

# O PAPEL DO 2,3-DPG NO METABOLISMO DAS HEMÁCIAS\*

## Introdução

A descoberta que o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) influencia profundamente a afinidade entre o oxigênio e a hemoglobina foi notável de duas maneiras: primeiro, pela sua grande importância e segundo, pelo espaço de tempo até sua descoberta (Brewer, 1974). Com respeito ao primeiro ponto, pode-se dizer que a ligação entre hemoglobina, 2,3-DPG, e o metabolismo das hemácias (eritrócitos ou células vermelhas) têm profunda implicação para a regulação do transporte de oxigênio, e na preservação sanguínea e, em muitos casos de intervenção terapêutica em ampla variedade de doenças. Em vista da grande importância do 2,3-DPG, e o fato de uma escala relativamente curta de tempo desde a sua descoberta até o presente, esse artigo procurará fazer uma revisão detalhada de como as hemácias, hemoglobinas e 2,3-DPG se inter-relacionam.

## As hemácias

As hemácias são células que reúnem certas características que as distinguem das outras que compõem o organismo, pois apresentam dois períodos marcadamente distintos em sua evolução: um período intra-celular ósseo, em que se apresenta como célula nucleada (pró-eritroblasto e eritroblasto) cuja maturação leva cerca de 14 dias, e o período extra-medular, onde se mostra como célula anucleada (reticulócito e eritócito), vivendo cerca de 120 dias na circulação periférica.

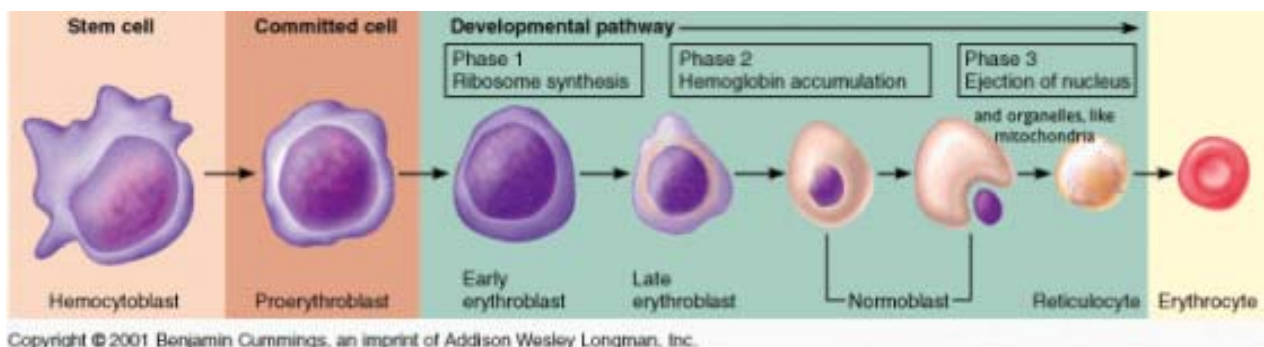


**Figura 1. Ilustração simplificada das fases de desenvolvimento das hemácias até seu amadurecimento pleno (eritrócito).**

\* Seminário apresentado pelo aluno Diego Bitencourt de David na disciplina de BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL, NO Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no primeiro semestre de 2009. Professor Responsável pela disciplina: Félix H.D. González

Ainda de maneira bem peculiar, as hemácias experimentam profundas alterações no decorrer do seu desenvolvimento, e a mais expressiva se refere ao trabalho celular representado pela extrusão do núcleo. Este é realmente um momento de revolução na história das hemácias, em que, através de sua simples expulsão ou através da passagem forçada pelos pólos capilares da medula óssea, o núcleo é expelido, sendo esta perda acompanhada da saída de outras organelas.

O jovem eritrócito assim formado não possui retículo endoplasmático, mas exibem ainda vestígios do aparelho de Golgi, mitocôndrias, ribossomos os quais desaparecem ao cabo de um a três dias. Pelo fato de não possuírem núcleo e outras organelas são impossibilitados de realizar a síntese de ácidos nucleicos ou proteínas. Além disso, essa célula magistralmente suprime a mitocôndria, eliminando a respiração celular, a realização do ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa fazendo com que as hemácias não mais consumam oxigênio, passando a desempenhar eficientemente sua função principal de transporte de hemoglobina, esta, intrinsecamente ligada ao transporte dos gases oxigênio ( $O_2$ ) e carbônico ( $CO_2$ ) e tamponamento de íons de hidrogênio ( $H^+$ ).

