticulocitos.¹¹

Este recambio de poblaciones se relaciona en el presente trabajo con el mecanismo que regula la concentración del 2,3-DPG en el desarrollo postnatal del conejo en un modelo que se describe en la introducción que básicamente establece que la combinación en la sangre periférica de estas 2 poblaciones celulares determina la concentración de 2,3-DPG para cada día de desarrollo y en la medida que aumenta el número de células provenientes de médula aumentará también la concentración de 2,3-DPG.

Para probar el modelo se procedió a la separación de las poblaciones anteriormente descritas. La metodología empleada ha sido desarrollada por el laboratorio y ha sido empleada con éxito en la separación y purificación de células de la médula osea y en la purificación de reticulocitos en conejos anémicos.

Los resultados de la separación celular se observan en la tabla 5.

Día	2,3-DPG (Mol/grHgb)	Bard y Shapiro (1979) 2,3-DPG (Mol/grHgb)	HOLTER y Halvorsen, S. (1982, 1984) 2,3-DPG (Mol/grHgb)
0	1.91	2.1 - .9	-
1	2.04	2.0 + .9	2 + 2
4	6.08	2.5 + 1.5	7 + 2
15	15.87	16	16
20	21.2	23 + .2	22
30	31.14	25 + .5	31.9 + .1

Tabla 3. Comparación de datos obtenidos en este trabajo con respecto a otros autores.

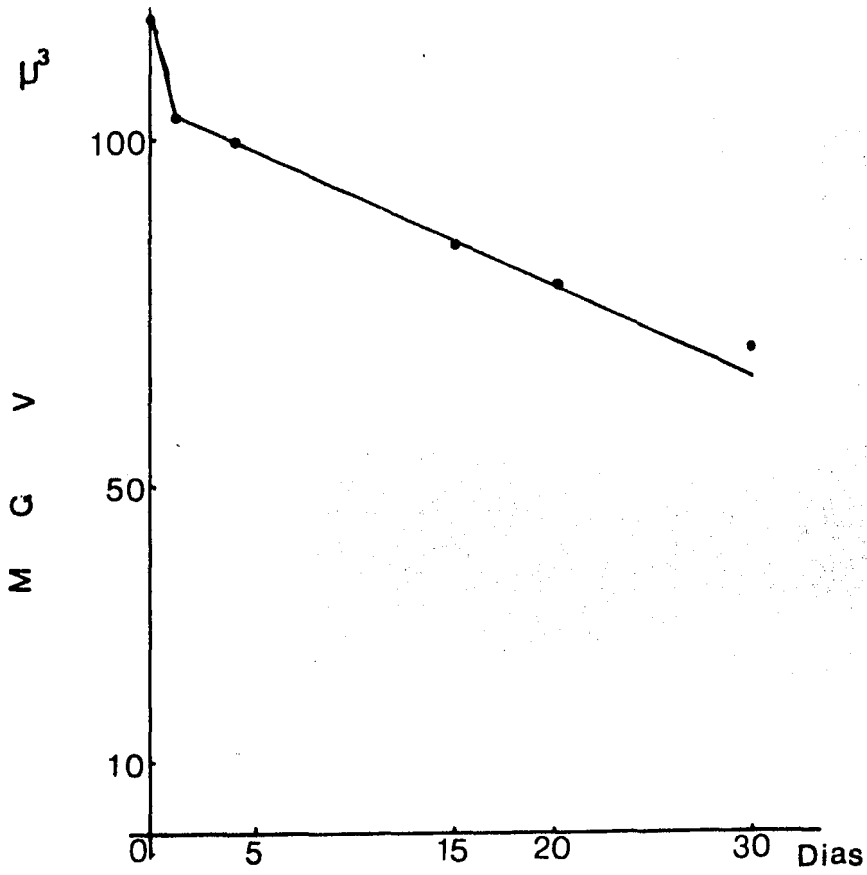
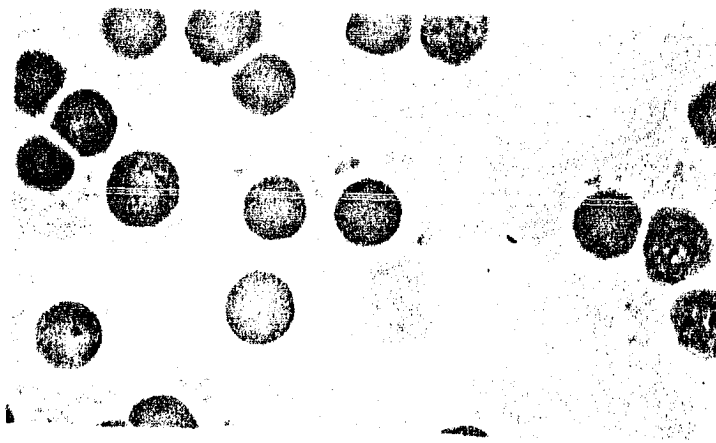
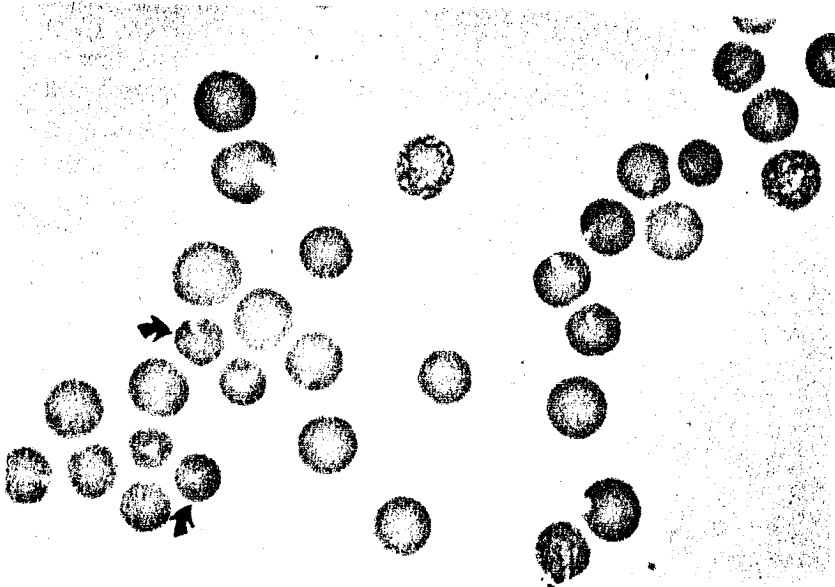


Fig. 17 Cambio en el Volúmen Corpúscular Medio (MCV) en el desarrollo postnatal del conejo.

