

00562
1
19

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO SOBRE LOS NIVELES DE ACIDO 2,3-DIFOS-
FOGLICERICO (2,3-DPG) EN DISTINTAS ESPECIES
DE MAMIFEROS, BAJO CONDICIONES NORMALES.

RELACION DE ESTE Y OTROS METABOLITOS
AFINES CON LA ANEMIA CRONICA INDUCIDA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

P R E S E N T A:

BALTAZAR BECERRIL LUJAN



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.

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	gliceraldehído 3-fosfato
2-PG	2-fosfoglicerato
DP Gasa	2,3-DPG fosfatasa = 2,3-DP Gasa
ATP	adenosín trifosfato o trifosfato de adenosina
μ mol	micro mol (10^{-6} mol)
g (s)	gramo (s)
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 volumen
M	molaridad
rpm	revoluciones por minuto
G	fuerza de gravedad
PGM	monofosfo glicerato mutasa

P fosfato inorgánico libre (HPO_4^-)
PGK fosfoglicerato kinasa
GAPD gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
nm nanometro (10^{-9} metro) = milimicra
m.s.n.m. metros sobre el nivel del mar.
NADH nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NAD⁺ " " " oxidado
Htc hematocrito.

INDICE

	Página
Abreviaturas	D
INTRODUCCION	1
Antecedentes sobre el papel del 2,3-DPG como regulador de la función de la hemoglobina.	1
Interacción del 2,3-DPG con la hemoglobina	3
Bioquímica del 2,3-DPG	6
Mecanismo de la desviación de la vía glucolítica.	8
Importancia fisiológica del 2,3-DPG	10
Importancia clínica del 2,3-DPG	13
Factores que regulan la concentración de - - 2,3-DPG	14
Objetivos	20
MATERIALES Y METODOS	21
Colecta de la sangre	21
Procesamiento de la sangre	21
Hematocrito	21
Hemoglobina	22
Conteo de células rojas	22
Determinación del 2,3-DPG	23
Determinación de ATP	23
Determinación de ácido láctico	23

	Página.
Conteo de reticulocitos	24
Inducción de la anemia	24
Semipurificación de reticulocitos	25
Incubación de muestras de sangre para estudios <u>in vitro</u> .	26
RESULTADOS Y DISCUSION	27
Respuesta del 2,3-DPG a la anemia	49
Número de células rojas	51
Hematocrito	55
Hemoglobina	59
2,3-difosfoglicerato	63
RESUMEN	110
BIBLIOGRAFIA	111

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 aspectos y la particularidad de otros. Desde el punto de vista hematológico, ha vertido datos que han derivado en el conocimiento de una buena parte de las características del tejido sanguíneo en los vertebrados (Rapoport y Guest, 1941; Harkness et al., 1969; Metcalfe y Dhinsa, 1970; Bunn et al., 1974).

No obstante que se conoce con cierta precisión la bioquímica de dicho tejido, los aspectos relacionados con la regulación de sus propiedades oxigenadoras, no están suficientemente claros. El compuesto que ha sido involucrado como responsable de tal regulación es el 2,3-DPG (Benesch y Benesch, 1967; Chantun y Curnish, 1967; Benesch et al., 1968; Benesch y Benesch, 1970).

Antecedentes sobre el papel del 2,3-DPG como regulador de la función de la hemoglobina. Ya para el año de 1920, se sabía que la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno era menor en el interior de las células rojas que en un hemolizado (Barcroft, 1920). 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 (Greenwald, 1925). Algunos años más tarde, en 1941 Rapoport y Guest reportaron que el hombre y otras especies de mamíferos también contenían concentraciones considerables de este metabolito (Rapoport y Guest, 1941). A partir de entonces se han reportado altas concentraciones de 2,3-DPG en otros tantos mamíferos (Harkness et al., 1969; Bartlett, 1970; Bunn et al., 1974).

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 regulador de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (Benesch y Benesch, 1967; Chanutin y Curnish, 1967).

Un año más tarde, en 1968 tal hallazgo fue confirmado en los eritrocitos intactos por Engel y Duc, quienes observaron un desplazamiento de la curva de disociación de oxígeno hacia la izquierda (mayor afinidad), 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) (Engel y Duc, 1968).

Posteriormente se hicieron estudios semejantes en los que se redujeron los niveles de 2,3-DPG con bisulfito de sodio, encontrándose el mismo resultado, es decir, una mayor afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. En estos mismos estudios se incrementó la concentración de dicho metabolito, incubando los eritrocitos en presencia de inosina, dando como resultado el caso contrario, es decir, una menor afinidad por el oxígeno (Lian et al., 1971). Todos estos datos indican que efectivamente el 2,3-DPG es un metabolito involucrado en la regulación de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en los humanos.

Interacción del 2,3-DPG con la hemoglobina. En los humanos el 2,3-difosfoglicerato se une a la deoxihemoglobina en una relación molar de 1:1, es decir, un mol de 2,3-DPG por mol de tetrámeros de desoxihemoglobina (Benesch et al., 1968; Benesch y Benesch, 1970).

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, situándose éste en la región del eje de simetría de la cavidad central que queda entre las cadenas beta (Arnone, 1972).

Durante la desoxigenación se forman ocho enlaces salinos que estabilizan la forma tensa (T) de la hemoglobina. Esta estructura presenta la particularidad de favorecer la orientación hacia la cavidad central; del grupo alfa amino, la lisina EF6

residuo #82) y la histidina H8 (residuo #143), de cada una de las cadenas beta (Arnone, 1972). La orientación de estos residuos da como resultado la creación de un sitio alostérico para el 2,3-DPG. (Fig. A-1).

A pH fisiológico (7.4), el 2,3-DPG se encuentra cargado -negativamente y es estereoquímicamente afín al agrupamiento de los seis residuos antes mencionados, los cuales a ese pH se encuentran cargados positivamente. El resultado de tal interacción es la formación de seis enlaces salinos adicionales a los otros ocho, formándose un complejo 2,3-DPG - desoxihemoglobina con una estabilidad considerable (Arnone, 1972; Kilmartin, 1976). (Fig.A-2)

La estabilización adicional de la forma tensa de la hemoglobina por el 2,3-DPG, explica la importancia de este compuesto en la regulación de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno.

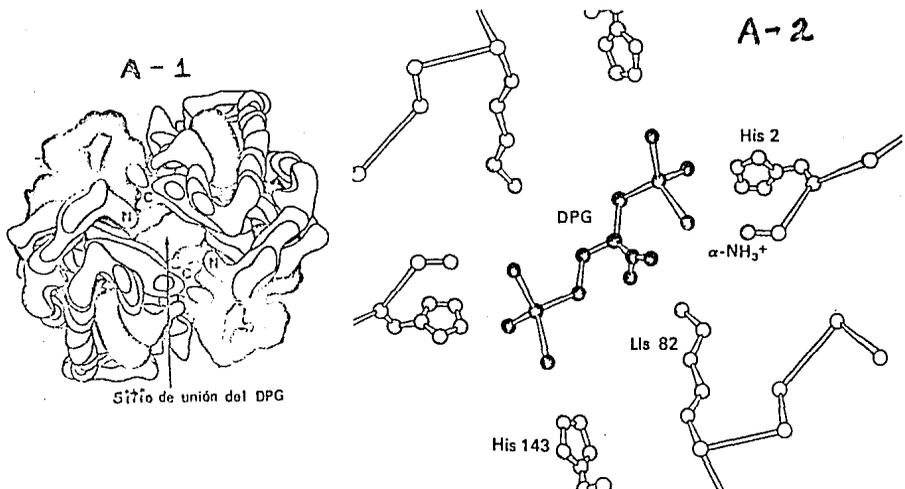


Fig.A-1 Modelo a baja resolución de la hemoglobina humana. En negro se muestran las cadenas beta y en blanco las α . Fig.A-2 Detalles del sitio de unión del 2,3-DPG.

Para que se lleve a cabo la oxigenación es necesario que se rompan 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 sobre estabilizada por el 2,3-DPG, a la forma relajada (R), para que la hemoglobina se pueda oxige-- nar. Esto explica la reducción de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, en presencia de 2,3-DPG (Benesch y Benesch, 1970).

El 2,3-DPG reduce la afinidad de la hemoglobina por el -- oxígeno sin modificar apreciablemente el mecanismo de oxigena-- ción, tal como lo indica el desplazamiento de la curva de diso-- ciación (modificación de la posición de la curva), sin perder -- su forma sigmoidea (Benesch y Benesch, 1970; Tyuma y Shimizu, -- 1970). (Fig. B)

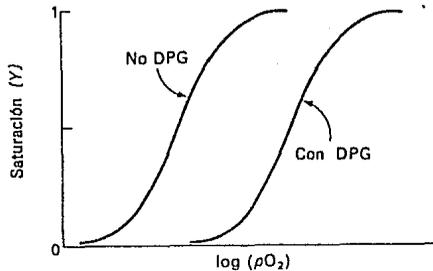
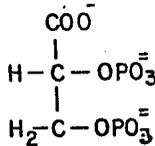


Fig. B. Curvas de disociación de oxígeno en ausencia y en presen-- cia de 2.3 - DPG.

Bioquímica del 2,3-DPG. El 2,3-difosfoglicerato 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 átomo de carbono #1 y dos grupos fosfoéster en los carbonos 2 y 3 (Fig.C)



2,3 DPG

Fig.C Fórmula del 2,3-DPG en su forma disociada.

El 2,3-DPG es un intermediario de la vía glucolítica, glucólisis ó Ruta de Embden - Meyerhof. (Fig D)

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 fue descubierta en 1950 por J. Luebering y S. Rapoport, dándosele entonces el nombre de Ciclo de Luebering - Rapoport. También se le conoce como Ciclo del Fosfoglicerato o desviación de la vía glucolítica (Rapoport y Luebering, 1950). (Fig. E)

Se ha calculado que aproximadamente un 20% de la glucólisis se desvía en este ciclo, en el eritrocito humano bajo condiciones normales (Duhm et al., 1968; Brand y Quadflieg, 1977; --

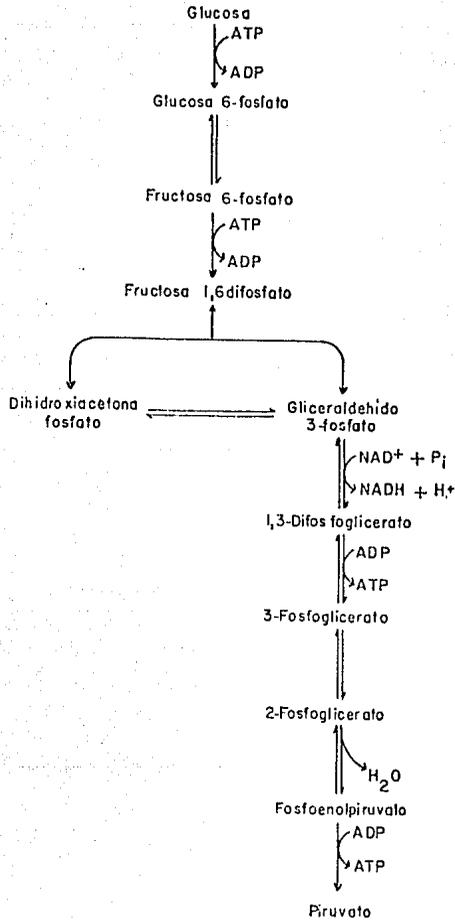


Fig. D. Vía glucolítica ó ruta de Embden-Meyerhof

Momsen y Vestergaard, 1978).

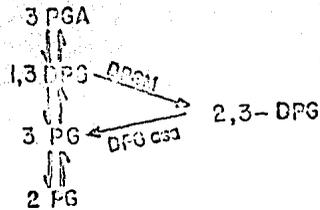
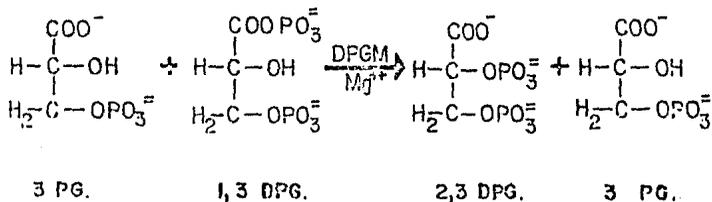


Fig.E Ciclo del Fosfoglicerato.

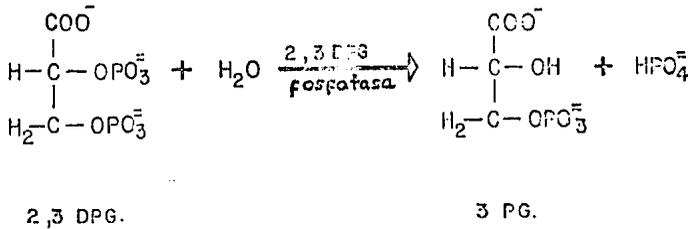
Mecanismo de la desviación de la vía glucolítica.

Formación de 2,3-DPG a partir de 1,3-DPG. La enzima involucrada en esta reacción es la difosfoglicerato mutasa (DPGM), la cual convierte al 1,3-DPG en 2,3-DPG. Esta reacción de mutasa requiere de 3-fosfoglicerato como aceptor de un grupo fosfato (Rose, 1968).

La mutasa capta simultáneamente 1,3-DPG y 3-PG. En este complejo ternario, se transfiere un grupo fosfato desde el carbono #1 del 1,3-DPG al carbono #2 del 3-fosfoglicerato (Fig. F):



Degradación del 2,3-DPG por la 2,3-DPG fosfatasa. En esta reacción el 2,3-DPG es hidrolizado a 3-fosfoglicerato, regresándose de esta manera a la vía glucolítica (Fig. G):



Es importante hacer notar que en esta desviación de la glucólisis, al impedirse el paso directo de 1,3-DPG a 3-PG, se está impidiendo a su vez la formación de una molécula de ATP. Desde el punto de vista de la economía celular, el ciclo del fosfoglicerato pareceto parece ir en detrimento de ésta, debido a que 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 sólomente en esta desviación de la glucólisis, es donde se sintetiza el 2,3-DPG. Este metabolito además de ser un regulador de la hemoglobina, también participa como acarreador de un grupo fosfato en el paso de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato. Es 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

za (DPGM) (Rose, 1968; 1970)

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 bajo condiciones de anemia, o de otros tipos de hipoxia, los niveles de 2,3-DPG se incrementan, provocando una disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y aumentando la eficiencia en la entrega de éste a los tejidos. (Agar et al., 1977; MacDonald, 1977).

Sólo 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 es el fosfato orgánico más abundante, mientras que en algunos reptiles y en las aves lo es el inositol pentafofosfato (Steward y Tate, 1969; Bartlett, 1970; Bunn et al., 1974; Petschow et al., 1977).

Estudios hechos en el hombre indican que bajo condiciones patológicas caracterizadas por una hipoxia, tales como: enfermedades pulmonares crónicas, enfermedad del corazón cianótico, insuficiencia cardíaca, anemia falciforme y anemia crónica, los niveles de 2,3-DPG se encuentran incrementados (Astrup, 1970; Charache et al., 1970; Eaton et al., 1970; Lenfant et al., 1970a; -

1970b; Brewer y Eaton, 1971; Brain, 1972).

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 una aproximación de la capacidad potencial de la oxigenación de los tejidos) y el nivel de 2,3-DPG estaban correlacionados negativamente. (Lenfant et al., 1970a). Este mismo fenómeno se observó en una muestra de pacientes con una variedad de desórdenes clínicos asociados con cambios en la curva de disociación de oxígeno (Eaton, 1970); Lenfant et al., 1970a; Minakami, 1975).

En condiciones caracterizadas por anemia severa, se han reportado incrementos de más de 150% en los niveles de 2,3-DPG, expresados como μ moles de 2,3-DPG/ml. de células rojas empacadas y hasta 300% como μ moles/g. de hemoglobina (Charache et al., 1970; Eaton et al., 1970).

En un estudio hecho en carneros en los que se indujo una anemia severa mediante la extracción de aproximadamente un 10% de la sangre total durante 4 días, se observaron incrementos de hasta 800% en los niveles de 2,3-DPG expresados como μ moles/g. de hemoglobina. Este incremento se dió cuando los valores de hemoglobina decrecieron a un 50% del nivel normal (Agar et al., 1977).

En otros experimentos semejantes, hechos también en carneros, en los que se produjo una única extracción del 20% de la

sangre total, se produjo un incremento de 1900% en los niveles de 2,3-DPG expresados como $\mu\text{moles/g.}$ de hemoglobina. (Studzinski, 1980).

En estudios realizados en humanos para determinar la respuesta de los niveles de 2,3-DPG ante un estado de hipoxia por exposición a grandes alturas, se encontró que había un incremento de los valores de este compuesto, en personas que habían ascendido desde el nivel del mar hasta los 4500 m. Se calculó que el incremento se empezó a dar a las seis horas de iniciado el ascenso. El caso contrario se observó cuando nativos del lugar de ascenso descendieron al nivel del mar. En el ascenso se encontró un corrimiento de la curva de disociación de oxígeno hacia la derecha (menor afinidad) y en el descenso el caso contrario (Lenfant et al., 1968; 1970b).

Experimentos equivalentes, hechos en ratas sometidas a una hipoxia, mediante la exposición a ambientes con una concentración de oxígeno disminuida, simulando con esto las condiciones de las grandes alturas; se observó que el 2,3-DPG se incrementó al disminuir la proporción de oxígeno en el aire del ambiente (Gerlach et al., 1970).

En otro trabajo, en el que se usaron ratas también y en el que la altura se simula con una cámara hipobárica, se observó un fenómeno semejante, es decir, cuando se disminuyó la presión en la cámara, se incrementó el 2,3-DPG después de 4 días bajo --

esas condiciones (Costa y Martín, 1976).

Importancia clínica del 2,3-DPG. El nivel de 2,3-DPG en los casos de pacientes con algún desorden clínico asociado con una hipoxia, es muy importante para diagnosticar la severidad del caso. Por otro lado, durante el almacenamiento de la sangre en ácido-citrato dextrosa (ACD), los niveles de 2,3-DPG disminuyen al mismo tiempo que aumenta la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, lo cual es de una gran importancia clínica. Si se dá a un paciente un volúmen considerable de sangre con una alta afinidad por el oxígeno, la cantidad de éste cedida a los tejidos puede ser comprometedora (Dawson, 1970; Shields et al., 1970; Papadopoulos et al., 1971).

Los eritrocitos transfundidos que han quedado completamente vacíos de 2,3-DPG, pueden recuperar el 50% de su nivel normal en 24 horas (Valeri y Fortier, 1970). Si se transfunde sangre exenta de 2,3-DPG, la recuperación de los valores normales puede no ser lo suficientemente rápida como para ser efectiva en un paciente severamente enfermo. Así que lo recomendable es transfundir sangre con al menos su nivel normal de 2,3-DPG (Papadopoulos et al., 1971).

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 les agrega fluoruro, adenosina y piruvato (Loos y Prins, 1971) ó glucosa, fosfato inorgánico e inosina (Valeri y -

Fortier, 1970). Estos nucleósidos no cargados (Adenosina e Inosina), pueden atravesar la membrana del eritrocito y su porción ribosa, quedar convertida en 2,3-DPG, mediante la vía colateral de las pentosas fosfato.

Una hidrólisis del nucleósido en el enlace base-azúcar, produce base libre y azúcar libre. Una fosforilación en el carbono #5 de la ribosa genera ribosa-5 fosfato, la cual en presencia de xilulosa-5 fosfato y por acción 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 (Brewer y Eaton, 1971; Brand y Quadflieg, 1977).

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

1).- La concentración de 2,3-DPG misma. Un mecanismo de retroinhibición opera sobre la 2,3-DPG mutasa (DPGM). Esta enzima presenta la característica de ser muy sensible a la inhibición por producto (Rose, 1968).

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 durante la glucólisis y como regulador de algunas enzimas de la misma, tales como la hexoquinasa, la piruvato quinasa y la 2,3-DPG mutasa. Para cumplir con estos papeles solamente se requiere de cantidades minúsculas de 2,3-DPG libre. Es por ello que -

las células no eritrocíticas poseen cantidades muy pequeñas de este metabolito (Rapoport y Luebering, 1950; Rose, 1968; 1970).

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

La 2,3-DPG mutasa de los eritrositos también es inhibida por producto, sin embargo, en estas células el 2,3-DPG interacciona con la desoxihemoglobina. Así que para inhibir a la DPGM-se requiere que esté presente una cantidad apropiada de 2,3-DPG libre.

Como la hemoglobina es el compuesto más abundante del -- eritrocito, para que el 2,3-DPG se encuentre libre, se requiere que haya una cantidad de 2,3-DPG un poco mayor a la de desoxihe moglobina. Esto explica los altos niveles de 2,3-DPG presentes en la mayoría de los mamíferos (Greenwald, 1925; Rapoport y -- Guest, 1941; Harkness et al., 1969; Bartlett, 1970; Bunn et al., 1974).

2).- Concentración de hidrogeniones (pH). En una situa-- ción de alcalosis, la velocidad de la glucólisis se encuentra -- incrementada y la actividad de la 2,3-DPG fosfatasa disminuida, siendo el resultado final una acumulación de 2,3-DPG. Esta es -- precisamente la situación que se presenta durante el ascenso a grandes alturas (Lenfant et al., 1968; 1970a; 1970b).

Si antes del ascenso se administra un fármaco (Diamox),- que mantenga al pH sanguíneo por debajo del normal, el 2,3-DPG-

no se incrementa, sin embargo la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno está disminuida (Lenfant et al., 1970b).