## Estrutura e função da hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma proteína com peso molecular de 64.500 dáltons que se constitui no principal componente do eritrócito, é solúvel na água e formada pela união de uma proteína incolor: a *globina*, que por sua vez é constituída de 2 pares de cadeias de aminoácidos,  $\alpha$  e  $\beta$  e de um composto prostético corado que possui quatro grupos, os quais contém ferro e são chamados de grupo *heme* (GARNIER *et al.*, 2002).

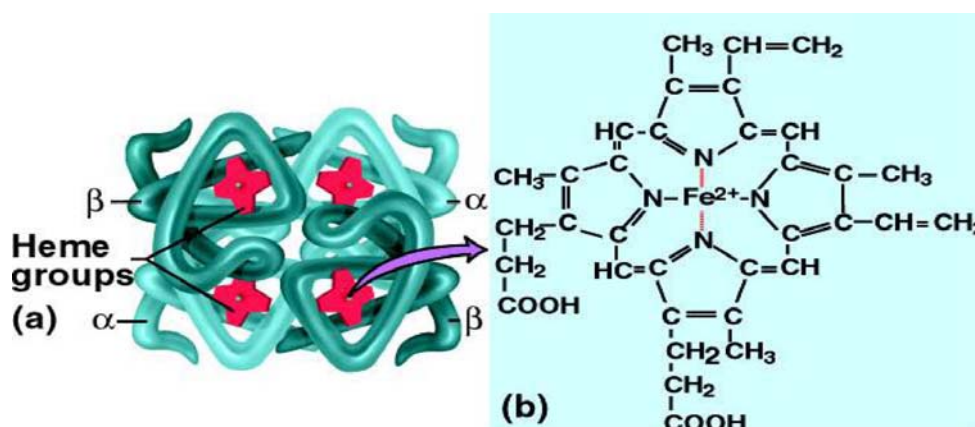


**Figura 2. Representação da hemoglobina com seus dois pares de cadeia alfa e beta (a) e da cadeia bioquímica do grupo heme.**

Os benefícios de conter hemoglobina dentro das células, ao contrário de livre no plasma, incluem: uma meia-vida maior (a Hb livre no plasma possui uma meia-vida de apenas algumas horas), a capacidade metabólica dos eritrócitos de manter o ferro ligado à Hb em seu estado funcional e a habilidade de controlar a afinidade do oxigênio pela Hb, alterando as concentrações de fosfatos orgânicos (especialmente o 2,3-DPG).

## O 2,3-DPG e seus mecanismos de ação

A pressão de oxigênio ( $P_{O_2}$ ) é necessária para liberar o oxigênio nos tecidos. A transferência se torna mais lenta à medida que a pressão atmosférica diminui, mas o organismo responde começando a produzir quantidades maiores de difosfoglicerato (2,3-DPG). A enzima tem a capacidade de enfraquecer a ligação oxigênio-hemoglobina e permite que o oxigênio saia com menor pressão. Quanto mais elevada for a situação de hipóxia (menor  $P_{O_2}$ ), mais 2,3-DPG será produzido, mantendo o processo de transferência de oxigênio para os tecidos. Portanto, esta enzima tem o potencial de deslocar o equilíbrio da curva de dissociação da hemoglobina para a esquerda, facilitando a liberação de  $O_2$  em tecidos onde há baixa pressão do mesmo, enquanto nos tecidos com alta pressão de  $O_2$  (pulmão), a molécula de 2,3-DPG é deslocada do centro da hemoglobina desoxigenada, facilitando a captação de  $O_2$ .

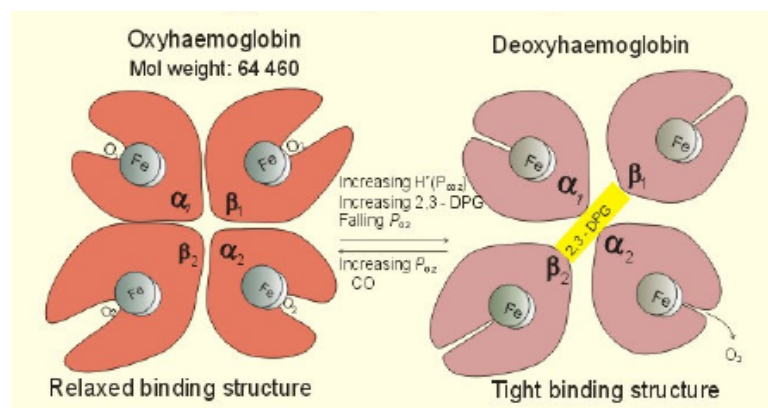


**Figura 3. Afinidade do oxigênio pela hemoglobina: influência do pH e do  $CO_2$**   
(Adaptado da Université de Sherbrooke, 2005).