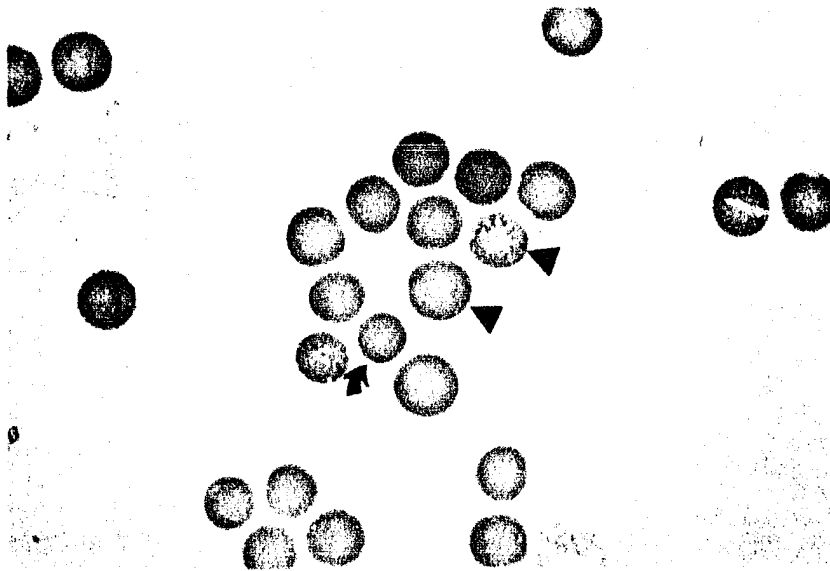


a

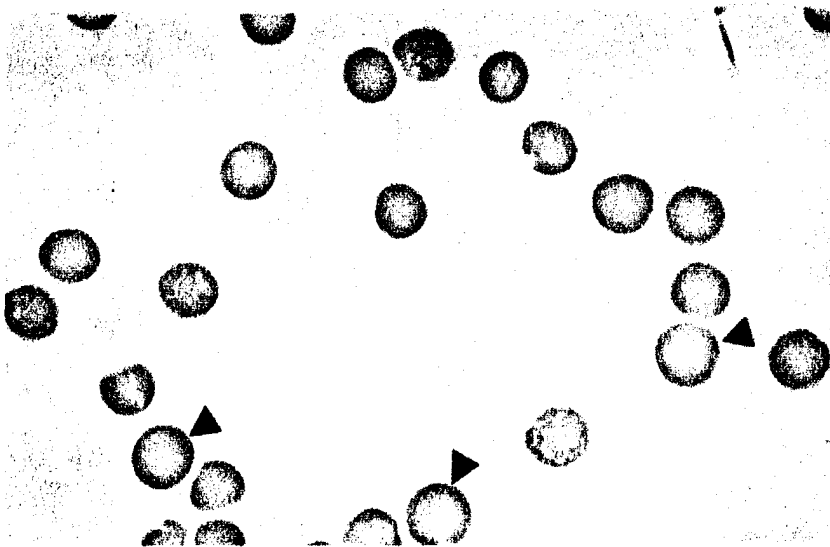


b

Fig. 18 Secuencia fotográfica del recambio de poblaciones que sufre el conejo en su desarrollo postnatal. Todas las fotos están tomadas al mismo aumento ($\times 16000$). a—DIA 0. Se observa una población celular homogénea ($MCV 118 \mu^3$) de origen hepático b—DIA 4. Para éste día se observa ya la aparición de células de menor tamaño provenientes de médula osea (fechas) c—DIA 15. Se observa la mezcla de poblaciones. Nótese que un reticulocito de médula osea tienen las mismas dimensiones que un eritrocito proveniente de hígado (triángulos). La flecha muestra un eritrocito de médula, d—DIA 20. Para éste día ya se tiene una mayoría de células de menor tamaño ($MCV 70 \mu^3$). Se observan algunas células de origen hepático (triángulos).



C



d

DIA	FRACCION	RBC X LO ⁶ / mm ³ sangre	MCV	WBC X 10 ³ / mm ³ sangre	% Retics.
0	1	2.1	116	8.24	21.12
	2	2.1	119	2.61	24.4
	3	1.89	116	.93	ND
	4	1.64	116	.55	ND
	5	1.63	119	.55	22.6
4	1	2.9	103	7.5	18.09
	2	3.2	106	2.4	ND
	3	2.3	99	1.28	13.04
	4	2.9	99	2.0	ND
	5	2.6	98	2.0	7.26
15	1	4.99	82	3.08	ND
	2	5.0	84	2.38	ND
	3	5.2	84	1.9	ND
	4	5.3	85	1.5	ND
	5	4.73	86	1.3	ND
	6	4.90	87	1.2	ND
20	1	4.2	75	2.8	10.8
	2	4.98	76	1.3	
	3	4.45	78.5	1.05	6.7
	4	4.19	81	1.1	
	5	4.8	85	1.1	5.5

Tabla 5. Datos obtenidos del fraccionamiento celular de la sangre obtenida del conejo en distintos días de su desarrollo postnatal.

RBC - Células rojas (eritrocitos)

MCV - Volumen Corpuscular Medio

WBC - Células blancas (Leucocitos)

% Retics. - Porcentaje de reticulocitos

ND No se determinó

Como se puede ver en la tabla 5, el procedimiento empleado para el fraccionamiento celular es útil para la separación de las células blancas de las rojas, ya que las primeras tienden a concentrarse en las fracciones superiores, por ejemplo ver fracción 1 vs fracción 5 en todos los casos. Este procedimiento es útil también para obtener la separación de reticulocitos de la población de eritrocitos, con excepción del día 0, en el cual no se nota un enriquecimiento de los reticulocitos en fracción alguna; esto probablemente es debido a que ambos presentan la misma densidad celular.

Para el día 4 y 20 si se puede observar esta separación y se asume que en el día 15 sucede lo mismo. Sin embargo, a pesar de la utilidad, del método para efectuar la separación de diversas poblaciones celulares, por los datos de la tabla se puede decir que las dos poblaciones celulares de nuestro interés no fueron satisfactoriamente separadas.

Debido a que, las poblaciones celulares a separar difieren grandemente en cuanto a su volumen celular promedio ($118 \mu^3$ vs $70 \mu^3$), en caso de existir esta separación, la misma podría monitorearse a través de la diferencia en el volumen celular promedio de las diferentes fracciones para cada uno de los días muestreados. Sin embargo, como puede observarse en la tabla 5, el volumen corpuscular medio de las diversas fracciones es siempre el mismo, lo que indica que no se obtuvo dicha separación.

El método empleado se basa en la densidad de las células para su separación; probablemente tanto las células de médula como las células de hígado, sean de densidades parecidas lo que dificulta su separación por este método, razón por la cual no se logro la separación.

Se puede concluir que la metodología empleada es adecuada para la separación de reticulocitos de eritrocitos, células blancas de células rojas, diferentes poblaciones celulares de la médula osea en un conejo adulto; pero en el período postnatal no es muy efectiva para separar entre sí los eritrocitos de las dos poblaciones mencionadas anteriormente.

Una posibilidad para la separación de las diferentes poblaciones existentes, es la utilización de gradientes de densidad en los que se puede controlar la densidad del gradiente y discernir entre densidades muy cercanas.

Otra posibilidad es hacer un conteo diferencial de células para cada día, al utilizar el diámetro de las células como indicador de origen; con esto podemos saber el número aproximado de células de origen hepático y medular; se puede saber la concentración de 2,3-DPG por célula tanto de origen hepático como medular. Por lo tanto, si se sabe el número total de células rojas para cada día del desarrollo del conejo, al multiplicar la concentración del 2,3-DPG por célula de origen hepático por el número de células de origen hepático y este valor se suma al producto de multiplicar el número de células de origen medular por la concentración del 2,3-DPG por célula de origen medular; si la hipótesis es correcta, esta suma dará la concentración por día de 2,3-DPG en el desarrollo postnatal del conejo.

