

A Biblioteca de
Faculdade de Medicina
de UFRGS

RF
20 de Maio de 77

2,3 - DIFOSFOGLICERATO ERITROCITÁRIO NA "DOENÇA DA MEMBRANA HIALINA."

**Tese apresentada para
Concurso de Docência Livre
à Faculdade de Medicina
da UFRGS.**

**RENATO MACHADO FIORI
Porto Alegre / 1976**



Bib. Fac. Med. UFRGS

T-0362

23-Difosfolicerato eritrocita

AGRADECIMENTOS

O autor deseja expressar seu agradecimento a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho:

Aos Drs. LUIS PRUDENT, AMBADAS PATHAK e NICHOLAS NELSON, pelo apoio e pela colaboração decisiva na fase de execução deste trabalho.

Ao Dr. CLÓVIS WANMACKER, pelo valioso auxílio, especialmente a avaliação crítica, durante a fase de redação.

Ao Dr. MÁRIO RIGATTO, por sugestões referentes a certos aspectos do manuscrito.

Ao Dr. RAUL G. SEIBEL e a todos os colegas do Departamento de Pediatria da UFRGS, pelo incentivo e apoio irrestritos.

À Sra. RUTH B. CHERRY, por nos ter ensinado alguns conceitos básicos de estatística, aqui utilizados.

Ao Dr. EDGAR MARIO WAGNER, pela revisão e complementação do estudo estatístico.

À Srta. MARILIN BOYER, por nos ter ensinado algumas das técnicas de laboratório utilizadas neste trabalho.

À Prof^a EUZA BONAMIGO, pelo auxílio que nos prestou na redação técnica.

À Sra. ANNA FRANCISCA PASSOS, pela ajuda na organização bibliográfica.

À Prof^a ELIANA HOLMER MARCOLIN, pela colaboração na revisão do português.

À ENEIDA, minha esposa, e meus filhos RENATO, HUMBERTO e ALEXANDRE, pela ajuda e solidariedade durante todas as fases deste trabalho.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
A AFINIDADE DA HEMOGLOBINA POR OXIGÊNIO	6
2,3-DIFOSFOGLICERATO E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A AFINIDADE DA HEMOGLOBINA POR OXIGÊNIO	11
A AFINIDADE POR OXIGÊNIO DA HEMOGLOBINA FETAL	19
2,3-DIFOSFOGLICERATO E A AFINIDADE DA HEMOGLOBINA NA OXIGENAÇÃO SANGUÍNEA ANORMAL E NA ACIDOSE	25
A DOENÇA DA MEMBRANA HIALINA	29
MATERIAL E MÉTODOS	32
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÕES	57
RESUMO	60
SUMMARY	64
BIBLIOGRAFIA	67

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A AFINIDADE DA HEMOGLOBINA POR OXIGÊNIO

No ser humano, o eritrócito é o principal responsável pelo transporte de oxigênio a ser fornecido aos tecidos.

Vários fatores determinam a normalidade deste transporte, incluindo a pressão parcial do oxigênio no ar inspirado, a ventilação alveolar, a relação ventilação/perfusão nos pulmões, o pH arterial, a temperatura, o rendimento cardíaco, o volume sanguíneo, a taxa de hemoglobina e a afinidade da hemoglobina por oxigênio.

A importância da afinidade da hemoglobina por oxigênio foi reconhecida por alguns pesquisadores há muitos anos (*Keys et alii, 1936*), mas o interesse pelo assunto foi somente reavivado recentemente, quando novas informações vieram a dar um maior significado a este fenômeno fisiológico.

A afinidade da hemoglobina por oxigênio pode ser representada pela curva de dissociação do oxigênio, em que a pressão parcial de oxigênio (PO_2) e a saturação correspondente da hemoglobina são registrados em um sistema gráfico de coordenadas (FIG. 1). A curva é de forma sigmóide e é usualmente definida em termos da PO_2 em que a hemoglobina fica 50% saturada (P_{50}). A P_{50} normal, após 1 ano de idade, é de 27 mmHg a um pH de 7,4 e uma temperatura de 37° C.

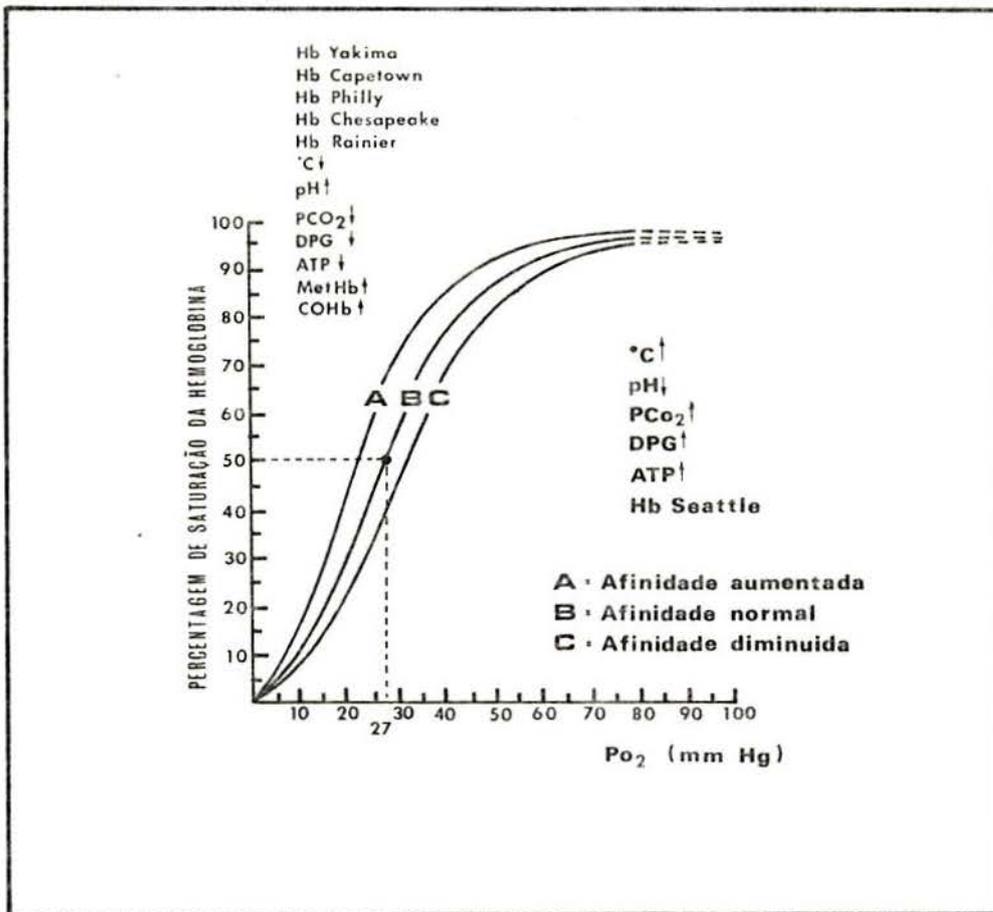


FIGURA 1 - Curvas de dissociação do oxigênio.

B: normal ($P_{50} = 27$ mmHg).

A e C: ilustram os efeitos sobre a curva (P_{50}) de variações da temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, PCO_2 , 2,3-difosfoglicerato (DPG), adenosina trifosfato (ATP) e das ocasionadas pela presença de meta-hemoglobina (MetHb) e carboxi-hemoglobina (COHb); mostram também as alterações encontradas com hemoglobinas anormais.

Alguns fatores, já de muito conhecidos, que influenciam a afinidade da hemoglobina e, portanto, alteram a curva de dissociação do oxigênio, são o pH (*Bohr et alii*, 1904), a temperatura (*Barcroft*, 1928), a pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) (*Margaria*, 1957), o monóxido de carbono (*Douglas et alii*, 1912) e a meta-hemoglobina (*Darling e Roughton*, 1942) (FIG. 1). A hemoglobina fetal possui maior afinidade que a hemoglobina adulta (*Anselmino e Hoffman*, 1930).

Várias hemoglobinas anormais possuem alterações da afinidade por oxigênio. Assim, as hemoglobinas Chesapeake, Capetown, Yakima, Kempsey, Rainier e Philly (*Adanson e Stamatoyannopoulos*, 1967; *Weatherall*, 1969; *Oski e Delivoria-Papadopoulos*, 1970), possuem maior afinidade, enquanto que a hemoglobina Seattle tem afinidade reduzida (*Stamatoyannopoulos*, 1969) (FIG. 1).

Eritrócitos novos têm uma afinidade por oxigênio diminuída (*Edwards e Rigas*, 1967; *Edwards e Cannon*, 1970).

Bellingham et alii (1971), encontraram uma correlação entre a afinidade (P_{50}) e a concentração da hemoglobina corpuscular média. Entretanto, esta correlação não foi encontrada por outros pesquisadores em experiências "in vitro" (*Wranne et alii*, 1972) e "in vivo" (*Thomas et alii*, 1974).

A influência dos fosfatos orgânicos, 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG)¹, adenosina trifosfato (ATP)¹ e outros fosfatos sobre a afinidade da hemoglobina constituiu-se em uma das mais importantes descobertas em fisiologia humana nos últimos anos, sendo este assunto discutido mais adiante em nosso trabalho.

Na figura 2, é apresentada uma demonstração esquemática da influência da posição da curva de dissociação do oxigênio sobre a liberação de oxigênio aos tecidos. O papel da posição da

¹ Embora não corretas as abreviaturas se levada em conta a grafia portuguesa, o uso destas justifica-se pela sua universalização.

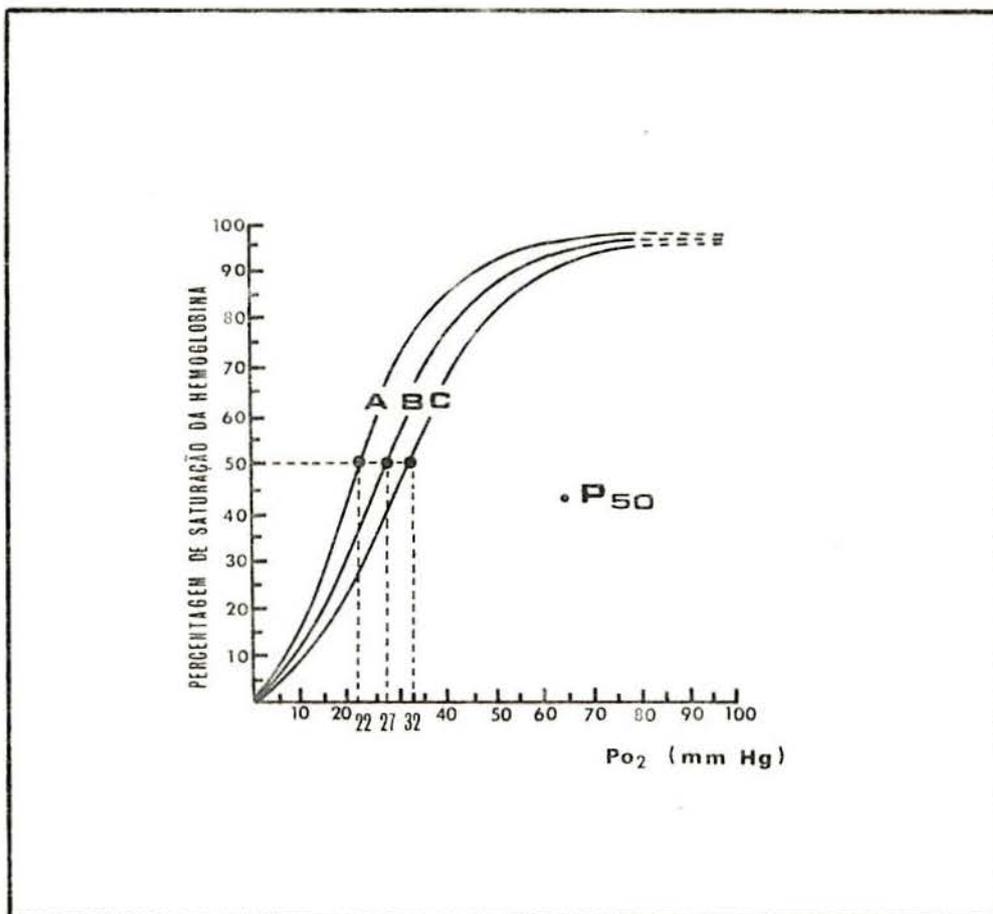


FIGURA 2 - Demonstração esquemática da influência da posição da curva de dissociação do oxigênio sobre a liberação de oxigênio aos tecidos:

B: curva normal ($P_{50} = 27$ mmHg)

A: curva desviada para a esquerda (maior afinidade da hemoglobina por oxigênio - menor fornecimento de oxigênio aos tecidos)

C: curva desviada para a direita (menor afinidade da hemoglobina por oxigênio - maior fornecimento de oxigênio aos tecidos).

curva é manter uma PO_2 relativamente elevada durante a passagem do sangue pelos vasos capilares. Segundo a lei de difusão de Fick, a quantidade de oxigênio que se difundirá, por minuto, do sangue para a mitocôndria celular, varia diretamente com a diferença de PO_2 entre os dois pontos. Uma vez que a PO_2 ao nível da mitocôndria é provavelmente menor que 1 mmHg (*Chance et alii, 1962*), a PO_2 no capilar determina a diferença em PO_2 entre o sangue capilar e a mitocôndria. Quanto mais elevada, pois, a PO_2 no capilar, maior quantidade de oxigênio passará às células. Um desvio da curva de dissociação do oxigênio para a direita provê uma PO_2 mais elevada para uma mesma saturação do sangue, mantendo, assim, uma liberação maior de oxigênio ao longo do capilar.

De Verdier e Garby, 1972, comentam a propósito de um trabalho de Chance et alii (1969), que a mitocôndria funciona bem, mesmo com baixas tensões de oxigênio, mas que a oxidação do microssoma depende da manutenção de uma tensão normal ao nível do capilar, podendo-se supor que células com oxidação normal da sua mitocôndria podem ter deficiente oxidação do microssoma. Uma diminuição da oxidação do microssoma pode não ser instantaneamente letal para a célula, da mesma forma que a diminuição da oxidação da mitocôndria, mas pode ser letal em prazo mais longo.

Do ponto de vista teórico, pois, modificações da afinidade da hemoglobina por oxigênio podem afetar significativamente o fornecimento de oxigênio tecidual. O desvio da curva de dissociação do oxigênio para a esquerda, refletindo uma menor afinidade, significará um menor aporte de oxigênio, enquanto que o desvio da curva para a direita, refletindo uma menor afinidade, significará um aumento de fornecimento. Como será visto adiante, recentes trabalhos experimentais em animais e em seres humanos trouxeram suporte a esta conclusão teórica.