En la acidosis sucede lo contrario, es decir, la glucólisis se decrementa y la fosfatasa se activa, dando como resultado una disminución de la concentración de 2,3-DPG (Astrup, 1970; Lenfant et al., 1970a; Minakami et al., 1975; Badwey y Westhead, 1976).

Estudios in vitro hechos con eritrocitos intactos confirman la relación entre los niveles de 2,3-DPG y los cambios de pH (Rapoport et al., 1977a; 1977b).

De todos estos datos se puede inferir que existe una estrecha relación entre el pH y los posibles cambios en los niveles de 2,3-DPG, como lo demuestra el hecho de que manteniendo el pH por debajo de 7.4, previo al ascenso, el 2,3-DPG no se incrementa. Por otro lado la afinidad de hemoglobina por el oxígeno sí se encuentra disminuida, indicando que el pH y el 2,3-DPG son los responsables de los cambios de dicha afinidad en los humanos.

A los cambios de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno debido a variaciones en el pH se le llama efecto Bohr.

La disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno por efecto de los protones, se explica porque estos últimos estabilizan la forma tensa de la hemoglobina (desoxihemoglobina), siendo éste un efecto semejante al producido por el -

2,3-DPG (Perutz, 1978).

Este aparente sinergismo entre el 2,3-DPG y los protones, ha sido demostrado in vitro al medir la constante de velocidad de la desoxigenación de la hemoglobina humana (de alguna manera indica la velocidad con la que la forma tensa está siendo estabilizada), bajo condiciones de pH extracelular constante y 2,3-DPG variable o viceversa. Se encontró que a pH fisiológico constante, cantidades crecientes de 2,3-DPG aumentaban la velocidad hasta un máximo cuando las concentraciones de 2,3-DPG y hemoglobina eran iguales. Cantidades mayores de 2,3-DPG no tuvieron -- ningún efecto. Sin embargo cuando se permitió que el pH variara, cantidades de 2,3-DPG por arriba del equimolar aumentaron la velocidad de desoxigenación comparada con las condiciones de pH - constante.

El 2,3-DPG como ya se ha mencionado, 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 (Salhany et al., 1971).

Experimentos hechos con hemoglobina humana aislada, han confirmado la estrecha relación entre los niveles de 2,3-DPG y el efecto Bohr (Caldwell et al., 1971; De Bruin et al., 1971).

Todo lo anterior parece indicar que la magnitud de los cambios en la concentración de 2,3-DPG está limitada por varia-

ciones en el pH y por la inhibición por producto de la 2,3-DPG - mutasa (Brewer y Eaton, 1971; Badwey y Westhead, 1976; MacDonald, 1977).

3).- Concentración de fosfato inorgánico. En condiciones de hipofosfatemia, la concentración de 2,3-DPG es baja (Lichtman et al., 1971), y en hiperfosfatemia es alta (Card y Brain, 1973).

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 reducción en la concentración de este compuesto (MacDonald, 1977).

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 debido a que la velocidad de la glucólisis se encontraría disminuida (Brewer y Eaton, 1971).

Si la deficiencia se encuentra en una enzima de la parte final de la vía, tal como la piruvato quinasa, tendría un efecto inverso ya que los metabolitos tanto del ciclo del fosfoglicerato como después de éste, pero antes de la piruvato quinasa, se encontrarían acumulados (Brewer y Eaton, 1971; Badwey y Westhead, 1976; MacDonald, 1977).

El otro fosfato orgánico que se encuentra en concentraciones también altas aunque menores que las del 2,3-DPG, es el ATP-

(Bartlett, 1970; Petchow, 1977).

Debido a que se ha demostrado que en el humano el ATP -- también interacciona con la desoxihemoglobina, y de una manera semejante a como lo hace el 2,3-DPG (Benesch y Benesch, 1967; - Chanutin y Curnish, 1967), algunos autores han propuesto que lo que realmente regula la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, es la suma de las concentraciones de 2,3-DPG y ATP (Eaton - et al., 1970).

Ante un estado de anemia, en el cual la capacidad oxigenadora de la sangre se encontrara disminuida debido a un decremento de los niveles normales de hemoglobina, se esperaría -- una elevación en la concentración de ácido láctico, como respuesta a la anaerobiosis sufrida por los tejidos (Huckabee, 1958; Faulkner et al., 1970).

OBJETIVOS

Con base en los estudios que se han reportado sobre la respuesta de los niveles de 2,3-DPG ante la anemia en los humanos y los carneros, se ha tratado de generalizar que el mecanismo de respuesta en los mamíferos anémicos, consiste en incrementar los niveles de 2,3-DPG para reducir la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, que ésta lo ceda más eficientemente a los tejidos y de esa manera solventar el déficit de hemoglobina (Agar et al., 1977).

En el presente trabajo se pretende dentro de lo posible, estudiar de una manera sistemática, el (los) mecanismo (s) de la respuesta del 2,3-DPG ante la anemia experimental crónica en los mamíferos. Para ello se han determinado los valores normales de 2,3-DPG sanguíneo en un número considerable de especies de estos animales.

Al grupo de animales muestreado, ha sido posible colocar lo dentro de tres categorías, de acuerdo a dichos valores. Posteriormente se han escogido representantes de cada una de las categorías, se les ha inducido y mantenido una anemia por sangrado intracardíaco y se les ha determinado los cambios en el 2,3-DPG.

Con el fin de conocer la relación del 2,3-DPG con otros metabolitos afines, se han determinado los cambios en el ATP y lactato en los representantes de una de las categorías.

MATERIALES Y METODOS.

Colecta de la sangre. Las muestras de sangre fueron obtenidas de animales seleccionados en algunos zoológicos, bioterios, granjas, acuarios, circos, y algunos otros colectados en el campo y llevados al laboratorio.

La toma de muestras se realizó con jeringas de vidrio, -- previamente enjuagadas con ácido etilen-dinitrilo-tetracético, -- sal disódica (Tritriplex III, Merck), al 20% P/V 20gs., EDTA/100 ml. en NaCl 0.154M pH 7.3), como anticoagulante (Miale, 1972; -- Wintrobe et al., 1974). Una vez tomada la muestra, las jeringas fueron selladas inmediatamente y sumergidas en un baño de hielo para evitar posibles cambios en la concentración de 2,3-DPG. (Eaton et al., 1970).

Procesamiento de la sangre. De las jeringas sumergidas en el baño de hielo, se usaron alícuotas para determinar los parámetros hematológicos clásicos y la concentración de 2,3-DPG. El -- tiempo transcurrido desde la toma de la muestra hasta la determinación del 2,3-DPG en ningún caso excedió los 120 minutos.

Hematocrito. El volumen ocupado por las células empacadas después de centrifugar la sangre, expresado como porcentaje del volumen total (Miale, 1972; Wintrobe, 1974), conocido como hematocrito, fue determinado usando tubos capilares (1.15 x 75 mm, -- Propper Manufacturing Co., Inc.), sellándolos por uno de sus extremos. Los capilares fueron centrifugados durante 30 minutos --

a 3000 rpm en una centrifuga clínica Adams - Dynac con cabezal - de columpio CT - 1350. 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 ciano metahemoglobina (International -- Committe for..., 1963; van Assendelft, 1965), efectuando las lec turas en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II a 540 nm. El coefi- - ciente de extinción milimolar de la ciano metahemoglobina a esa longitud de onda se tomó como 44 y el peso molecular usado en -- los cálculos fue de 66000 (van Assendelft, 1965; Wintrobe, 1974). El mismo espectrofotómetro fue utilizado en los métodos que re-- quirieron su uso. Los resultados se expresan como gramos de hemo globina/100 ml. de sangre. Cuando fue necesario estos valores se transformaron a micromoles/ml., simplemente sabiendo que un gra- mo de hemoglobina es igual a 15.15 micromoles, asumiendo un peso molecular de 66000.

Conteo de células rojas. La cantidad de células rojas en las muestras de sangre, fue medida en un contador electrónico -- HAEMA - COUNT MK - 2S, diluyendo la sangre 1:80,000 en una solu- ción isotónica comercial (ISOTON II, Coulter de México), que con tiene en gs./l.: NaCl 7.93; EDTA 0.38; KCl 0.40; NaH_2PO_4 0.19; - Na_2HPO_4 1.95. Las diluciones fueron hechas por duplicado. Los re sultados son expresados en millones de células rojas/ mm^3 de san- gre.

Determinación del 2,3-DPG. Se prepararon filtrados libres de proteínas mezclando un volumen de sangre con 3 volúmenes de ácido tricloroacético (TCA) al 8% P/V a 4°C. Los extractos fueron analizados utilizando un estuche de reactivos de Sigma Chem. (Kit No. 35 UV). En este método el 2,3-DPG es hidrolizado enzimáticamente a 3-fosfoglicerato, este último fosforilado a 1,3-DPG y el 1,3-DPG reducido a gliceraldehído 3-fosfato. Midiendo el decremento de absorbancia a 340 nm que resulta cuando el NADH es oxidado a NAD^+ en la última reacción, se puede calcular la concentración de 2,3-DPG presente en la muestra de sangre original, sabiendo que las conversiones son estequiométricas y que el coeficiente de extinción milimolar del NADH es 6.22. Los resultados son expresados como μmoles de 2,3-DPG/ml. de sangre.

Determinación de ATP. Se prepararon filtrados libres de proteínas mezclando un volumen de sangre con un volumen de TCA al 12% a 4°C. En este caso los extractos se analizaron utilizando el estuche de reactivos correspondientes (Sigma Chem. 366 UV). En este método el ATP es usado por la fosfoglicerato quinasa para fosforilar al 3-fosfoglicerato y el 1,3-difosfoglicerato producido es reducido a gliceraldehído 3-fosfato en presencia de NADH. Midiendo el decremento de absorbancia a 340 nm por efecto de la oxidación del NADH y haciendo las consideraciones antes mencionadas, se puede calcular la concentración de ATP originalmente presente en la sangre. ($\mu\text{moles/ml.}$).

Determinación de ácido láctico. El filtrado en este caso-

se prepara mezclando un volumen de sangre con 2 volúmenes de -- TCA al 8% a 4°C. El método utilizado en este caso es también de Sigma Chem. (Kit No. 826 UV), y consiste en la conversión de -- lactato en piruvato por la lactado deshidrogenasa. Como la reac-- ción es altamente reversible, se utiliza un exceso de NAD^+ y el piruvato producido se atrapa con hidrazina. El incremento de ab-- sorbancia a 340 m, debido a la reducción del NAD^+ a NADH, se -- utiliza para calcular la concentración de ácido láctico origi-- nalmente presente. Los resultados se expresan como μ moles de -- ácido láctico/ml. de sangre.

Conteo de reticulocitos. Este parámetro se midió efec-- tuando una tinción supravital a una alícuota de sangre con azul de cresilo brillante al 1% en NaCl 0.154M; 0.46 gr. citrato -- trisódico (Atwater y Erslev, 1972). La tinción se hace mezclan-- do una gota del colorante con una gota de sangre, se deja repo-- sar durante 30 minutos en una cámara húmeda. Se hacen frotis de esta mezcla usando cubreobjetos de 2 x 2 cms. El porcentaje de-- reticulocitos fue determinado contando al microscopio aproxima-- damente 500 células por frotis por duplicado.

Inducción de la anemia. Animales representantes de cada-- uno de los grupos que se definirán en los resultados, alimenta-- dos a voluntad, fueron sangrados por punción cardíaca durante -- un período que osciló de los 12 - 19 días. el volumen de sangre extraído diariamente fue de 10 ml./Kg. de peso. En este caso los

filtrados libres de proteínas se hicieron inmediatamente después de la flebotomía.

Semipurificación de reticulocitos. Debido a que en general los reticulocitos son menos densos que los eritrocitos, al centrifugar una muestra de sangre, los eritrocitos quedan en el fondo del paquete celular y los reticulocitos en la parte superior del mismo. (Murphy, 1973; Hjelm, 1974).

Por otro lado durante la anemia, el número de reticulocitos se incrementa hasta alcanzar un máximo que se mantiene relativamente constante en los conejos (Valdés, 1977).

Una manera de llegar a purificar la población de reticulocitos, es aislar y recentrifugar la parte superior del paquete celular repetidamente (Valdés, 1977), de una muestra de sangre del día de la anemia en que se tiene el máximo porcentaje de aquellos.

Con el propósito de enriquecer las poblaciones de reticulocitos y de eritrocitos, se centrifugaron 10 ml. de sangre de animales anémicos (3,000 rpm, 10 min.), se separó el plasma y la capa de leucocitos y se resuspendió el tercio superior del paquete celular en su propio plasma al hematocrito original. A esta muestra se le llamó fracción enriquecida en reticulocitos.

El tercio inferior fue tratado de la misma manera y a esta muestra se le llamó fracción enriquecida en eritrocitos. A cada una de estas fracciones se le determinó el hematocrito, la

concentración de hemoglobina y la de ATP. Se realizó sólomente un paso de purificación porque ésto resultó ser suficiente para los fines que se pretendían y de paso se evitaban posibles cambios en la concentración de ATP.

Incubación de muestras de sangre para estudios in vitro

Se tomaron muestras de sangre con jeringas de vidrio previamente enjuagadas con EDTA al 20% y se determinaron la hemoglobina, hematocrito, 2,3-DPG y ATP inmediatamente después de la flebotomía.

Las muestras de sangre fueron vaciadas en matraces Erlenmeyer, sumergiéndolos inmediatamente en un baño de agua a 37°C, para transportarlos al laboratorio. Una vez en el laboratorio, los matraces fueron sumergidos en un baño con agitación y termo regulado a 37°C (Grant Instruments), e incubados por un tiempo máximo de 4 horas. Durante ese lapso de tiempo, se sacaron alícuotas cada 30 ó 60 minutos y se determinaron la hemoglobina, hematocrito, 2,3-DPG y ATP.

RESULTADOS Y DISCUSION

Es un hecho bien establecido que la concentración de 2,3-DPG es alta en la mayoría de los mamíferos que han sido estudiados (Greenwald, 1925; Rapoport y Guest, 1941; Harkness et al., 1969; Bartlett, 1970; Bunn et al., 1974; Costa y Miranda 1976; Petschow, 1977), aunque varía ampliamente entre las distintas especies. Se tienen datos en la literatura de la concentración milimolar de 2,3-DPG para poco menos de cien especies diferentes (Rapoport y Guest, 1941; Bartlett, 1970; Bunn et al., 1974). Sin embargo, dado que la concentración de hemoglobina también varía ampliamente en los mamíferos (Wintrobe et al., 1974; Eduard y Norman, 1976), creemos que un parámetro importante que se debe obtener es la relación de la concentración de 2,3-DPG con respecto a la de hemoglobina, en términos molares.

Dicha relación no ha sido reportada explícitamente excepto para el humano (Morpurgo et al., 1976), e implícitamente como μ moles de 2,3-DPG/g de hemoglobina en otras pocas especies (Agar et al., 1977; Studzinski, 1980; Bard y Shapiro, en prensa), siendo inclusive difícil de obtener combinando la información de distintas fuentes (Becerril, 1979).

Dada la posible inexactitud de los valores obtenidos con datos de diversas fuentes, se trató en este trabajo de obtener una panorámica general directa de la relación molar 2,3-DPG/

TABLA 1

COBAYO

Cavia porcellus

(5 machos)

Cobayo No.	<u>µmoles de 2,3-DPG</u> ml. de sangre	<u>µmoles Hb/ml.</u>	Rel. mol. DPG/Hb
1	3.0223	2.5159	1.201
2	2.9414	2.4636	1.194
3	2.4486	2.2909	1.069
4	2.8528	2.5364	1.125
5	2.5236	2.5545	0.989
	\bar{X} 2.7580	2.4723	1.116
	s 0.2565	0.1069	0.089
	CV 9.3000	4.3300	7.980
(4 hembras)			
1	2.7412	2.4450	1.121
2	3.3572	2.9068	1.154
3	3.3880	2.8533	1.187
4	2.8182	2.3970	1.175
	\bar{X} 3.0761	2.6500	1.159
	s 0.3440	0.2666	0.028
	CV 11.1820	10.0600	2.490

Hb en los mamíferos. Para tal fin se obtuvieron muestras sanguíneas del mayor número posible de especies distintas. Sin embargo, puesto que en la mayoría de los casos, se contaba con uno o dos ejemplares por especie, era imprescindible el efectuar un trabajo previo para estudiar la posible variación intraespecífica de dicha relación.

Con el fin de conocer la variación intraespecífica de los valores normales de 2,3-DPG, se midieron los niveles de este metabolito en un número determinado de animales de las especies más asequibles. En algunas de ellas, se hicieron mediciones para ambos sexos.

En las tablas 1-5, se muestran los resultados de la determinación de los valores normales de dicho metabolito en una serie de tales especies. En estas tablas los valores se expresan como μ moles de 2,3-DPG/ml. de sangre. el valor de hemoglobina (gs./100 ml. de sangre), ha sido transformado a μ moles/ml. para tener la relación de moles de 2,3-DPG por mol de hemoglobina (relación molar).

En la tabla 1, se presentan los valores normales para los cobayos. En la parte superior de la tabla se muestran los valores de las concentraciones de 2,3-DPG y hemoglobina, en μ moles/ml. de sangre, cuya relación da el número de moles de 2,3-DPG por mol de tetrámeros de hemoglobina y de aquí en adelante se le referirá como relación molar 2,3-DPG/Hb. En esta parte superior-

se presentan los valores de 5 machos y en la parte inferior los de 4 hembras. Como se puede observar, en los cobayos la relación molar 2,3-DPG/Hb se mantiene constante, tanto en los machos como en las hembras.

Es notable que en el caso de las hembras, la relación molar se mantiene muy constante a pesar de que los valores de hemoglobina y de 2,3-DPG varían alrededor de un 10%. Este hecho indica que existe una estrecha relación entre ambos parámetros. De hecho se puede observar que en los casos en que la hemoglobina es alta lo es también el 2,3-DPG. A su vez se observa lo propio en el caso opuesto. Dado que la hemoglobina alberga al 2,3-DPG, es de esperarse que la concentración de aquella determine la de éste. El mismo fenómeno se observa en otras especies según se muestra más adelante. A pesar de las variaciones en los niveles de hemoglobina y 2,3-DPG, es evidente que no existe un dimorfismo sexual en los cobayos, en cuanto a la relación 2,3-DPG/Hb.

En la tabla 2, se presentan los datos correspondientes a 8 hámsteres machos, en los cuales nuevamente es evidente que la relación molar se mantiene constante. Al parecer por los datos de los cobayos y de los hámsteres, una variación hasta de un 8% sería una variación normal.

En la tabla 3, se muestran los valores encontrados en la rata de laboratorio. En este caso se muestrearon 6 hembras y 6-

TABLA 2

Hámster No.	HAMSTER $\mu\text{moles DPG/ml}$	<u>Mesocricetus auratus</u> $\mu\text{moles Hb/ml.}$	(8 machos) 2,3-DPG/Hb
1	3.3418	2.5568	1.3070
2	3.3649	2.8863	1.1658
3	3.9347	2.9520	1.3328
4	3.6450	2.7790	1.3117
5	3.3260	2.5400	1.3091
6	3.3990	2.4750	1.3735
7	4.0460	2.7130	1.4911
8	3.5180	2.6700	1.3177
	\bar{x} 3.5719	2.6965	1.3261
	s 0.2800	0.1699	0.0895
	CV 7.8530	6.3020	6.7535

TABLA 3

RATA DE LABORATORIO

Rattus norvegicus

(6 hembras)

Rata No.	μ moles DPG/ml.	μ moles Hb/ml.	DPG/Hb
1	2.564	2.434	1.053
2	2.491	2.338	1.065
3	2.529	2.427	1.040
4	3.114	2.143	1.453
5	2.256	2.225	1.013
6	3.603	2.434	1.480
	\bar{X} 2.759	2.333	1.184
	s 0.500	0.124	0.219
	CV 18.149	5.318	18.536
(6 machos)			
1	3.896	2.477	1.573
2	3.804	2.418	1.573
3	4.189	2.668	1.570
4	4.489	2.495	1.789
5	4.335	2.604	1.669
6	4.181	2.514	1.663
	X 4.149	2.529	1.640
	s 0.259	0.091	0.090
	CV 6.248	3.597	5.470

machos. En esta tabla se puede observar que estos animales tienen un claro dimorfismo sexual en cuanto a los valores de la relación molar, como lo demuestra el hecho de que en las hembras - el promedio de dicha relación es 1.184 mientras que en los machos es de 1.64. Por otro lado en el caso de las hembras se observa un fenómeno de variación muy marcada en los valores normales de 2,3-DPG, mientras que los correspondientes de hemoglobina son mucho menos variables, lo cual se ve reflejado en la variación de la relación molar. Por los valores de las ratas 4 y 6, tal parece que la muestra de ratas hembras estaba constituida por dos subpoblaciones, una con una relación molar de aproximadamente 1 y otra de 1.4 - 1.5. En el caso de los machos las variaciones de 2,3-DPG y hemoglobina son mínimas, lo cual a su vez minimiza la variación de la relación molar.

La variación de la relación molar en las hembras quizá - se deba a una variación determinada genéticamente, como ya ha sido reportado por algunos autores (Brewer y Eaton, 1971; Noble y Tanaka, 1979; 1981).