De cualquier manera la evidencia fotográfica muestra que el recambio de las poblaciones existe y es un elemento a considerar en el mecanismo de regulación de la concentración de 2,3-DPG en la sangre de conejo en su desarrollo postnatal.

Como ya se indicó, la actividad eritropoyética del conejo se incrementa conforme avanza el desarrollo. El número de células rojas es un índice que demuestra tal actividad. La cinética seguida por las células rojas en el conejo se expresan en la figura 19.

Se puede observar el comportamiento que siguen las células rojas. Conforme avanza el desarrollo hay un incremento en las células rojas y para el día 30 ya se tiene un número cercano al del conejo adulto. Al nacimiento se tiene un número de células rojas de 2.4×10^6 células/mm³ de sangre y para el día 30 tenemos 5.8×10^6 células/mm³ de sangre.

Este resultado demuestra de una gran actividad eritropoyética desde el momento en que la médula ósea comienza a ser activa.

Los datos obtenidos presentan algunas diferencias con los reportados por Vázquez, 11 aunque la cinética es similar. Concretamente esta autora reporta un porcentaje de $17 \pm 3\%$ de reticulocitos para el día 5 de edad que sirve de ejemplo para demostrar la gran actividad eritropoyética del conejo en el desarrollo postnatal.

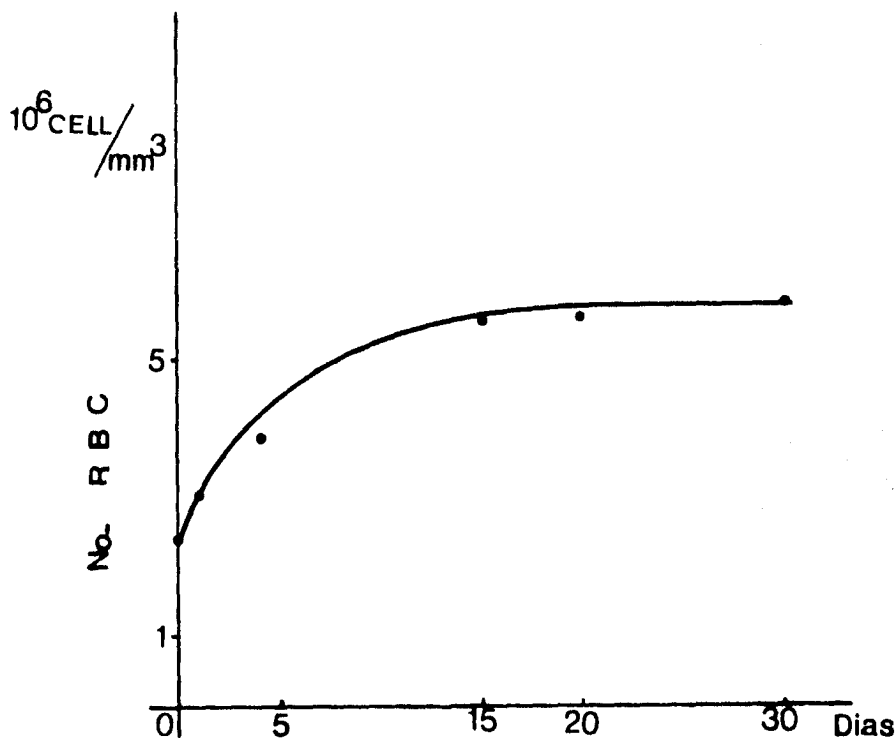


Fig. 19. Aumento en el número de células rojas conforme avanza el desarrollo del conejo.

Concomitante al aumento en el número de células rojas se produce un incremento en los valores de la hemoglobina.

La figura 20 muestra los valores obtenidos para la concentración de hemoglobina en cada día. Al nacimiento, se registra una concentración de hemoglobina de 1.22 Mol/ml de sangre y la concentración aumenta hasta llegar a un valor aproximado de 2 Mol/ml para el día 30. Esta concentración de hemoglobina —al igual que la concentración de 2,3-DPG— es una concentración que se mantiene en la etapa adulta. Nótese que la concentración en el día 30 es exactamente la mitad de la concentración de 2,3-DPG para ese día.

Tanto Vázquez,¹¹ como Halvorsen²¹ reportan que la concentración de hemoglobina en la sangre de conejo tiene una “caída” en su concentración para el día 20. En este trabajo no se encuentra este resultado; Halvorsen atribuye esa caída a deficiencias alimenticias del conejo, dado que ese día corresponde al término de la lactancia; se sabe también que al suministrar hierro, esta “anemia temprana” no se presenta. Es probable que el conejo aquí empleado, no tuviera esa deficiencia en hierro por lo que no manifestó esa caída de hemoglobina.

Al combinar los parámetros de 2,3-DPG y hemoglobina obtenemos la figura 21. Se observa que hay una estrecha correlación lineal entre la relación molar 2,3-DPG/Hgb. y el desarrollo postnatal del conejo. La relación molar máxima que se llega es de 2; esta relación molar no cambia después del día 30, se encuentra por lo tanto en la etapa adulta. Esta relación molar ya no cambia, ni aún en el período de anemia crónica inducida.

Este hecho, como ya se indicó, ubica al conejo en el grupo 3 que incluye a organismos que presentan una hemoglobina muy afín por el 2,3-DPG. Se cree que hay una relación entre el tipo de hemoglobina y la concentración de 2,3-DPG; en el caso del conejo se piensa, debido a la alta concentración de 2,3-DPG que presenta en la etapa adulta, que su hemoglobina pueda tener dos sitios de unión para este metabolito.

Para probar esta hipótesis se montó una columna como se describe en materiales y métodos. Se utilizaron las condiciones ácidas pues se ha encontrado que la interacción del 2,3-DPG hemoglobina es más fuerte a pH ácido.^{39,40} El pH de las condiciones experimentales no refleja el pH intraeritrocítico sino simplemente amplificará el efecto de unión del 2,3-DPG a la hemoglobina.

El pH intraeritrocítico del conejo es ácido (6.7)⁴¹ en condiciones normales presenta una concentración de lactato sanguíneo 10 a 30 veces mayor que en el humano, lo cual puede tener alguna relación con el valor normal de la relación molar 2,3-DPG/Hgb. Se sugiere que estas altas concentraciones de lactato propician un microambiente intracelular por efecto de pH, en el cual la hemoglobina puede interaccionar de manera especial con el 2,3-DPG.

Para determinar en términos cuantitativos cuanto 2,3-DPG se encuentra unido a la hemoglobina de conejo y con base en esto determinar los posibles sitios de unión, se utilizó los principios de la cromatografía de exclusión molecular.