Se por um lado uma menor afinidade da hemoglobina por oxigênio significa uma vantagem do ponto de vista de fornecimento

de oxigênio aos tecidos, pode representar uma desvantagem do ponto de vista de captação de oxigênio ao nível pulmonar. Neste aspecto, a forma sigmóide da curva de dissociação (FIG. 2) implica numa excepcional vantagem, pois a partir de uma PO_2 de 60 mmHg a saturação da hemoglobina é quase 100%, independentemente de desvios da curva. Sendo a PO_2 alveolar, no indivíduo que inspira ar atmosférico, ao redor de 100 mmHg, há uma boa margem de segurança, ficando a hemoglobina quase totalmente saturada desde que a PO_2 alveolar não caia a níveis críticos.

2,3-DIFOSFOGLICERATO E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A AFINIDADE DA HEMOGLOBINA POR OXIGÊNIO

Já em 1921, Adair et alii mencionavam suas suspeitas da existência de uma terceira substância fazendo parte do complexo hemoglobina-oxigênio. Estas suspeitas foram várias vezes levantadas, subseqüentemente, por aqueles que observaram que soluções de hemoglobina livre tinham maior afinidade por oxigênio que o sangue total ou soluções de eritrócitos intactos (*Christensen e Dill, 1935; Allen et alii, 1953*).

Por outro lado, Greenwald (1925) e Guest e Rapoport (1939) demonstraram a existência de elevadas concentrações de 2,3—difosfoglicerato em eritrócitos de mamíferos, incluindo seres humanos. Guest (1942) demonstrou, subseqüentemente, que a concentração de 2,3-DPG é eqüimolar à da hemoglobina no eritrócito.

Estes achados só passaram a ter real significado recentemente, quando Benesch e Benesch (1967) e Chanutin e Curnish (1967), estudando o efeito deste fosfato orgânico sobre a curva de dissociação do oxigênio, descobriram ser ele um poderoso regulador da afinidade da hemoglobina. Estes autores determinaram a curva de dissociação de soluções de hemoglobina livre,

adicionaram quantidades progressivas de 2,3-DPG, e observaram um concomitante deslocamento da curva para a direita, indicando uma diminuição da afinidade da hemoglobina por oxigênio. Assim, sabe-se hoje que este fosfato orgânico funciona como um co-fator essencial no transporte de oxigênio no sangue, ligando-se à desóxi-hemoglobina, reação esta que inibe a ligação mas facilita a liberação de oxigênio aos tecidos (*Benesch et alii, 1968 e Benesch, 1969*).

Segundo Benesch e Benesch (1969), a seguinte reação pode ser descrita:



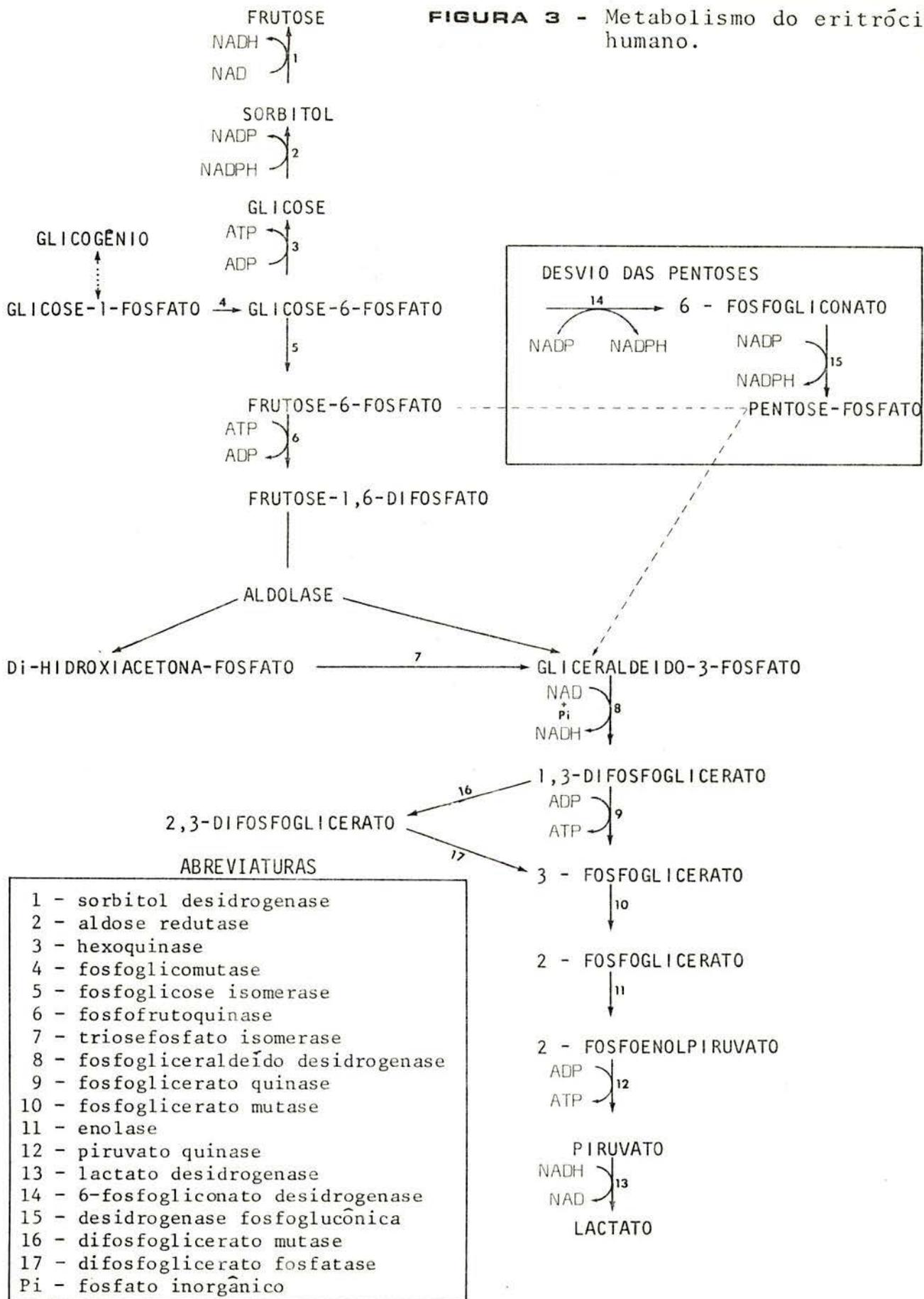
Além da ligação com a desóxi-hemoglobina, outro mecanismo pelo qual o 2,3-DPG determina a redução da afinidade da hemoglobina por oxigênio é através da baixa que produz no pH eritrocitário (*Battaglia et alii, 1970; Duhm, 1972*). A afinidade é diminuída através do efeito Bohr.

Benesch et alii (1968) concluíram que somente a desóxi-hemoglobina reage com o 2,3-DPG. Entretanto, outros estudos sugerem que também a óxi-hemoglobina pode ligar-se a pequenas quantidades deste fosfato orgânico (*Chanutin e Hermann, 1969; Garby e De Verdier, 1971; Caldwell e Nagel, 1973*), mas Brewer (1974) afirma que esta ligação não tem significação fisiológica.

A relação quantitativa entre 2,3-DPG e a afinidade da hemoglobina por oxigênio foi determinada (*Duhm, 1972*). Cada aumento de 0,4 mM na concentração de 2,3-DPG eritrocitário corresponde a um aumento de 1,0 mmHg na P_{50} .

O 2,3-DPG eritrocitário é um produto da glicólise eritrocitária (FIG. 3), produzido através do desvio de Rapoport-Luebering (FIG. 4). Este desvio leva à formação de 2,3-DPG a partir de 1,3-difosfoglicerato, por ação da enzima 2,3-difosfoglicerato mutase. O 2,3-DPG é então hidrolizado a 3-fosfo-

FIGURA 3 - Metabolismo do eritrócito humano.



Reproduzido de Oski e Delivoria-Papadopoulos (1970) e Brewer (1974).

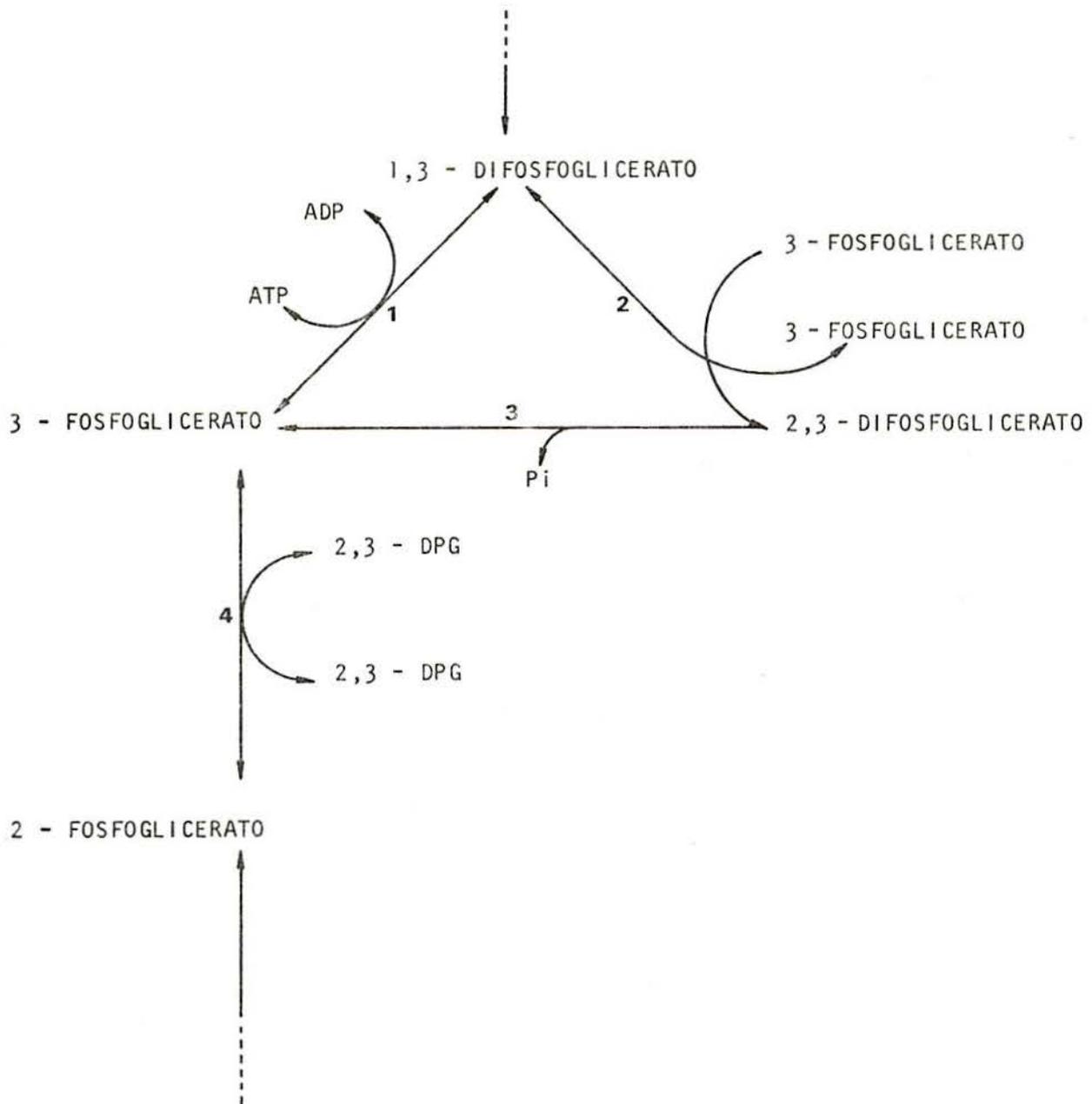


FIGURA 4 - O desvio de Rapoport-Luebering, reproduzido de Keitt (1966). Rapoport e Nieradt (1955) estimam que cerca de 90% da glicose é convertida em 2,3-DPG.

- 1 - Fosfoglicerato quinase
- 2 - 2,3-difosfoglicerato mutase
- 3 - 2,3-difosfoglicerato fosfatase
- 4 - Fosfoglicerato mutase
- Pi - Fosfato inorgânico

glicerato e fosfato inorgânico, através da enzima 2,3-difosfoglicerato fosfatase.

A intensidade da glicólise no eritrócito está sob constante inibição através da limitação de certas enzimas controladoras (Yoshikawa e Minakami, 1968; Rapoport, 1970). Segundo Yoshikawa, o controle é exercido primariamente ao nível das enzimas hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato quinase.

Vários mecanismos podem ser responsáveis pelas alterações nos níveis de 2,3-DPG eritrocitário. Pode haver um aumento global da intensidade da glicólise, um aumento da conversão de 1,3-difosfoglicerato a 2,3-DPG, uma diminuição da degradação de 2,3-DPG em 3-fosfoglicerato, um bloqueio na via metabólica posterior a 3-fosfoglicerato, uma modificação da intensidade do fluxo através do desvio das pentoses ou combinações destes vários mecanismos (Brewer, 1974).

Os trabalhos de Rose (1968) com 2,3-difosfoglicerato mutase, sugerem que o 2,3-DPG é um potente inibidor desta enzima. Deste modo, o nível de 2,3-DPG livre (não ligado à hemoglobina) seria um fator importante na regulação de sua formação, determinando a quantidade de 1,3-difosfoglicerato que seguirá o desvio de Rapoport-Luebering. Ao ligar-se o 2,3-DPG com a hemoglobina, cessa a inibição da enzima 2,3-difosfoglicerato mutase, pois seu produto é deslocado. Isto estimularia nova formação de 2,3-DPG. Este mecanismo foi sugerido para explicar a elevação das concentrações de 2,3-DPG eritrocitário que ocorre na hipóxia, pois nesta circunstância, o 2,3-DPG livre liga-se à desóxi-hemoglobina. Isto tem sido questionado por alguns pesquisadores (Duhm e Gerlach, 1971; Rorth, 1972) e, segundo Brewer (1969), o 2,3-DPG inibe outras enzimas glicolíticas, tais como a hexoquinase. Segundo Brewer (1974), o aumento global da intensidade da glicólise, controlada pela hexoquinase, fosfofrutoquinase e possivelmente a piruvato quinase, constitui-se no mais importante fator para o aumento do 2,3-DPG na hipóxia, com efeitos sobre as enzimas do desvio de Rapoport-Luebering (di-

fosfoglicerato mutase e difosfoglicerato fosfatase), como fatores moduladores adicionais. Um dos fatores que influenciaram a atividade da hexoquinase é sua inibição por seu produto, a glicose-6-fosfato (Rose e O'Connell, 1964). Por outro lado, o fosfato inorgânico é um importante ativador da hexoquinase, limitando sua inibição pela glicose-6-fosfato (Rose et alii, 1964).