En la tabla 4, se muestran los datos correspondientes al ratón de los volcanes. En este caso se determinaron los valores de 6 machos, en los cuales se observa una variación importante - introducida por el organismo número 3, el cual tiene una relación de 1.787, mientras que los otros cinco ratones poseen un valor próximo a 1.3. De estos resultados surge la pregunta de -

TABLA 4

RATON DE LOS VOLCANES

Neotomodon alstoni

(6 machos)

Ratón No.	μ moles DPG/ml.	μ moles Hb/ml.	DPG/Hb
1	2.752	2.066	1.3324
2	3.022	2.284	1.3233
3	4.897	2.741	1.7866
4	3.353	2.598	1.2907
5	2.618	2.079	1.2592
6	3.260	2.379	1.3707
	\bar{X} 3.317	2.357	1.3938
	s 0.824	0.274	0.1961
	CV 24.840	11.588	14.0700

que tan ampliamente distribuido se encuentra entre los roedores el fenómeno de la existencia de cepas de animales con valores de 2,3-DPG determinadas genéticamente.

En la tabla 5 se presentan los datos para el conejo doméstico (6 hembras y 3 machos), de los cuales se puede decir que no se presenta un dimorfismo sexual aparente y que la relación molar en ambos sexos permanece aceptablemente constante y próxima a un valor de 2 moles de 2,3-DPG/mol de hemoglobina.

De todos los datos anteriores se puede afirmar que en los animales en los que no se presenta algún tipo de polimorfismo en cuanto a los valores de la relación molar 2,3-DPG/Hb, ésta es una constante característica de la especie en cuestión. Por los datos de la rata de laboratorio y del ratón de los volcanes, en los cuales se observa un marcado polimorfismo de la relación molar 2,3-DPG/Hb, se ve que es necesario realizar estudios detallados en las especies en que éste se presenta, con el objeto de precisar este fenómeno.

En la tabla 6 se resumen los datos de la determinación de los valores normales de 2,3-DPG en 53 especies de mamíferos, representantes de 11 de los 20 órdenes existentes. Dichos valores se expresan en términos de la relación molar 2,3-DPG/Hb. Con el fin de obtener datos lo más cercanos a los valores reales, se tomaron una serie de precauciones. Por ejemplo se evitó al máximo el uso de anestésicos para inmovilizar a los animales,

TABLA 5

Conejo No.	CONEJO		<u>Orvctolaqus cuniculus</u>	
	$\mu\text{moles DPG/ml.}$	$\mu\text{moles Hb/ml.}$	(6 hembras)	
1	4.913	2.483	1.978	
2	4.720	2.164	2.181	
3	4.535	2.421	1.873	
4	4.177	2.203	1.896	
5	3.819	2.173	1.757	
6	4.489	2.423	1.853	
	\bar{X} 4.442	2.311	1.923	
	s 0.392	0.146	0.145	
	CV 8.820	6.320	7.540	
			(3 machos)	
1	4.374	2.125	2.058	
2	4.197	2.098	2.000	
3	4.481	2.223	2.017	
	X 4.351	2.149	2.025	
	s 0.144	0.066	0.030	
	CV 3.306	3.060	1.472	

TABLA 6

Nombre común Nombre científico	(No;sexo)	Rel.mol. DPG/Hb	Conc.mM DPG	Orden	Familia
Venado cola blanca <u>Odocoileus virginianus</u>	(1,H)	0.016	0.1004	Artiodactyla	Cervidae
Cabra <u>Capra hircus</u>	(1;M)	0.018	0.1092	"	Bovidae
Carnero <u>Ovis aries</u>	(1,M)	0.018	0.1037	"	"
Vaca <u>Bos taurus</u>	(2,M) (2,H)	0.039 0.065	0.2356 0.3939	"	"
Carnero de Turquía <u>Ovis sp.</u>	(1,M) (1,H)	0.048 0.098	0.2776 0.6366	"	"
Gamo <u>Dama dama</u>	(1,M)	0.061	0.3554	"	Cervidae
Wapiti <u>Cervus canadensis</u>	(1,M)	0.084	0.5320	"	"
Carnero de las montañas <u>Ovis canadensis</u>	(2,M)	0.086	0.5763	"	Bovidae
León africano <u>Panthera leo</u>	(2,M)	0.125	0.7210	Carnivora	Felidae
Ocelote <u>Felis pardalis</u>	(1,M)	0.128	0.9710	"	"

Tigre	(2, M)	0.137	0.9820	Carnivora	Felidae
<u>Panthera tigris</u>	(1, H)	0.143	1.0070		
Puma	(1, M)	0.160	1.2360	Carnivora	Felidae
<u>Felis concolor</u>					
Leopardo	(1, M)	0.170	1.2020	"	"
<u>Panthera pardus</u>					
Gato	(4, M)	0.186	1.1180	"	"
<u>Felis catus</u>					
Elefante indio	(1, H)	0.784	6.2180	Proboscidea	Elephantidae
<u>Elephas indicus</u>					
Delfín pico de botella	(1, M)	0.823	4.8760	Cetacea	Delphinidae
<u>Tursiops truncatus</u>	(1, H)	0.703	4.3650		
Liebre de la Patagonia	(1, M)	0.826	5.5210	Rodentia	Cavidae
<u>Dolichotus patagoum</u>					
Guanaco	(1, H)	0.906	8.1200	Artiodactyla	Camelidae
<u>Lama guanicoe</u>					
Humano	(5, M)	0.945	6.0800	Primates	Hominidae
<u>Homo sapiens</u>	(6, H)	0.979	6.2760		
Macaco rabón	(2, H)	0.951	6,0110	"	Cercopithecidae
<u>Macaca arctoides</u>					
Armadillo de nueve bandas	(1, M)	1.020	7.5000	Edentata	Dasyproctidae
<u>Dasyprocta novemcinctus</u>					

Papión sagrado <u>Papio hamadryas</u>	(5,H)	1.070	7.2500	Primates	Cercopithecidae
Cobayo <u>Cavia porcellus</u>	(5,M) (4,H)	1.115 1.159	6.3100 6.3750	Rodentia	Cavidae
Caballo <u>Equus caballus</u>	(2,M) (2,H)	1.134 1.317	8.7570 9.5210	Perissodactyla	Equidae
Zorra norteña <u>Vulpes macrotis</u>	(1,M)	1.147	7.6510	Carnivora	Canidae
Elefante africano <u>Loxodonta africana</u>	(2,H)	1.154	9.0970	Proboscidea	Elephantidae
Tuza <u>Pappogeomys merriami</u>	(3,H)	1.155	7.5750	Rodentia	Geomyidae
Llama <u>Lama glama</u>	(1,M)	1.237	9.5750	Artiodactyla	Camelidae
Perro <u>Canis familiaris</u>	(2,M) (2,H)	1.284 0.904	_____	Carnivora	Canidae
Pecari de collar <u>Tayassu tajacu</u>	(1,H)	1.297	7.7330	Artiodactyla	Tayassuidae
Hámster dorado <u>Mesocricetus auratus</u>	(8,M)	1.326	7.7970	Rodentia	Cricetidae
Mono verde <u>Cercopithecus aetiops</u>	(2,M)	1.345	7.8520	Primates	Cercopithecidae

Mono araña <u>Ateles geoffroyi</u>	(1,M)	1,364	8.5050	"	Cebidae
Coyote <u>Canis latrans</u>	(1,M)	1.371	10.1000	Carnivora	Canidae
Ratón de los volcanes <u>Neotomodon alstoni alstoni</u>	(6,M)	1.394	8.4700	Rodentia	Cricetidae
Martucha <u>Potos flavus</u>	(1,H)	1.457	8.4930	Carnivora	Procyonidae
Murciélago zapotero <u>Artibeus lituratus intermedius</u>	(2,M)	1.476	8.7000	Quiroptera	Phyllostomatidae
Mono aullador <u>Alouatta palliata</u>	(1,M)	1.488	7.8980	Primates	Cebidae
Vampiro de patas pelonas <u>Desmodus rotundus murinus</u>	(1,M)	1.532	_____	Quiroptera	Desmodontidae
Conejo de los volcanes <u>Romerolagus diazi</u>	(1,M) (4,H)	1.570 1.578	_____ 10.683	Lagomorpha	Leporidae
Zorra gris <u>Urocyon cinereoargenteus</u>	(1,M)	1.572	_____	Carnivora	Canidae
Rata de campo <u>Neotoma mexicana torcuata</u>	(2,M)	1.602	8.7710	Rodentia	Cricetidae
Aguti <u>Dasyprocta mexicana</u>	(2,M)	1.621	9.1580	"	Dasyproctidae

Rata de laboratorio	(6,M)	1.640	8.4350	"	Muridae
<u>Rattus norvegicus</u>	(6,H)	1.184	6.1910		
Cacomixtle	(1,M)	1.645	10.1320	Carnivora	Procyonidae
<u>Bassariscus astutus</u>					
Mono rhesus	(1,M)	1.706	10.0240	Primates	Cercopithecidae
<u>Macaca mulatta</u>					
Mucielago de charreteras	(1,M)	1.752	_____	Quiroptera	Phyllostomatidae
<u>Sturnira lilium parvidens</u>					
Lobo marino	(1,M)	1.760	11.9600	Prinnípedos	Otaridae
<u>Zalophus californianus</u>	(1,H)	2,114	13.8300		
Conejo doméstico	(3,M)	2.025	10.2470	Lagomorpha	Leporidae
<u>Oryctolagus cuniculus</u>	(6,H)	1.923	10.1330		
Coatí	(2,M)	2.155	12.0710	Carnivora	Procyonidae
<u>Nasua narica</u>					
Mapache	(1,M)	2.157	_____	"	"
<u>Procyon lotor</u>					
Cerdo	(2,H)	2.186	13.081	Artiodactyla	Suidae
<u>Sus scrofa</u>					
Ratón de laboratorio	(7,M)	2.335	_____	Rodentia	Muridae
<u>Mus musculus</u>					

H = Hembra M = Macho
 _____ Valor no determinado.

las muestras se procesaron lo más rápidamente posible, la sangre se transportó en jeringas selladas y sumergidas en un baño de hielo. Por lo que respecta a los parámetros hematológicos, éstos se cotejaron con los disponibles en la literatura (Wintrobe et al., 1974; Eduard y Norman, 1976). Sin importar el número de ejemplares por especie, todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Los valores han sido arreglados en orden creciente de la relación molar 2,3-DPG/Hb, aunque en los casos en que se muestrearon ambos sexos, se ubicó primero el valor de los machos. También se presentan los valores de la concentración de 2,3-DPG con respecto al volumen del paquete celular (milimoles de 2,3-DPG/litro de células rojas empacadas).

Como se puede apreciar, el orden cambiaría si éste se hiciera en base a la concentración milimolar de 2,3-DPG. La razón de la variación, es que este parámetro depende del número de células rojas, del volumen corpuscular promedio y de la concentración corpuscular promedio de 2,3-DPG, presentes en un volumen del paquete celular. Es por ello que se decidió manejar el valor de la relación molar para hacer el ordenamiento. La relación molar no depende más que de las concentraciones de 2,3-DPG y hemoglobina presentes en un volumen de sangre.

Debido a que se han reportado cambios en la concentración de 2,3-DPG en función de la altitud (Ienfant et al., 1970b;

Morpurgo et al., 1976), y los resultados de la tabla 6 se obtuvieron de animales residentes en la Ciudad de México (2200 m.s.n.m.) se decidió comparar los valores presentes en dicha tabla con los reportados en la literatura para las especies en común, según Bunn et al., 1974.

Los resultados se presentan en la figura 1, en la cual se puede ver que existe una correlación alta (0.969, $n=13$, $p < 0.01$), aunque también se observa que hay una ligera tendencia a ser más altos los valores reportados en la tabla 6. La tendencia hacia valores más altos se infiere debido a que una correlación de 100% (situación teórica), indica una línea que pasa por el origen y con una pendiente de 1.000. No obstante de que la pendiente de la figura 1 es prácticamente de uno (1.047), el intercepto no es cero, sino 0,518.

De cualquier manera, la correlación es suficientemente alta (0.969) y la desviación con respecto a la línea teórica es mínima, por lo que se puede decir que los valores reportados en la tabla 6, son comparables a los reportados por Bunn et al., para las especies en común.

Aunque no se menciona la altura del lugar en que se realizó el trabajo de Bunn et al., la altura de la Ciudad de México no parece ser determinante para la comparación. De hecho los efectos de la altura sobre los niveles de 2,3-DPG, se hacen notables por arriba de los 3,500 m. (Lenfant et al., 1970b).

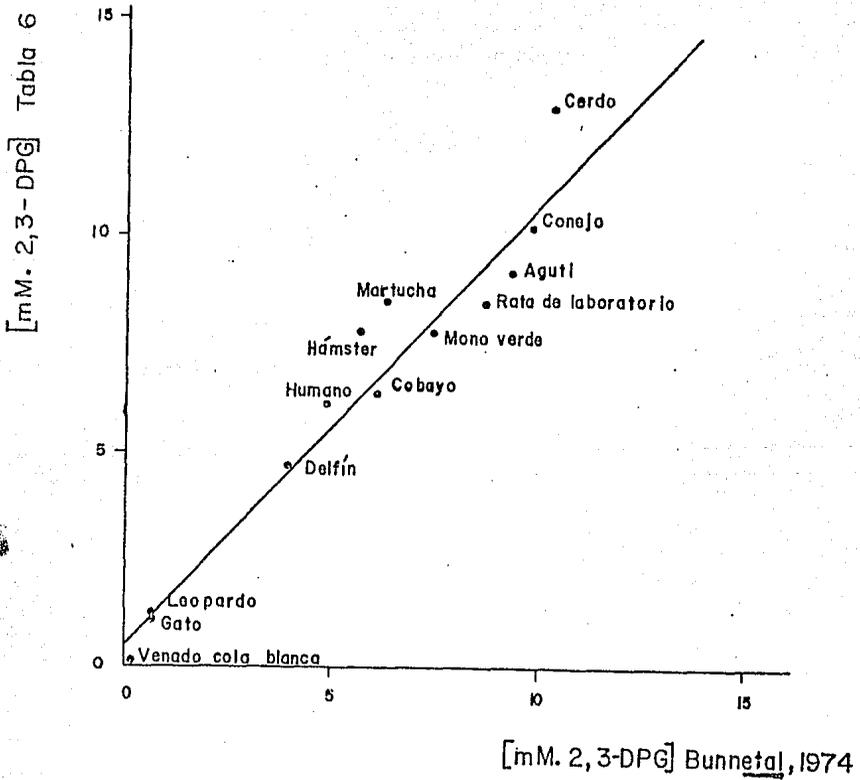


Figura 1. Correlación entre los valores de la concentración milimolar de 2,3-DPG reportados por Bunn et al., 1974 (abscisas), y los que se presentan en la tabla 6 (ordenadas), de las especies comunes en ambos trabajos. La pendiente es 1.047, el intercepto es 0.518 y el coeficiente de correlación 0.969 para una $p < 0.01$ y n de 13.

Con el fin de conocer la distribución de las 53 especies de mamíferos que se presentan en la tabla 6, con respecto al valor de la relación molar 2,3-DPG/Hb, se determinó el número de ellas que se situaban en un margen de 0.1 unidades de relación molar. Este valor se graficó a manera de un histograma de barras en las ordenadas. En las abscisas se colocaron los valores de la relación molar desde cero hasta 2.5 (Fig.2)

Cuando se grafica el número de especies que caen dentro de un intervalo de 0.1 unidades de la relación molar contra esta última, según se muestra en la figura 2, se puede apreciar que las 53 especies de mamíferos que se analizan en el presente trabajo, conforman 3 grupos en cuanto a los valores normales de la relación molar 2,3-DPG/Hb.

El primer grupo, con una relación molar de 0.0 - 0.2, incluye una serie de artiodáctilos de las familias Cervidae y Bovidae (0.0-0.1 tabla 6) y a una serie de carnívoros de la familia Felidae (0.1-0.2).

Un segundo grupo que no se caracteriza por integrar miembros de algún orden o familia en particular, sino por el contrario, de una composición diversa. Los valores de este grupo oscilan entre 0.7 y 1.8, con una distribución aparentemente normal (campana de Gauss), con una media alrededor de una relación molar de 1.3

Por último, un tercer grupo que tampoco se caracteriza -

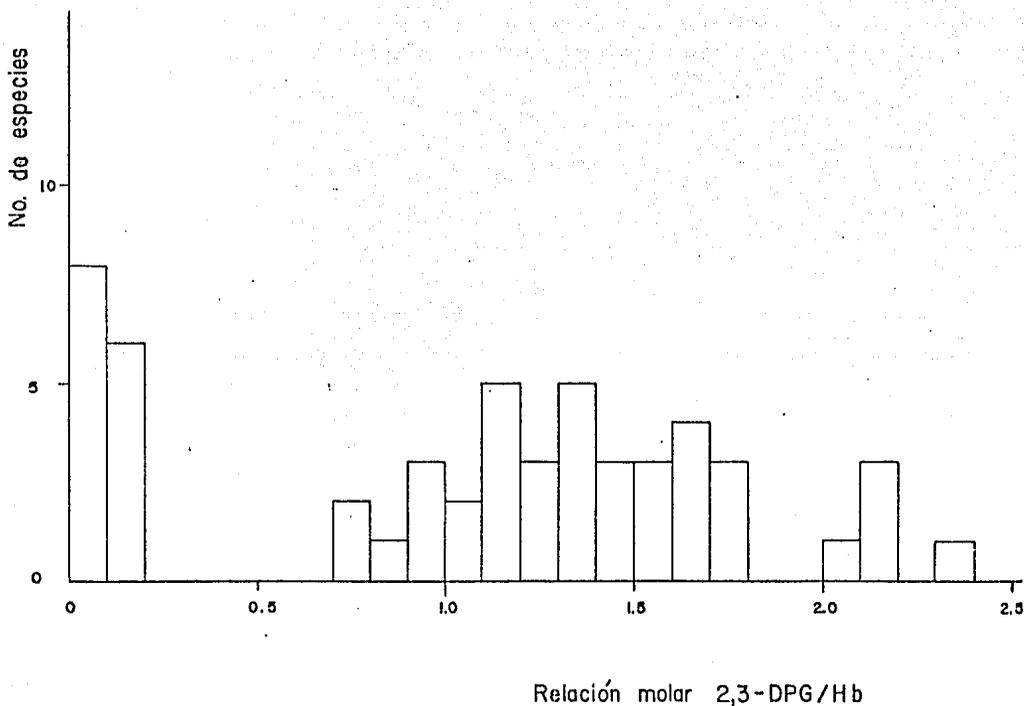


Figura 2. Distribución de los mamíferos muestreados, con respecto a los valores normales de la relación molar 2,3-DPG/Hb.- Se grafica el número de especies dentro de un intervalo de 0.1 unidades de la relación molar contra la relación molar 2,3-DPG /Hb.

por conjuntar familias u órdenes determinados, con relaciones molares que van desde 2 hasta 2.4.

Es interesante observar que hay un vacío de especies con relaciones molares entre 0.2 y 0.7, el cual no se puede decidir si se trata de una situación natural o es que no se han muestreado suficientes especies de mamíferos. No obstante tomando los datos de la literatura para la concentración milimolar de 2,3-DPG por un lado y los de hemoglobina y hematocrito por otro, para algunos animales que inclusive en este trabajo no se muestrearón, se pudo estimar la relación molar 2,3-DPG/Hb, observándose un hueco similar (Becerril, 1979). Tomando ésto en consideración, al parecer se trata de un fenómeno natural. De hecho la muestra de la tabla 6 representa más del 1% de las especies existentes y más del 50% de los órdenes totales, lo cual es bastante considerable.

La falta de especies en esta parte, se puede explicar en base a los estudios que se han hecho sobre las secuencias de las hemoglobinas de algunos animales pertenecientes al primer grupo. Entre las hemoglobinas de las familias Bovidae y Cervidae se han detectado deleciones de uno o más residuos del extremo amino de las cadenas beta (referencia y comunicación personal citadas en Bunn et al., 1974). Debido a un incremento de la distancia intermolecular entre los extremos amino de las cadenas beta, el 2,3-DPG no puede formar los enlaces salinos que estabilizan la estructura tensa (Perutz, 1970).

Por otro lado, entre los felinos se ha detectado una acetilación del grupo amino terminal de las cadenas beta (Bunn, - 1971), la cual también impide ampliamente la interacción con el 2,3-DPG. Si bien en los felinos el efecto es menor (tienen una concentración mayor de 2,3-DPG), éste ha sido igualmente importante.

Estos datos evidencian muy claramente que la hemoglobina es la que determina la concentración de 2,3-DPG, es decir, en estos animales en los que se han dado cambios en las cadenas beta, que han derivado en una baja reactividad con el 2,3-DPG, éste se encuentra consecuentemente en muy baja concentración. Al parecer por estos datos, en condiciones normales se esperaría en encontrar animales con una concentración mínima de 2,3-DPG en funcción de los cambios en las cadenas beta. Por otro lado, se debe rían encontrar animales con una concentración alta en función de una interacción adecuada de sus hemoglobinas con el 2,3-DPG. Esta concentración alta estaría próxima a una relación molar de 1:1, en concordancia con los estudios para el humano (Benesch et al., 1968; Benesch y Benesch, 1970), en función de la estructura de la hemoglobina (Arnone, 1972). La característica tetramérica de la hemoglobina podría estar favoreciendo la existencia de sitios adicionales de interacción con el 2,3-DPG, distintos al del eje de simetría de la cavidad central, que explicaran las relaciones molares de 2 y más que presentan los animalos.

les del tercer grupo. De hecho, se han reportado relaciones molares hasta de 3:1 en anemias severas en el humano (Charache et al., 1970; Eaton et al., 1970).