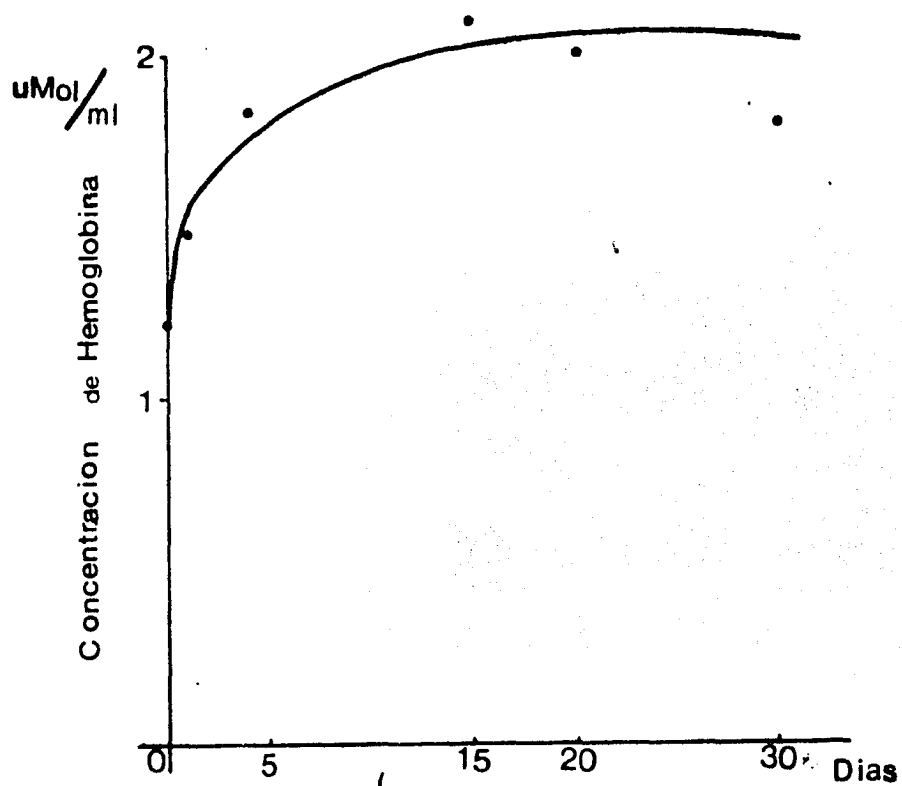


Fig. 20. Cambio en la concentración de hemoglobina a través del desarrollo postnatal del conejo.

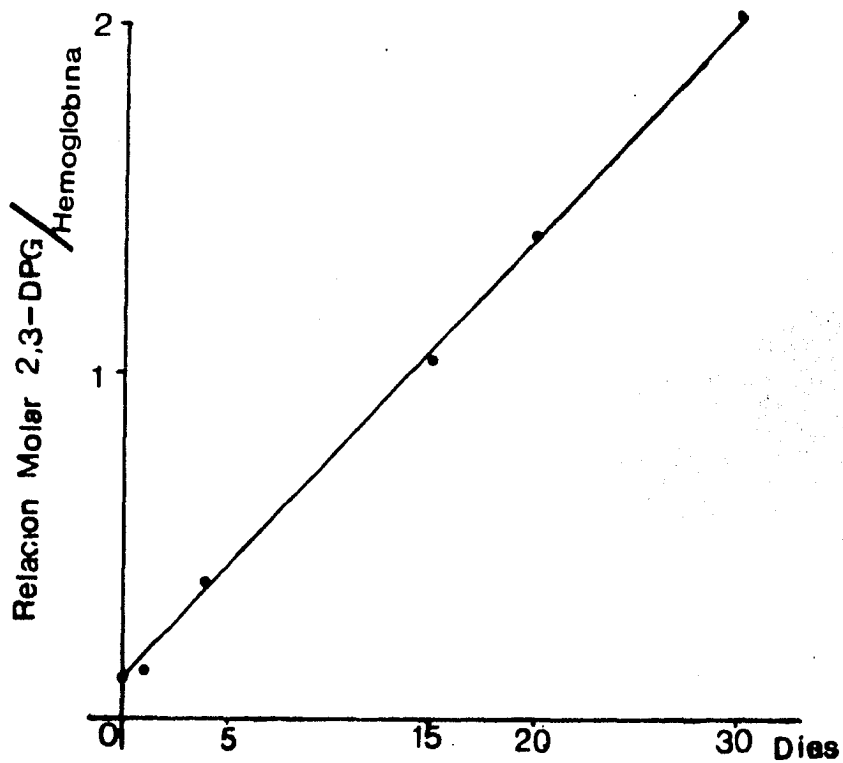


Fig. 21. Cambio en la relación molar 2,3-DPG/Hemoglobina del nacimiento al día 30 de edad en el conejo.

La figura 22 es el cromatograma obtenido para el 2,3-DPG patrón. El 2,3-DPG presenta un pico máximo de concentración en la fracción 50. Este cromatograma va a servir de referencia para distinguir el 2,3-DPG unido a la hemoglobina del que no lo está.

También por la columna se corrió el sobrenadante de un hemolizado celular, se midió la absorbancia del eluido a 414 nm y de esta manera se determinó la concentración de hemoglobina. La hemoglobina tiene su pico máximo de concentración en la fracción número 25. Esta corrida servirá también de referencia.

En las condiciones empleadas la hemoglobina empieza a salir en la fracción 22 y termina de salir en la fracción 40; para el 2,3-DPG se empieza a tener lectura a partir de la fracción 40 y termina de salir en la fracción 63, como se puede ver en este caso el pico es muy simétrico.

Al tomar en cuenta esta información, en estas condiciones, los cromatogramas patrón, tanto de hemoglobina como de 2,3-DPG, no se sobrelapan.

FRACCION	2,3-DPG (Mol/ml)
35	.003
40	.017
45	.228
50	.510
51	.452
52	.447
54	.387
55	.330
56	.269
57	.233
62	.031
67	0

Tabla 6. Datos obtenidos al medir el eluido de una solución patrón de 2,3-DPG. Se utilizó el método modificado descrito en Mat. y Met. Con estos datos se obtiene el comportamiento del 2,3-DPG al salir de la columna. Los datos son graficados en la fig. 22.