O pH é o fator mais importante na regulação dos níveis de 2,3-DPG eritrocitário. O aumento do pH estimula a glicólise, aumentando a concentração de 2,3-DPG no eritrócito, enquanto que a baixa do pH produz uma diminuição da concentração deste fosfato orgânico (Chapman et alii, 1962; Minakami e Yoshikawa, 1966). Os mesmos Minakami e Yoshikawa (1966), sugerem que o pH atue ao nível da fosfofrutoquinase, uma vez que os produtos do ciclo glicolítico anteriores à fosfofrutoquinase diminuem e os produtos subsequentes aumentam com a elevação do pH. O pH atua também ao nível da difosfoglicerato mutase, alterando o equilíbrio entre 1,3-difosfoglicerato e 2,3-DPG (Minakami, 1969 e Rapoport et alii, 1972).

O fosfato inorgânico altera as concentrações de 2,3-DPG eritrocitário. A diminuição deste fosfato no sangue, determina uma queda nas concentrações de 2,3-DPG (Lichtman et alii, 1971; Travis et alii, 1971; Sheldon, 1972), com redução significativa da afinidade da hemoglobina por oxigênio. Por outro lado, a elevação dos níveis de fosfato inorgânico estimula a glicólise, elevando o 2,3-DPG eritrocitário (Rose e Warms, 1966). Há evidências de que o fosfato inorgânico age ao nível das enzimas fosfofrutoquinase e hexoquinase.

Alguns defeitos hereditários do metabolismo do eritrócito, caracterizados por deficiências de enzimas intermediárias da glicólise, podem alterar os níveis de 2,3-DPG eritrocitário. Se a deficiência enzimática está localizada antes da formação de 2,3-DPG, as concentrações deste tenderão a ser diminuídas. A deficiência de hexoquinase é um exemplo desta condição (Delivoria-Papadopoulos et alii, 1969). Entretanto, se a deficiência

enzimática é posterior à formação de 2,3-DPG, o nível deste fosfato orgânico tende a ser elevado. Na deficiência de piruvato quinase, há aumento do 2,3-DPG com concomitante aumento da P_{50} (Keitt, 1966; Delivoria-Papadopoulos et alii, 1970; Oski e Delivoria-Papadopoulos, 1970; Oski et alii, 1971).

Várias situações têm sido descritas em que ocorrem alterações da concentração de 2,3-DPG eritrocitário. Bunn et alii (1969) e Haidas et alii (1971) observaram uma maior concentração de 2,3-DPG em eritrócitos novos, provavelmente porque a atividade de certas enzimas eritrocitárias diminui com o envelhecimento dos eritrócitos. Na policitemia vera, o 2,3-DPG eritrocitário foi encontrado diminuído por alguns pesquisadores (Hakim et alii, 1972) e normal por outros (Hjelm, 1972; Valeri et alii, 1972). Entretanto, na policitemia experimental, Duhm e Gerlach (1971) encontraram concentrações baixas.

A hiperoxigenação hiperbárica do sangue (Astrup et alii, 1968; Rorth, 1972), é também uma condição associada à diminuição de 2,3-DPG eritrocitário. O exercício físico, por outro lado, produz aumento de 2,3-DPG (Eaton et alii, 1969; Faulkner et alii, 1970; Shappel et alii, 1971; Austin et alii, 1973). Da mesma forma, a gravidez acompanha-se de elevação do 2,3-DPG eritrocitário (Rorth e Bille Brahe, 1971). Além disto, Mills et alii (1961) comunicaram elevação de 2,3-DPG em pacientes com câncer.

Vários hormônios influem também na concentração de 2,3-DPG eritrocitário. A administração de andrógenos produz aumento de 2,3-DPG (Parker et alii, 1972). Trabalhos experimentais de Snyder e Reddy (1970) mostraram que a triiodotironina eleva o 2,3-DPG eritrocitário. Além disto, valores elevados foram encontrados em pacientes com hipertireoidismo (Miller et alii, 1970). Da mesma forma, Rorth (1972) encontrou aumento do 2,3-DPG em experiências "in vitro" com a prostaglandina E_2 . Por outro lado, pacientes com pan-hipopituitarismo podem ter baixos níveis deste fosfato orgânico (Rodrigues e Shahidi, 1971).

Os níveis de 2,3-DPG eritrocitário são mais elevados em mulheres do que em homens (*Arturson e Robert, 1971*), devido a um maior consumo de glicose no eritrócito feminino (*Brewer et alii, 1970*).

A procura do local de ligação do 2,3-DPG com a hemoglobina, levou Benesch et alii (*1968*) a testar isoladamente as cadeias alfa e beta da hemoglobina humana em sua reatividade com este fosfato orgânico. Observaram então que o 2,3-DPG reage com a cadeia beta na proporção de 1/4 de mol para cada cadeia beta. A cadeia alfa não reage com o 2,3-DPG. Concluíram então que a ligação deveria se fazer em algum ponto das cadeias beta da desóxi-hemoglobina, uma vez que somente esta mostrou-se capaz de reagir significativamente com o 2,3-DPG. Perutz e Lehmann (*1968*) sugeriram que o local mais provável seria a cavidade central do eixo de simetria, que se sabe possuir vários amino-ácidos básicos. Sendo o 2,3-DPG um anion forte, poderia ligar-se eletrostaticamente com estes amino-ácidos, carregados positivamente. O conhecimento de que a entrada da cavidade central da hemoglobina é maior na forma de desóxi-hemoglobina do que na forma de óxi-hemoglobina (que não permite a entrada de uma molécula de 2,3-DPG), parece explicar o porque da diferença na reação com as duas formas (*Muirhead e Perutz, 1963; Muirhead et alii, 1967*).

De Verdier e Garby (*1969*) sugeriram que a histidina beta-143 é o sítio mais provável para a ligação da hemoglobina com o 2,3-DPG. Este amino-ácido está localizado na entrada da cavidade central e, sendo seu imidazol carregado positivamente, poderia ligar-se eletrostaticamente com anions como o 2,3-DPG. O amino-ácido histidina beta-143 não pode, entretanto, ser o único local de fixação deste fosfato orgânico, pois a hemoglobina fetal, que possui cadeias gama em vez de beta, tendo um resíduo de serina não ionizado em lugar da histidina, mostra alguma reatividade com o 2,3-DPG. Muirhead et alii (*1967*) e Perutz et alii (*1970*), através de estudos cristalográficos, concluíram que, além da histidina beta-143, a valina-1 e a lisi

na-82 devem ser outros pontos de fixação do 2,3-DPG na hemoglobina.

O mecanismo pelo qual o 2,3-DPG altera a afinidade da hemoglobina por oxigênio parece ser o seguinte: ligando-se à hemoglobina em sua cavidade central, a molécula de 2,3-DPG força a hemoglobina a adotar uma conformação semelhante à da desóxi-hemoglobina, expulsando o oxigênio. Por outro lado, uma elevação da PO_2 do sangue aumenta a oxigenação da molécula, provocando a saída do 2,3-DPG (Brewer, 1974).

A AFINIDADE POR OXIGÊNIO DA HEMOGLOBINA FETAL

Em 1930, Anselmino e Hoffman observaram que o sangue fetal apresentava uma afinidade por oxigênio maior do que a do sangue materno. Este característico desvio da curva de dissociação do oxigênio do sangue fetal para a esquerda, em relação ao sangue do adulto, é mostrado na figura 5.

Allen et alii, em 1953, demonstraram que soluções dialisadas de hemoglobina fetal e de hemoglobina adulta tinham a mesma afinidade por oxigênio e concluíram que a diferença nas curvas de dissociação dos dois tipos de sangue não podia ser atribuída à hemoglobina, mas que um outro fator, no interior do eritrócito, devia ser o responsável.

A descoberta de que os fosfatos orgânicos reduziam a afinidade da hemoglobina por oxigênio, levou imediatamente à suspeita de que o desvio para a esquerda da curva do sangue fetal poderia ser conseqüência de uma menor concentração destes fosfatos no eritrócito fetal. Entretanto, logo ficou evidente não haver diferenças significativas nas concentrações destes nos eritrócitos adultos e fetais. A explicação para este fenômeno veio com a demonstração, por vários investigadores, de que a

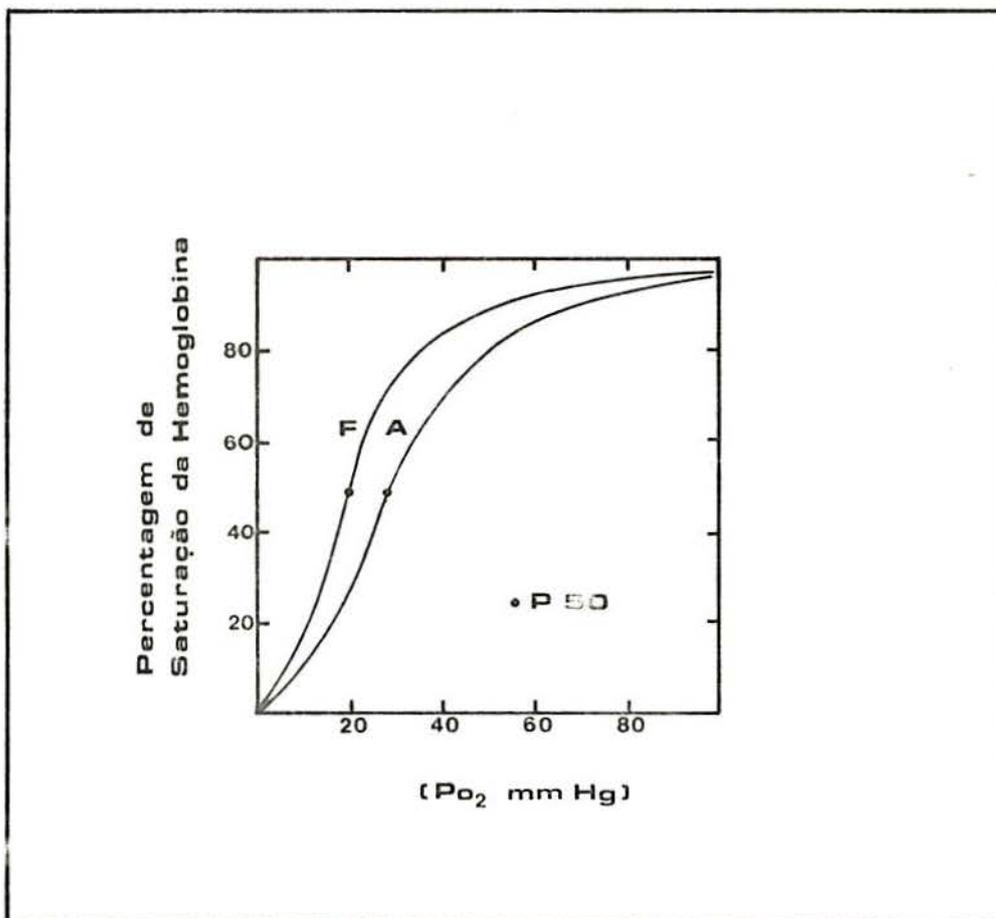


FIGURA 5 - A curva de dissociação do oxigênio do sangue fetal (F) em relação à curva do sangue do adulto (A). O característico desvio da curva para a esquerda é devido à menor reatividade da hemoglobina fetal com o 2,3-difosfoglicerato.

afinidade do 2,3-DPG pela hemoglobina fetal era menor do que pela hemoglobina adulta, não produzindo, pois, o mesmo efeito sobre a curva de dissociação do oxigênio quando adicionado ou retirado das soluções de hemoglobina fetal (*Bauer et alii*, 1968; *Tyuma e Shimizu*, 1969; *DeVerdier e Garby*, 1969). Esta diferença em reatividade tem sido atribuída ao fato de que as cadeias gama da hemoglobina fetal não possuem resíduo de histidina, onde se crê ocorrer a principal ligação do 2,3-DPG nas cadeias beta (*Bunn e Briehl*, 1970).

A hemoglobina F_1 , um dos componentes hemoglobínicos do sangue fetal, correspondente a cerca de 10% da hemoglobina do feto, não mostra nenhuma reação com o 2,3-DPG, enquanto que a hemoglobina F_{II} , o principal componente da hemoglobina fetal, apresenta alguma reação, embora bem inferior à da hemoglobina adulta. A única diferença entre as hemoglobinas F_1 e F_{II} reside nos grupos amino N-terminais das cadeias gama que são bloqueados por grupos acetil na hemoglobina F_1 e que estão livres na hemoglobina F_{II} (*Schroeder et alii*, 1962; *Huehns e Shooter*, 1966).

A P_{50} do sangue fetal, refletindo sua curva de dissociação do oxigênio, é de cerca de 20 mmHg (*Delivoria-Papadopoulos e Oski*, 1970). Após o nascimento, à medida que o tempo passa, a hemoglobina fetal vai sendo substituída por hemoglobina adulta, ocorrendo um aumento progressivo da P_{50} até níveis adultos (*Fiori et alii*, 1970) (FIG. 6), o que acontece ao redor de 4 a 6 meses de idade (*Delivoria-Papadopoulos e Oski*, 1970; *Oski*, 1973) (FIG. 7).

A P_{50} correlaciona-se mais significativamente com o produto da percentagem da hemoglobina adulta multiplicado pela concentração de 2,3-DPG eritrocitário ($\{2,3\text{-DPG}\} \times \%HbA$). *Delivoria Papadopoulos e Oski* (1970) chamaram este produto de "fração ativa de 2,3-DPG", enfatizando a importância de ambos os fatores na determinação da P_{50} .

Orzalesi e Hay (1971), entretanto, considerando que a hemoglobina fetal reage parcialmente com o 2,3-DPG e que o efeito

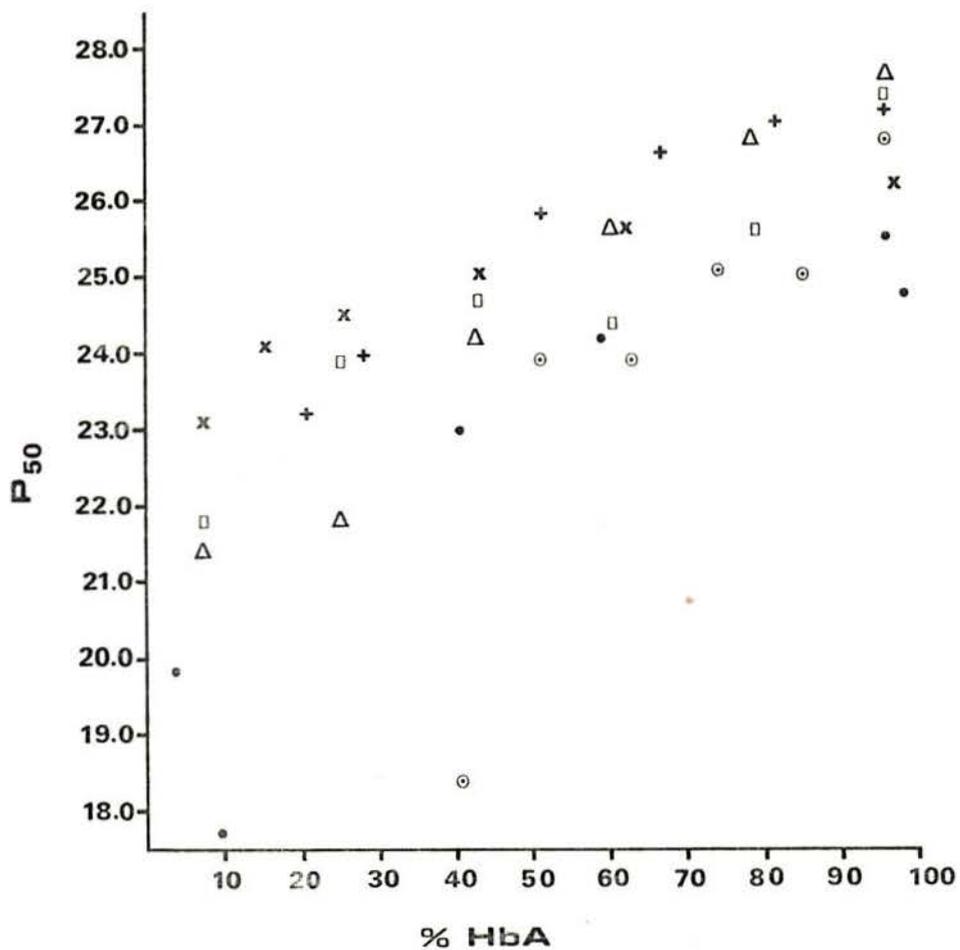


FIGURA 6 - Efeito da adição de eritrócitos de adultos (hemoglobina A) sobre a posição da curva de dissociação do oxigênio (P_{50}) do sangue fetal. Observa-se uma forte correlação entre estas variáveis: $r = 0,94$; $t_c = 15,586$; $t_{0,001} = 3,646$; $p < 0,001$. (Fiori et alii, 1970).