La diferencia de los mecanismos que han llevado a las hemoglobinas de los animales del primer grupo hacia una baja reactividad con el 2,3-DPG, es un claro ejemplo de una evolución convergente entre los rumiantes y los felinos, en cuanto a la regulación de la hemoglobina.

Respuesta del 2,3-DPG a la anemia. Uno de los objetivos fundamentales del presente trabajo es estudiar (dentro de lo posible) de una manera sistemática, el mecanismo o mecanismos de la respuesta del 2,3-DPG a la anemia inducida en los mamíferos.

Una primera parte ha consistido en tener una panorámica -- directa de la distribución de los valores normales de la relación molar 2,3-DPG/Hb en estos animales (tabla 6, figura 2). Esta primera parte, ha permitido tener una idea general de la ubicación de dichos animales en cuanto al contenido sanguíneo de 2,3-DPG, -- para posteriormente en una segunda fase de esta investigación, conocer la generalidad o particularidad de los mecanismos involucrados en los cambios de la concentración de dicho metabolito ante un estado de hipoxia, ocasionado por una sangría crónica.

Sabiendo que existe una gradación de los valores normales de 2,3-DPG, la pregunta inmediata es cual será el patrón de respuesta de la concentración de este metabolito ante una anemia cró-

nica inducida.

Para contestar a esa interrogante, se decidió inducir y mantener la anemia en una serie de animales de alguna especie - representante de cada uno de los grupos que ya se han discutido. Las especies representantes de los grupos, en el orden en que fueron presentados han sido respectivamente:

Gato doméstico. El interés de estudiar este representante del primer grupo consistió en que se trata de una especie -- que pertenece al segundo subgrupo de este primer grupo. Conociendo la respuesta de los gatos se tiene la del grupo ya que existen en la literatura los datos para el carnero (Agar et al., 1977), que es un representante del primer subgrupo.

En este caso se trabajó con 4 machos adultos de 2-3 Kg - de peso, con una relación molar promedio de 0.186.

Cobayo. El interés de estudiar a los cobayos estuvo relacionado con el hecho de que estos animales tienen una relación molar semejante a la de los humanos (1.14 y 0.96 respectivamente), por lo que al conocer la respuesta de los cobayos se puede comparar dicha respuesta con la de los humanos en condiciones - análogas de anemia. Por otro lado 1.14 está muy próximo a 1,3, - que es la relación molar promedio del grupo. Se utilizaron 5 machos adultos de 0.8 - 1,1 Kg.

Conejo. El interés de estudiar este representante del -- tercer grupo, estuvo basado en que ya se tenían estudios pre-

vios en los que se demostró que la relación molar no cambia durante la anemia.

Al saber que la relación molar 2,3-DPG/Hb no cambia, se determinaron otros metabolitos afines al 2,3-DPG que pudieran dar una explicación a este hecho. Se usaron 3 machos adultos de 2-3 Kg de peso.

Número de células rojas. El efecto de la remoción diaria de 10 ml./Kg de peso sobre el número de células rojas de los gatos, cobayos y conejos se muestra en las figuras 3,4 y 5 respectivamente. Como se puede apreciar, en las 3 especies, el número de células rojas decrece rápidamente en los primeros cuatro días de sangrado. A partir del quinto día, se nota una atenuación de la caída, hasta que a partir del octavo día aproximadamente, hay una tendencia a estabilizarse, lográndose ésto a partir del día-10. En el equilibrio, los decrementos en este parámetro son: gatos, 53%; cobayos 56% y conejos 62%.

La explicación de la cinética del número de células rojas en las tres especies estudiadas, es que en condiciones de equilibrio normales, el número de eritrocitos que se produce es pequeño y está determinado por el número de éstos que es removido de la circulación. Se calcula que en los humanos, el recambio normal diario de células rojas es a lo sumo del 1% (Giblett et al., -1956).

Al producirse la primera remoción de un volumen considerable de sangre, esto representa un estímulo para la producción de

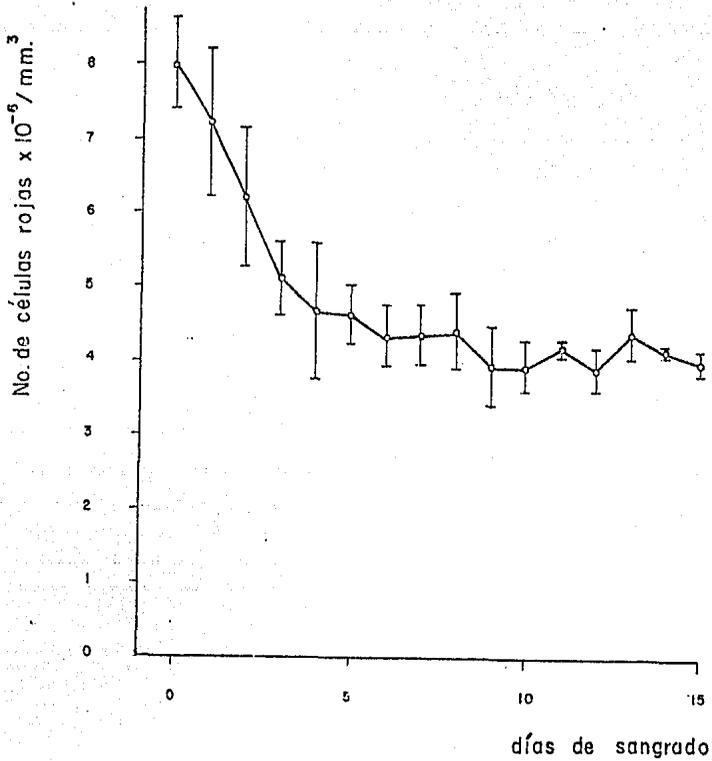


Figura 3. Efecto de la remoción diaria de un volumen constante de sangre (10 ml./Kg. de peso), sobre el número de células rojas de los gatos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea continua une los valores promedio obtenidos de 3-4 determinaciones por duplicado por día.

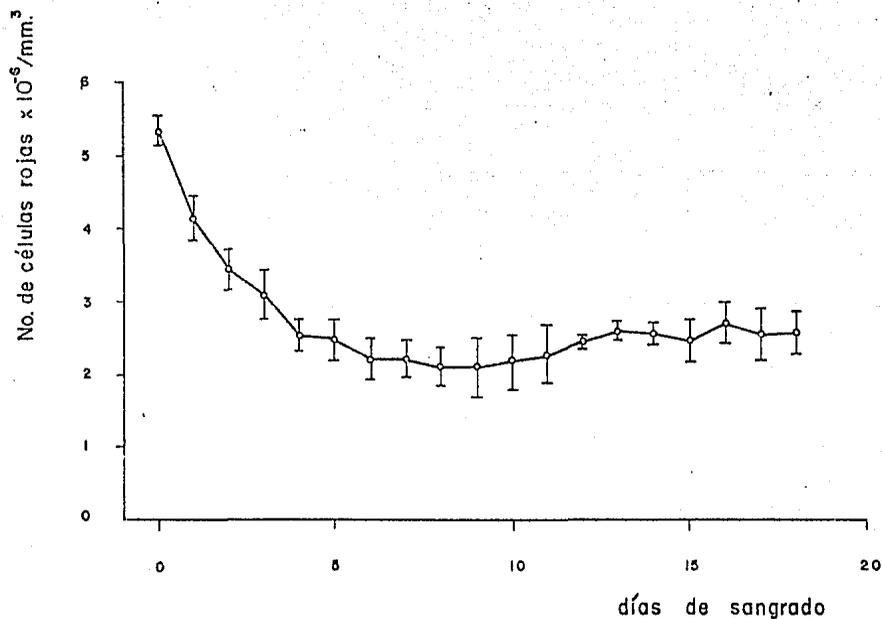


Figura 4. Efecto de la remoción diaria de un volumen constante de sangre (10 ml./Kg. de peso), sobre el número de células rojas de los cobayos. Se muestra la media (o) y la desviación -- estándar (I). La línea sólida une los valores promedio obtenidos de 4-5 determinaciones por duplicado por día.

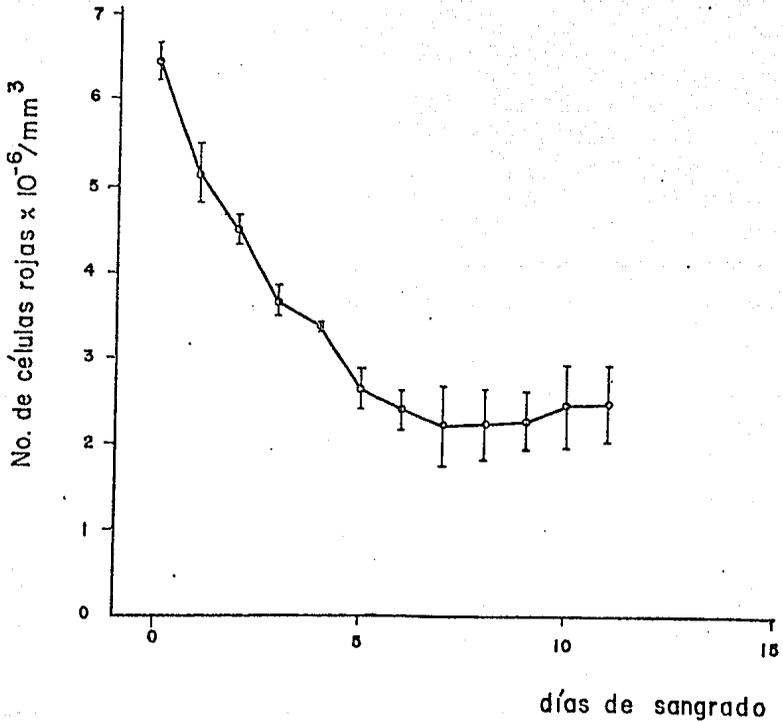


Figura 5. Efecto de la remoción diaria de un volumen constante de sangre (10 ml./Kg de peso), sobre el número de células rojas de los conejos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). la línea continua une los valores promedio de 2-3 determinaciones por duplicado por día.

células rojas. Dado que se está retirando de la circulación un número de eritrocitos mucho mayor que el que normalmente se produce, al mantener el estímulo, se incrementa la respuesta, hasta que la respuesta iguala al estímulo. Cuando esto sucede, se llega a un nuevo equilibrio en donde el mismo número de células rojas que se extrae es el que se produce, aunque evidentemente amplificado, comparado con el proceso normal.

Hematocrito. La respuesta del paquete celular presente en un volumen constante de sangre, se muestra en las figuras 6, 7 y 8 para los gatos, cobayos y conejos respectivamente.

Al igual que el número de células rojas, el hematocrito decrece rápidamente en los primeros cuatro días, a partir del cual se da una fase de recuperación cuya magnitud es particular de cada especie. La cinética de la recuperación es también particular, por ejemplo en los gatos se produce la recuperación a partir del día 6, llegando a su máximo el día 8, a partir del cual se estabiliza. En los cobayos la respuesta es semejante aunque hay un desfase de 4 días en la fase de recuperación. Finalmente en los conejos se da una respuesta más rápida, llegándose al equilibrio en el día 11, comparada con el día 15 de los cobayos.

La caída más lenta del hematocrito, comparada con la del número de células rojas, junto con la fase de recuperación, cuando el número de éstas tiende a estabilizarse, indica que el volumen corpuscular promedio (hematocrito/no. de células en un ml.

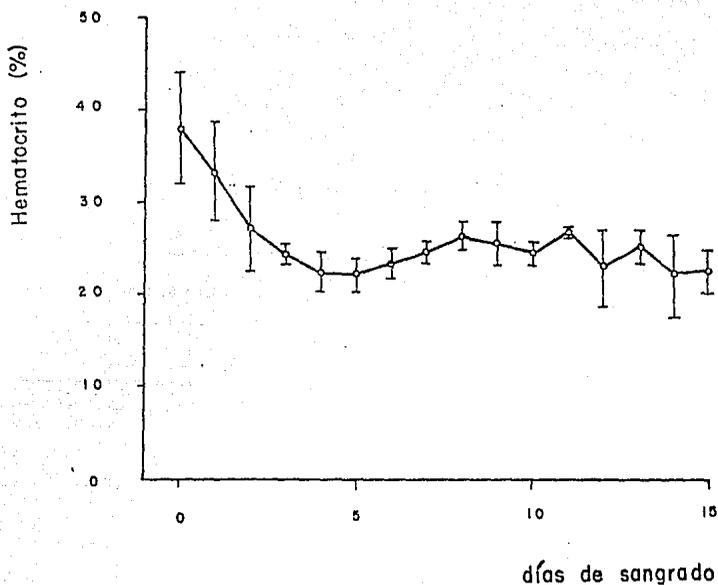


Figura 6. Variación del hematocrito en respuesta a la inducción de anemia por remoción diaria de un volumen constante de sangre en los gatos. Se muestra la media (o) y la desviación-estándar (I). La línea continua une los valores promedio de 3-4 determinaciones por duplicado por día.

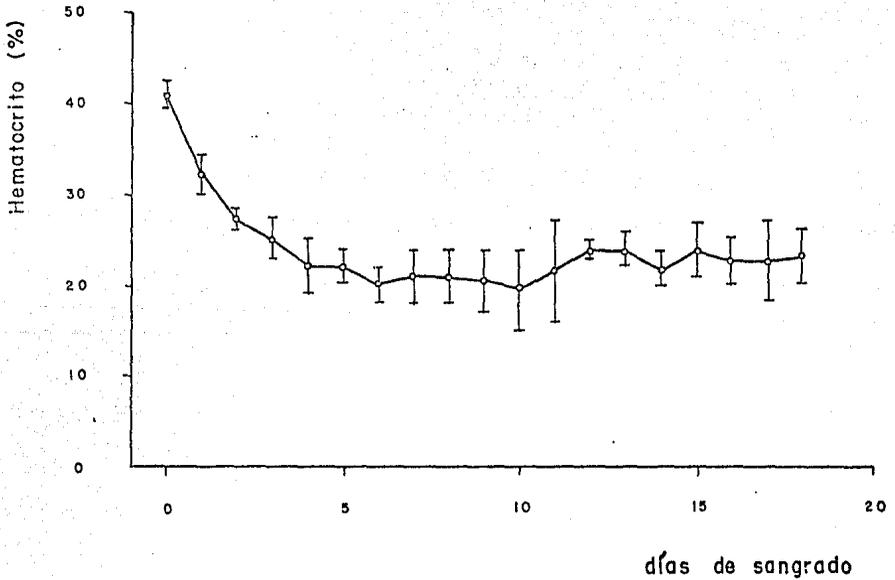


Figura 7. Variación del hematocrito en respuesta a la inducción de anemia por remoción diaria de un volumen constante de sangre en los cobayos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea sólida une los valores promedio de 4-5 determinaciones por duplicado por día.

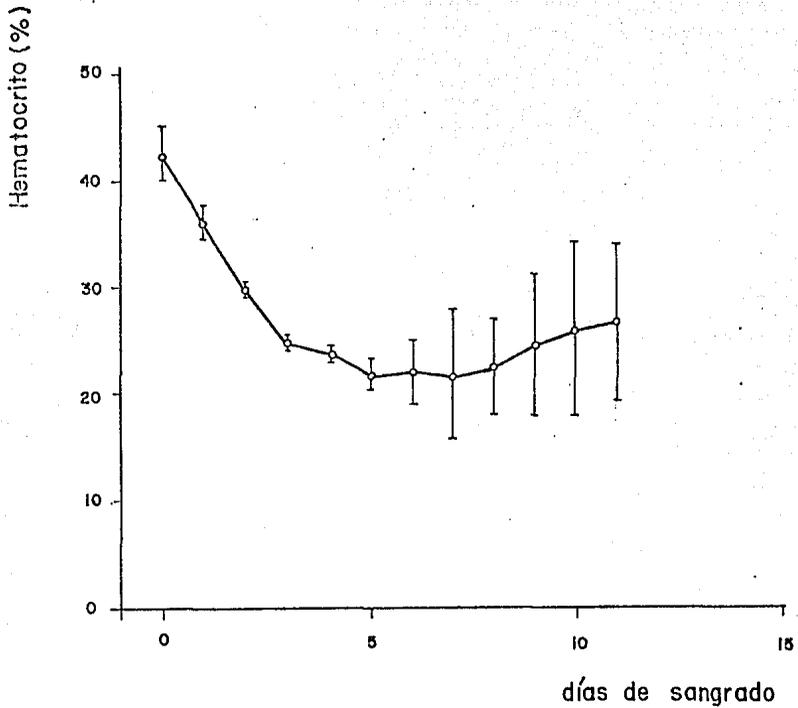


Figura 8. Variación del hematocrito en respuesta a la inducción de anemia por remoción diaria de un volumen constante de sangre en los conejos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea continua une los valores promedio de 2-3 determinaciones por duplicado por día.

de sangre), se está incrementando.

Al analizar las cinéticas del volumen celular (no se -- muestran), se observa un incremento de este parámetro en las 3 especies. En los gatos, de un valor inicial de $49 \mu^3$ se incrementa hasta $59 \mu^3$ en el equilibrio, representando un aumento -- del 17% en el volumen corpuscular promedio. Los incrementos -- respectivos en los cobayos y los conejos son: 76 a $96 \mu^3$ (21%) y 67 a $103 \mu^3$ (35%). Probablemente estos cambios tienen algún-- significado en la anemia como se discutirá más adelante.

Hemoglobina. Las consecuencias de la remoción diaria de un volumen constante de sangre (10 ml./Kg de peso), sobre la -- concentración de hemoglobina (gs./100 ml. de sangre), en los -- gatos, cobayos y conejos se muestran en las figuras 9,10 y 11. En este caso se observa una cinética muy semejante a la del nú-- mero de células rojas, es decir, en los primeros días una caí-- da muy rápida, un período de atenuación y finalmente un nuevo-- equilibrio.

Es notable que mientras que en los cobayos y los cone-- jos, con un valor inicial de hemoglobina de aproximadamente 15 gs./100 ml, el nuevo equilibrio se alcanza cuando la hemoglobi-- na llega a un valor de 7.5 gs./100 ml., en los gatos con un va-- lor inicial de hemoglobina, semejante, dicho equilibrio se da-- en los 9 gs./100 ml.

La diferencia se podría explicar en base a la dieta de

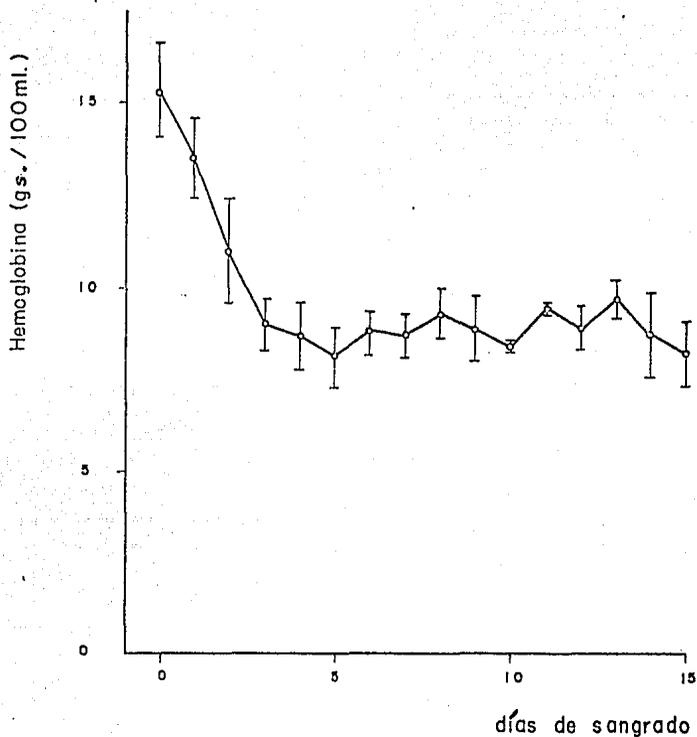


Figura 9. Efecto de la inducción de la anemia por sangrado diario sobre la concentración de hemoglobina (gs./100 ml) en los gatos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea sólida une los valores promedio de 3-4 determinaciones por duplicado por día.

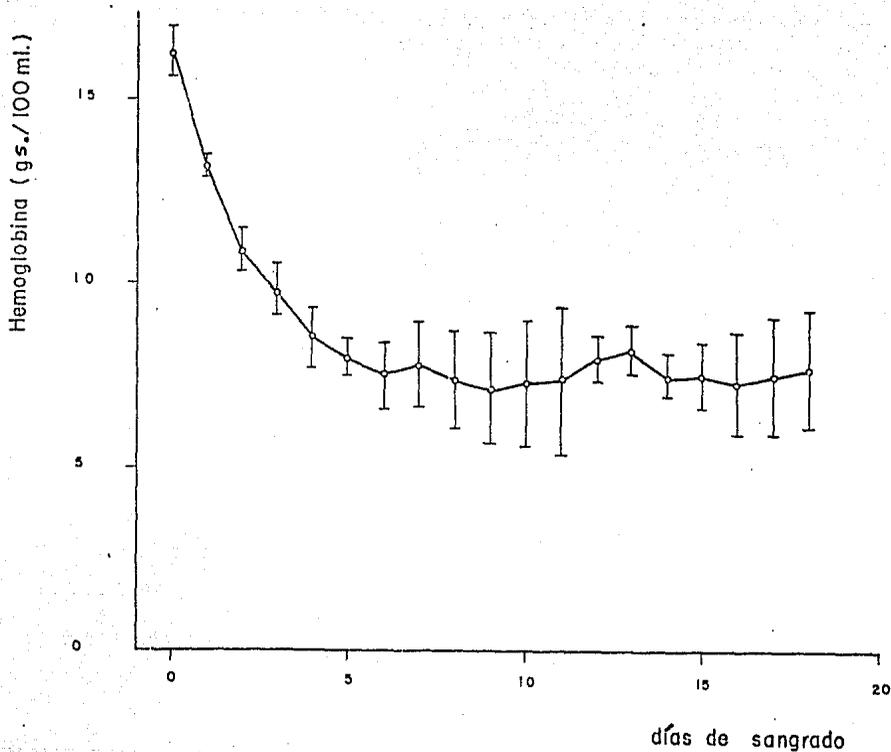


Figura 10. Efecto de la inducción de la anemia por sangrado -- diario sobre la concentración de hemoglobina (gs. /100 ml.) en los cobayos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea continua une los valores promedio de 4-5 determinaciones por duplicado por día.