Dois são os fatores que explicam esse efeito: 1) ação direta do 2,3-DPG nas propriedades alostéricas da hemoglobina e 2) uma queda no pH intra-eritrocitário, causada pela elevação da concentração do 2,3-DPG, que desvia a curva para a direita devido ao efeito Bohr.

Na ação direta, o 2,3-DPG liga-se preferencialmente à hemoglobina desoxigenada à oxigenada. A ligação do 2,3-DPG com a hemoglobina provoca uma mudança conformacional na hemoglobina.

O desvio da curva também se dá por via indireta, pela alteração do pH. A lei da neutralidade elétrica (Equilíbrio de Donnan) das soluções se aplica ao conteúdo dos eritrócitos. O mesmo número de cargas iônicas positivas deve ser igual ao de cargas iônicas negativas. O 2,3-DPG é um ânion impermeável em relação à membrana eritrocitária; portanto, o aumento desse ânion intraeritrocitário desvia o equilíbrio de Donnan, fazendo com que ocorra um influxo de íons hidrogênio. Isto leva a uma queda do pH intraeritrocitário. Desta forma, o aumento do 2,3-DPG diminui a afinidade do oxigênio pela hemoglobina devido ao efeito Bohr.

Os eritrócitos de várias espécies mamíferas também contêm 2,3-DPG, contudo algumas delas, como ovinos e caprinos, tem hemoglobinas com apropriada afinidade pelo oxigênio e não utilizam fatores alostérico intracelulares da hemoglobina como o 2,3-DPG. Pássaros utilizam um fosfato orgânico diferente, inositol fosfato, para modulação intracelular do oxigênio afinidade pela hemoglobina.

### ***O papel do 2,3-DPG e outros fatores na curva de dissociação e saturação por O<sub>2</sub> da hemoglobina***

O organismo humano possui mecanismos de adaptação para compensar a menor P<sub>O<sub>2</sub></sub> em situações de hipóxia (diminuição da quantidade de oxigênio distribuído aos tecidos pelo sangue). Nesses casos, ocorrem alterações em todos os níveis de transporte de oxigênio, desde a inspiração até o nível das mitocôndrias, ou seja, ventilação, difusão, circulação nas propriedades de transporte de oxigênio do sangue, microcirculação e na célula.

A nível celular quatro fatores são conhecidos por influenciar a afinidade entre o oxigênio e as hemácias (hemoglobina). Estes são pH, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), temperatura, e certos fosfatos orgânicos (Brewer, 1974), representados na Figura 4.

Um decréscimo em pH diminui a afinidade do oxigênio através do efeito de Bohr. Um aumento no CO<sub>2</sub> diminui oxigênio afinidade via efeito de Bohr, mas também em função de uma combinação direta do CO<sub>2</sub> na forma de carbonato com hemoglobina. Um aumento na temperatura também diminui oxigênio afinidade. Finalmente, fosfatos orgânicos das hemácias, sendo o DPG quantitativamente mais importante, diminuem a oxigênio afinidade.