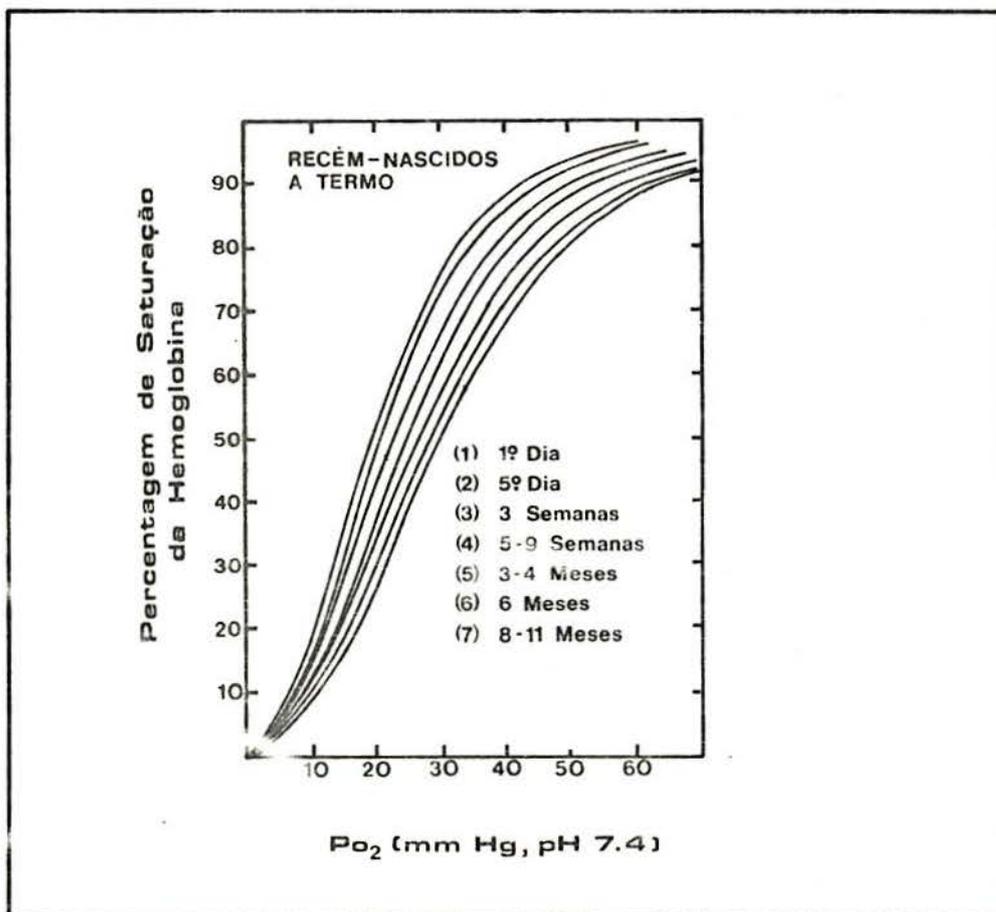


FIGURA 7 - Curvas de dissociação do oxigênio durante o primeiro ano de vida (*Delivoria-Papadopoulos e Oski, 1970*).

"in vitro" deste fosfato orgânico sobre a P_{50} da hemoglobina fetal é de 40% do efeito sobre a hemoglobina adulta, estabelecem o conceito de "fração efetiva de 2,3-DPG" - $\{2,3\text{-DPG}\} \times \times (\%HbA + 0,4 \times \%HbF) -$, aparentemente ainda mais preciso que o anterior.

Como referido anteriormente e discutido mais adiante, a hipóxia produz elevação dos níveis de 2,3-DPG e um conseqüente desvio da curva de dissociação do oxigênio para a direita, permitindo assim uma melhor liberação de oxigênio aos tecidos. No recém-nascido isto não ocorre, conforme foi demonstrado "in vitro" e "in vivo" por Oski et alii (1970). O sangue fetal pois, pela sua baixa P_{50} , além de liberar menos oxigênio aos tecidos que o sangue do adulto, não possui este mecanismo de adaptação à hipóxia, como ocorre em idades posteriores. Entretanto, esta maior afinidade do sangue fetal poderá constituir-se em uma vantagem "in útero", facilitando a captação do oxigênio liberado pelo sangue materno ao nível da placenta, que como se viu anteriormente, tem uma afinidade diminuída durante o período de gravidez, provavelmente para facilitar a transferência de oxigênio ao feto.

Estudos feitos em cordeiros submetidos a transfusões intra-uterinas com sangue de adulto da mesma espécie, parecem demonstrar que um certo estado hipóxico é desencadeado (Battaglia et alii, 1969). De qualquer forma, o desvio para a esquerda da curva de dissociação do oxigênio do feto "in útero" não parece ser crucial, porque transfusões intra-uterinas, que produzem um desvio da curva fetal para a posição da curva do adulto, parecem não comprometer fetos humanos (Novy et alii, 1971). Além disso, têm sido comunicados casos de recém-nascidos normais, de mães com hemoglobinas anormais, cujo sangue tinha afinidade por oxigênio maior que o sangue do filho (Parer, 1970).

Se por um lado a hemoglobina fetal, com maior afinidade, apresentaria vantagens para o feto no útero materno, este tipo de sangue poderia ser desvantajoso para o recém-nascido, uma

vez que esta hemoglobina libera menos oxigênio aos tecidos, enquanto que o problema da captação desaparece ao ser trocada a placenta pelo pulmão, como órgão oxigenador. Estudos experimentais em animais (*Battaglia et alii*, 1969; *Delivoria-Papadopoulos et alii*, 1971), mostraram que a substituição do sangue fetal por sangue do animal adulto, produz uma elevação da pressão parcial de oxigênio do sangue venoso misto.

2,3-DIFOSFOGLICERATO E A AFINIDADE DA HEMOGLOBINA NA OXIGENAÇÃO SANGUÍNEA ANORMAL E NA ACIDOSE

Keys et alii, em 1936, comunicaram alterações da curva de dissociação do oxigênio ocasionadas pela altitude. Mais de 30 anos depois, Claude Lenfant et alii (1968) realizaram uma clássica experiência, levando 7 pessoas residentes ao nível do mar, em Lima, Perú, a uma altitude de 4.530 metros, em um período de menos de 24 horas. Durante a subida, houve progressiva elevação do 2,3-DPG eritrocitário, com paralelo desvio da curva de dissociação do oxigênio para a direita. Ao contrário, na descida, houve uma queda na concentração de 2,3-DPG e um retorno da curva ao normal.

Em 1970, o mesmo Lenfant, com outro grupo de pesquisadores, refez esta experiência, levando a uma alta montanha um grupo de indivíduos tornados acidóticos pela ingestão de acetazolamida. Os indivíduos com sangue não previamente acidificado apresentaram, ao subir, alcalose respiratória com elevação do 2,3-DPG eritrocitário e desvio da curva de dissociação do oxigênio para a direita, enquanto que aqueles tornados acidóticos, não tiveram aumento significativo do pH nem elevação das concentrações de 2,3-DPG e alterações da curva de dissociação. À luz destes dados, sugerem os autores que a diminuição da afinidade da hemoglobina por oxigênio na hipóxia da altitude é mediada pelo 2,3-DPG eritrocitário, mas que a eleva-

ção deste fosfato orgânico é desencadeada por um aumento do pH. Mais recentemente, Rorth et alii (1972), sugeriram que uma substância oxidante desconhecida, liberada pelo organismo durante o exercício, possa ser um co-fator para a elevação da concentração do 2,3-DPG eritrocitário na adaptação do indivíduo à altitude.

Eaton et alii (1969) e Torrance et alii (1970) confirmaram achados de Lenfant, mostrando que indivíduos que vivem em grandes altitudes tem um 2,3-DPG eritrocitário mais elevado do que os que vivem em baixa altitude, tendo pois uma afinidade da hemoglobina por oxigênio diminuída e, conseqüentemente, uma liberação de oxigênio aos tecidos facilitada. Em vista de que este desvio da curva de dissociação do oxigênio para a direita reduz sua captação ao nível dos pulmões, diminuindo assim a saturação do sangue arterial, os benefícios de uma liberação facilitada ao nível dos tecidos ficam prejudicados. Segundo cálculos feitos por Torrance et alii (1970), indivíduos que residem a 4.000 metros de altura tem uma PO_2 arterial ao redor de 48 mmHg e uma PO_2 do sangue venoso misto de 34 mmHg (normal: 38 a 40 mmHg). A PO_2 do sangue venoso misto seria de 27 mmHg (7 mmHg a menos), se não houvessem mecanismos de adaptação tais como hiperventilação, policitemia e um aumento de 2 mmHg na P_{50} . O aumento da P_{50} produziria um aumento de 2 mmHg na PO_2 do sangue venoso misto, enquanto os outros fatores seriam responsáveis pelos outros 5 mmHg.

Já nas primeiras décadas deste século, alguns eméritos pesquisadores haviam demonstrado que em situações clínicas associadas à hipóxia, a curva de dissociação do oxigênio desviava-se para a direita, refletindo assim uma menor afinidade da hemoglobina por oxigênio e, aparentemente, permitindo um melhor fornecimento de oxigênio aos tecidos (Hasselbach et alii, 1917; Richard e Strauss, 1927). Mais recentemente, vários pesquisadores encontraram um 2,3-DPG eritrocitário aumentado e uma afinidade da hemoglobina diminuída em pacientes com pneumopatias associadas à hipóxia (Edwards et alii, 1968; Lenfant et alii, 1969; Oski

et alii, 1969; Weiss e Desforges, 1972; Edwards e Canon, 1972). Os últimos autores observaram que alguns pacientes apresentavam pouca ou nenhuma elevação do 2,3-DPG. Isto se deve, provavelmente, à acidose que ocorre freqüentemente nestes pacientes e que tende a reduzir a concentração de 2,3-DPG eritrocitário.

Em 1950, Morse et alii observaram um desvio para a direita da curva de dissociação do oxigênio em pacientes com cardiopatia congênita cianótica. Posteriormente ao conhecimento da ação do 2,3-DPG sobre a afinidade da hemoglobina, Oski et alii (1970) repetiram este trabalho, encontrando um aumento do 2,3-DPG e a mesma diminuição da afinidade verificada pelos primeiros autores.

A anemia é também acompanhada de desvio da curva de dissociação do oxigênio para a direita (Richards e Strauss, 1927 ; Kennedy e Valtis, 1954; Mulhausen et alii, 1967). A associação deste desvio com elevação dos níveis de 2,3-DPG eritrocitário, foi amplamente demonstrada por Valeri e Fortier (1969), Huehns e Bellingham (1969) e Torrance et alii (1970). Além disso, Eaton e Brewer (1968), Hjelm (1969) e Torrance et alii (1970), encontraram uma correlação inversa entre 2,3-DPG e concentração de hemoglobina. Estes achados sugerem que o sangue de indivíduos normais é programado para um fornecimento normal de oxigênio aos tecidos, fazendo ajustamentos nos níveis de uma variável para compensar a outra. Indivíduos programados para possuírem uma taxa relativamente baixa ou alta de hemoglobina teriam um metabolismo eritrocitário programado para altos ou baixos níveis de 2,3-DPG, enquanto que indivíduos com altas ou baixas concentrações de 2,3-DPG, estariam programados para baixos ou altos níveis de hemoglobina no sangue. A correlação inversa entre hemoglobina e 2,3-DPG eritrocitário não foi encontrada por outros pesquisadores ao estudarem pacientes com anemia ferropriva (Slawsky e Desforges, 1972).

O trabalho experimental de Thomas et alii (1974) em cães, mostrou que o 2,3-DPG e a P_{50} se correlacionavam inversamente

com a concentração de hemoglobina e com a saturação do sangue venoso misto, sugerindo que nos pacientes com anemia, a dessa turação do sangue venoso é a responsável pelo aumento do 2,3-DPG eritrocitário e o conseqüente desvio da curva de dissociação do oxigênio para a direita.

Pacientes com cirrose hepática apresentam, da mesma forma, aumento do 2,3-DPG e da P_{50} (Keys e Snell, 1938; Hurt e Chanutin, 1965; Caldwell et alii, 1965; Mulhausen et alii, 1967; Astrup e Rorth, 1973). Embora o exato mecanismo deste aumento não esteja totalmente claro, aparentemente a anemia e a alcalose metabólica que usualmente acompanham esta hepatopatia são, pelo menos em parte, responsáveis pelo fenômeno (Thomas et alii, 1970).

Da mesma maneira que ocorre "in vivo", a hipóxia produz elevação do 2,3-DPG eritrocitário em experiências "in vitro" (Asakura et alii, 1966; Caldwell et alii, 1973).

O mecanismo pelo qual a hipóxia estimula a formação de 2,3-DPG não está totalmente compreendido. Além da ligação com a desóxi-hemoglobina, já mencionada anteriormente, outro mecanismo importante parece ser o aumento do pH eritrocitário quando a hemoglobina é desoxigenada, o que produziria um estímulo à glicólise (Asakura et alii, 1966; Rorth, 1969; Astrup, 1970; Duhm e Gerlach, 1971).

Todas estas observações levaram à compreensão de que o 2,3-DPG e outros fosfatos orgânicos em menor grau, alterando a afinidade da hemoglobina por oxigênio, eram responsáveis por um extraordinário mecanismo de adaptação à hipóxia, abrindo-se pois novas perspectivas ao estudo da fisiologia humana.