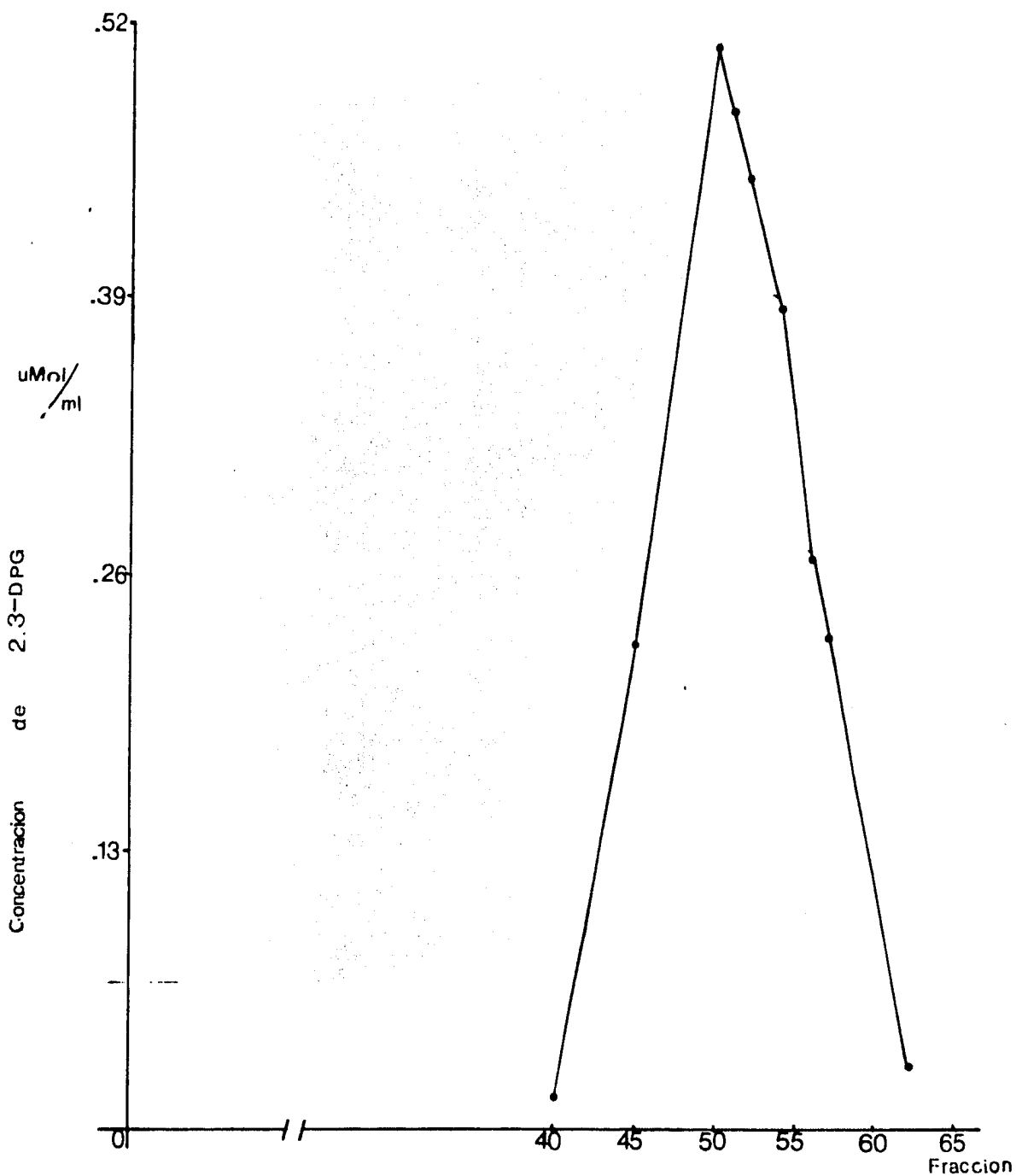


Fig. 22. Cromatograma obtenido al medir el eluido de una solución patrón de 2,3-DPG. La concentración de 2,3-DPG se determinó con el método de Sigma Chemical modificado como se establece en materiales y métodos. Sephadex G-50, flujo: 2 ml/min; 4°C.

FRACCION	(Hgb) μ Mol/ml)
19	.005
20	.05
21	.1
22	.160
23	.21
24	.25
25	.306
26	.270
27	.21
28	.17
29	.13
30	.1
32	.06
34	.04
36	.03
38	.01
40	.004

Tabla 7. Datos obtenidos al medir el eluido de un hemolizado celular a 414 nm. Se observa que la absorbancia max. esta en la fracción # 25. Con estos datos se obtiene el comportamiento de la hemoglobina al salir de la columna.

Estos datos se encuentran graficados en la fig. 23.

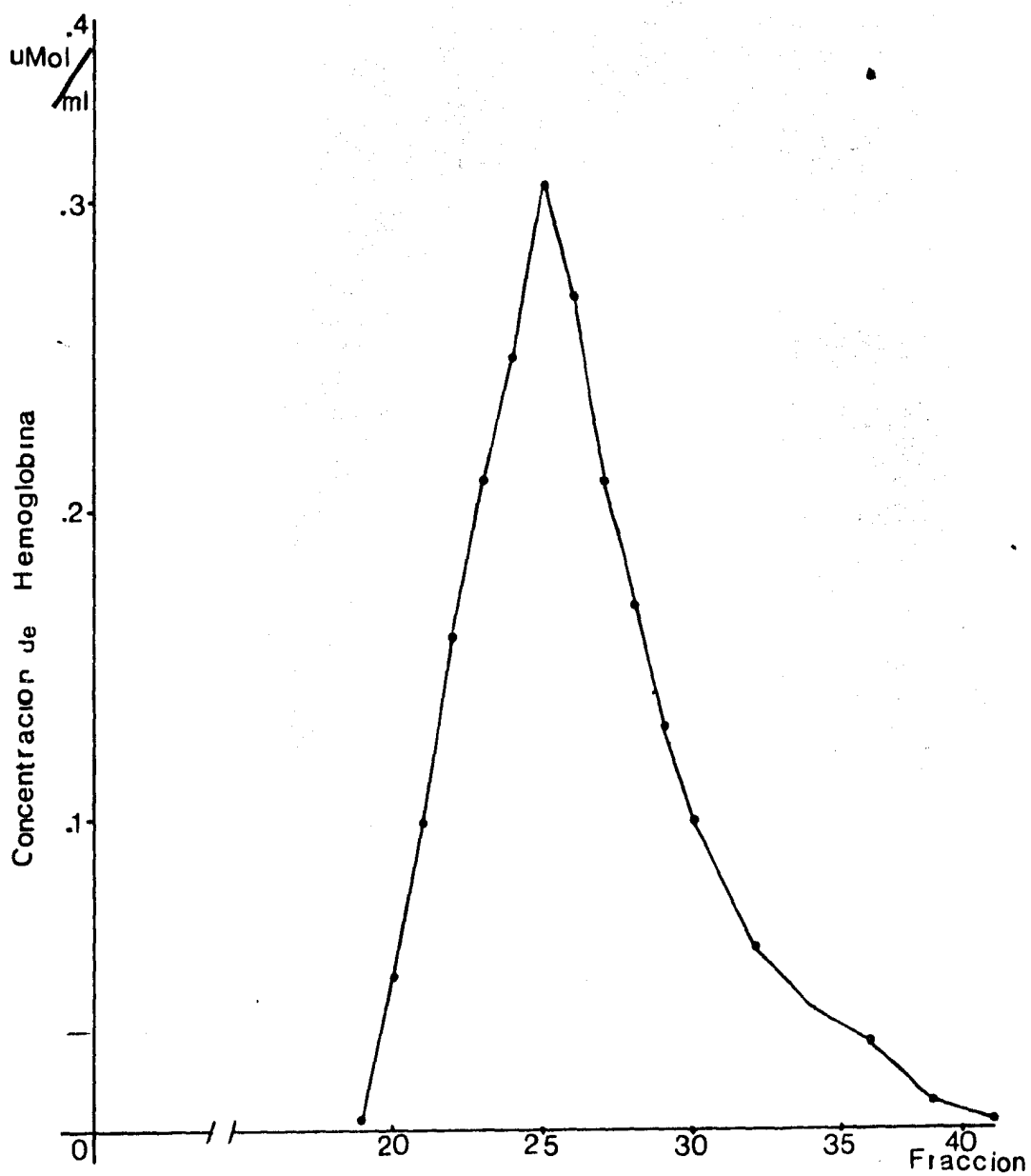


Fig. 23 Cromatograma obtenido a partir de la lectura espectrofotométrica del eluido del sobrenadante de un hemolizado celular. Se midió la absorbancia del eluido a 414 nm y de esta manera se determinó la concentración de hemoglobina.