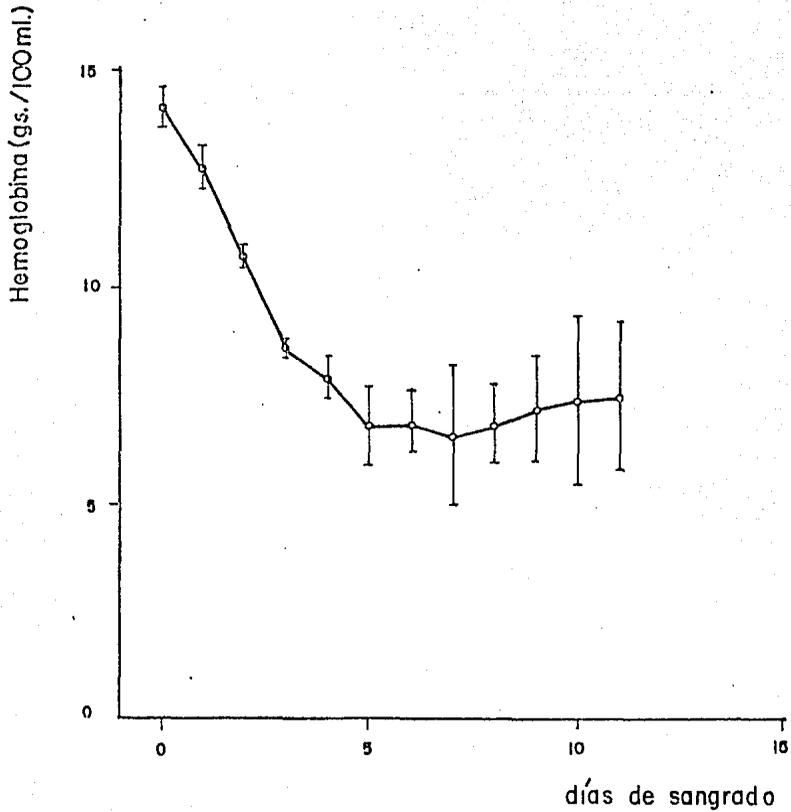


Figura 11. Efecto de la inducción de la anemia por sangrado diario sobre la concentración de hemoglobina (gs./100 ml.) en los conejos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I).- La línea continua une los valores promedio de 2-3 determinaciones por duplicado por día.

estos animales. Por un lado, los cobayos y los conejos al ser -- herbivoros, incorporan el hierro de la dieta en forma de hierro libre, el cual tiene que ser unido posteriormente al heme y finalmente a la hemoglobina. Por otro lado, la dieta carnívora de los gatos probablemente propicia el transporte de hierro ligado a heme, el cual puede ser incorporado más rápidamente a la hemoglobina, en comparación con el mecanismo de los conejos y cobayos. Esta mayor rapidez de incorporación de hierro a la hemoglobina daría la diferencia de la cantidad de ésta en el equilibrio.

La integración de las respuestas del número de células rojas, el hematocrito y la hemoglobina, dejan claro que en esta serie de experimentos, se ha logrado inducir y mantener una anemia de magnitud considerable. Por ejemplo, en el equilibrio, el número de células y la hemoglobina decrecen por lo menos un 50%, excepto la hemoglobina de los gatos que es de un 40%, aunque es -- igualmente considerable este déficit.

2,3-difosfoglicerato. La respuesta de este parámetro, expresado como μ moles de 2,3-DPG/ml. de sangre, durante la anemia de los gatos, cobayos y conejos, se muestra en las figuras 12, 13 y 14 respectivamente.

En el caso de los gatos, se observa que la concentración disminuye rápidamente durante los primeros 3 días de sangrado, -- dándose a partir del día 4 un incremento sostenido hasta alcanzar un máximo en los días 8-9, después del cual se aprecia un --

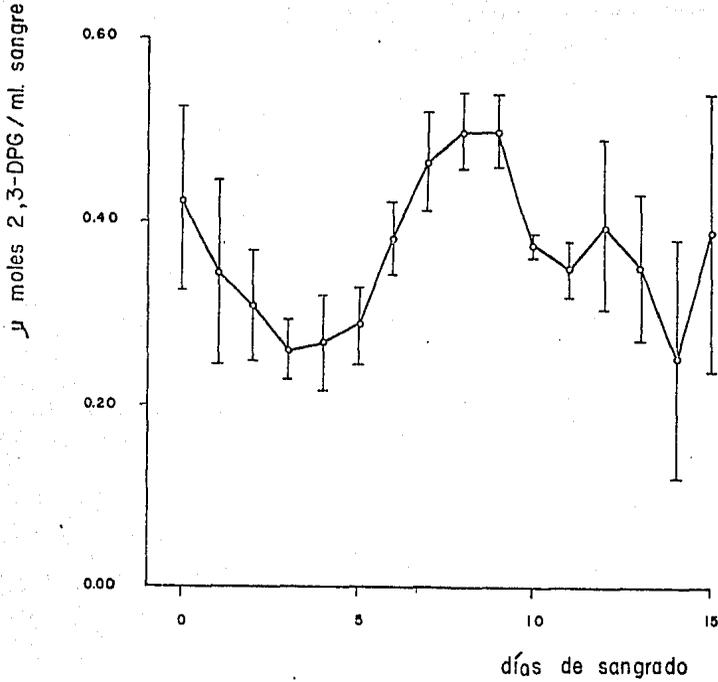


Figura 12. Efecto de la anemia inducida por sangrado diario sobre la concentración de 2,3-DPG/ml. de sangre en los gatos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea sólida une los valores promedio obtenidos de 3-4 determinaciones por duplicado por día.

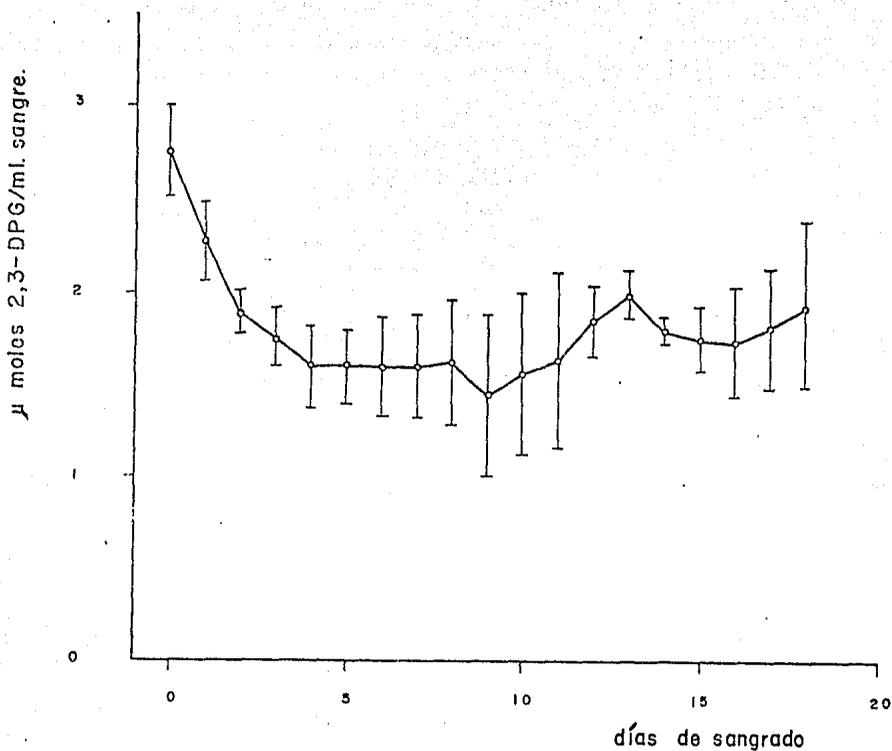


Figura 13. Efecto de la anemia inducida por sangrado diario sobre la concentración de 2,3-DPG/ml. de sangre en los cobayos.- Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea continua une los valores promedio obtenidos de 4-5 determinaciones por duplicado por día.

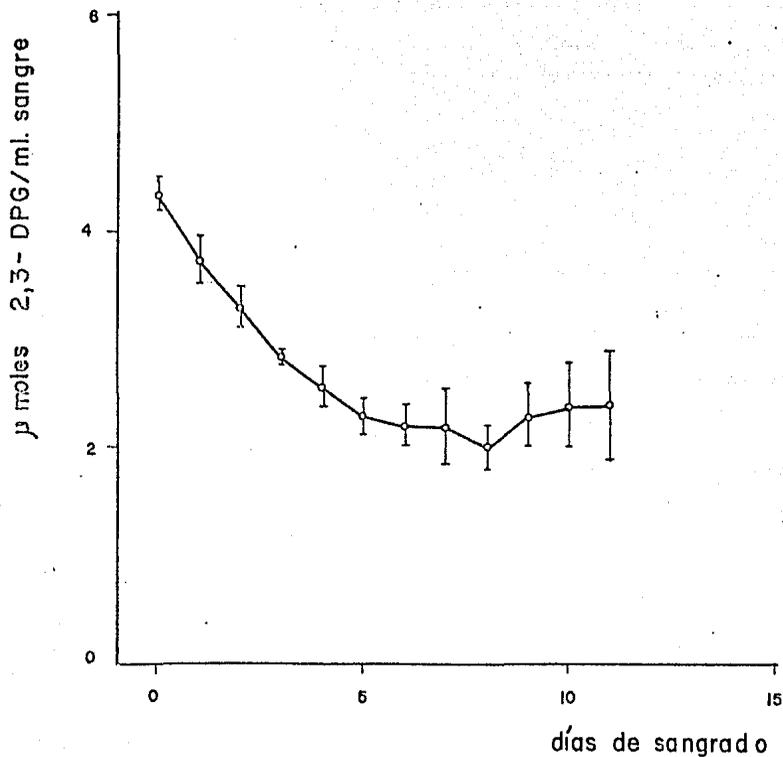


Figura 14. Efecto de la anemia inducida por sangrado diario sobre la concentración de 2,3-DPG/ml. de sangre en los conejos.- Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea sólida une los valores promedio obtenidos de 2-3 determinaciones por duplicado por día.

nuevo decremento.

Para conocer la magnitud de los cambios en la concentración de 2,3-DPG/ml., en términos absolutos, se relacionan estos cambios con los de la hemoglobina, en términos de la relación molar 2,3-DPG/Hb, los cuales se muestran en la figura 15. En esta figura se puede apreciar que en los primeros 3 días, la relación molar permanece relativamente constante, lo cual es un reflejo de los cambios en las concentraciones de 2,3-DPG y hemoglobina por mililitro en estos días, es decir, ambos decrecen. A partir del día 4 se da un claro incremento de la relación molar la cual se explica porque es en estos días en los que se atenúa la caída de la hemoglobina (figura 9), mientras que el 2,3-DPG se incrementa (figura 12). Cuando la hemoglobina está tendiendo al equilibrio, el 2,3-DPG se está incrementando sostenidamente hasta alcanzar su máximo, el cual coincide con el máximo en la relación molar debido a que la hemoglobina estaba ya en su fase de equilibrio. Después del máximo en la concentración de 2,3-DPG, el nuevo decremento de ésta se refleja en la relación molar, la cual tiende hacia los valores iniciales, debido a que mientras que el 2,3-DPG disminuye por debajo de los valores iniciales, la hemoglobina se encuentra en franco equilibrio.

En términos absolutos, el incremento de la relación molar 2,3-DPG/Hb. en su fase máxima representa un aumento de un 100%, desde un valor inicial de 0.186 hasta 0.370 en los días 7

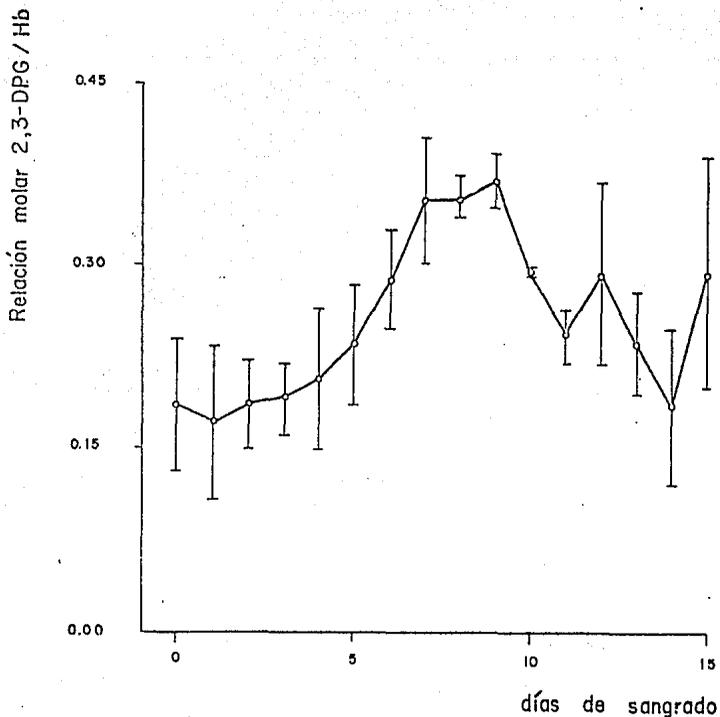


Figura 15. Influencia de la anemia crónica inducida sobre la relación molar 2,3-DPG/Hb en los gatos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea continua une los valores promedio obtenidos de 3-4 determinaciones por duplicado por día, de la concentración de 2,3-DPG dividida entre la concentración de hemoglobina, ambas expresadas como $\mu\text{moles/ml}$. de sangre.

-9 (figura 15).

Es importante hacer notar que en los gatos, si bien se da un incremento de un 100% en la relación molar 2,3-DPG/Hb, éste no se mantiene, sino por el contrario tiende a regresar a los valores iniciales. Este tipo de respuesta puede ser considerada como una reacción de alarma, es decir mientras el organismo está en un desequilibrio producido por las pérdidas masivas de -- sangre, responde incrementando la proporción de 2,3-DPG con respecto a la hemoglobina. Cuando esta última se encuentra en su nuevo equilibrio, dicha proporción disminuye debido a que no ha tenido algún efecto importante cuando la anemia es máxima y se encuentra en su fase de equilibrio.

Por lo que respecta a los cobayos (figura 13), la respuesta de la concentración de 2,3-DPG, es similar a la de los gatos durante los primeros 3 días de sangrado. En este período, se observa una disminución de ésta, paralela a la correspondiente de la hemoglobina (figura 10), hecho que se pone de manifiesto en los valores de la relación molar (figura 16), los cuales en este mismo período, se mantienen relativamente constantes. Durante los días 4-8, la concentración de 2,3-DPG/ml. se mantiene constante (figura 13), mientras que la hemoglobina está en su fase de atenuación y tendiendo a estabilizarse, aunque no lo ha logrado aún (figura 10). Los pequeños decrementos de la concentración de hemoglobina sumados a la constancia de la concentración de 2,3-DPG en este período, dan como resultado un incre

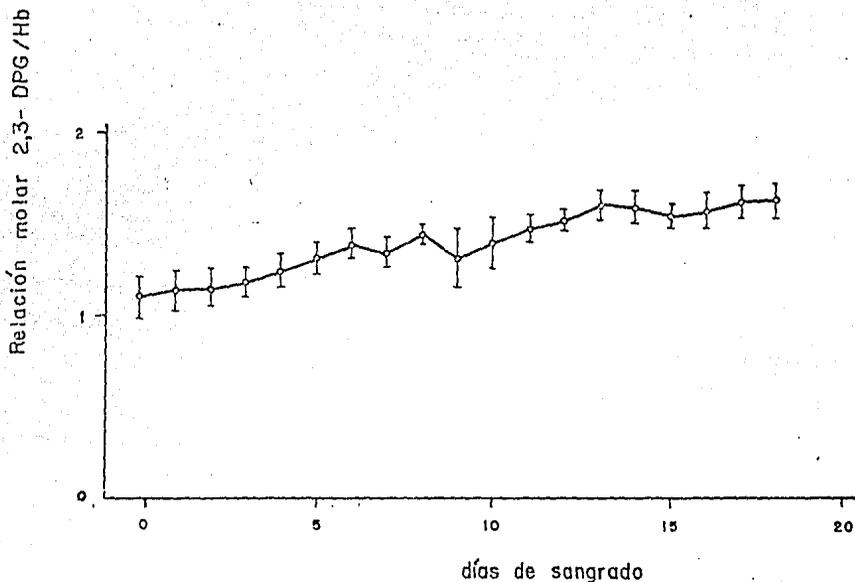


Figura 16. Influencia de la anemia crónica inducida sobre la relación molar 2,3-DPG/Hb en los cobayos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea sólida une los valores - promedio obtenidos de 4-5 determinaciones por duplicado por día, de la concentración de 2,3-DPG dividida entre la concentración de hemoglobina, ambas expresadas como $\mu\text{moles/ml}$. de sangre.

mento lento de la relación molar tal y como se puede apreciar para los días 4,8- en la figura 16.

A partir del día 8 la hemoglobina está en su fase de nuevo equilibrio (figura 10) mientras que la concentración de 2,3-DPG entra en una fase de recuperación, con una tendencia a equilibrarse entre los días 14-18 (figura 13). Esta fase de recuperación de la concentración de 2,3-DPG y una concentración de hemoglobina en equilibrio da como resultado un incremento adicional de la relación molar como puede apreciarse en la parte correspondiente de la figura 16. El equilibrio en la relación molar 2,3-DPG/Hb, se da entre los días 17-18, que es justamente cuando la concentración de hemoglobina es constante y la concentración de 2,3-DPG varía mínimamente. El incremento de la relación molar en el equilibrio, con respecto al valor inicial es de un 45%, desde 1.11 en el día cero hasta 1.60 en los días 17-18.

A diferencia de los gatos, el incremento de la relación molar 2,3-DPG/Hb en los cobayos, sí parece tener un efecto importante en estos organismos. Mientras que en los gatos la relación molar se incrementa durante la fase de desequilibrio, tendiendo a regresar a los valores iniciales cuando la anemia se encuentra en su fase estable, en los cobayos el aumento aunque lento es sostenido y se mantiene constante cuando la anemia se encuentra estable (días 17-18).

Finalmente en relación a los conejos, se puede hacer no-

tar el estrecho paralelismo entre las cinéticas de la hemoglobina (figura 11) y el 2,3-DPG (figura 14), lo cual se ve reflejado en la propia de la relación molar (figura 17). En esta última figura se puede apreciar que la relación molar permanece -- prácticamente constante, ya que si bien se presenta un incremento entre los días 2-7, con un máximo en el día 7, éste solamente representa un aumento de 11%. Después del máximo en el día 7, la relación molar disminuye alcanzando un nuevo equilibrio con un valor prácticamente igual al inicial.

En resumen se puede decir que en los conejos si bien se da un ligero incremento en la relación molar 2,3-DPG/Hb, la respuesta en su conjunto es claramente poco importante debido a -- que los valores tienden a mantenerse en sus valores normales, -- es decir en un valor de 2 moles de 2,3-DPG/mol de hemoglobina.

En la figura 18 se muestran los resultados de un trabajo en el que se utilizó el mismo enfoque experimental, en el cual se usaron 6 animales y se encontró el mismo hecho que aquí se -- presenta, es decir, la relación molar 2,3-DPG/Hb no se incrementó durante la anemia de esos 6 conejos. La concentración de -- 2,3-DPG con respecto a la concentración de hemoglobina, se expresa como micromoles de 2,3-DPG por gramo de hemoglobina, la -- cual es una manera alternativa de representar la relación molar ya que un gramo de hemoglobina equivale a 15.1 micromoles, asumiendo un peso molecular de 66,000. En esta misma gráfica se --

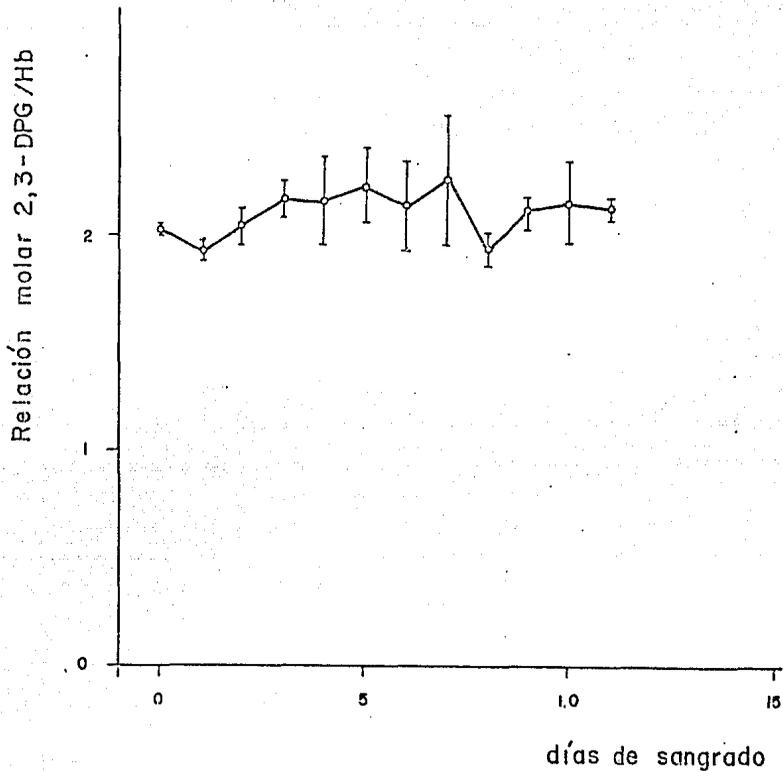


Figura 17. Influencia de la anemia crónica inducida sobre la relación molar 2,3-DPG/Hb en los conejos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea continua une los valores promedio obtenidos de 2-3 determinaciones por duplicado -- por día, de la concentración de 2,3-DPG dividida entre la concentración de hemoglobina, ambas expresadas como $\mu\text{moles/ml}$. de sangre.