Já em 1939, Rapoport e Guest observaram, através de experiências "in vitro", que a acidificação do sangue produzia uma queda na concentração de 2,3-DPG eritrocitário. Subseqüentemente, mostraram uma diminuição do 2,3-DPG em um voluntário, cujo sangue foi acidificado até um pH de 7,06, através da in-

gestão de cloreto de amônio (*Guest e Rapoport, 1939*). Uma queda similar foi observada pelos mesmos autores em um paciente com acidose diabética e em um lactente com gastroenterite e acidose. Asakura et alii (*1966*), em um estudo mais extenso "in vitro" e variando o pH de 6,5 a 9,0, mostrou uma correlação linear entre pH e 2,3-DPG, obtendo valores máximos deste fosfato orgânico com um pH de 8,0 a 8,2. Os trabalhos de Rorth (*1969*) e Bellingham et alii (*1971*), confirmaram estes achados.

Há pois dois tipos de ação do pH sobre a afinidade da hemoglobina: um imediato, conhecido desde 1904 através da observação clássica de Bohr et alii (ver FIG. 1); outro mais lento e progressivo, em sentido oposto, recentemente demonstrado, através do efeito sobre as concentrações de 2,3-DPG eritrocitário. Esta função regulatória do pH sobre a afinidade do sangue levou Astrup a afirmar em editorial no *New England Journal of Medicine* (*1970*):

"Esta conexão entre o efeito do pH sobre a afinidade da hemoglobina por oxigênio e sua relação com um ajustamento auto-regulado da liberação de oxigênio para os tecidos, pode ser a explicação do porque da manutenção de um pH no plasma e no eritrócito dos organismos vivos dentro de limites tão estreitos, um fato que até agora tem sido uma interrogação para muitos."

A "DOENÇA DA MEMBRANA HIALINA"²

Extensas revisões sobre a Doença da Membrana Hialina foram feitas nos últimos anos por Gregg e Bernstein, 1961, Rudolph e Yuan, 1966, Sinclair, 1966, Nelson, 1970, Reynolds, 1970,

² O autor prefere, no momento, esta denominação por ter sido consagrada pelo uso e ser universalmente entendida. Em 1959, um simpósio internacional tentou estabelecer um único nome para a doença, tendo vencido no final da votação a denominação "Idiopathic Respiratory Distress Syndrome

Auld, 1973, Gluck e Kulovich, 1973, Simpson, 1974 e Stahlman, 1975. Trata-se de uma doença de incidência universal, ocorrendo quase que exclusivamente em recém-nascidos prematuros, sobretudo na faixa de 28 a 32 semanas de gestação. É a causa mais importante de morte neonatal precoce na maioria das maternidades americanas e européias.

A maior parte dos recém-nascidos mostram sinais de asfixia ao nascer. Quando a dificuldade respiratória não está presente nos minutos que se seguem ao nascimento, é quase que invariavelmente evidente ao fim da primeira hora de vida. São marcantes a retração da caixa torácica na inspiração, o gemido expiratório, a frequência respiratória elevada e a cianose generalizada em ar ambiente. A ausculta pulmonar revela um murmúrio vesicular simetricamente diminuído e rude, podendo ser ouvidos estertores úmidos finos em ambos os pulmões. Crises de apnéia são freqüentes, sobretudo nos prematuros de mais baixo peso. É também freqüente a ocorrência de edema, oligúria e hipotensão. A PO₂ arterial é baixa, não se obtendo elevações muito significativas com o uso de altas concentrações de oxigênio. Ocorrem graus variados de acidose respiratória e metabólica.

Radiologicamente, encontra-se um padrão retículo-granulado

of the Newborn" (Rudolph e Smith, 1960). Entretanto, a maioria dos neonatologistas passou a usar uma forma mais abreviada: "Respiratory Distress Syndrome" (RDS). Para o português, a doença foi traduzida como "Síndrome de Angústia Respiratória Idiopática", provavelmente buscando uma sigla de fácil memorização e utilização (SARI). Outros a traduziram para "Síndrome de Desconforto Respiratório do Recém-nascido" (SDRI). A palavra inglesa "distress" tem uma conotação mais ampla que a palavra portuguesa angústia, que exprime uma situação basicamente psicológica (grande aflição, desgosto, ansiedade com opressão, agonia - *Aurélio Buarque de Holanda Ferreira, 1972*), certamente não adequada a uma dificuldade respiratória mecânica de grande intensidade de um recém-nascido. A tradução de "distress" como desconforto (falta de conforto, desconsolo), parece mais inadequada. Acrescente-se o fato de que a adjetivação "idiopática" não tem mais sentido, uma vez que a causa da doença é hoje perfeitamente conhecida. Gluck et alii, em 1972, propôs a troca do nome para "Dificuldade Respiratória do Desenvolvimento", de acordo com sua teoria de que não se trata de uma doença propriamente dita, mas um fenômeno do desenvolvimento.

difuso, presente em ambos os campos pulmonares, dando o clássico aspecto de "vidro esmerilhado". Há variações do grau de opacidade pulmonar, sendo que nos casos mais graves pode-se observar opacificação completa dos pulmões. A presença de broncograma aéreo é característica.

O pico da intensidade dos sinais clínicos ocorre no 2º ou 3º dia de vida, havendo nos sobreviventes uma melhora progressiva a partir de 72 horas, com recuperação usualmente completa entre uma e duas semanas. É relativamente pequena a incidência de seqüelas nos que sobrevivem e que são adequadamente tratados.

A causa da doença é uma atelectasia expiratória: cada vez que o recém-nascido expira, o pulmão colapsa, requerendo grande pressão para reabrir os alvéolos. Esta atelectasia é ocasionada pela falta de substâncias redutoras da tensão superficial, que forram os alvéolos dos pulmões que atingem a maturidade. A atelectasia faz com que grande parte do sangue que passa pelos pulmões não se oxigene. Há hipoperfusão pulmonar em consequência de vasoconstrição arteriolar pulmonar pela acidose, hipovolemia e choque. O aumento da resistência vascular pulmonar produz "shunts" da direita para a esquerda através do foramen oval, ductus arterioso e dos próprios pulmões.

Desde que a Doença da Membrana Hialina do recém-nascido é usualmente acompanhada de acentuada hipóxia e acidose, este trabalho foi planejado para determinar suas consequências sobre os níveis de 2,3-DPG eritrocitário.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente trabalho³, foram estudados vinte e dois (22) recém-nascidos prematuros, sendo que onze (11) deles eram portadores de quadro clínico e radiológico característicos da Doença da Membrana Hialina (Grupo A), enquanto que os outros onze (11) não apresentavam quaisquer manifestações clínicas de doença (Grupo B).

O Grupo A foi acompanhado desde o primeiro dia de vida até à morte ou até sua recuperação completa. O critério clínico para o diagnóstico da Doença da Membrana Hialina foi a presença dos seguintes sinais: gemido expiratório, taquipnéia (mais do que 60 movimentos respiratórios por minuto), retração costal e esternal e cianose de tipo central em ar ambiental. O critério radiológico foi a presença de um padrão retículo-granulado difuso em ambos os campos pulmonares e broncograma aéreo.

A doença era classificada como leve, se a acidose fosse leve (pH acima de 7,25) ou inexistente após as primeiras horas de vida e o paciente não requeresse concentrações de oxigênio ambiental maiores do que 40%. A doença era considerada de moderada gravidade, se ocorresse acidose importante (pH abaixo de 7,25) após as primeiras horas, e/ou se fosse necessária a administração de concentrações de oxigênio acima de 40%, não requerendo porém a instalação de um respirador. Os pacientes

³ Este trabalho foi realizado no "Neonatal Research Laboratory", Boston Lying-in Hospital, Harvard Medical School, em Boston, Massachusetts.

eram catalogados como portadores de doença muito grave, quando necessitassem de assistência ventilatória. Alguns dados clínicos referentes a estes prematuros, tais como idade gestacional, peso ao nascer, contagem de Apgar e resultado final encontram-se no Quadro I ⁴.

Todos os prematuros tiveram sua artéria umbilical cateterizada segundo a técnica descrita por Cochran et alii (1968). Através deste cateter, sangue arterial era retirado com a frequência requerida pela condição clínica do paciente, para determinações do pH, PO₂, PCO₂, hematócrito e 2,3-difosfoglicerato eritrocitário.

Para a gasometria arterial e hematócrito, um centímetro cúbico de sangue era colhido ⁵ em seringa cujo espaço morto havia sido preenchido por heparina. A extremidade era obturada e a seringa colocada em um recipiente contendo gelopicado. As determinações eram realizadas dentro de 10 minutos da coleta do sangue, sendo utilizado um sistema padrão de eletrodos (IL, modelo nº 113) ⁶. O hematócrito era também determinado com este mesmo sangue numa centrífuga microcapilar ⁷.

Simultaneamente, em outra seringa heparinizada, era colhido um centímetro cúbico de sangue para determinação do 2,3-DPG eritrocitário. Esta amostra de sangue era imediatamente colocada em um mililitro de ácido tricloroacético, homogeneizada, centrifugada e, a porção sobrenadante, diluída a 1% com água

⁴ Sendo a Doença da Membrana Hialina uma doença da prematuridade de qualquer etiologia, desencadeada ou agravada frequentemente pela hipóxia, independente da causa, e que apresenta manifestações clínicas superponíveis, foi julgada desnecessária, para os fins deste trabalho, a descrição da história obstétrica e dos sinais clínicos de cada paciente separadamente.

⁵ Todas as coletas de material e todas as determinações laboratoriais obedeceram sempre às mesmas técnicas e foram realizadas pelo próprio autor deste trabalho.

⁶ Instrumentation Laboratories, Lexington, Massachusetts, U.S.A.

⁷ International Equipment Company, Needham, Massachusetts, U.S.A.

QUADRO I

IDADE GESTACIONAL, PESO AO NASCER, CONTAGEM DE APGAR E RESULTADO FINAL DOS PACIENTES COM DOENÇA DA MEMBRANA HIALINA (GRUPO A)

PACIENTE	IG	PN	Apgar	RESULTADO
QUADRO CLÍNICO LEVE				
1	31	1276	7-8-8	Sobreviveu
2	32	1361	7-8-9	Sobreviveu
3	37	2863	baixo	Sobreviveu
QUADRO CLÍNICO MODERADAMENTE GRAVE				
4	34	2438	2-2-6	Sobreviveu
5	34	2041	5-5-8	Sobreviveu
6	37	2325	7-8-9	Sobreviveu
7	37	2114	9-9-9	Sobreviveu
QUADRO CLÍNICO MUITO GRAVE				
8	27	1190	NR	Faleceu *
9	32	1531	1-4-9	Faleceu *
10	34	1583	5-6-7	Faleceu *
11	32	1247	baixo	Sobreviveu *
$\bar{X} \pm S$	33,4 ± 3,04	1815 ± 568		

IG : idade gestacional (semanas)

PN : peso ao nascer (gramas)

Apgar: contagem de Apgar a 1, 3 e 5 minutos

NR : não registrado

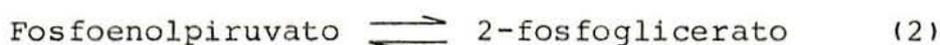
* necessitou ventilação assistida

destilada. O 2,3-DPG era determinado nesta amostra pelo método de Krimsky (1963), modificado por Schroter e Hayden (1965).

O princípio do método é o seguinte: o 2,3-difosfoglicerato é necessário como co-fator para a reação:



A fosfoglicerato mutase catalisa esta reação. O conteúdo de 2,3-DPG de uma amostra de sangue é determinado comparando seu efeito ativador com o de uma preparação padrão. A reação (1) é associada com a reação catalisada pela enolase:



Conseqüentemente, a intensidade da reação (1) é medida pela diminuição na densidade óptica a 240 nm, devido à remoção do fosfoenolpiruvato na reação (2).

Em cubetas de quartzo com capacidade para 1,5 mililitros, eram misturados os seguintes reagentes: tampão Tris (pH 9,0): 0,02 ml; cloreto de magnésio, 0,5 M: 0,01 ml; fosfoenolpiruvato⁸: 0,03 ml de uma solução contendo 11,62 mg/ml, previamente preparada e estocada a 4°C; enolase⁹: 0,125 mg; fosfoglicerato mutase⁹: 0,025 mg; 0,03 ml da solução contendo 2,3-DPG, cujo preparo foi acima descrito. Água destilada era utilizada para perfazer um volume total de 1,5 mililitros.

A curva padrão era obtida utilizando-se 2,3-DPG produzido por Calbiochem Laboratories⁸, preparando-se uma solução cuja concentração era 0,76 mg%. Havia linearidade quando utilizados volumes entre 0,005 e 0,06 mililitros desta solução.

A análise espectrofotométrica foi feita num aparelho Beckman, modelo 2.400¹⁰, a um comprimento de onda de 240 nm.

⁸ Calbiochem Laboratories, Los Angeles, California, U.S.A.

⁹ Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

¹⁰ Beckman Instrumentation, Inc., Fullerton, California, U.S.A.

Todas as determinações foram feitas em duplicata, sendo repetidas no caso de uma discrepância maior do que 3% entre elas.

O Grupo B, considerado grupo de controle, foi acompanhado do 19º ao 20º dia de vida. A idade gestacional, o peso ao nascer e a contagem de Apgar destes recém-nascidos são mostrados no Quadro II. O sangue destes prematuros era obtido através de punção de veia periférica, para determinação do 2,3-DPG eritrocitário e do hematócrito. Dosagens simultâneas de sangue arterial e venoso, feitas previamente pelo próprio autor, não mostraram discrepância maior do que 3% entre estes dois tipos de sangue.

QUADRO II

ALGUNS DADOS DA HISTÓRIA OBSTÉTRICA DOS PACIENTES DO GRUPO B
(PREMATUROS SEM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS)

PACIENTE	IG	PN	Apgar
1	29	964	NR
2	36	2098	7-9-9
3	34	2098	9-?-?
4	36	2722	7-8-8
5	33	1644	8-9-9
6	32	2013	5-6-8
7	36	2778	8-9-9
8	33	2013	7-8-9
9	36	2211	NR
10	33	1644	9-9-9
11	31	NR	NR
$\bar{X} \pm S$	$33,5 \pm 2,34$	2019 ± 529	

IG : *idade gestacional (semanas)*

PN : *peso ao nascer (gramas)*

Apgar : *contagem de Apgar a 1, 3 e 5 minutos*

NR : *não registrado*

RESULTADOS

RESULTADOS

A idade gestacional das crianças do Grupo A foi de $33,4 \pm \pm 3,04$ semanas e seu peso ao nascer 1815 ± 568 gramas (Quadro I).

No Grupo B (controle), a idade gestacional foi de $33,5 \pm \pm 2,34$ semanas e o peso 2019 ± 529 gramas (Quadro II), não havendo diferença significativa do Grupo A (idade gestacional: $t_c = 0,086$; $t_{0,05} = 2,086$; $p > 0,05$ - peso: $t_c = 0,849$; $t_{0,05} = 2,093$; $p > 0,05$).