La figura 24 nos muestra el eluido del sobrenadante de un hemolizado celular; en el cromatograma el pico correspondiente a la hemoglobina sigue el mismo comportamiento que el de la hemoglobina de referencia; sin embargo el 2,3-DPG no sigue estrictamente el comportamiento observada respecto a su patrón. Se observa que una parte del 2,3-DPG sale casi conjuntamente con la hemoglobina. Este pico pequeño corresponde al 15 % del 2,3-DPG que se recuperó (hubo una recuperación del 77%), en el otro 85% se observa que tiene un pico máximo en la fracción 60 por lo que se puede decir que corresponde a 2,3-DPG no unido o libre. Sin embargo, se puede notar que, este pico no presenta una simetría como la observada en el patrón sino que presenta un corrimiento o un desplazamiento hacia la izquierda, lo que indica que hubo un retardo de este 2,3-DPG que no correspondería estrictamente a 2,3-DPG libre y que por esta metodología no se puede cuantificar; por lo tanto, se puede decir que más del 15% del 2,3-DPG se encuentra unido a la hemoglobina.

Ahora, se está trabajando con oxihemoglobina, de modo que aunque se tenga un gran porcentaje de 2,3-DPG no unido, tenemos más del 15% que si permaneció unido, lo que indicaría que este 2,3-DPG está unido a la oxihemoglobina en un solo sitio de unión; este sitio de unión no sería el mismo sitio de unión para el 2,3-DPG, que está en la cavidad central entre las cadenas beta en la desoxihemoglobina, pues se está trabajando con oxihemoglobina, y en esta forma el sitio es muy compacto para una molécula de 2,3-DPG.

Por diversas técnicas se ha reportado la unión del 2,3-DPG a la oxihemoglobina humana.^{42,43,44,46} de Bruin, y col.⁴⁵ han propuesto un sitio para esta interacción, en este sitio intervendría el grupo amino de la cadena alfa. El autor propone este grupo dado que presenta una captación de protones nula por efecto Bohr en la presencia del 2,3-DPG. Este sitio sólo sería funcional en la forma oxi, pues el grupo amino de la cadena alfa forma un enlace salino con la otra cadena alfa en la desoxihemoglobina. Así se tiene que la hemoglobina humana puede tener un sitio de unión ya sea para la forma oxi o desoxi pero no los dos al mismo tiempo.

Probablemente en el conejo, el 2,3-DPG que se reporta en este trabajo unido a su oxihemoglobina, este unido en un sitio de unión similar al reportado por de Bruin para la oxihemoglobina humana.

Marshal⁴⁷ ha estudiado el metabolismo de eritrocitos humanos por medio de la técnica de Resonancia Magnético Nuclear. También por esta técnica ha estudiado la interacción de la hemoglobina y fosfatos orgánicos en eritrocitos humanos, que aporta nueva información acerca de la interacción de la hemoglobina con el 2,3-DPG.

La posibilidad de estudiar la interacción del 2,3-DPG-hemoglobina en el conejo por medio de esta técnica, nos permitira aclarar de que manera interacciona el 2,3-DPG y la hemoglobina de conejo.

El estudio de los mecanismos de transporte y liberación de O₂ a los tejidos en el conejo nos ha llevado a tener un esquema general del proceso, a partir del momento en que se establece la circulación en el embrión hasta la etapa adulta.

FRACCION	2,3-DPG (Mol./ml)	Hgb. (Mol./ml)
19	—	.006
20	—	.012
21	—	.068
22	.008	.160
23	—	.275
24	.041	.355
25		.382
26	.072	.354
27	.0942	.283
28	.089	.184
29		.121
30	.051	.076
32		.033
34		.0189
35	.05	
36		
38		
40	.090	
45	.199	
48	.27	
49	.275	
50	.297	
51	.156	
55	.082	
60	.004	

Tabla 8. Datos obtenidos al medir 2,3-DPG y hemoglobina en el eluido del sobrenadante de un hemolizado celular. Estos datos están representados gráficamente en la fig. 24