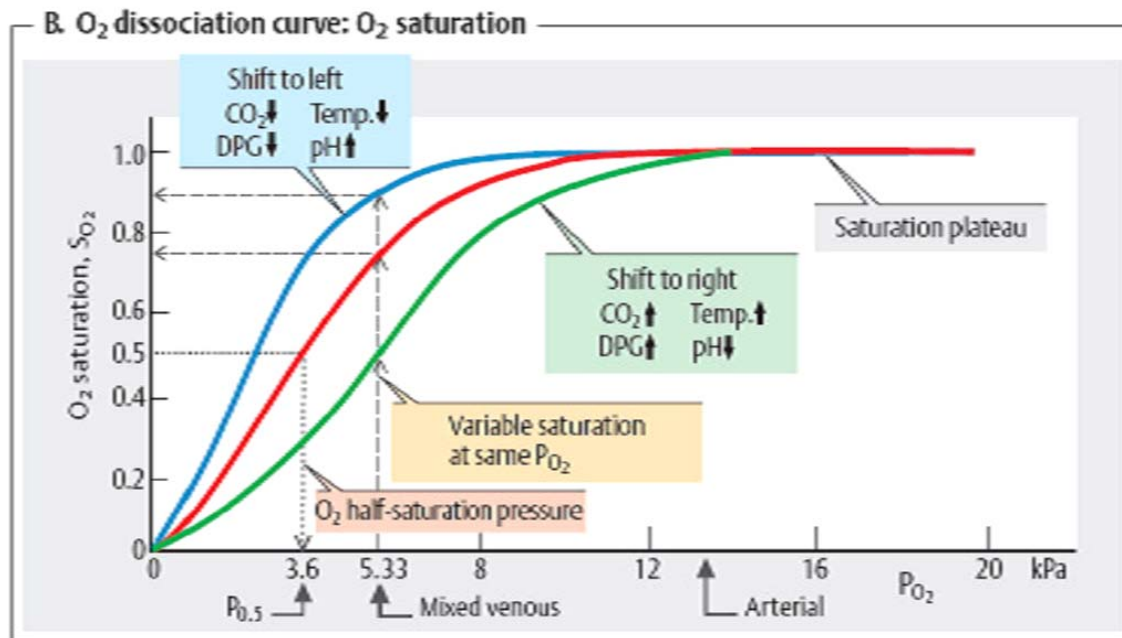


**Figura 4.** Curva de saturação e dissociação do oxigênio (O<sub>2</sub>) em relação aos fatores temperatura, pH, CO<sub>2</sub> e 2,3-DPG.

A alteração da afinidade do oxigênio pela Hb ocasionada por esses efeitos é representada pelo deslocamento da curva de dissociação da hemoglobina para a esquerda (maior afinidade) ou para a direita (menor afinidade). O deslocamento da curva pode ser mensurado pela medida da pressão parcial de oxigênio que satura 50% da hemoglobina, chamada de P<sub>50</sub>. A P<sub>50</sub> padrão (P<sub>50st</sub>) pode ser estimada por uma equação desenvolvida por Severinghaus a partir de uma gasometria venosa (SEVERINGHAUS, 1976), corrigindo para a condição padrão (temperatura de 37°C, pH de 7,4 e PaCO<sub>2</sub> de 40mmHg). A P<sub>50st</sub> da curva normal é de 26,8 mmHg (HSIA, 1998). Aumentos da P<sub>50</sub> indicam um deslocamento da curva para a direita e p<sub>50</sub> inferiores a 26,8 mmHg indicam um deslocamento para a esquerda (Figura 2). O resultado da P<sub>50st</sub> é usado para detectar alterações na afinidade do O<sub>2</sub> pela hemoglobina devido à existência de hemoglobinas variantes ou modificações na concentração do 2,3-DPG. No entanto, o importante efeito fisiológico é determinado pela P<sub>50</sub> *in vivo*, que rapidamente se modifica para a temperatura corporal, P<sub>CO<sub>2</sub></sub> e pH no sangue.

### ***Metabolismo das hemácias e origem do 2,3-DPG***

O transporte de oxigênio pelas hemácias não é uma atividade que, por si, dependa de energia metabólica. Todavia, é necessário que além da elevada concentração de hemoglobina em solução,

todos os constituintes das hemácias sejam preservadas de lesões oxidativas e que a hemólise osmótica seja evitada. Assim, a manutenção dos constituintes globulares no estado ativo, a conservação de ingredientes iônicos através da membrana e a flexibilidade das hemácias em circulação são propriedades que requerem energia metabólica.