Os resultados das determinações de 2,3-DPG eritrocitário e hematócrito dos pacientes do Grupo B são mostrados no Quadro III. Utilizando dois desvios padrões, o 2,3-DPG eritrocitário, no 1º dia de vida, variou de 4,070 a 4,906 milimóis por litro (mM/l) de eritrócitos; entre o 2º e o 4º dia, de 5,026 a 7,478 mM/l; entre o 5º e o 12º dia, de 6,276 a 7,648 mM/l e, na terceira semana, de 5,762 a 7,466 mM/l.

Como se pode ver através do Quadro III e da figura 8, há uma elevação das concentrações de 2,3-DPG durante a primeira semana de vida (a diferença entre os valores do 1º dia e os do 5º ao 12º dia é estatisticamente significativa: $t_c = 16,046$; $t_{0,001} = 4,437$; $p < 0,001$). O 2,3-DPG eritrocitário permanece elevado nas restantes semanas do período neonatal, sendo também significativa a diferença dos valores encontrados entre o 2º e o 20º dia e os valores obtidos pelo autor em 10 adultos normais, utilizando o mesmo método ($4,750 \pm 0,200$ mM/l de eritrócitos) ($t_c = 10,611$; $t_{0,001} = 3,690$; $p < 0,001$).

QUADRO III

DETERMINAÇÕES DE 2,3-DPG ERITROCITÁRIO E HEMATÓCRITO EM PREMATUROS SEM QUAISQUER MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS (GRUPO B)

1º DIA	DPG	Ht
	4,496	58,0
4,328	48,0	
4,155	60,0	
4,425	46,6	
4,556	44,6	
4,810	49,7	
4,588	55,0	
$\bar{X} \pm S$	4480 \pm 0,209	

2º AO 4º DIA	DPG	Ht
	5,170	48,8
6,210	47,5	
6,986	51,8	
6,616	50,5	
6,127	49,3	
6,402	49,2	
$\bar{X} \pm S$	6,252 \pm 0,613	

5º AO 12º DIA	DPG	Ht
	6,322	43,7
7,263	41,3	
6,899	49,6	
6,961	47,0	
7,188	44,0	
7,139	44,3	
$\bar{X} \pm S$	6,962 \pm 0,343	

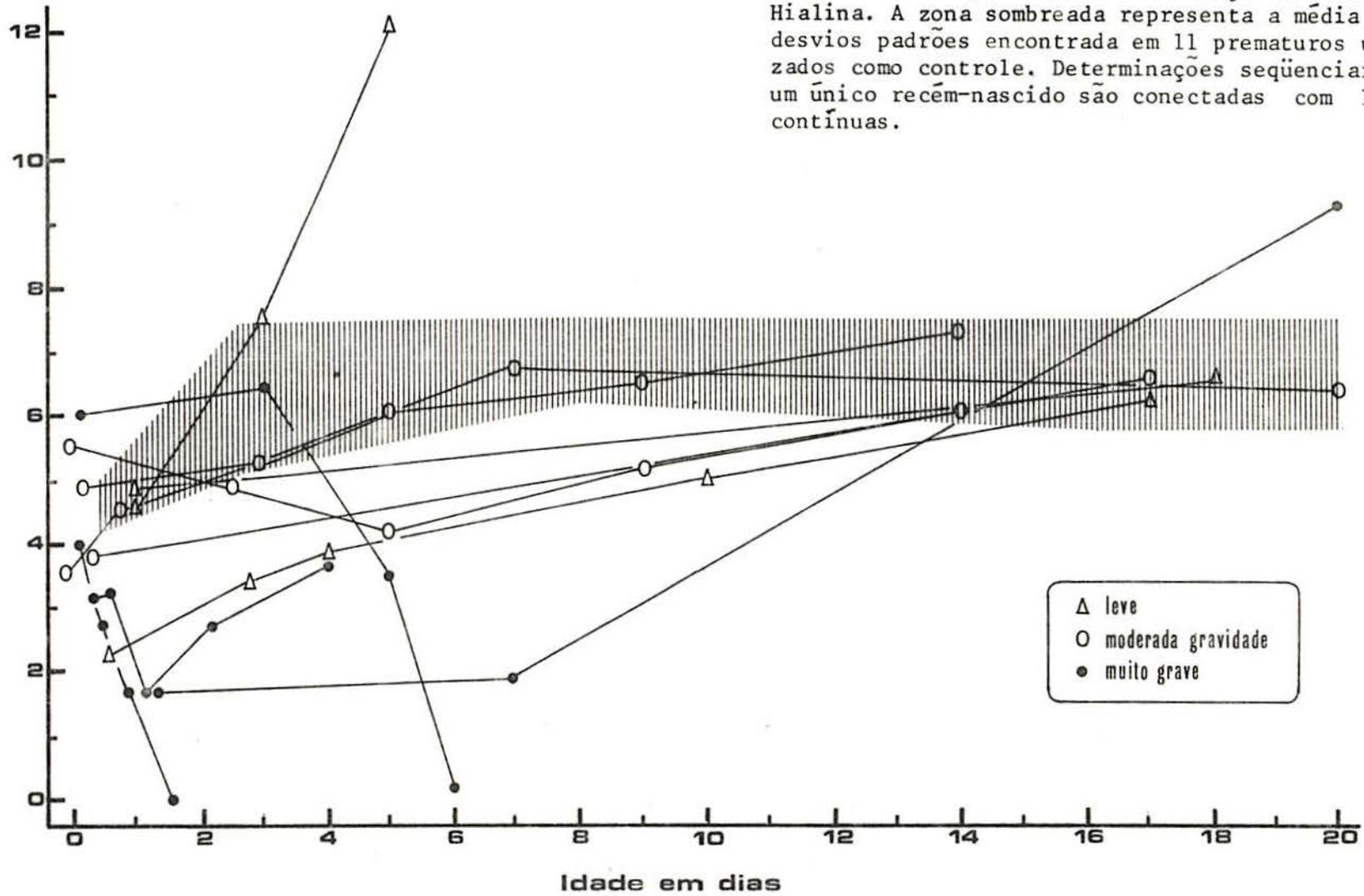
13º AO 20º DIA	DPG	Ht
	6,551	47,2
6,314	50,1	
7,074	39,2	
5,880	39,3	
6,560	34,0	
7,005	45,0	
6,914	46,3	
$\bar{X} \pm S$	6,614 \pm 0,426	

DPG: 2,3-difosfoglicerato (mM/l de eritrócitos)

Ht : hematócrito

2,3-DPG

(mM/l de eritrócitos)



No Quadro IV estão registrados os resultados de todas as determinações seriadas realizadas nos pacientes do Grupo A: 2,3-DPG eritrocitário, hematócrito, P_aO_2 , PCO_2 e pH, além do estado clínico do paciente por ocasião da coleta de sangue. Na figura 8 são mostradas graficamente as determinações de 2,3-DPG destes recém-nascidos, juntamente com uma faixa correspondente aos valores normais.

Nos casos leves e de moderada gravidade, o 2,3-DPG, no 19 dia, foi de $4,260 \pm 1,090$ mM/l de eritrócitos, não significativamente diferente dos valores do grupo controle, embora houvesse uma ampla variação ($t_c = 0,533$; $t_{0,05} = 2,179$; $p > 0,05$). Um destes prematuros tinha um 2,3-DPG baixo (2,310 mM/l) com 15 horas de vida. Na maioria destes prematuros houve um aumento de 2,3-DPG eritrocitário durante a primeira semana de vida, embora os valores durante este período tendessem a ser mais baixos que os do grupo controle. Durante a terceira semana, entretanto, não houve diferença significativa do grupo controle ($t_c = 0,333$; $t_{0,05} = 2,201$; $p > 0,05$). Um prematuro que teve um quadro respiratório leve e cuja história obstétrica indicava ser filho de mãe diabética, mostrou uma elevação de 2,3-DPG a níveis muito altos aos 5 dias de vida. Infelizmente, este paciente foi perdido para posteriores determinações.

Quatro recém-nascidos prematuros com Doença da Membrana Hialina muito grave, apresentaram níveis muito baixos de 2,3-DPG eritrocitário. Houve uma rápida queda nos valores deste fosfato orgânico durante a fase mais aguda da doença. Quando agonizantes, seus níveis de 2,3-DPG eram extremamente baixos. Um destes prematuros, tinha um 2,3-DPG de zero e outro de apenas 0,500 mM/l de eritrócitos. No terceiro prematuro gravemente afetado, os valores de 2,3-DPG eritrocitário caíram a 1,660 mM/l no momento mais crítico da doença, tendo-se elevado a 3,730 mM/l com a melhora clínica do paciente. Este, finalmente, teve seu estado novamente agravado, indo a êxito letal. No quarto paciente gravemente doente (o único destes quatro que sobreviveu), os níveis de 2,3-DPG aumentaram muito durante a

QUADRO IV

DETERMINAÇÕES DE 2,3-DPG ERITROCITÁRIO, HEMATÓCRITO, GASES SANGÜÍNEOS E ESTADO CLÍNICO DOS PACIENTES COM DOENÇA DA MEMBRANA HIALINA DURANTE A EVOLUÇÃO

QC	P	IDADE	2,3-DPG	Ht	PaO ₂	PCO ₂	pH	ESTADO CLÍNICO
LEVE	1	15 h	2,310	46,2	120	52	7,28	DR
		2 dias 15 h	3,320	45,8	-	-	-	DR
		4 dias	3,880	37,8	-	-	-	N
		10 dias	5,100	38,0	-	-	-	N
		17 dias	6,340	33,0	-	-	-	N
	2	24 h	4,900	48,0	62	55	7,45	DR
		18 dias	6,600	34,5	-	-	-	N
	3	24 h	4,650	47,8	75	50	7,30	DR
		3 dias	7,690	45,8	65	71	7,38	DR
5 dias		12,190	41,2	-	-	-	N	
MODERADAMENTE GRAVE	4	4 h	4,980	56,1	109	63	7,14	DR
		3 dias	5,140	54,5	55	82	7,32	DR
		5 dias	5,900	46,2	87	83	7,38	DR
		9 dias	6,400	48,6	-	-	-	N
		14 dias	7,390	41,8	-	-	-	N
	5	2 h	5,540	53,7	420	63	7,16	DR
		2 dias 14 h	4,840	38,8	142	76	7,35	DR
		5 dias	4,170	43,6	102	63	7,34	DR
		9 dias	5,220	41,2	-	-	-	N
		14 dias	5,950	37,4	-	-	-	N
	6	7 h	3,790	47,0	43	50	7,19	DR
		17 dias	6,600	41,5	-	-	-	N
	7	2 h	3,620	58,1	44	40	7,22	DR
		20 h	4,540	57,1	54	50	7,34	DR
		7 dias	6,500	57,8	-	-	-	N
20 dias		6,300	45,3	-	-	-	N	
MUITO GRAVE	8	4 h	4,000	52,3	86	59	7,16	DR
		13 h	2,650	50,1	88	77	7,23	DR
		21 h	1,660	48,0	45	95	7,05	DR
		35 h	zero	44,2	-	-	-	DR
	9	8 h	6,000	46,5	110	40	7,35	DR
		3 dias	6,510	41,8	43	45	7,40	DR
		5 dias	3,500	44,2	11	84	7,11	DR
		6 dias	0,500	35,5	8	-	6,80	DR
	10	8 h	3,060	50,0	85	40	7,20	DR
		17 h	3,090	49,0	81	58	7,26	DR
		26 h	1,670	46,3	20	112	7,02	DR
		2 dias 4 h	2,710	42,4	61	47	7,29	DR
		4 dias	3,730	40,8	62	37	7,34	DR
	11	1 dia 4 h	1,710	53,0	49	70	7,20	DR
7 dias		2,030	43,6	40	110	7,19	DR	
20 dias		9,370	42,7	-	-	-	N	

2,3-DPG: mM/l de eritrócitos
 DR: dificuldade respiratória
 QC: quadro clínico

Ht: hematócrito
 N: normal
 P: paciente

terceira semana, quando a criança estava clinicamente recuperada.

A figura 9 mostra uma forte correlação positiva entre pH arterial e 2,3-DPG eritrocitário ($r = 0,70$; $t_c = 5,093$; $t_{0,001} = 3,725$), que é altamente significativa ($p < 0,001$). Pode-se observar também, através desta figura, que quando o pH estava abaixo de 7,30 havia apenas dois valores de 2,3-DPG acima dos limites mínimos normais. Além disto, quando o pH era maior que 7,30, havia apenas uma determinação abaixo de 4 mM/l de eritrócitos. Este único valor abaixo de 4 mM/l foi observado em um prematuro, previamente acidótico, cujo 2,3-DPG estava em elevação. Esta estreita correlação entre pH e concentração de 2,3-DPG eritrocitário é ilustrada na figura 10. A queda dos níveis de 2,3-DPG mantém-se paralela à do pH e, após a correção deste, através de ventilação assistida, ocorreu uma gradual elevação.

É interessante observar que quando os prematuros gravemente doentes entravam em período terminal e tornavam-se extremamente acidóticos, a velocidade de queda do 2,3-DPG eritrocitário era bastante similar, sendo aproximadamente da ordem de 0,150 mM/l de eritrócitos por hora.

Não houve correlação significativa entre a concentração de 2,3-DPG e a pressão parcial de oxigênio arterial ($r = 0,334$; $t_c = 1,772$; $t_{0,05} = 2,060$; $p > 0,05$). Da mesma forma, não foi observada correlação entre a concentração de 2,3-DPG e a pressão parcial de dióxido de carbono ($r = -0,311$; $t_c = 1,603$; $t_{0,05} = 2,064$; $p > 0,05$). Entretanto, foi encontrada uma correlação inversa significativa entre a concentração de 2,3-DPG eritrocitário e hematócrito, nos recém-nascidos prematuros do Grupo B (controle) ($r = -0,5$; $t_c = 2,828$; $t_{0,01} = 2,797$; $p < 0,01$).