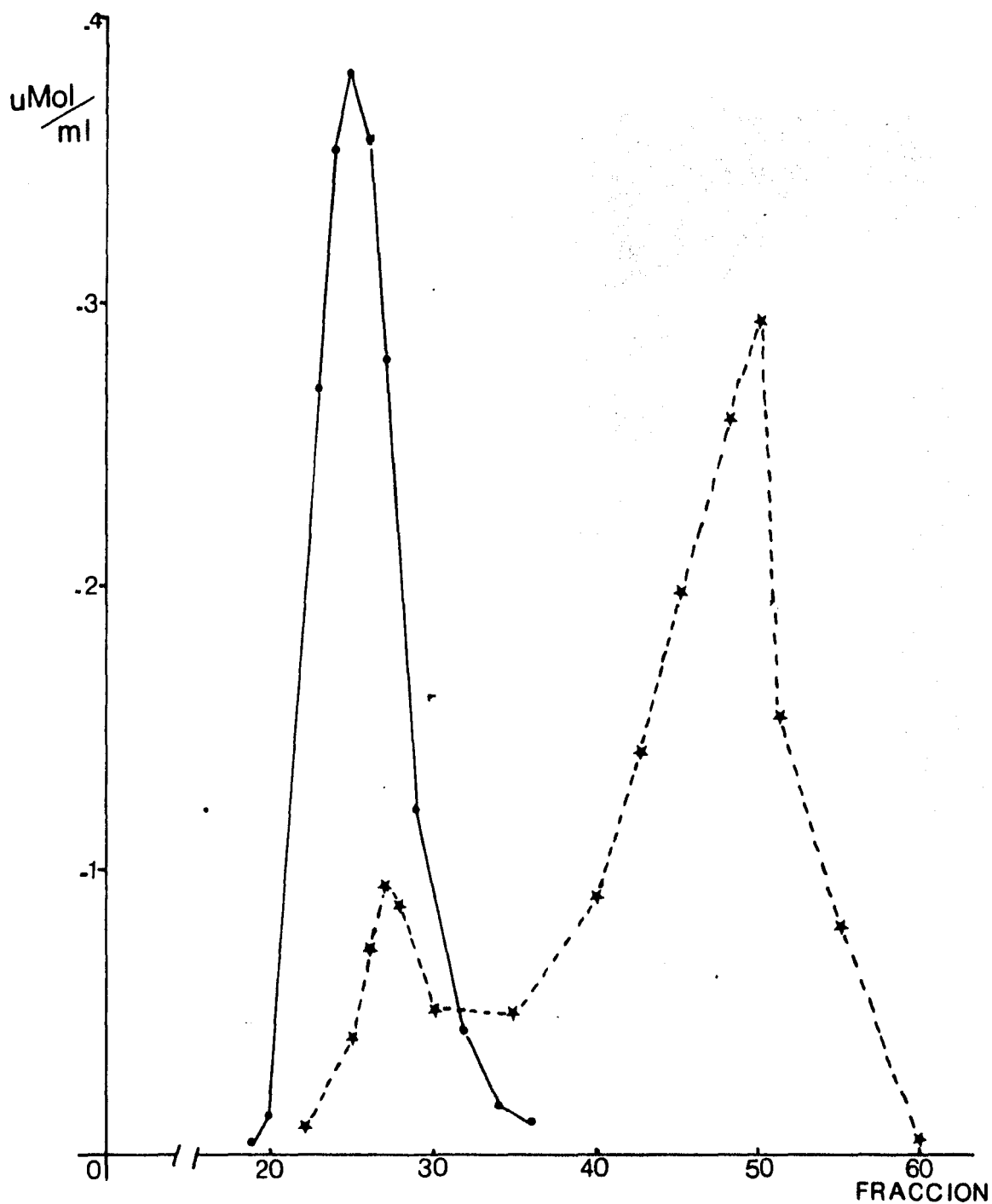


Fig. 24. Cromatograma que muestra el eluido del sobrenadante de un hemolizado celular al cual se le midió la concentración de hemoglobina y 2,3-DPG. —★—★— 2,3-DPG
 —●—●—●— hemoglobina.

Cuando el embrión llega a un cierto tamaño durante el desarrollo, no es posible consumir O_2 sólo por difusión y tiene que desarrollar un sistema circulatorio. Las primeras células que contienen hemoglobina son producidas por el mesénquima del saco vitelino y más adelante la sangre circula por el cordón umbilical. El conejo termina su etapa embrionaria a los 14 días de gestación, en este momento el embrión presenta una concentración de 2,3-DPG similar a la del adulto, para esta etapa los requerimientos de O_2 son suficientes para sus necesidades.

En el momento en que el embrión pasa a feto, se da un cambio de hemoglobinas: de embrionaria a definitiva. Esta nueva hemoglobina presenta una alta afinidad por el O_2 . Al desarrollarse el feto, la necesidad de O_2 aumenta pues la tasa de crecimiento es mayor a la tasa de flujo de O_2 de la madre al feto;²² para este momento se observa un decremento en la concentración del 2,3-DPG este decremento provoca que aumente la afinidad de la hemoglobina por el O_2 ; de esta manera la oxigenación para los tejidos no se altera.

Al término de la etapa fetal (a los 30 días de gestación) los niveles de 2,3-DPG llegan a estar en su punto más bajo, en este momento el conejo nace y se enfrenta a la necesidad de respirar ahora con sus propios pulmones y transportar O_2 a sus tejidos. Debido a que no hay recambio de hemoglobinas para compensar la alta afinidad de la hemoglobina por el O_2 que presenta al nacimiento, el conejo aumenta sus niveles de 2,3-DPG en una forma paulatina, lo que hace pensar en mecanismos que regulen esta concentración en esta etapa. Se piensa que el mecanismo regulador es el recambio de poblaciones de eritrocitos que hemos observado ocurre en esta etapa.

Al aumentar los niveles de 2,3-DPG, el conejo va disminuyendo la afinidad de la hemoglobina por el O_2 , es decir, que el aumento en la concentración de 2,3-DPG obedece a la demanda de O_2 por parte del organismo.

Para la edad de 30 días el conejo presenta una concentración de 2,3-DPG definitiva ya que esta concentración es similar a la que presenta el conejo en etapa adulta. La concentración de hemoglobina es tal que representa la mitad de la concentración del 2,3-DPG. Esta alta concentración del 2,3-DPG estaría interaccionando con la hemoglobina, si se acepta que el 2,3-DPG esta modulando el funcionamiento de esta proteína. Esta interacción, esta en una relación de 2 moléculas del 2,3-DPG con una hemoglobina, por lo que es fácil suponer que 2 moléculas del 2,3-DPG interaccionan con la hemoglobina cada una en un sitio de unión diferente.

De este trabajo se desprende que el 2,3-DPG interacciona con la oxihemoglobina de conejo en un sitio de unión. Por la metodología empleada no se puede decir más acerca de la interacción. Sin embargo, con otra técnica como la Resonancia Magnética Nuclear se podría establecer de manera más fina la interacción entre el 2,3-DPG y la hemoglobina en el conejo.

R E S U M E N

Uno de los propósitos de este trabajo es el de investigar si el incremento en la concentración de 2,3-DPG durante el desarrollo postnatal del conejo, es debido a un recambio poblacional de eritrocitos que sufre el conejo en esta etapa o a un incremento celular de los niveles de 2,3 DPG en las células ya existentes. Para determinar esto, tomé alicuotas de sangre de conejo a distintos días de su desarrollo postnatal. Registré los parámetros hematológicos para cada día. De estos resultados corroboré el incremento en la concentración de 2,3 DPG y una disminución en el Volumen Corpuscular Medio (MCV). Para separar a las dos poblaciones celulares existentes, utilicé un método desarrollado por el Laboratorio de Biología Molecular que ha dado buenos resultados en la purificación de reticulocitos y células de la médula ósea. Los resultados de la separación indican que el método fue útil para la separación de leucocitos de eritrocitos, así como de reticulocitos de eritrocitos, pero no fue satisfactoria para la separación de células de nuestro interés, probablemente debido a que presentan una densidad muy semejante.

Dada la interacción intracelular entre la hemoglobina y el 2,3-DPG y, el hecho de que la concentración de este metabolito da valores muy constantes dentro de una especie en la etapa adulta pero que varían mucho entre diversas especies de mamíferos; tratamos de estudiar también, la relación entre el tipo de hemoglobina de una especie determinada y su concentración intraeritrocítica de 2,3-DPG. Por lo tanto, la hemoglobina de conejo en condiciones normales presentará dos sitios de unión para el 2,3-DPG. Para tal fin utilicé el principio de exclusión molecular para cuantificar la cantidad de 2,3-DPG unido a hemoglobina.