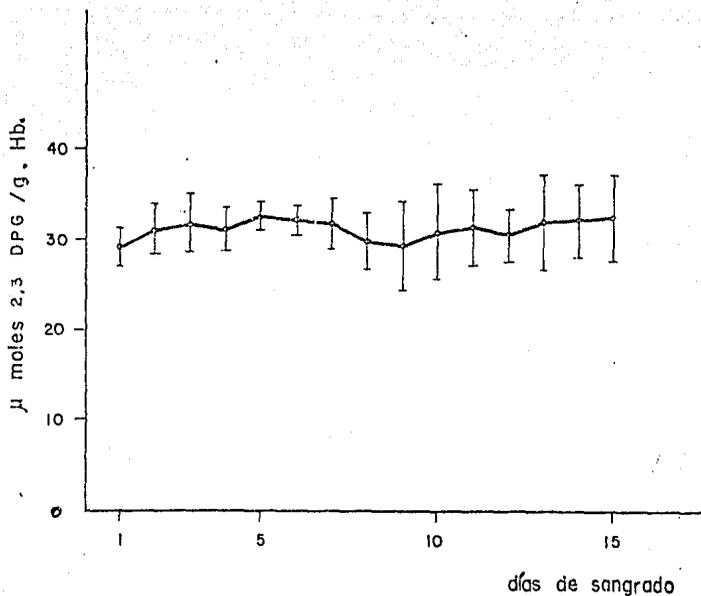


Figura 18. Influencia de la anemia crónica inducida sobre la concentración de 2,3-DPG/gr. de hemoglobina en los conejos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea -- continua une los valores promedio obtenidos de 3-6 determinaciones por duplicado por día, en relación a la concentración de hemoglobina en gramos/ml. (Tomada de Becerril, L. B., 1979).

puede ver que la relación 2,3-DPG/Hb es constante y se mantiene en 30 micromoles por gramo de hemoglobina que equivale a una relación molar de 2.

De los resultados hasta aquí presentados queda claro que en los gatos la relación molar si bien se incrementa alcanzando un máximo, tiende a regresar a los valores iniciales.

Es importante recalcar que aunque parece impresionante - un incremento de 100%, en términos absolutos solamente se trata de un cambio de 0.186 a 0.370 moles de 2,3-DPG/mol de hemoglobina, el cual no tiene un significado importante debido a que los valores tienden a regresar al nivel original cuando la concentración de hemoglobina llega a un mínimo y permanece constante.

Por lo que respecta a los cobayos, es evidente que en estos animales un incremento de la relación molar 2,3-DPG/Hb conforme transcurre la anemia, debe tener algún significado, debido a que la relación molar aumenta y cuando la concentración de hemoglobina llega al equilibrio, dicha relación molar se mantiene incrementada y constante.

Por último es también claro que en los conejos, la relación molar 2,3-DPG/Hb no se incrementa ostensiblemente y que inclusive se puede afirmar que en términos globales, permanece constante durante la anemia.

Al parecer por los datos que hasta aquí se presentan, la respuesta del 2,3-DPG ante la anemia es importante sólo para --

los animales del segundo grupo, al cual pertenece el hombre (tabla 6 y figura 2), según se amplía a continuación.

Haciendo uso de los datos de la literatura (Lenfant et al., 1970a), se puede hacer un cálculo aproximado de la relación molar 2,3-DPG/Hb en el humano bajo condiciones de anemia equivalentes a las del cobayo (50% de hemoglobina). En este último, el hematocrito disminuye de 40 a 25%. Asumiendo un cambio equivalente en el humano, éste sería de 45 a 28%. Para un 50% de la hemoglobina normal (18gs./100 ml), en el humano, se reporta una concentración de 2,3-DPG de 6.9 mM. Sabiendo que 1 g de hemoglobina equivale a 15.1 μ moles, una concentración de hemoglobina de 9gs. por 100 ml. de sangre, representa un equivalente de 1.36 μ moles/ml. Por otro lado, una concentración 6.8 mM de 2,3-DPG, con un hematocrito de 28% representa 1.90 μ moles/ml. La relación molar 2,3-DPG sobre hemoglobina es por tanto de 1.4.

Sabiendo que la relación molar normal es de 0.96 (tabla 6), el incremento que representa el cambio de 0.96 a 1.4, es de 46%, el cual es prácticamente igual al de los cobayos bajo condiciones semejantes de anemia.

Haciendo una estimación semejante para el caso de una anemia severa en el humano (4-5 gs. de hemoglobina/100 ml), se encuentra que la relación molar 2,3-DPG/Hb puede llegar a una relación máxima de 2:1. Aunque se han reportado incrementos (de manera implícita en μ moles de 2,3-DPG/g Hb), de la relación molar --

hasta de 3:1 (Eaton et al., 1970), éstos han sido esporádicos. Asumiendo que en condiciones de anemia severa en el humano, en realidad la relación molar sólo llega a un máximo de 2:1, podría ser éste el tope para los animales del segundo grupo. Haría que hacer los experimentos con animales de una relación cercana a 2:1 para conocer la realidad.

Retomando a los conejos, en los que la relación molar 2,3-DPG/Hb no cambia durante la anemia, surge la pregunta de cuales son los cambios que se dan en el ATP. Este último también ha sido involucrado como regulador de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (Benesch y Benesch, 1967; Chanutin y Curnish, 1967).

Los resultados de la determinación de la concentración de este metabolito, expresada como micromoles de ATP por mililitro de sangre, se muestran en la figura 19.

Lo más notable de esta figura es que, como se puede apreciar, la concentración de ATP disminuye hasta un mínimo en el día 4 de sangrado, a partir del cual se recupera regresando al valor inicial (0.83 μ moles/ml.), en el día 7. Después de regresar al valor inicial, se sigue dando una recuperación hasta llegar a un equilibrio en los días 10-11 con un valor de 0.87 μ moles/ml.

Hay que hacer notar también que la caída de la concentración de ATP, es más lenta que la correspondiente de la hemoglo-

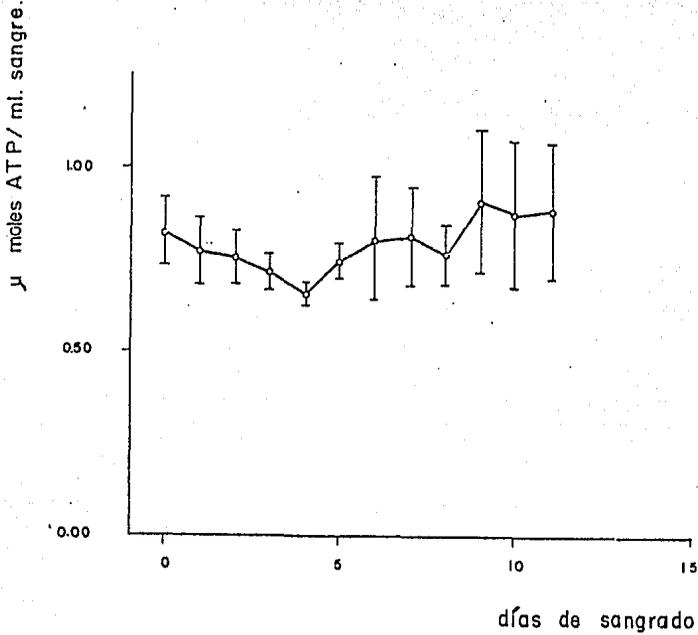


Figura 19. Efecto de la remoción diaria de un volumen constante de sangre sobre la concentración de ATP en los conejos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea -- continua une los valores promedio de 2-3 determinaciones por duplicado por día.

bina (comparar con la figura 11), Por otro lado, la recuperación de la concentración de ATP se da cuando la hemoglobina está tendiendo al equilibrio. Tomando estas observaciones en conjunto, es de esperarse que la relación molar ATP/Hb se incremente desde un principio. Los resultados se muestran en la figura 20, en la cual se observa efectivamente un incremento sostenido, hasta alcanzar un equilibrio en los días 10-11. En el equilibrio, el incremento de la relación molar ATP/Hb representa un aumento de 0.39 - 0.78, es decir un 100%.

Es importante recalcar que la concentración de ATP regresa al valor inicial a pesar de que el déficit en el número de células rojas es de un 60% (figura 5).

En un experimento preliminar hecho con un sólo conejo se observan prácticamente los mismos resultados que aquí se comentan, según puede pareciarse en las figuras 21 y 22, en las cuales la concentración de hemoglobina se expresa como $\mu\text{moles/ml}$. En la figura 21 se ve que el ATP disminuye y regresa a los valores iniciales mientras que la relación molar se incrementa hasta un 100% -- (0.4 moles ATP/mol Hb en el día cero a 0.8 moles ATP/mol Hb en el día 14), cuando la hemoglobina está en equilibrio.

Si las células rojas de los conejos anémicos estuvieran -- constituidas solamente por eritrocitos maduros, estos deberían -- contener aproximadamente el doble de ATP que los eritrocitos normales para explicar la recuperación de los valores normales de --

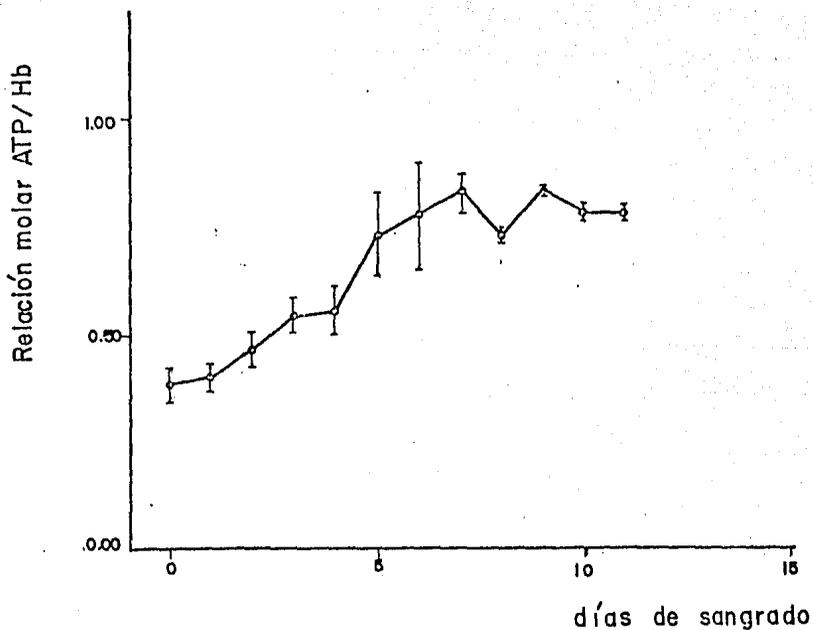


Figura 20. Influencia de la inducción de la anemia crónica sobre la relación molar ATP/Hb en los conejos. Se muestra la me dia (o) y la desviación estándar (I). La línea continua -- los valores promedio obtenidos de 2-3 determinaciones por du-- plicado por día, de la concentración de ATP dividida entre la-- concentración de hemoglobina, ambas expresadas como μ moles/ml. de sangre.

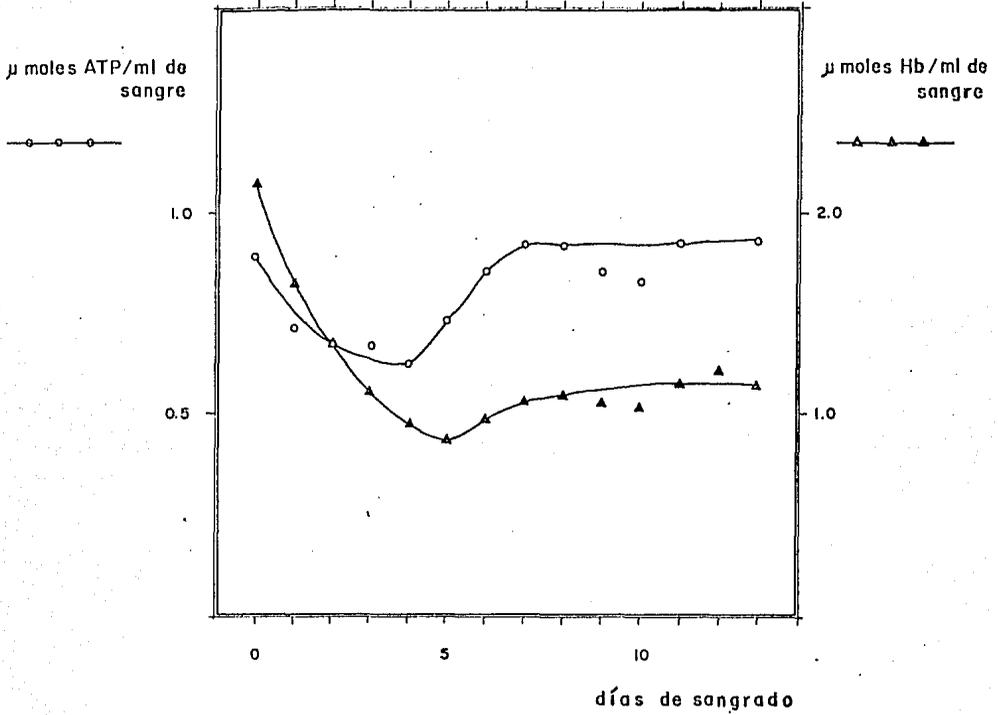


Figura 21. Efecto de la remoción diaria de un volumen constante de sangre (10 ml./Kg de peso) sobre las concentraciones de ATP- y hemoglobina en un conejo adulto. Se muestra el promedio de -- una determinación por duplicado por día.

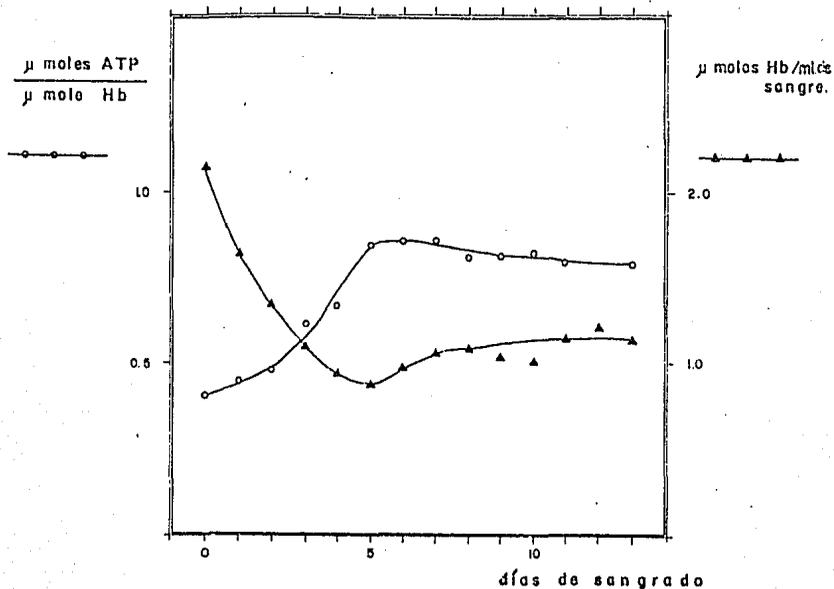


Figura 22. Efecto de la remoción diaria de un volumen constante de sangre (10 ml./Kg de peso) sobre la concentración de hemoglobina y la relación molar ATP/Hb en un conejo adulto. Se muestra el promedio de una determinación por duplicado por día.

ATP (Figuras 19 y 21). Sin embargo se ha demostrado que durante la anemia de los conejos, el número de reticulocitos se incrementa notablemente (Valdés, 1977).

Al determinar el porcentaje de reticulocitos en el presente trabajo, se encontró un incremento máximo de 50%, según puede apreciarse en la figura 23.

Asumiendo que durante la anemia de los conejos el incremento en el porcentaje de reticulocitos es típicamente de un 50% (figura 23), y que en el equilibrio el decremento del número de células rojas es aproximadamente de un 50% (figura 6), se esperaría que los reticulocitos tuvieran en promedio, 4 veces más ATP que los eritrocitos, en caso de que éstos no presentaran cambios en el contenido de aquél. Esto explicaría tanto el regreso a los valores normales de ATP (figuras 19 y 21), como el incremento de 100% en la relación molar ATP/Hb (figuras 20 y 22).

Cuando se semipurificaron las poblaciones de reticulocitos y eritrocitos del día 9 de la anemia de un experimento previo (obsérvese que en el día nueve el porcentaje de reticulocitos y eritrocitos es máximo y constante, figura 23), se aislaron las fracciones denominadas "rica en eritrocitos y "rica en reticulocitos" (ver materiales y métodos) y se determinaron el número de células, el porcentaje de reticulocitos y la concentración de ATP en cada fracción.

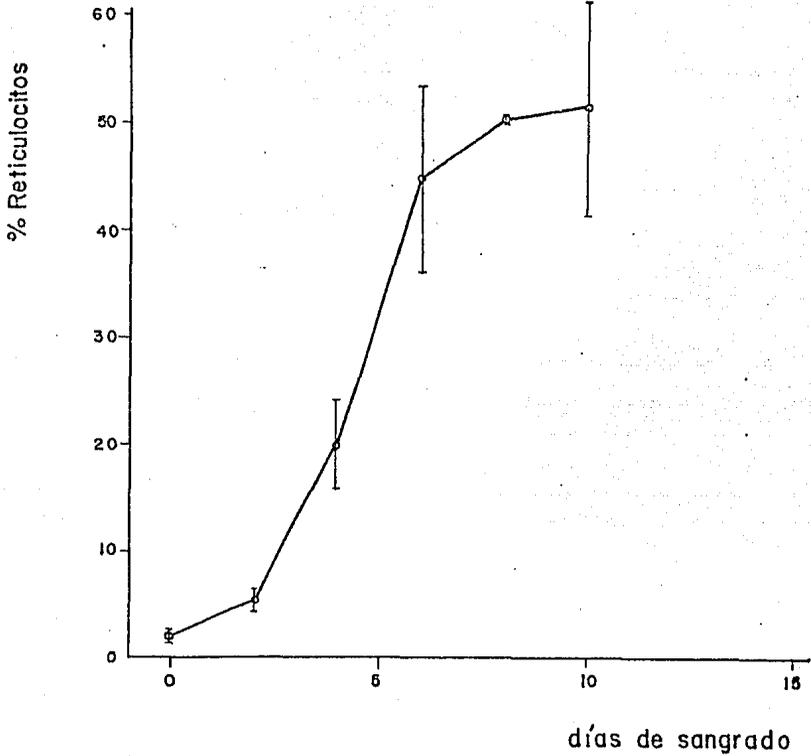


Figura 23. Influencia de la remoción diaria de un volumen constante de sangre sobre el porcentaje de reticulocitos en los conejos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). - La línea continua une los valores promedio de 2-3 conteos por-duplicado por día.

Conociendo el porcentaje de reticulocitos, el número de células rojas y el contenido de ATP en cada fracción, se puede calcular la concentración corpuscular promedio de ATP en ambas poblaciones de células rojas (eritrocitos y reticulocitos), simplemente valiéndose de un sistema de ecuaciones simultáneas como se ejemplifica a continuación:

CONEJO 1

	<u>Fracción enriquecida en eritrocitos</u>	<u>Fracción enriquecida en reticulocitos</u>
% de reticulocitos	17.85	67.00
No. de céls./ml	2.725×10^9	2.16×10^9
ATP (μ moles/ml)	0.66	0.91
No. de eritrocitos/ml	2.238×10^9 (82.15%)	0.7128×10^9 (33%)
No. de reticulocitos/ml	0.486×10^9 (17.85%)	1.4472×10^9 (67%)

$$1.4472 \times 10^9 \text{ retics.} + 0.7128 \times 10^9 \text{ erits.} = 0.91 \mu\text{moles ATP}$$

$$0.486 \times 10^9 \text{ retics.} + 2.238 \times 10^9 \text{ erits.} = 0.66 \mu\text{moles ATP}$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones resulta que un eritrocito contiene 1.772×10^{-16} moles de ATP y un reticulocito contiene 5.415×10^{-16} moles de ATP, de donde se concluye que un reticulocito tiene 3 veces más ATP que un eritrocito.

CONEJO 2

	<u>Fracción enriquecida en eritrocitos</u>	<u>Fracción enriquecida en reticulocitos</u>
% reticulocitos	17.60	69.32
No. de células/ml	1.522×10^9	1.233×10^9
ATP (μ moles/ml)	0.370	0.603
No. de eritrocitos/ml	1.254×10^9	0.3781×10^9
No. de reticulocitos/ml	0.268×10^9	0.8544×10^9

Procediendo de la misma manera resulta que un eritrocito tiene 1.586×10^{-16} moles de ATP y un reticulocito 6.364×10^{-16} moles por lo que un reticulocito tiene 4 veces más ATP que un eritrocito en este conejo.