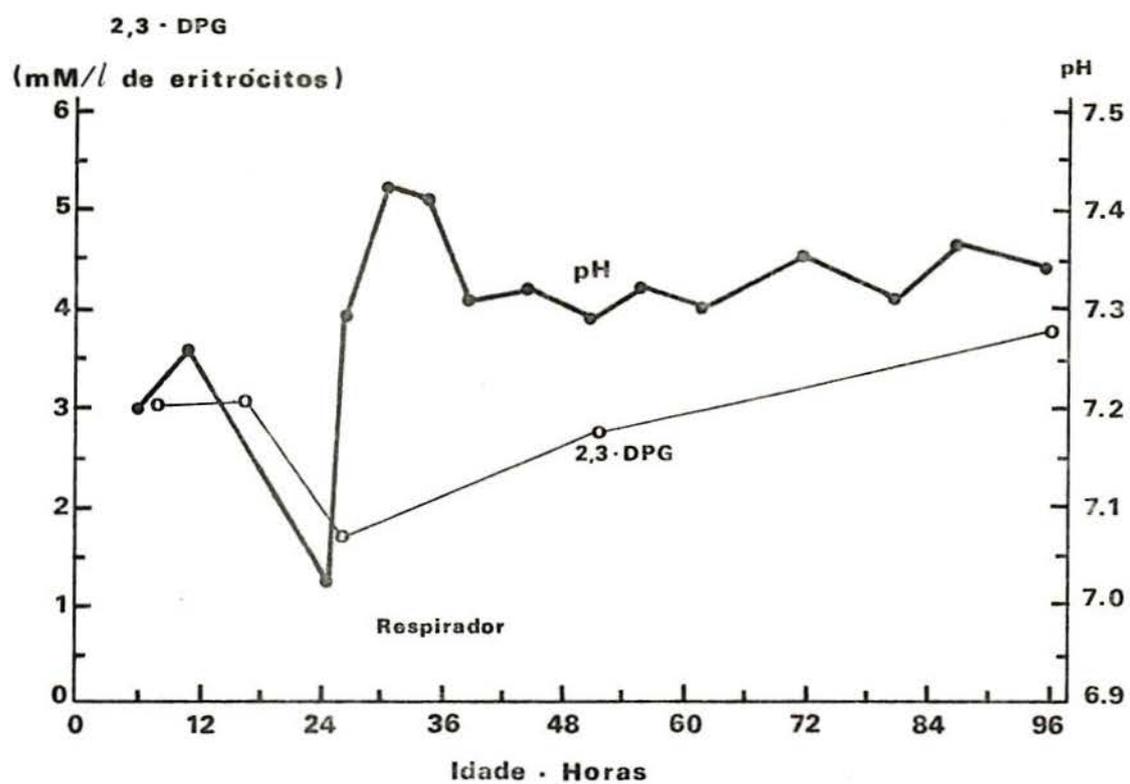


FIGURA 10 - 2,3-DPG eritrocitário e pH arterial em um recém-nascido com Doença da Membrana Hialina submetido à ventilação controlada.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

As determinações iniciais de 2,3-difosfoglicerato eritrocitário em recém-nascidos, foram feitas com métodos físico-químicos não específicos (*Greenwalt e Ayers, 1956*) e mostraram valores menores que os encontrados em adultos. Investigações mais recentes, entretanto, utilizando métodos enzimáticos específicos (*Schröter e Winter, 1967*), estabeleceram corretamente os níveis de 2,3-DPG no sangue do cordão umbilical e durante os primeiros dias de vida, os quais são sensivelmente semelhantes aos aqui apresentados, em recém-nascidos prematuros. Outro grupo de investigadores refere níveis de 2,3-DPG no sangue do cordão umbilical mais elevados que no sangue de adultos (*Bauer et alii, 1968*).

A elevação das concentrações de 2,3-DPG eritrocitário que nós observamos em prematuros "normais", durante os primeiros dias de vida, foi também encontrada em recém-nascidos a termo (*Sterns e Warweg, 1932; Hjelm, 1969*) e prematuros (*Delivoria-Papadopoulos et alii, 1971*). Nós não verificamos, entretanto, uma queda dos valores de 2,3-DPG durante as primeiras quarenta horas de vida, precedendo a elevação, conforme comunicado por Hjelm (1969). Talvez esta discrepância seja devida a diferenças no intervalo das determinações.

Enquanto que em adultos foi demonstrada uma relação negativa entre pressão parcial de oxigênio e concentração de 2,3-DPG eritrocitário, nós não observamos, neste trabalho, tal correlação nos recém-nascidos prematuros. Isto confirma as expe-

riências "in vitro" de Rorth (1969) e Oski et alii (1970), que in cubaram sangue de recém-nascidos em nitrogênio, não encontran do elevação de 2,3-DPG, e as observações "in vivo" de Oski et alii (1970), mostrando que recém-nascidos portadores de cardiopatia congênita cianótica também não apresentam 2,3-DPG elevado, ao contrário do que ocorre em crianças acima de 1 mês de idade. Esta resposta diferente à hipóxia deve-se, possivelmente, à interação diminuída entre a hemoglobina fetal desoxigenada e o 2,3-DPG, de tal modo que a persistência de níveis altos deste fosfato orgânico livre no eritrócito impediria a liberação da enzima 2,3-difosfoglicerato mutase e, possivelmente, de outras enzimas do ciclo glicolítico durante a hipóxia.

Conforme visto na primeira parte deste trabalho, a correlação negativa entre 2,3-DPG eritrocitário e hemoglobina foi bem documentada por vários autores, fora do período neonatal. Entretanto, Schröter e Winter (1967) não observaram tal correlação em recém-nascidos. Mais recentemente, Orzalesi e Hay (1975), estudando o sangue do cordão umbilical de recém-nascidos com anemia intra-uterina, encontraram a mesma correlação negativa entre as concentrações de hemoglobina e de 2,3-DPG, que se verifica em adultos. Os dados apresentados agora em recém-nascidos prematuros, sem quaisquer manifestações clínicas de doença e não anêmicos, mostram também uma correlação negativa entre a concentração de 2,3-DPG e hematócrito. Estas variações dos níveis de 2,3-DPG eritrocitário não parecem ser devidas a alterações da oxigenação do sangue venoso, pois no recém-nascido, como foi visto anteriormente, a desoxigenação não altera a quantidade de 2,3-DPG livre no eritrócito.

Conforme já relatado neste trabalho, Rapoport e Guest mostraram, há quase 40 anos, uma queda nos valores de 2,3-DPG eritrocitário em alguns pacientes com acidose, e, mais recentemente, foi demonstrado "in vitro", em sangue de adultos, uma correlação linear positiva entre pH e 2,3-DPG (Asakura et alii, 1966; Rorth, 1969). Esta mesma correlação foi encontrada em experiências "in vivo" realizadas por Astrup et alii (1970) e

Bellingham et alii (1971), e em pacientes com acidose diabética, por Munk et alii (1974). Além disto, Duc e Engel (1970) e Delivoria-Papadopoulos et alii (1971) comunicaram níveis baixos de 2,3-DPG em recém-nascidos com Doença da Membrana Hialina. O presente trabalho confirma estes achados e demonstra a existência, nestes prematuros, da mesma correlação positiva entre as concentrações de 2,3-DPG eritrocitário e pH, encontrada em outras faixas etárias e em outras situações clínicas.

A despeito do fato evidente de que a acidose persistente é associada a baixas concentrações de 2,3-DPG eritrocitário, nós encontramos alguns recém-nascidos, nas primeiras quatro horas de vida, que tiveram acidose grave, mas valores normais de 2,3-DPG (Quadro IV, casos 4 e 5). Nossa explicação para este fato é de que a acidose deve persistir por algumas horas para que haja uma queda considerável nos níveis de 2,3-DPG eritrocitário.

Embora a variabilidade do pH em situações clínicas não permita uma avaliação exata, como se pode fazer em experiências "in vitro", nossos resultados indicam que a um pH abaixo de 7,30 os níveis de 2,3-DPG eritrocitário começam a cair significativamente. Este limiar é bastante comparável ao encontrado por Rapoport e Guest em suas experiências "in vitro".

A velocidade da queda das concentrações de 2,3-DPG eritrocitário na fase terminal da doença, embora bastante constante em nossos poucos casos, é muito menor que a velocidade da queda encontrada em experiências "in vitro". A diferença deve-se, possivelmente, ao pH muito baixo usado nestas experiências. Alternativamente, a discrepância pode indicar que, "in vivo", existam outros fatores, inexistentes "in vitro", que atuem impedindo sua rápida queda.

A inspeção da Fig. 8, revela que vários dos recém-nascidos com Doença da Membrana Hialina tinham níveis de 2,3-DPG normais imediatamente após o nascimento. O fato de que a aci-

dose prolongada levaria a uma profunda queda nas taxas de 2,3-DPG eritrocitário (como ocorreu posteriormente em alguns recém-nascidos gravemente doentes), sugere que estes recém-nascidos não tiveram um episódio prolongado de asfixia intra-útero, antecedendo o parto. Assim, a asfixia prolongada não parece ser um pré-requisito necessário ao desenvolvimento da doença, embora muitos pacientes que desenvolvem o quadro, nasçam asfixiados. Às mesmas conclusões chegaram estudos feitos na Doença da Membrana Hialina experimental em animais (Normand, 1968).

Quais as evidências de que alterações da afinidade da hemoglobina por oxigênio têm um real significado clínico? Alguns dados acumulados ultimamente, sugerem que estas alterações podem ter grande importância.

Indivíduos com hemoglobinas anômalas, que intrinsecamente possuem afinidade por oxigênio elevada, são policitêmicos (Weatherall, 1969), enquanto que outros, com baixa afinidade, toleram sem dificuldade graus de anemia considerados importantes (Adamson e Stamatoyannopoulos, 1967).

Um recente trabalho experimental de Oski et alii (1971) trouxe evidências adicionais à importância deste mecanismo fisiológico. Dois pacientes com graus similares de anemia, por defeitos intrínsecos hereditários do eritrócito, um com uma curva de dissociação do oxigênio desviada para a esquerda e outro com uma curva desviada para a direita, foram submetidos a exercícios físicos em uma bicicleta ergométrica. O paciente com desvio da curva para a esquerda, ao mínimo exercício, mostrou uma queda da PO_2 do sangue venoso misto, acompanhada de um aumento do rendimento cardíaco. O segundo paciente, com curva desviada para a direita, apresentou apenas uma queda gradual da PO_2 do sangue venoso misto e, por poder oxigenar melhor seus tecidos, não teve o mesmo grau de compensação cardíaca.

Além disso, Sugerman et alii (1970) comunicaram que transfusões maciças de sangue com baixas taxas de 2,3-DPG eritrocitário produziram uma queda nas concentrações deste fosfato orgânico no receptor, um desvio da sua curva de dissociação para a esquerda e uma queda na pressão parcial de oxigênio do sangue venoso misto.

Versmold et alii (1975)¹¹, em trabalho experimental, demonstraram que a oxigenação da mitocôndria celular é dificultada pelo aumento da afinidade da hemoglobina por oxigênio.

O papel do 2,3-DPG na determinação da afinidade da hemoglobina está hoje bem esclarecido, sendo, no recém-nascido, juntamente com a percentagem de hemoglobina adulta, o fator determinante da posição da curva de dissociação do oxigênio, segundo a equação de Orzalesi e Hay (1971).

A queda dos níveis de 2,3-DPG eritrocitário nos prematuros acidóticos, levaria a um aumento da afinidade da hemoglobina por oxigênio, contrapondo-se ao efeito Bohr, que, neste caso, tenderia a diminuir a afinidade e melhorar a oxigenação tecidual. Este efeito deletério da acidose prolongada sobre a oxigenação, agravando a hipóxia pré-existente devido ao comprometimento pulmonar, parece ser mais um na lista dos efeitos indesejáveis da acidose.

Nossos dados sugerem que se a acidose, nestes recém-nascidos, for vigorosamente tratada desde as primeiras horas de vida, a redução dos níveis de 2,3-DPG eritrocitário não ocorrerá, possivelmente melhorando as chances de sobrevivência. Em verdade, já alguns estudos feitos por Usher (1963) e Hobel et alii (1970 e 1971) mostraram uma redução da mortalidade de prematuros com Doença da Membrana Hialina, quando álcalis eram usados precocemente no curso da doença.

¹¹ VERSMOLD, H.; BRAUSER, B. e RIEGEL, K.P. - *Influence os hemoglobin oxygen on oxydation reduction state of cytochrome a3 in perfused liver.* Comunicação pessoal. Dados ainda não publicados.

Na tentativa de melhorar a oxigenação tecidual, Delivoria-Papadopoulos et alii (1972) passaram a fazer exsanguíneo-transfusões com sangue fresco de adulto em recém-nascidos prematuros com Doença da Membrana Hialina. A finalidade das transfusões era prover o recém-nascido com o par 2,3-DPG - hemoglobina adulta, que liberasse mais oxigênio. Este grupo comunicou uma redução da mortalidade nos prematuros tratados. Mais recentemente, Gottuso et alii (1975), referem significativa redução da mortalidade no grupo de pacientes com Doença da Membrana Hialina que recebeu exsanguíneo-transfusão. Além disso, Rubenstein et alii (1975) observaram que prematuros submetidos à exsanguíneo-transfusões apresentavam aumento da P_{50} e da PO_2 do sangue venoso misto, mas, concomitantemente, diminuição do conteúdo de oxigênio, devido à diminuição da taxa de hemoglobina pós-transfusional. Utilizando sangue de hematócrito elevado (60-65%), obtiveram, além de um aumento da P_{50} e da PO_2 do sangue venoso misto, uma elevação ou manutenção do conteúdo de oxigênio do sangue. Estes pesquisadores comunicaram também bons resultados com este método terapêutico.

Por outro lado, Bustamante e Scott (1975), não encontraram diferença na mortalidade ou na evolução de 40 prematuros de menos de 1250 gramas com Doença da Membrana Hialina, submetidos à exsanguíneo-transfusões, apesar de ter sido observado aumento transitório do pH e da pressão arterial. Além disso, Alexander et alii (1976), encontraram um aumento da mortalidade dos prematuros submetidos a este tratamento.

Recentes comunicações de Aranda et alii (1975) e Bard et alii (1975), sugerem que grandes transfusões com sangue de adultos, feitas em prematuros, podem potencializar o efeito do oxigênio sobre a retina imatura, provavelmente por uma maior liberação de oxigênio por parte do sangue transfundido.

Em vista deste possível efeito danoso das transfusões sobre a retina do prematuro, da variabilidade do índice de complicações da exsanguíneo-transfusão de centro para centro e

dos resultados contraditórios obtidos com este tipo de tratamento, o autor deste trabalho sugere que as exsanguíneo-transfusões não devam, no momento, entrar na rotina terapêutica de recém-nascidos com Doença da Membrana Hialina.

Por outro lado, a correção precoce e cuidadosa do pH, prevenindo a queda das concentrações de 2,3-DPG eritrocitário e outros efeitos deletérios da acidose sobre o organismo, parece ser uma medida terapêutica comprovadamente benéfica e simples que merece ser enfatizada.

Em 1954, Valtis e Kennedy comunicaram que o sangue acidificado para estocagem (ácido citrato dextrose - ACD), aumentava sua afinidade por oxigênio com o passar dos dias e que a transfusão de tal sangue produzia um desvio da curva de dissociação do oxigênio para a esquerda, no receptor. Hoje se sabe que este aumento da afinidade deve-se a uma queda nas concentrações de 2,3-DPG do sangue estocado, devido a um baixo pH (*Akerblom et alii, 1968; Bunn et alii, 1969*). McConn e Derrick (1972) mostraram que pacientes que receberam grandes transfusões de sangue ACD tiveram uma grande redução de suas concentrações de 2,3-DPG eritrocitário, com desvio para a esquerda de sua curva de dissociação, e, como foi visto anteriormente, Sugerman et alii (1970), mostraram que tal desvio da curva, produzido no receptor, poderia levar a uma queda na pressão parcial de oxigênio do sangue venoso misto. Isto poderia ser a explicação para mortes aparentemente inexplicáveis, ou agravamento súbito do estado clínico de pacientes que receberam grandes transfusões ou exsanguíneo-transfusões com sangue acidificado, estocado por longo tempo.