De los resultados obtenidos, encontré que hay una interacción entre el 2,3-DPG y la oxihemoglobina de conejo, probablemente en un sitio de unión, indicando con esto que no solamente la desoxihemoglobina puede unir este metabolito.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Asimov, I. 1979. La fascinante historia del torrente sanguíneo Ed. Limusa. México, D.F.
- 2) Leeson; Leeson. 1977. Histología 3a. ed. Editorial Interamericana México.
- 3) Chiba, H. y Sasaki, R. 1978. Functions of 2,3-DPG and its metabolism. Current Topics in Cellular Regulation. Vol. 14 Academic Press. H. Y. Horecker, B.L, and Stadtman, E.R. Eds.
- 4) Cárdenas, A. Tesis de Licenciatura en preparación.
- 5) Bard, H. y Shapiro, M. 1979. Perinatal changes of 2,3-Diphosphoglycerate and oxygen affinity in mammals not having fetal type hemoglobins. Pediat. Res. 13:167-169.
- 6) Jelkmann, W. y Bauer, Ch. 1978. High pyruvate kinase activity causes low concentration of 2,3-Diphosphoglycerate in fetal rabbit red cells. Pflügers Arch. 375:189-195.
- 7) Holter, H.P., Halvorsen, S., Refsum, H.E. 1984. Erythrocyte 2,3-Diphosphoglycerate P_{O_2} 50% and available oxygen in young rabbits with and without postnatal fall in hemoglobin. Pediat. Res. 18(2):154-157.
- 8) Halvorsen, Holter, H.P., Refsum, H.E. 1982. Erythrocyte 2,3-DPG, P_{O_2} 50% and available O during the early post-natal fall in hemoglobin in rabbits. Acta Physiol Scand. 116: 7-12.
- 9) Jelkman, W and Bauer, Ch. 1977. Oxygen affinity and phosphate compounds of red cells during intrauterine development of rabbits. Pflügers Arch. 372:149-156.
- 10) Rapoport, S. 1968. The regulation of glycolysis in mammalian erythrocytes. Essays Biochem. 4:69-103.
- 11) Vázquez, N. 1984. Cambios en los parámetros hematológicos y aspectos del transporte de hierro durante las primeras etapas del desarrollo postnatal en el conejo. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias Depto. de Biología, UNAM.
- 12) Narita, H. Ikura, K., Yanagawa, S., Sasaki, R., Ciba, M. 1980. 2,3-Bisphosphoglycerate in developing rabbit erythroid cells. The J. Biol. Chem. 255(11): 5230-5235.
- 13) Becerril, L.B. 1982. Estudio sobre los niveles de 2,3-DPG en distintas especies de mamíferos bajo condiciones normales, relación de este y otros metabolitos afines con la anemia crónica inducida. Tesis maestría. Facultad de Química UNAM.
- 14) Perutz, M.F. 1980. Regulation of Oxygen affinity of mammalian hemoglobins. J. Mol. Biol. 136:183-191.
- 15) Becerril, L.B. 1979. Estudio sobre los niveles de 2,3 -DPG en conejos sujetos a un proceso de anemia experimental crónica. Tesis de licenciatura Fac. de Ciencias Depto. de Biología UNAM.
- 16) Maclean, N. 1979. Hemoglobina. Cuadernos de Biología. Ed. Omega. Barcelona.
- 17) Perutz, M.F. 1983. Species adaptation in a protein molecule. Mol. Biol. Evol. 1(1):1-28

- 18) Zuckerkandl, E. 1965. La evolución de la hemoglobina. Investigación y Ciencia (5): 388-397.
- 19) Steinheider, G., Melderis, H. Ostertag, W. 1975. Enbrionic e Chains of Mice and rabbits. Nature, 257(10):714-716.
- 20) Stryer, L. 1979. Bioquímica. Ed. Reverté, S.A. Caracas Venezuela.
- 21) Antonioni, E. y Brunori, M. 1971. Hemoglobin and Myoglobin in their reactions with ligands. Frontiers of Biology Vol. 21. A. Neuberger and E.L. Tatum Editors.
- 22) Perutz, M.F. 1979. La estructura de la hemoglobina y el transporte respiratorio. Investigacion y Ciencia(1): 40-55.
- 23) Perutz, MF. 1970. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin, Nature. 228*11):726-739.
- 24) Lehninger, A. 1984. Principios de Bioquímica. Ed. Omega. España.
- 25) Benesch, R. Benesch, R.E. 1970. The reaction Between diphosphoglycerate and hemoglobina. Fed. Procc. 29(3):1101.
- 26) Rapoport, S. y Lubering, J. 1950. The formation of 2,3-DPG in rabbit erythrocytes; the existence of a diphosphoglycerate mutase. J. Biol. Chem. 183:507.
- 27) Monsen, G. y Vestergaard, B.B. 1978. Human erythrocyte 2,3-DPG metabolism Arch. Biochem. Biophys. 190(1):67.
- 28) Rose, Z.B. 1968. The purification and properties of diphosphoglycerate mutase. from human erythrocytes. J. Biol. Chem. 243:4810.
- 29) Rose, Z.B. 1980. Enzymes controlling 2,3-DPG in human erythrocytes, Fed. Procc. 29(3):1105.
- 30) Miale, Y.B. 1972. Laboratory Medicine Hematology. 4th. ed. the C.V. Mosby Co. Saint Louis, Mis. USA.
- 31) Chanutin, A. and Curnish, R.R. 1967. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxigen equilibrium of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 121:196.
- 32) McDonald, R. 1977. Red cell 2,3-DPG and oxigen affinity. Anaesthesia 32:544.
- 33) Wintrobe, M.M. LEE, G.R., Boggs, D.R., Bithell, T.C., Athens, J.W. 1974. CLINICAL HEMATOLOGY. 7th. ed. Lee and Febiger. Philadelphia.
- 34) Eaton, J.W. Brwer, G.J., Shults, J. y Sing, C.F. 1970. Variations in 2,3-DPG and ATP levels in human erythrocytes and effects on oxygen transport. Advan. Exp. Med Biol. 6:21.
- 35) Coulter Counter Model Z_F Manual. USA. 1979.
- 36) Sigma Technical Bulletin No. 35 UV, 1980.
- 37) Ikura, K. Sasaki, R., Narita, H., Sugimoto, E., Chiba, H. 1979. Multifunctional enzyme, bisphosphogly-ceromutase/2,3-Biphosphoglycerate phosphatase/phosphoglicero-mutase, from human erithrocytes. Eur. J. Biochem. 66:515-522.
- 38) Mayony, V.H. Tesis de Maestría en Preparación.
- 39) Benesch, R.E. Benesch, R., Chi. Ing. 1969. The Oxigenation of Hemoglobin in the presence of 2,3-Diphosphoglycerate. Effect of tempeature, pH, ionic strength, adn hemoglobin concentration. Biochemistry. 8(6):2567-2571.

40) Deuticke, B. Duhm, J., Dierkesman., R. 1971. Maximal elevation of 2,3-DPG concentration in human erythrocytes: influence on glycolytic Metabolism and intracellular pH. Pflügers Arch. 326:15-34.

41) Moon, B.R. and Richards, H.J. 1973. Determination of intracellular pH by ^{31}P magnetic resonance. Journal of Biological Chemistry. 248(20):7276-7278.

42) Henderson, T. Costello, A.J., Omachi, A. 1974. Phosphate metabolism in intact human erythrocytes determination by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71(6):2487-2490.

43) Costello, A.J.R., Marswall, W.E. Omachi, A., Hendersonit. Between interactions hemoglobin and organic phosphates investigated with P nuclear magnetic resonance spectroscopy and ultrafiltration. Biochim Biophys. Acta 427:481-491.

44) de Bruin, H.S., Rollema, H.S., Lambert, H.M. 1974. The interaction of 2,3-DPG with human desoxy and oxyhemoglobin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 55(1): 193-99.

46) Berger, H. Janig, G.R., Gerber, G., Ruckpaul, K., Rapoport, S.M. 1973. Interaction of hemoglobin with ions. Eur. J. Biochem. 38:553-562.

47) Marshall, E.W. Costello, A.J., Henderson, T., Omachi, A. 1977. Organic phosphate binding to hemoglobin in intact human erythrocytes determined by P nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochem. Biophys. Acta. 490:290-300.