Por otro lado conociendo el número de células rojas en el día cero y sabiendo que el porcentaje de reticulocitos es típicamente de un 2% se tienen los siguientes datos:

	CONEJO 1	CONEJO 2
% reticulocitos	2.0	2.0
No. de células/ml	6.588×10^9	5.153×10^9
ATP (μ moles/ml)	0.9574	0.8833
No. de eritrocitos	6.324×10^9	4.947×10^9
No. de reticulocitos	0.1318×10^9	0.103×10^9

Asumiendo los respectivos valores de los reticulocitos, resulta que los eritrocitos del día cero contienen respectivamente 1.40×10^{-16} moles y 1.52×10^{-16} moles de ATP. La variación-

en el conejo 1 es de 21% y en el 2 de - 1%, lo cual no explicaría la cinética de las figuras 19 y 21, si se pensara en los eritrocitos como los responsables del regreso a los valores normales. Por tanto es claro que los reticulocitos son los que explican las figuras 19 y 21.

Si fuera cierto que los reticulocitos son los que explican la cinética de la concentración de ATP, debería existir una correlación entre el número de reticulocitos presentes en la circulación y la relación molar ATP/Hb. Para confirmar esta predicción, se determinó el número de reticulocitos según se muestra en la figura 24, en la cual se ve que la cinética del número de reticulocitos es muy semejante a la del porcentaje de éstos (figura 23), excepto en el día 10 en el cual el número es mayor que para el día 8, a diferencia del porcentaje que es constante. La explicación la da el número de células, el cual en el día 10 tiene un valor mayor que para el día 8 (figura 5).

La correlación del número de reticulocitos contra la relación molar ATP/Hb se muestra en la figura 25, en la cual se ve que efectivamente hay una alta correlación entre el número de reticulocitos y la relación molar ATP/Hb, por tanto es evidente que el aumento de la relación molar ATP/Hb es debida a la presencia de los reticulocitos en la circulación.

Dado que los reticulocitos son metabólicamente mucho más activos que los eritrocitos (Rapoport et al., 1974), por ejem--

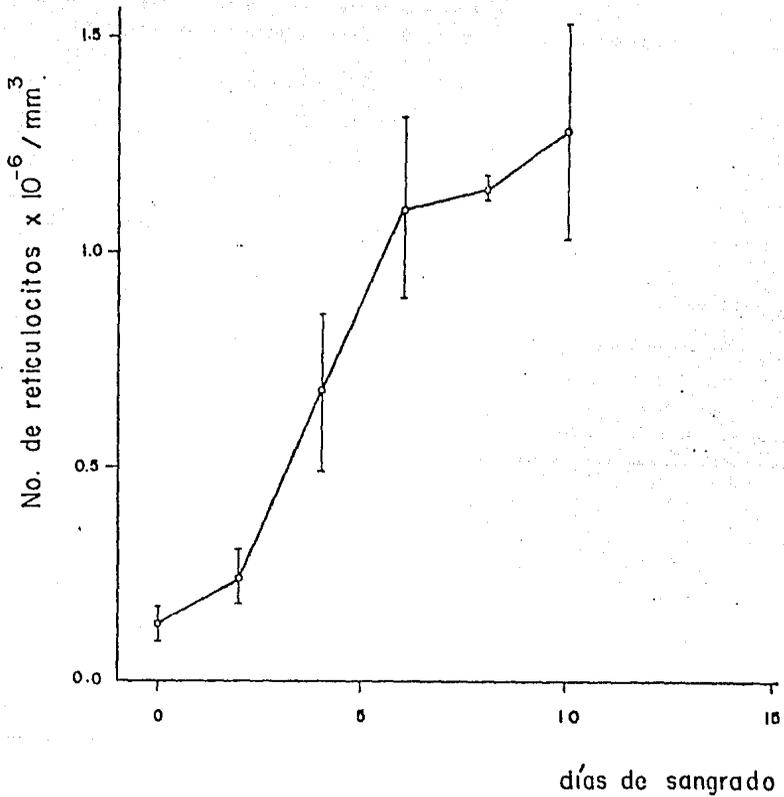


Figura 24. Efecto de la remoción diaria de un volumen constante de sangre sobre el número de reticulocitos en los conejos.- Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea sólida une los valores promedio de 2-3 determinaciones por duplicado por día.

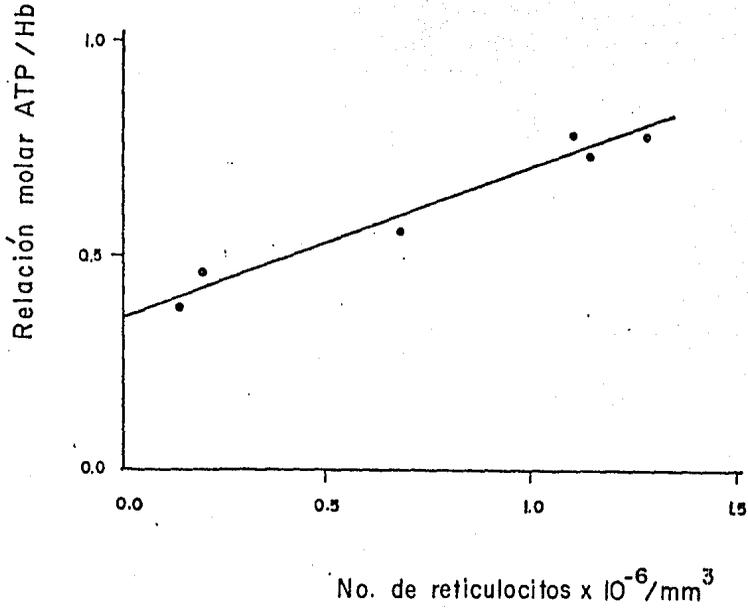


Figura 25. Correlación entre el número de reticulocitos y la relación molar ATP/Hb. La pendiente es 0.344, el intercepto es -- 0.353 y el coeficiente de correlación es 0.984 para una $p < 0.01$ y n de 6.

plo sintetizan hemoglobina, aún tienen mitocondrias y por tanto Ciclo de Krebs, etc., es lógico que aquellos tengan más ATP que éstos. Como la relación molar ATP/Hb no cambia importantemente durante la anemia en los eritrocitos, queda la duda de si el -- ATP de los reticulocitos está influyendo en la afinidad de la -- hemoglobina por el oxígeno.

Dos evidencias invalidan esta última posibilidad. Una de ellas indica que durante una anemia hemolítica inducida con -- finilhidrazina en conejos, en la cual se detecta una reticuloci -- tosis (10-50%), la curva de disociación de oxígeno no se modifi -- ca ostensiblemente (Brewer y Eaton, 1971). En este reporte se -- discute que posiblemente no se modifica debido a que la alta -- concentración de ATP en los reticulocitos, queda balanceada por la menor cantidad de 2,3-DPG presente en los mismos.

Aunque no es una evidencia excluyente, en el presente -- trabajo se demuestra que la relación 2,3-DPG/Hb no se modifica -- notablemente durante la anemia de los conejos, no obstante que -- el porcentaje de reticulocitos alcanza un valor de 50%. Este he -- cho indica fuertemente que no hay modificación de la relación -- molar 2,3-DPG/Hb en los reticulocitos con respecto a los eritro -- citos. Si bién el reticulocito tiene menos 2,3-DPG, también tie -- ne menos hemoglobina (Valdés, 1977). Este estrecho paralelismo -- entre la hemoglobina y el 2,3-DPG, el cual ya fue discutido, pro -- bablemente indica que la afinidad de la hemoglobina por el oxí --

geno permanece inalterada en función de la constancia de dicha relación, según se discute posteriormente.

Una segunda evidencia aunque demostrada en eritrocitos humanos, indica que a partir de los cálculos de las constantes de afinidad del ATP por el magnesio, de la hemoglobina, por el ATP y de la hemoglobina por el complejo ATP magnesio, in vitro, así como de las concentraciones de ATP, magnesio y hemoglobina, se concluye que de 85-90% del ATP se encuentra en forma de complejo ATP-Mg y demostrándose a la vez que este complejo es incapaz de interaccionar con la hemoglobina. (Franklin, et al., 1971).

Suponiendo que el ATP no tiene influencia sobre la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y que la relación 2,3-DPG/Hb no cambia durante la anemia de los conejos, surge la interrogante de si se estará oxigenando adecuadamente el organismo a pesar de un déficit de 50% en la concentración de hemoglobina (figura 11).

La determinación de los niveles de lactato sanguíneo, como ya se ha mencionado puede dar una idea del estado de anaerobiosis sufrida por un organismo (Huckabee, 1958; Faulkner et al., 1970).

Los valores de la concentración de ácido láctico durante la anemia se muestran en la figura 26, en la cual se puede observar que a excepción de los días 1 y 7, el resto de los valores se encuentran ligeramente por debajo del nivel normal, ex--

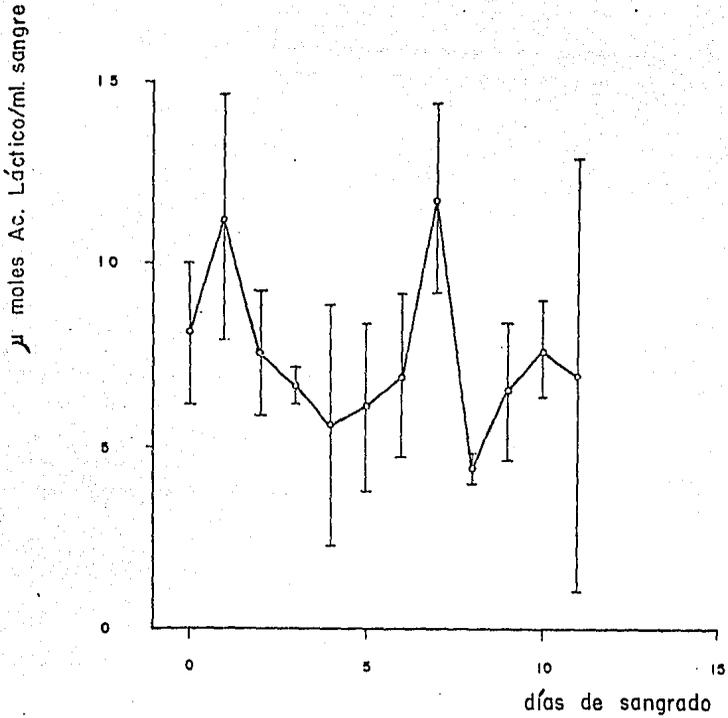


Figura 26. Variación de la concentración de ácido láctico ($\mu\text{moles/ml}$), en respuesta a la remoción diaria de un volumen constante de sangre en los conejos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea continua une los valores promedio obtenidos de 2-3 determinaciones por duplicado por día.

presado como μ moles de ácido láctico/ml. de sangre. Es notable la tendencia de los niveles de lactato durante la anemia a oscilar alrededor del valor inicial (8 μ moles/ml).

Sin embargo, cuando los valores se expresan en términos de la relación molar lactato/Hb, se encuentra que los niveles consistentemente se mantienen por encima del valor inicial (figura 27).

Es importante hacer notar que los conejos tienen un valor normal de lactato sanguíneo 10-30 veces mayor que el de los humanos (Sigma Technical Bulletin 826 UV), lo cual puede tener alguna relación con el valor normal de la relación molar 2-3-DPG/Hb. Es sugerente que estas altas concentraciones de lactato propicien un microambiente intracelular (por efecto de pH), en el cual la hemoglobina pueda interaccionar de una manera especial con el 2,3-DPG. Tal vez la acidosis producida por el ácido láctico favoreciera la creación de un segundo sitio de interacción de aquella con éste. Las altas concentraciones de lactato sanguíneo indican que los conejos realizan un metabolismo hipóxico de manera mucho más activa que los humanos, es decir, que de manera natural los conejos están adaptados a un metabolismo que requiere relativamente poco oxígeno.

Si durante la anemia se continuara teniendo ese ritmo -- de metabolismo hipóxico, los niveles de ácido láctico por mililitro de sangre se mantendrían.

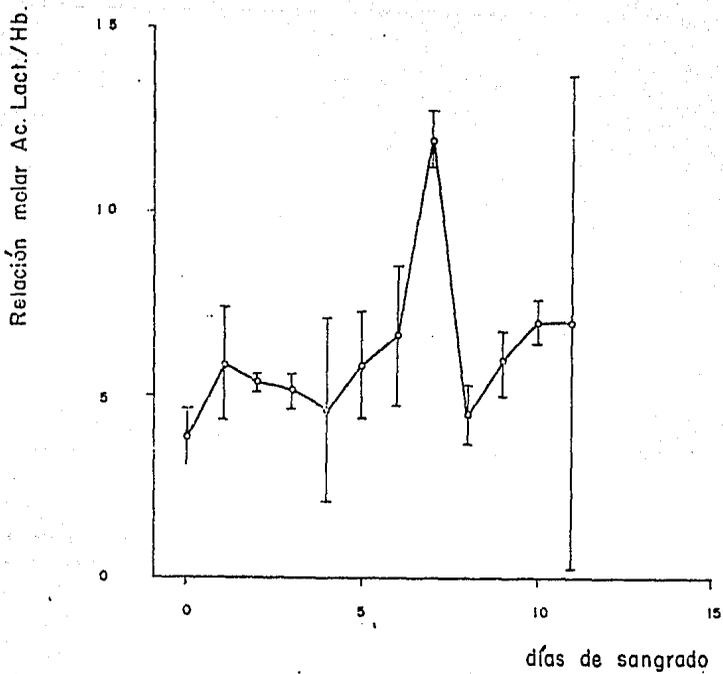


Figura 27. Efecto de la remoción diaria de un volumen constante de sangre sobre la relación molar ácido láctico/Hb en los conejos. Se muestra la media (o) y la desviación estándar (I). La línea sólida une los valores promedio de 2-3 determinaciones -- por duplicado por día de la concentración de lactato dividida -- entre la concentración de hemoglobina, ambas expresadas como -- μ moles/ml. de sangre.

En la figura 26 se observa que aunque se producen oscilaciones en la concentración de lactato, hay una marcada tendencia a hacerlo alrededor del valor inicial, es decir 8 μ moles por ml. Esto indica que el metabolismo hipóxico en los conejos reviste alguna importancia. Como que de una manera natural están adaptados a condiciones de hipoxia tal como ya ha sido mencionado.

La tendencia de los valores de la concentración de lactato a oscilar entre los valores normales, mientras que la hemoglobina decrece y se estabiliza por debajo de los valores normales, evidencia que la relación molar lactato/Hb ha de mantenerse incrementada, aunque oscilante también.

Al parecer el oxígeno que es transportado por el 50% de la hemoglobina (figura 11), es todavía suficiente para mantener funcional al conejo.

Al seguir explorando en las propiedades de la sangre del conejo en relación a la oxigenación se hicieron una serie de experimentos basados en las siguientes observaciones:

Se recomienda que una vez tomada una muestra de sangre, se selle la jeringa y se sumerja en un baño de hielo para evitar cambios en la concentración de 2,3-DPG. Esta recomendación está basada en el modelo de regulación de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno mediada por el 2,3-DPG. Se supone que el DPG únicamente se une a la desoxihemoglobina por lo que si se mantuviera la sangre venosa a temperatura ambiente y en presencia de

aire, ésta se oxigenaría, se despegaría el DPG y este último se ría hidrolizado por la 2,3-DPG fosfatasa (Benesch y Benesch, -- 1970; Rose, 1970).

Casualmente en el conejo hemos observado que la relación molar 2,3-DPG/Hb no varía al oxigenar la sangre, según se muestra en la tabla 7, en la cual se puede apreciar que durante 4 - horas de incubación a 37°C y en presencia de aire, la relación molar 2,3-DPG/Hb permanece constante. Estos datos indican una - de dos posibilidades, o que la unión del 2,3-DPG es tanto a la -oxi como a la desoxihemoglobina ó que la 2,3-DPG fosfatasa tiene una actividad muy reducida. Pero por muy reducida que estuviera la actividad de la fosfatasa, en 4 horas debería observar se algún cambio.

Con el fin de saber que pasaba con el ATP, se repitió el experimento midiendo también este último. De paso con este experimento se descartaba la posibilidad de que los valores de 2,3-DPG/Hb no cambiaran porque los eritrocitos no estuvieran funcio nales. Los resultados se muestran en la tabla 8. En esta ta- bla se puede observar que en un lapso de 3 horas los niveles de 2,3-DPG se mantienen constantes mientras que el ATP disminuye - desde los 84 μ moles/100 ml de sangre, hasta aproximadamente 70- μ moles/ml. Este mínimo se produce a las 2 horas de incubación- quedando prácticamente constante durante los siguientes:60 minu- tos.

TABLA 7

Determinación de la concentración de 2,3-DPG a distintos tiempos de incubación de sangre de conejo a 37°C.

Tiempo de incubación (minutos)	μmoles DPG/ml.	μmoles Hb/ml.	DPG/Hb
0	4.073	1.934	2.106
30	3.865	"	1.998
60	3.819	"	1.975
120	3.965	"	2.050
240	4.004	"	2.070

La hemoglobina se determinó a los 0 y 240 minutos y fue prácticamente constante.

TABLA 8

Determinación de las concentraciones de 2,3-DPG y ATP a distintos tiempos de incubación de sangre de conejo a 37°C.

Incubación (minutos)	μmoles DPG/ml.	μmoles Hb/ml.	DPG/Hb	μmoles ATP/100 ml.
0	3.792	1.837	2.064	84.34
60	3.681	"	2.003	77.22
120	3.773	"	2.053	68.54
180	3.827	"	2.083	72.74

La hemoglobina se determinó a los 0 y 180 minutos y fué prácticamente constante.

Un experimento de cierta manera concluyente es el que se presenta en la tabla 9 en la cual se comparan la sangre venosa y la sangre arterial. En esta tabla se puede apreciar que inclusive in vivo la relación molar 2,3-DPG/Hb no cambia en función de la oxigenación.

Integrando los resultados hasta aquí presentados, éstos apoyan la primera de las dos posibilidades arriba planteadas, es decir, aparentemente el 2,3-DPG se une tanto a la oxi como a la desoxihemoglobina, y de una manera muy constante.

Para explicar esta posibilidad, proponía que la gran cantidad de ácido láctico propiciara un microambiente intracelular (por efecto del pH), que a su vez favoreciera la formación de un segundo sitio de interacción 2,3-DPG-Hb. Por otro lado, que durante la anemia, el incremento de la relación molar lactato/Hb reforzara esta interacción, de tal manera que no fuera necesario aumentar la relación 2,3-DPG/Hb. De hecho se ha demostrado que la hemoglobina humana reacciona más fuertemente con el 2,3-DPG a pH ácido (Jelkman y Bauer, 1976).

Para que la hipótesis sea consecuente con los resultados obtenidos, se tendría que plantear que la interacción 2,3-DPG - Hb además de valerse de un segundo sitio, la unión tendría que ser tanto a la oxi como a la desoxihemoglobina y además de una manera muy estable, dando como resultado un complejo 2,3-DPG - Hb con una afinidad por el oxígeno baja y permanente. Ese complejo permanentemente poco a fin por el oxígeno, estaría mante-

TABLA 9

Comparación de las concentraciones de 2,3-DPG, ATP y lactato en sangre venosa y arterial - de conejo.

	Sangre venosa	Sangre arterial
Hemoglobina (grs./100 ml.)	15.300	15.600
2,3-DPG (μ moles/ml.)	4.400	4.430
ATP (μ moles/100 ml.)	95.000	100.000
Acido láctico (μ moles/ml.)	9.300	9.100
2,3-DPG/Hb	1.900	1.875

La sangre arterial fue obtenida por punción cardíaca y la venosa, de la vena marginal de la oreja.

niendo una hipoxia natural que explicaría los altos niveles de lactato en el conejo comparado con el humano. Durante la anemia, el complejo se vería reforzado debido a que el lactato se sigue produciendo en grandes cantidades mientras que la hemoglobina se encuentra por debajo de los valores normales.

La importancia del papel del ATP como regulador de la afinidad de la hemoglobina humana por el oxígeno in vivo, es cuestionable, en base al reporte de Franklin y colaboradores (Franklin et al., 1971), en el cual se demuestra que 85-90% del ATP en el eritrocito está complejado con Mg⁺⁺ siendo el complejo -- ATP-Mg incapáz de interaccionar con la hemoglobina.

Por otro lado los datos de Brewer y Eaton (Brewer y Eaton, 1971), sobre la invariabilidad de la curva de disociación de oxígeno en la anemia de los conejos, no obstante una reticulocitosis de hasta 50% (lo cual en el presente trabajo representa un aumento de 100% en la relación molar ATP/Hb), en conjunto indican muy probablemente que in vivo el papel del ATP no es precisamente el de regular la función de la hemoglobina en los mamíferos.

Hecha esta salvedad, no queda más que resaltar la importancia de la dilucidación de los mecanismos de la respuesta del 2,3-DPG a la anemia en los mamíferos, teniendo confianza en que in vivo éste es el principal regulador de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno.

A manera de conclusiones tentativas, a continuación se hace un análisis general de los mecanismos de la respuesta del - -

2,3-DPG a la anemia de las especies estudiadas en el presente trabajo, complementándolo con los datos de la literatura, que permiten validar dichas conclusiones.