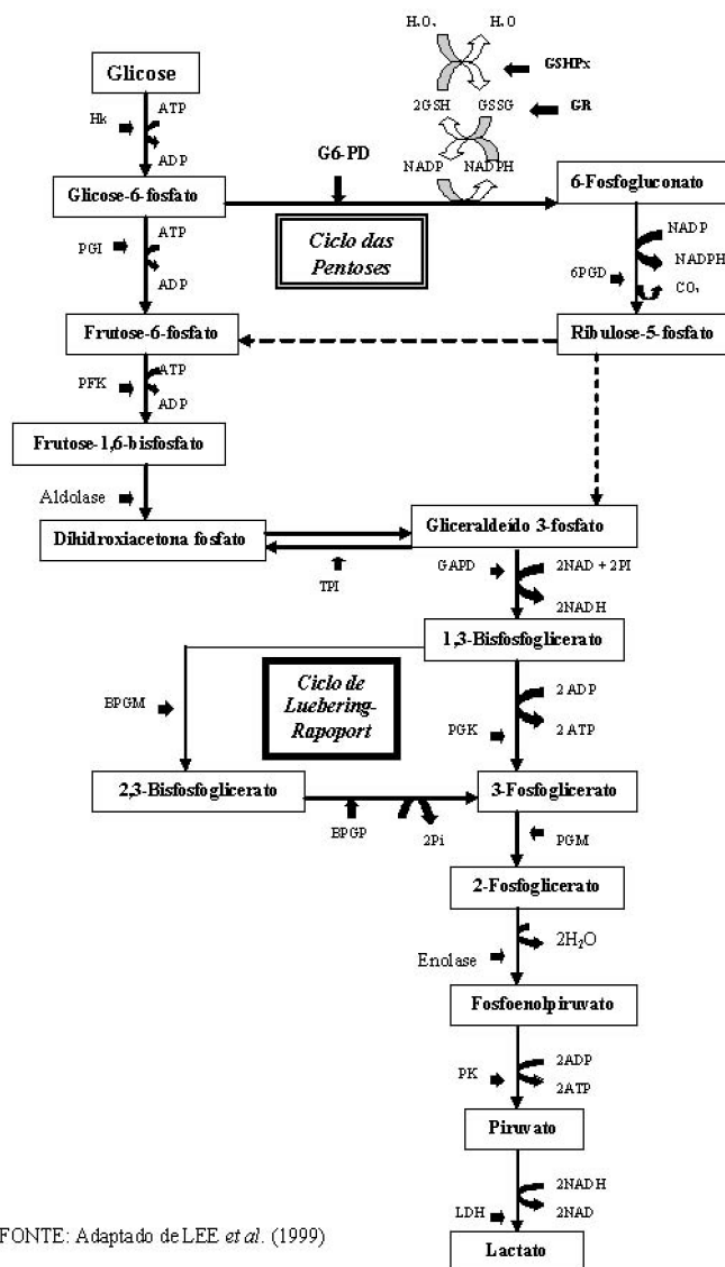
Como o eritrócito maduro não possui mitocôndrias, sua energia é obtida por duas vias principais: a via glicolítica anaeróbia (Embden-Meyerhof) e a via das pentoses fosfato ou derivação da hexose monofosfato, ou ainda via do fosfogliconato, cujas vias estão ilustradas na Figura 5. Sob circunstâncias normais, cerca de 90% da glicose da hemácia é metabolizada pela via anaeróbia e 10% pela via não produtora de ATP (Luebering-Rapaport). Já em condições de estresse oxidativo, a via de oxidação das pentoses pode ser responsável por até 90% do consumo de glicose (LEE et al., 1999). A via glicolítica de Embden-Meyerhof forma três importantes produtos: NADH, um co-fator na reação da metahemoglobina redutase; ATP, o principal nucleotídeo fosfato de alta energia; e 2,3-DPG, um regulador da função da hemoglobina. Atualmente, considera-se que a síntese e degradação do 2,3-DPG estão sob o controle de duas enzimas, a difosfoglicerato-mutase (BGPM) e a difosfoglicerato-fosfatase (BPGP), respectivamente.

### ***Efeito metabólico do 2,3-DPG***

Outra das funções do 2,3-DPG, não relacionadas diretamente com as propriedades respiratórias da hemoglobina, consistem na inibição de algumas enzimas da glicólise, da via das fosfopentoses e do metabolismo dos nucleotídeos, regulando a produção de ATP. Estes efeitos inibidores resultam da interação do 2,3-DPG com as proteínas catalíticas e/ou formação de quelatos com um cofator indispensável, o  $Mg^{2+}$ . Conforme referido anteriormente, a atividade glicolítica diminui nos eritrócitos que contem elevada concentração de 2,3-DPG. Em princípio esse efeito inibidor é influenciado por determinadas condições intraglobulares, tais como a porcentagem de deoxihemoglobina presente.

De todas as enzimas da glicólise, a hexoquinase (HK) é a que se revela mais sensível à inibição pelo 2,3-DPG, deste modo influenciando toda a seqüência metabólica; em contrapartida, se desconhece a relevância fisiológica do efeito inibidor produzido pelo 2,3-DPG nas restantes enzimas glicolíticas (fosfofructoquinase, aldolase, desidrogenase do gliceraldeído-fosfato, fosfogliceratoquinase) que não parecem ser afetadas significativamente por concentrações elevadas de 2,3-DPG. Quanto à piruvato-quinase, embora seja inibida por concentrações elevadas de 2,3-DPG, não deverá exercer grande influência no consumo da glicose em eritrócitos com 2,3-DPG em excesso, atendendo a localização em que se encontra na seqüência glicolítica.

Observações permitiram concluir que cerca de 50% da inibição da glicólise em eritrócitos com 2,3-DPG elevado seria devido à diminuição do pH intraglobular, induzida pelo 2,3-DPG; nestas condições, a atividade glicolítica torna-se dependente da inibição da fosfofructoquinase, por diminuição do pH. O resto do efeito inibidor seria causado pela inibição da hexoquinase pela 2,3-DPG, independentemente da variação do pH.



FONTE: Adaptado de LEE et al. (1999)

**Figura 5: Representação esquemática da glicólise, do ciclo das pentoses e do ciclo de Luebering-Rapaport nos eritrócitos.**

### ***Fatores que regulam a síntese e degradação do 2,3-DPG***

Os principais fatores que regulam a concentração do 2,3-DPG dentro dos eritrócitos são dois: a alteração do pH intra-eritrocitário e a hipóxia (Figura 7).

#### **pH**

Pequenas alterações do pH intracelular podem interferir na glicólise e no metabolismo do 2,3-DPG. A elevação do pH intracelular estimula a glicólise, aumenta a atividade da DPG-mutase (enzima que converte 1,3-DPG em 2,3-DPG) e inibe a atividade da DPG-fosfatase (enzima que decompõe o 2,3-DPG em 3-fosfoglicerato), resultando numa maior síntese e menor degradação de 2,3-DPG. Por outro lado, a queda do pH intracelular provoca um efeito contrário, diminuindo a concentração de 2,3-DPG e contribuindo para a síntese de lactato (DUHN e GERLACH, 1971).

Esse mecanismo de síntese e degradação do 2,3-DPG assume grande importância clínica na preservação de estoques de sangue, uma vez que a degradação do 2,3-DPG diminui a afinidade da hemoglobina para o oxigênio, dificultando a oxigenação dos tecidos periféricos. Entre outros processos utilizados para maior preservação do sangue coletado, salienta-se a elevação do pH no meio da colheita e preservação, além da adição de diversos compostos (Ex: fosfato inorgânico, piruvato azul de metileno, ácido ascórbico) ou a conservação das amostras congeladas.

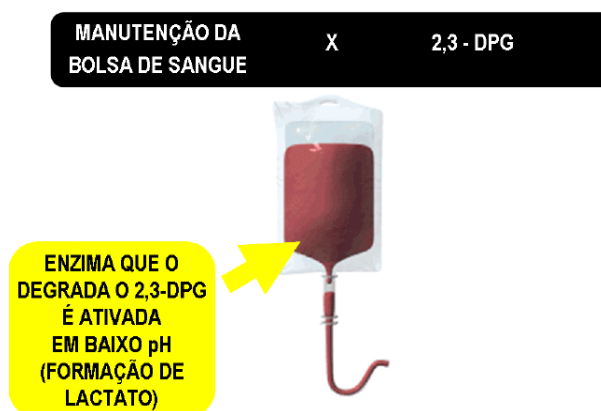


**Figura 6. Manutenção da bolsa de sangue versus a concentração de 2,3-DPG  
(Adaptado de Lacerda, 2005)**

## Hipóxia

O stress hipóxico produz um aumento nos níveis de DPG. Isso inclui exposição à altitude, anemia, insuficiência cardíaca, e alguns casos de doenças pulmonares. Três hipóteses buscam explicar esse mecanismo. A primeira atribui ao eritrócito desoxigenado o desvio do pH plasmático para o lado alcalino, visto que a hemoglobina desoxigenada é um ácido mais fraco do que a forma oxigenada. Como dito acima, o pH intra-eritrocitário alcalino aumenta a síntese do 2,3-DPG (DUHN e GERLACH, 1971).

A segunda hipótese baseia-se no fato de o 2,3-DPG possuir maior afinidade pela hemoglobina desoxigenada do que pela oxigenada. Em situação de hipóxia, há um aumento da hemoglobina desoxigenada, fazendo com que o 2,3-DPG ligue-se mais facilmente à hemoglobina. Desta forma, ocorre uma diminuição do 2,3-DPG livre. Essa queda do 2,3-DPG livre reduz sua ação como inibidor da DPG mutase, resultando assim num aumento da síntese do 2,3-DPG (DUHN e GERLACH, 1971).

A terceira teoria atribui à hipóxia um estímulo à eritropoeiese, aumentando o número de eritrócitos relativamente jovens. Tem sido demonstrado que os eritrócitos jovens possuem maior concentração de 2,3-DPG que os mais velhos (SAMAJA et al, 1991).