De un análisis global de las especies estudiadas bajo condiciones de anemia, queda claro que los incrementos de la relación molar 2,3-DPG/Hb responden de una manera inversa (en los puntos máximos), a los valores normales de dicha relación molar. En los gatos el incremento fue de 100%, con una relación 2,3-DPG/Hb inicial de 0.186:1, en los cobayos fue de 45% para un nivel inicial de 1.11 y finalmente en los conejos 11% con una relación molar de 2. Es también claro que dicho incremento solamente revisten importancia en los cobayos ya que en los gatos y los conejos, no se mantienen cuando la anemia es máxima y estable.

Estudios preliminares hechos en ratones de laboratorio, en los que se indujo y mantuvo la anemia hasta que los niveles de hemoglobina tendieran al equilibrio, apoyan esta idea según se puede apreciar en la tabla 10. En ésta se puede observar como decrece la hemoglobina hasta tender al equilibrio, mientras que la relación molar 2,3-DPG/Hb se mantiene prácticamente constante los primeros cuatro días de sangrado. Se observa un ligero incremento de esta relación en el día cinco, cuando la hemoglobina está cercana al equilibrio. Este incremento representa un aumento de 9% con respecto al valor inicial (2.395/2.590). El ratón de laboratorio es el mamífero que posee los niveles más -

TABLA 10

Datos preliminares sobre la determinación de los niveles de 2,3-DPG durante la anemia --
en el ratón de laboratorio.

Día de sangrado	(No. ind.)	µmoles DPG/ml.	µmoles Hb/ml.	grs. Hb/ml.	2,3-DPG/Hb
1	5	4.8890	2.1316	14.0680	2.395
2	3	4.7359	2.0026	13.2117	2.365
3	2	4.2735	1.7954	11.8490	2.380
4	3	3.4547	1.4480	9.5568	2.382
5	2	3.7320	1.4400	9.5040	2.590

altos de 2,3-DPG, dentro de los animales muestreados hasta la fecha.

Parece ser que la explicación de la respuesta del 2,3-DPG ante un estado de anemia en los mamíferos, está centrada en el P_{50} . Se define el P_{50} como la presión parcial de oxígeno requerida para saturar un 50% de las moléculas de hemoglobina bajo determinadas condiciones.

En la tabla 11 se presentan datos tomados de la literatura sobre el P_{50} bajo distintas condiciones para las especies hechas anémicas en el presente trabajo. También se presentan los datos correspondientes a otras especies pertenecientes a los respectivos grupos (figura 2), que ellas representan. Por ejemplo del primer grupo están el gato y el carnero, el segundo el humano y el cobayo. Del tercer grupo se encuentran el conejo y el ratón, aunque de este último solamente se tiene el P_{50} de la sangre total.

Las condiciones en que se midió el P_{50} fueron la hemoglobina libre de 2,3-DPG, en presencia de distintas cantidades de este compuesto y en la sangre total.

El P_{50} de la hemoglobina libre de 2,3-DPG indica la afinidad intrínseca de ésta por el oxígeno y en presencia de concentraciones crecientes de aquél, su reactividad con dicho metabolito.

El gato y el carnero, representantes del primer grupo de

los animales que aquí se estudiaron, tienen en común poseer hemoglobinas con una afinidad intrínseca por el oxígeno notablemente menor que la de los otros animales. Otra característica en común es su baja reactividad con el 2,3-DPG. Esta última ha sido explicada en el caso de los borregos, en base a deleciones de uno o dos residuos de aminoácidos del extremo amino de las cadenas beta (Bunn et al., 1974). En el caso de los gatos el grupo amino terminal de las cadenas β se encuentra acetilado (Bunn, 1971). Como ya ha sido mencionado, el extremo amino de las cadenas beta es una región que participa en la creación del sitio alostérico del 2,3-DPG. Las deleciones en los borregos y las acetilaciones de los gatos dan como resultado hemoglobinas poco reactivas con el 2,3-DPG.

Por otro lado las especies representantes del segundo y tercer grupos poseen hemoglobinas intrínsecamente más afines por el oxígeno y más reactivas con el 2,3-DPG. Atendiendo a los valores normales de este compuesto (tabla 6), y a las características intrínsecas de las hemoglobinas en cuanto a la afinidad por el oxígeno, dicho metabolito se encuentra en grandes cantidades en los animales con hemoglobinas muy afines por el oxígeno. En condiciones normales las altas concentraciones de 2,3-DPG disminuyen dicha afinidad.

Los gatos y los carneros poseen pequeñas cantidades de este compuesto por 2 razones, una hemoglobina intrínsecamente poco afín por el oxígeno y a su vez poco reactiva con el 2,3-DPG.

TABLA 11

Afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en ausencia y en presencia de 2,3-DPG, en solución y en la sangre total.

Especie	P_{50} de la Hb. libre de DPG	P_{50} de la Hb. +0.2mM DPG	P_{50} de la Hb +1 mM DPG	P_{50} de la - sangre total
Gato	13.8	15.0	16.5	36
Carnero	16.0	16.6	21.0	41
Humano	4.0	7.0	10.5	26
Cobayo	5.7	8.2	11.6	27
Conejo	5.1	9.9	13.5	32
Ratón	-	-	-	50

Excepto para el ratón, los datos fueron tomados de Bunn et al., 1974

El P_{50} de la sangre del ratón fue tomado de Neilsen y Larimer, 1958.

En estos animales, la baja reactividad de la hemoglobina con el 2,3-DPG queda balanceada con la baja afinidad intrínseca por el oxígeno, siendo el resultado final una sangre poco afín por el oxígeno.

En los animales con hemoglobinas muy afines por ambos -- compuestos, las altas concentraciones de 2,3-DPG contrarrestan la alta afinidad por el oxígeno dando finalmente el mismo resultado, una sangre con una afinidad por el oxígeno decremen-tada.

Una característica común de los animales representantes del segundo grupo (humano y cobayo), es el P_{50} de la sangre total, el cual es menor que el resto de los animales. Es justamente en el cobayo en donde el 2,3-DPG se incrementó importantemente de una manera definida, es decir, se incrementó y se mantuvo como tal cuando la anemia fue máxima y estable.

Tomando en consideración los incrementos máximos de 2,3-DPG durante la anemia reportados en la literatura para los carneros (800%, Agar et al 1977; 1900% Studzinski et al., (1980 en términos absolutos tales incrementos no representan relaciones molares mayores de 0.16. En el gato el incremento máximo de 100% (0.186 a 0.370) en la relación molar 2,3-DPG/Hb parecía ser importante, sin embargo se observó una tendencia de regreso hacia los valores normales. Es por todo esto que en el primer grupo de animales (fig 2), el mecanismo de incrementar los niveles -- de 2,3-DPG para reducir la afinidad de la hemoglobina por --

el oxígeno no es muy importante. Al parecer estos animales resisten la anemia sin contar con dicho mecanismo simplemente -- porque sus sangres son naturalmente poco afines por el oxígeno.

Por lo que respecta al tercer grupo desafortunadamente só lo se cuenta con los datos de los conejos. Ya se ha discutido -- que en estos animales el mecanismo de resistencia a la anemia parece ser su adaptación natural al metabolismo hipóxico, probablemente relacionado con las características especiales del complejo 2,3-DPG-Hb. De hecho en la misma tabla 11 se ve que la hemoglobina del conejo es la más reactiva con el 2,3-DPG.

En el caso del ratón la explicación parece darla el P_{50} - de la sangre total. Aparentemente el 2,3-DPG ha reducido tanto - la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, que ya no es necesario reducirla aún más.

En conclusión el incremento de los niveles de 2,3 DPG como respuesta a la anemia, al parecer solamente opera en el segun do grupo de mamíferos al cual pertenece el hombre.

La respuesta del 2,3 a la anemia de los mamíferos, es sólo un aspecto de los mecanismos que pueden estar operando. Por - ejemplo se ha reportado que el flujo cardíaco se incrementa durante la anemia (Metcalf y Dhinsa, 1970). Por otro lado al disminuir el número de células, es de esperarse que la viscosidad - de la sangre disminuya con un aumento concomitante de la fluidez. O como se hizo observar cuando se discutieron los cambios en el hematocrito, en donde se observó que una respuesta general fué -

el incremento del volúmen celular. ¿Que importancia tendrá para un organismo anémico el poseer células con una mayor superficie de contacto? ¿Cual es la razón de la entrada masiva de los reticulocitos a la circulación en el conejo y en general en los mamíferos anémicos?

Es evidente que este trabajo es sólo una pequeña contribución a la dilucidación de los mecanismos compensatorios que operan en los mamíferos ante un estado de anemia, en el cual la capacidad oxigenadora de la sangre se encuentra disminuida.

También es evidente que se requieren estudios en un mayor número de especies, principalmente entre las del segundo grupo - con relaciones 2,3-DPG/Hb mayores a 1.5, para corroborar o corregir la predicción de que durante la anemia en esas especies la relación molar llegue a un máximo de 2:1. El estudio detallado de otras especies del tercer grupo permitirá saber si el conejo es una excepción o es la regla en el grupo.

RESUMEN.

Con el fin de conocer dentro de lo posible y de una manera sistemática, los mecanismos de la respuesta de 2,3-DPG a la anemia en los mamíferos, se determinaron los valores normales de este metabolito en 53 especies de aquellos, representantes de 11 de los 20 órdenes existentes.

En función de los valores normales de la relación molar 2,3-DPG/Hb, fue posible agrupar al conjunto de animales estudiado, dentro de 3 categorías.

Se escogió una especie representante de cada una de las 3 categorías, se le indujo una anemia crónica por sangrado intracardiaco diario y se determinaron los cambios en la concentración de 2,3-DPG en el transcurso de dicha anemia.

A la especie representante de la tercera categoría se le determinaron además los cambios en la concentración de ATP y ácido láctico, con la finalidad de conocer de que manera estaban relacionados con la variación de la concentración de 2,3-DPG.

Tomando los datos de la literatura sobre el P_{50} de las especies hechas anémicas y otras pertenecientes a sus respectivos grupos, se hizo un análisis global de la respuesta del 2,3-DPG a la anemia, en función de las afinidades intrínsecas por el oxígeno de sus hemoglobinas y del P_{50} de la sangre total.

BIBLIOGRAFIA.

- Agar, N. S., Harley, J.D., Gruca, M.A. and Roberts, J. Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate in anaemic sheep. *Specialia* 15 (2) 275-277, 1977.
- Arnone, A. X ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhemoglobin. *Nature* 237 146, 1972.
- Astrup, P. Dependence of oxyhemoglobin dissociation and intracellular erythrocytic 2,3-DPG on acid base status of blood. *Advan. Exp. Med. Biol.* 6 67, 1970.
- Atwater, J. and Erslev, A.J. Reticulocyte staining. En *HEMATOLOGY* Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J. and Rundles, R.W.-Eds. Mc Graw Hill Co., N.Y. p 1361, 1972.
- Badwey, J.A. and Westhead, E.W. Hysteretic response of human erythrocyte pyruvate kinase to phosphoenolpyruvate. *J. Biol. Chem.* 251 (18) 5600, 1976.
- Barcroft. J. Anoxaemia, Presidential Address. *Lancet* 199 485, -1920.
- Bard, H. and Shapiro, M. Perinatal changes of 2,3-diphosphoglycerate and oxygen affinity in mammals not having fetal type hemoglobins (*Pediat. Res.*, en prensa).
- Bartlett, G.R. Patterns of phosphate compounds in red blood cells of man and animals. *Advan. Exp. Med. Biol.* 6 245, 1970.
- Becerril, L.B. Estudios sobre los niveles de ácido 2,3-difosfoglicérico (2,3-DPG) en conejos sujetos a un proceso de anemia experimental crónica. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, -U.N.A.M. 1979.
- 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.
- Benesch, R., Benesch, R.E. and Yu, C.I. Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 59 526, 1968.
- Benesch, R. and Benesch R.E. The reaction between diphosphoglycerate and hemoglobin. *Fed. Procc.* 29 (3) 1101, 1970.

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

Brand, K. and Quadflieg, K.H. Interrelationship between energy metabolism from various substrates and the 2,3-bisphosphoglycerate bypass in human erythrocytes. Acta Biol. Med. Germ, 56 - 507, 1977

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.

Brewer, G.J. and Eaton, J.W. Erythrocyte Metabolism. Interaction with oxygen transport. Science 171 1205, 1971.

Bunn, H.F. Differences in the interaction of 2,3-diphosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins. Science 172 1049, - 1971.

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, 1974.

Caldwell, P.R.B., Nagel, R.L. and Jaffé, E.R. The effect of oxygen, carbon dioxide, pH and cyanate on the binding of 2,3-diphosphoglycerate to human hemoglobin. B. B. R. C. 44 (2) - - 544, 1971.

Card, R.T. and Brain, M.C. The "anemia" of childhood. Evidence for a physiologic response to hyperphosphatemia. New England - Journal of Medicine. 288 388, 1973.

Costa, L.E. and Martín de, M.I. Effect of hypobaric hypoxia on erythrocytic glycolysis and 2,3-DPG in rodents. Acta Physiol.-Latinoam. 26 115, 1976.

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.

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.

Dawson, R.B. Jr. The hemoglobin function of blood stored at -- 4°C. Adan. Exp. Med. Biol. 6 305, 1970.

- De Bruin, S.H., Janssen, L.H.M. and Van Os G.A.S. Effect of -- 2,3-diphosphoglycerate on the Bohr effect of human adult hemoglobin. B. B. R. C. 45 (2) 544, 1971.
- Duhm, J., Deuticke, B. and Guerlach, E. Metabolism of 2,3-diphosphoglycerate and glycolysis in human red blood cells under the influence of dipyriddyamole and inorganic sulphur compounds. Biochem. Biophys. Acta. 170 452, 1968.
- Eaton, J.W., Brewer, G.J., Shultz, J. and Sing, C.F. Variation in 2,3-diphosphoglycerate and ATP levels in human erythrocytes and effects on oxygen transport. Advan. Exp. Med. Biol. 6 21, - 1970.
- Eduard, M.C. Jr. and Norman, A.H. Handbook of Laboratory Animal Science Vol. III. CRC press Inc., Cleveland Ohio, p 429, 1976.
- Engel, K, and Duc, G. Effect of iodoacetate and fluoride on the position of the hemoglobin oxygen disassociation curve of human whole blood. Nature 219 936, 1968.
- Faulkner, J.A., Brewer, G.J. and Eaton, J.W. Adaptation of the red blood cell to muscular exercise. Advan. Exp. Med. Biol. 6 213, 1970.
- Franklin, H.F., Ransil, B.J. and Chao, A. The interaction between erythrocyte organic phosphates, magnesium ion, and hemoglobin, Journal of Biological Chemistry. 246 5273, 1971.
- Guerlach, E., Duhm, J. and Deuticke, B. Metabolism of 2,3-diphosphoglycerate in red blood cells under various experimental conditions. Advan. Exp. Med. Biol. 6 155, 1970.
- Giblett, E.R., Coleman, D.H., Pirzo-Biroli, G., Donohue, D.M., - Motulsky, A.G. and Finch, C.A. Erythrokinetics: quantitative -- measurements of red cell production and destruction in normal - subjects and patients with anemia. Blood 11 291, 1956.
- Greenwald, I. A new type of phosphoric acid compound isolated - from blood, with some remarks on the effect of substitution on the rotation of l-glyceric acid. J. Biol. Chem. 63 339, 1925.
- Harkness, D.R., Ponce, J. and Frayson, B. Comparative study of the phosphoglyceric acid cycle in mammalian erythrocytes. Comp. Biochem. Physiol. 28 129, 1969.
- Hjelm, M. Methodological aspects of current procedures to separate erythrocytes into age groups. En: Cellular and Molecular -

Biology of erythrocytes (Yoshikawa and Rapoport, Eds.) University park press. Baltimore. 427, 1974.

Huckabee, W.E. Relationships of pyruvate and lactate during -- anaerobic metabolism. II. Exercise and formation of oxygen -- debt. J. Clin Invest. 37 255, 1958.

International comitte for the standarization in hematology of the european society of hematology. Recomendations and require ments for haemaglobinometry, in human blood. Nature 206 119,- 1963.

Jelkman, W. and Bauer, C. What is the best method to remove -- 2,3-diphosphoglycerate from hemoglobin?. Analytical Biochemis- try 375 382, 1976.

Kilmartin, J.V. Interaction of hemoglobin with protons, CO₂, - and 2,3-diphosphoglycerate. Brit. Med. Bull. 32 209, 1976.

Lenfant, C., Torrance, J., English, E., Finch, C.A., Reinafar- C., Ramos, J. and Faura, J. Effect of altitude on oxygen bin- ding by hemoglobin and organic phosphate levels, J. Clin. In- vest. 47 2652, 1968.

Lenfant, C., Torrance, J.D., Woodson, R.D., Jacobs, P. and Fin- ch, C.A. Role of organic phosphates in the adaptation of man - to hypoxia. Fed. Procc. 29 (13) 1115, 1970a.

Lenfant, C., Torrance, J.D., Woodson, R.D. and Finch, C.A. Adap- tation to hypoxia. Advan. Exp. Med. Biol. 6 203, 1970b.

Lian, C.Y., Roth, S. and Harkness, D.R. Rhe effect of altera- - tion of intracellular 2,3-DPG concentration upon oxygen binding of intact erythrocytes containing normal and mutant hemoglo- - bins. B. B. R. C. 45 151, 1971.

Lichtman, M.A., Miller, D.R., Cohen, J. and Waterhouse, C. Re- duced red cell glycolysis, 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate concentration and increased hemoglobin oxygen- affinity caused by hypophosphatemia. Annals of Internal Medici- ne 74 562, 1971.

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

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

Metcalfe, J. and Dhindsa, D.S. A comparison of mechanisms of oxygen transport among several mammalian species. *Advan. Exp.-Med. Biol.* 6 229, 1970.

Miale, Y.B. *Laboratory Medicine Hematology*. 4th. Ed. The C.V.-Mosby Co. Saint Louis. 1972.

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.

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

Morpurgo, G., Arese, P., Bosia, A., Pescarmona, G.P., Luzzana, M., Modiano, G. and Krishna, S. Sherpas living at high altitude: A new pattern of adaptation. *P. N. A. S.* 73 (3) 747, 1976.

Murphy, J.R. Influence of temperature and method of centrifugation on the separation of erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 82 334, 1973.

Neilsen, K.S. and Larimer, J.L. Oxygen dissociation curves of mammalian blood in relation to body size. *Am. J. Physiol.* 195 (2) 424, 1958.

Noble, N.A. and Tanaka, K.R. Erythrocyte enzymes in groups of *Rattus norvegicus* with genetic differences in 2,3-diphosphoglycerate levels. *Comp. Biochem. Physiol.* 62B 81, 1979.

Noble, N.A. and Tanaka, K. R. Erythrocyte PFK in rat strains with genetically determined differences in 2,3-DPG levels. -- *Biochem. Genet.* 19 (1-2) 61, 1981.

Papadopoulos, M.D., Morrow, G. and Oski, F.A. Exchange transfusion in the newborn infant with fresh and "old" blood. The role of storage on 2,3-diphosphoglycerate, hemoglobin-oxygen affinity, and oxygen release. *Journal of Pediatrics.* 79 (6) -- 899, 1971.

Perutz, M.F. Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. *Nature* 228 726, 1970.

Perutz, M.F. Hemoglobin structure and respiratory transport. - Sci. American. 239 (6) 92, 1978.

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

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

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.

Rapoport, S. et al. The metabolism of the reticulocyte. En: Cellular and Molecular Biology of Erythrocyte. (Yoshikawa and Rapoport, Eds.). University Park Press. Tokyo, Japan. 1974.

Rapoport, I., Berger, H., Elesner, R. and Rapoport, S. pH dependent changes of 2,3-bisphosphoglycerate in human red cells during transitional and steady states in vitro. Eur. J. Biochem. 73 421, 1977a.

Rapoport, I., Berger, H. and Rapoport, S. pH dependent changes of 2,3-bisphosphoglycerate. Acta biol. med. germ. 36 515, 1977b.

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

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

Salhany, J.M., Keitt, A.S. and Elliot, R.S. The rate of deoxygenation of red blood cells: Effect of intracellular 2,3-diphosphoglycerate and pH. FEBS Letters 16 257, 1971.

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

Sigma Technical Bulletin No. 35 UV, 1980.

Sigma Technical Bulletin No. 366 UV, 1980.

Sigma Technical Bulletin No. 826 UV, 1980.

Steward, J.H. and Tate, E.M. Gel chromatography of inositol polyphosphates and the avian hemoglobin-inositol pentaphosphate-complex. *J. Chromatog.* 45 400, 1969.

Studzinski, T., Czarnecki, A. and Gluszak, A. Effect of acute-posthemorrhagic anaemia on the level of 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) in the erythrocytes of sheep. *Acta Physiol. Pol.* 31 365, 1980.

Tyuma, I. and Shimizu, K. Effect of organic phosphates in the difference in oxygen affinity between fetal and adult hemoglobin. *Fed. Procc.* 29 (3) 1112, 1970.

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.

Valdés, L.V.M. Estudios sobre la dinámica de formación de la sangre en conejos hechos anémicos por sangrado. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México, 1977.

Van Assendelft, O.W. Photometry and the standardized method for the determination of hemoglobin. *Schweiz. Med. Wschr.* 101 1649, 1965.

Wintrobe, M.M., Lee, G.R., Boggs, D.R., Bithell, T.C., Athens, J.W. and Forester, S. *CLINICAL HEMATOLOGY* 7th. Ed. Lee and Febigger. Philadelphia, 1974.