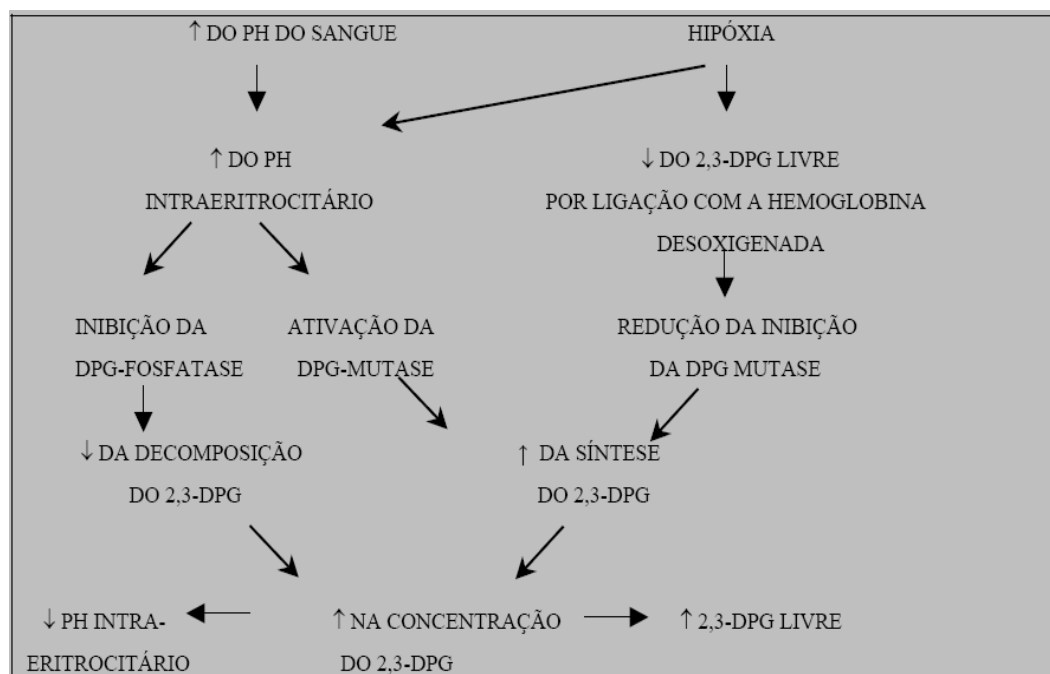


**Figura 7: Representação simplificada do efeito do pH e da hipóxia sobre a regulação da formação de 2,3-DPG no eritrócito.**

As adaptações resultantes da hipóxia, principalmente hematológicas, são freqüentemente buscadas por atletas, que procuram na melhoria das condições de transporte do oxigênio um melhor desempenho em atividades de alta exigência física ao nível do mar ou em altitudes próximas. Para alcançar esses efeitos, desenvolveu-se o Treinamento de Altitude (TA), muito difundido entre os atletas de alto nível, que inclui, durante a temporada, um período de permanência em locais acima de 2.000 metros (Geller, 2005).

Dentre as mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem, pode se ressaltar o 2,3-DPG como fator fundamental no incremento da eficiência de transporte de oxigênio e sua essencialidade na liberação do oxigênio aos tecidos periféricos sob baixas pressões de  $O_2$ . A representação esquemática dessas modificações é apresentada na Figura 8, que ilustra também o treinamento de atletas sob condições de hipóxia através de aparelhos simuladores de altitude.

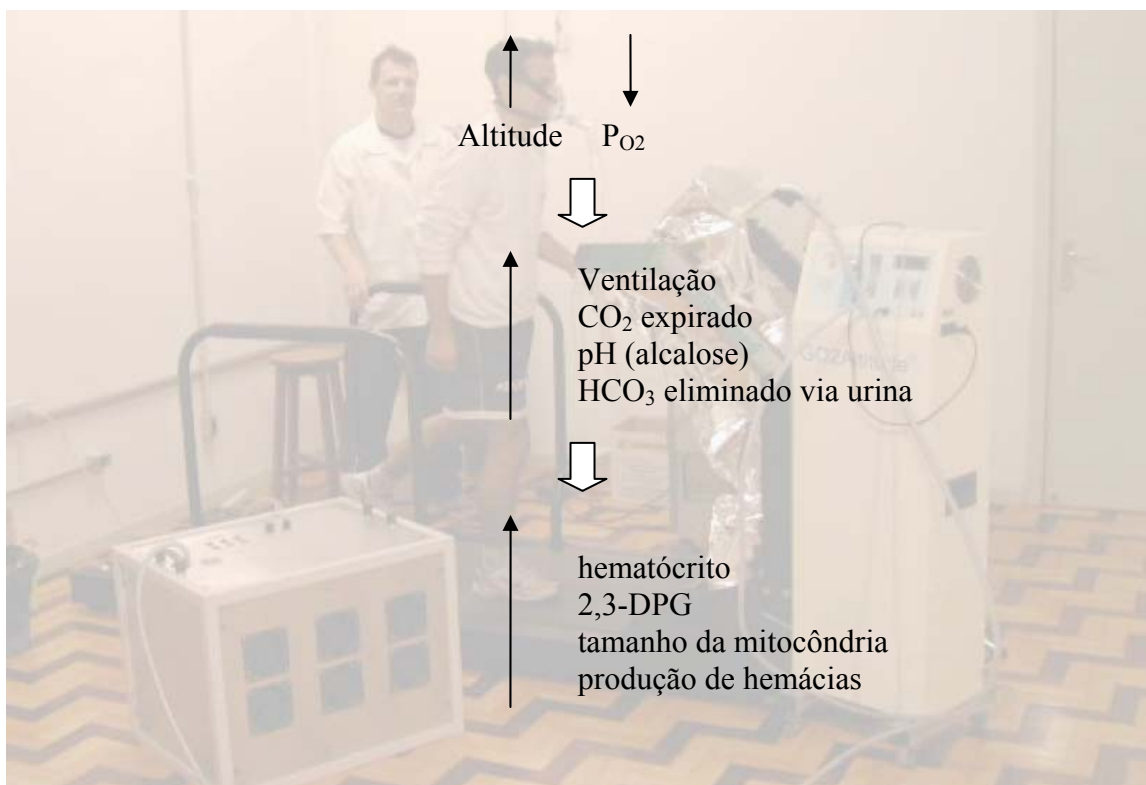


**Figura 8: Representação simplificada dos efeitos da altitude sobre a fisiologia e bioquímica da respiração para aclimatização humana nesses ambientes (Ilustração adaptada de Geller, 2005 em condições de hipoxia em aparelho simulador de altitude (GO2) para avaliação do desempenho físico).**

### **Outros fatores de regulação do 2,3-DPG**

A regulação na concentração do 2,3-DPG também é feita por mecanismo de *feedback* negativo, ou seja, um aumento na concentração do 2,3-DPG, por aumento do pH ou por hipóxia, levará: 1) à redução do pH intra-eritrocitário, por desvio no equilíbrio de Donnan, como explicado anteriormente e 2) a um aumento o 2,3-DPG livre (DUHN e GERLACH, 1971). Ambos os efeitos levarão a uma redução na concentração do 2,3-DPG.

Além desse fator, recentemente têm sido demonstrados que a concentração de hemoglobina e  $Mg^{2+}$ , também podem estar regulando a síntese e degradação do 2,3-DPG, contudo os mecanismos de ação desses fatores permanecem desconhecidos (Mulquiney & Kuchel, 1999).

### **Referências bibliográficas**

- BREWER, G. J. 2,3-DPG and erythrocyte oxygen affinity. *Annual Review of Medicine*, v. 25, p. 29-38, 1974.
- DUHN, J.; GERLACH, E. On the mechanisms of the hypoxia-induced increase of 2,3- diphosphoglycerate in erythrocytes. *Pflugers Archives*, v.326, p. 254-269, 1971.
- GARNIER, M.; DELAMARE, J.; DELAMARE, V.; DELAMARE, T. *Dicionário Andrei de Termos de Medicina*. 2. ed., São Paulo: Andrei Editora Ltda, 2002.
- GELLER, C.A. Efeitos do treinamento hipóxico intermitente sobre variáveis hematológicas e capacidade de performance. 2005. 132f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciência do Movimento Humano) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Movimento Humano, Área de Fisiologia do Exercício, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS). Santa Maria, 2005.
- HSIA, C.C.W. Respiratory function of hemoglobin. *New Eng. J. Med.*, v. 338, p. 239-247, 1998.
- LACERDA, L.A. O metabolismo do eritrócito. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/bioquimica>>
- LEE, R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.; RODGERS, G. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p.196-217.
- MULQUINEY, P.J.; KUCHEL, P.W. Model of 2,3-biphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: computer simulation and Metabolic Control Analysis. *Biochemical Journal*, v. 342, p. 597-604, 1999.
- SEVERINGHAUS, J.W. Acid-base balance nomogram - a Boston Copenhagen Detente. *Anesthesiology*, v.45, p.539, 1976.
- SAMAJA, M.; ROVIDA, E.; MOTTERLINI, R.; TARATOLA, M. The relationship between the blood oxygen transport and the human red cell aging process. *Adv Exp Med Biol*, v. 307, p. 115-23, 1991.
- UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE. BCM-514: Biochimie des protéines. Disponível em: <<http://www.callisto.si.usherb.ca/~bcm514/2d.html>>. Acesso em: 20/04/2009.