Delivoria-Papadopoulos et alii (1971) observou diferenças significativas na afinidade do sangue preservado em ácido-citrato-dextrose após 24 horas de estocagem. Sugere-se, pois, que apenas sangue fresco (de menos de 24 horas), seja empregado para transfusões maciças ou exsanguíneo-transfusões. Métodos para preservar ou mesmo elevar os níveis de 2,3-DPG do

sangue estocado, têm sido testados nos últimos anos (*Oski et alii, 1971*), sendo que o sangue adicionado de fosfato (citrato-fosfato - dextrose), recomendado por Shafer et alii (*1971*) passou já a ser usado por muitos bancos de sangue.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A análise dos resultados deste trabalho permite concluir que:

1. Recém-nascidos prematuros "normais" apresentam, no 19 dia de vida, níveis de 2,3-DPG eritrocitário bastante próximos aos do adulto.
2. Ocorre, nestes prematuros, uma elevação significativa das concentrações deste fosfato orgânico durante a primeira semana de vida, havendo persistência de níveis elevados em relação aos do primeiro dia e em relação aos do adulto, pelo menos até a terceira semana de vida.
3. Recém-nascidos prematuros com Doença da Membrana Hialina, que apresentam quadro clínico leve ou de moderada gravidade, sem acidose profunda e persistente, têm concentrações de 2,3-DPG eritrocitário normais ou pouco reduzidas.
4. Recém-nascidos, com quadro clínico muito grave, acompanhado de intensa acidose, apresentam níveis de 2,3-DPG muito baixos.
5. No recém-nascido, as concentrações de 2,3-DPG eritrocitário parecem ser dependentes do pH, da mesma forma que em outras faixas etárias e em outras situações clí

nicas, havendo uma forte correlação positiva entre pH arterial e este fosfato orgânico em recém-nascidos com Doença da Membrana Hialina.

6. Na acidose grave, "in vivo", a queda das concentrações de 2,3-DPG parece ser bastante constante, tendo sido, em nossos casos, da ordem de 0,150 mM/l de eritrócitos por hora.
7. A determinação dos níveis de 2,3-DPG, ao nascer, poderá ser útil como um índice indireto da presença ou ausência de acidose prolongada "in útero", nas horas que antecedem o parto. A verificação de que vários prematuros com Doença da Membrana Hialina tinham concentrações normais de 2,3-DPG eritrocitário nas primeiras horas de vida, sugere que, provavelmente, não tiveram acidose (e portanto asfixia) prolongada antecedendo o nascimento.
8. Não pode ser demonstrada uma correlação entre 2,3-DPG eritrocitário e PO_2 ou PCO_2 do sangue arterial.
9. Há uma correlação negativa entre hematócrito e 2,3-DPG em recém-nascidos prematuros sem sinais clínicos de doença.

RESUMO

RESUMO

Foi demonstrado, nos últimos anos, que o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), um produto da glicólise eritrocitária, é um potente regulador da afinidade da hemoglobina por oxigênio, influenciando assim no seu transporte aos tecidos. Um aumento das concentrações de 2,3-DPG no eritrócito diminui a afinidade da hemoglobina, facilitando a liberação de oxigênio ao nível tecidual. Por outro lado, uma diminuição das taxas de 2,3-DPG aumenta a afinidade, dificultando esta liberação. Em vista de que os níveis deste fosfato orgânico no eritrócito são alterados pelo pH e por variações da oxigenação do sangue, este trabalho foi planejado para verificar seu comportamento na "Doença da Membrana Hialina" do recém-nascido, que é usualmente acompanhada de acentuada hipóxia e acidose.

Onze recém-nascidos prematuros com a doença (Grupo A), foram acompanhados desde o nascimento até sua morte ou recuperação completa, sendo obtidas amostras de sangue arterial para determinações do pH, PO_2 , PCO_2 , hematócrito e 2,3-DPG eritrocitário, com a frequência requerida pela condição clínica do paciente. Onze prematuros, de idade gestacional e peso comparáveis, sem manifestações clínicas de doença (Grupo B), foram utilizados como controles, sendo as concentrações de 2,3-DPG e o hematócrito, nestes prematuros, determinados seqüencialmente até o 20º dia de vida.

Comparados com o grupo controle, os recém-nascidos do Grupo A, que apresentavam um quadro clínico leve ou de moderada

gravidade, mostraram níveis de 2,3-DPG eritrocitário normais ou levemente diminuídos. Entretanto, nos casos muito graves, acompanhados de intensa acidose, as concentrações de 2,3-DPG caíram profundamente, a uma velocidade aproximada de 0,150 mM/l de eritrócitos por hora. Houve uma forte correlação positiva entre pH arterial e 2,3-DPG eritrocitário ($p < 0,001$). O autor sugere que o efeito marcado da acidose sobre este fosfato orgânico, com provável agravamento da hipóxia pré-existente, deva se constituir em um motivo adicional para enfatizar a necessidade de um combate vigoroso à acidose, desde as primeiras horas de vida.

Baseado nos dados apresentados até agora por vários pesquisadores, o autor deste trabalho julga desaconselhável, no presente, a indicação de exsanguíneo-transfusão para prover o recém-nascido prematuro, portador de Doença da Membrana Hialina, com o par 2,3-DPG - hemoglobina adulta, na tentativa de melhorar a oxidação tecidual. Ressalta, entretanto, a importância do uso de sangue fresco (de menos de 24 horas), para transfusões maciças ou exsanguíneo-transfusões em recém-nascidos hipóxicos, a menos que sejam usados métodos que evitem a queda das concentrações de 2,3-DPG, devido à acidificação do sangue estocado.

A queda dos níveis de 2,3-DPG eritrocitário por efeito da acidose não é abrupta, levando algumas horas para que ocorra uma redução significativa. A observação de que vários recém-nascidos com Doença da Membrana Hialina tinham concentrações normais de 2,3-DPG após o nascimento, apesar de um baixo pH, nos leva a crer que estes recém-nascidos não tiveram um episódio prolongado de asfixia intra-uterina, antecedendo o parto. O autor sugere que a determinação das concentrações de 2,3-DPG ao nascer, possa ser utilizada como um método indireto de avaliação da presença ou ausência de acidose intra-uterina, nas horas que precedem ao parto.

Não foi observada, nos recém-nascidos do Grupo A, correla-

ção significativa entre a PO_2 ou a PCO_2 arterial e as concentrações de 2,3-DPG. Entretanto, no Grupo B, verificou-se uma correlação negativa entre hematócrito e 2,3-DPG.

Os níveis de 2,3-DPG eritrocitário, no 1º dia de vida, no Grupo B, foram bastante próximos aos do adulto, ocorrendo um aumento significativo durante a primeira semana de vida, havendo persistência de níveis elevados até a 3ª semana do período neonatal, quando foram feitas as últimas determinações.

SUMMARY

SUMMARY

It has been demonstrated, over the last years, that red cell 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG), a product of erythrocytic glycolysis, is a powerful regulator of hemoglobin affinity for oxygen, affecting its transport to the tissues. An increase in red cell 2,3-DPG levels decreases the hemoglobin affinity, improving the release of oxygen to the tissues. A decrease in red cell 2,3-DPG levels increases the affinity, decreasing the unloading of oxygen. As red cell 2,3-DPG levels are affected by pH and blood oxygenation, this research was conducted to study its behavior in the "Hyaline Membrane Disease" of the newborn, which is usually associated with severe hypoxia and acidosis.

A group of eleven (11) premature infants with the disease (Group A), were studied serially from birth to death or complete recovery. PO_2 , PCO_2 , pH, hematocrit and red cell 2,3-diphosphoglycerate were determined according the clinical condition of the infant. Eleven (11) "normal" premature babies, of comparable gestational age and birth weight, were studied as controls. The 2,3-DPG levels and hematocrit in these infants were followed up to the age of 20 days.

If compared with the control group, the mild and moderately affected infants of Group A had normal or slight decreased red cell 2,3-DPG levels. However, in the very sick infants, with very low pH, red cell 2,3-DPG fell to remarkably low levels, being the rate of fall approximately 0,150 mM/l of red blood

cells/hour. There was a close correlation between arterial pH and red cell 2,3-DPG ($p < 0,001$). We suggest that the marked effect of acidosis on this organic phosphate, probably aggravating the pre-existing hypoxia, is an additional reason to emphasize the need to treat vigorously acidosis since the first hours of life.

Based on the data presented up to this moment by many researchers, the author believes not justifiable, at the present time, to indicate exchange transfusion to provide the premature infant with the pair 2,3-DPG - hemoglobin A, trying to improve oxygen release to the tissues. However, the advantages of employing only fresh blood (less than 24 hours) for massive transfusions or exchange transfusions in hypoxic newborns must be emphasized, unless the fall of 2,3-DPG due to acidification of stored blood be prevented.

The fall in red cell 2,3-DPG due to acidosis is not instantaneous. It takes some hours for a significant decrease. The fact that many infants with Hyaline Membrane Disease had normal 2,3-DPG levels after birth, in spite of low pH, suggests that these newborn infants did not have sustained a prolonged episode of fetal or intrapartum asphyxia. The author suggests that the red cell 2,3-DPG determination may be used as an indirect method to evaluate the presence or absence of intrauterine acidosis.

There was no significant correlation between red cell 2,3-DPG levels and arterial PO_2 or PCO_2 in the Group A. However, in the Group B, we found out an inverse correlation between hematocrit and 2,3-DPG levels.

The levels of red cell 2,3-DPG, in the first day of life, in the Group B, were very close to the adult levels, occurring a significant increase during the first week of life. These higher values persisted at least up to the third week, when the last measurements were done.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ADAIR, G.D.; BARCROFT, J.; BOCK, A.V. - The identity of haemoglobin in human beings. *J. Physiol.*, 55:332, 1921.
- ADAMSON, J.W. & STAMATOYANNOPOULOS, G. - Erythrocytosis associated with abnormal hemoglobins: aspects of marrow regulation. *Blood*, 30:848, 1967.
- AKERBLOM, O. et alii. - Restoration of defective oxygen-transport function of stored red blood cells by addition of inosine. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21:245, 1968.
- ALEXANDER, G.; VISVESHWARA, N.; BAUER, C.R. - Prophylactic exchange transfusion in very low birth weight infant. *Pediatr. Res.* 10:420, 1976.
- ALLEN, D.W.; WYMAN, T.; SMITH, C.A. - The oxygen equilibrium of fetal and adult human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 203:84, 1953.
- ANSELMINO, K.T. & HOFFMAN, E. - Die Ursachen des Icterus Neonatorum. *Arch. Gynaekol.*, 143:477, 1930.
- ARANDA, J.V. et alii. - Blood transfusion, possible potentiating risk factor in retrolental fibroplasia. *Pediatr. Res.*, 9:362, 1975.
- ARTURSON, G. & ROBERT, M. - Oxygen affinity of whole blood in normal human subjects. *Acta Anaesthesiol. Scand., suppl.* 45:22, 1971.

- ASAKURA, T. et alii. - Effect of deoxygenation of intracellular hemoglobin on red cell glycolysis. *J. Biochem (Tokyo)* 5:524, 1966.
- et alii. - pH dependency of 2,3-diphosphoglycerate content in red cells. *Clin. Chim. Acta.* 14:840, 1966.
- ASTRUP, P. - Red-cell pH and oxygen affinity of hemoglobin. *New Engl. J. Med.*, 283:202, 1970.
- & RORTH, M. - Oxygen affinity of hemoglobin and red cell 2,3-diphosphoglycerate in hepatic cirrhosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 31:311, 1973.
- ;---;THORSHAUGE, C. - Dependency on acid-base status of oxyhemoglobin dissociation and 2,3-diphosphoglycerate level in human erythrocytes. II. In vivo studies. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 26:47, 1970.
- et alii. - Changes of oxygen affinity of blood at low and high pressures. *Lancet*, 2:732, 1968.
- AULD, P.A.M. - "Hyaline membrane disease (idiopathic respiratory distress syndrome)". In: BEHRMAN, R. *Neonatology*. St. Louis, Mosby, 1973. p. 360.
- AUSTIN, P.L. et alii. - The effect of exercise on red blood cell 2,3-diphosphoglycerate in children. *J. Pediatr.*, 83:41, 1973.
- BARCROFT, J. - *The respiratory function of the blood*. 2.ed. London, Cambridge, 1928. p. 174.
- BARD, H. et alii. - Retrorenal fibroplasia and exchange transfusions. *Pediatr. Res.*, 9:362, 1975.
- BATTAGLIA, F.C. et alii. - The effect of fetal exchange transfusion with adult blood upon fetal oxygenation. *Pediatr. Res.*, 3:60, 1969.

- et alii. - The post-natal changes in oxygen affinity of sheep red cells: a dual role of diphosphoglycerate acid. *Am. J. Physiol.*, 219:217, 1970.
- BAUER, C.; LUDWIG, I.; LUDWIG, M. - Different effects of 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate on oxygen affinity of adult and fetal human hemoglobin. *Life Sci.*, 7:1339, 1968.
- BELLINGHAM, A.J.; DETTER, J.C.; LENFANT, C. - Regulatory mechanisms of hemoglobin oxygen affinity in acidosis and alkalosis. *J. Clin. Invest.*, 50:700, 1971.
- BENESCH, R. - How do small molecules do great things? *New Engl. J. Med.*, 280:1179, 1969.
- & BENESCH, R.E. - Effect of organic phosphates from human erythrocyte on allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 26:162, 1967.
- ;---. - Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by hemoglobin. *Nature*, 221:618, 1969.
- ;---; ENOKI, Y. - The interaction of hemoglobin and its subunits with 2,3-diphosphoglycerate. *Biochem.*, 61:1102, 1968.
- ;---; YU, C.I. - Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 59:526, 1968.
- BOHR, C.; HASSELBALCH, K.A.; KROGH, A. - Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt. *Skand. Arch. Physiol.*, 16:402, 1904.
- BREWER, G.J. - 2,3-DPG and erythrocyte oxygen affinity. *Ann. Rev. Med.*, 25:29, 1974.

- . - Erythrocyte metabolism and functions: hexokinase inhibition by 2,3 diphosphoglycerate and interaction with ATP and Mg²⁺. *Biochim. Biophys. Acta*, 192:157, 1969.
- et alii. - *Red cell metabolism and function*. New York, Plenum, 1970.
- BUNN, H.F. & BRIEHL, R.W. - The interaction of 2,3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins. *J. Clin. Invest.*, 49:1088, 1970.
- et alii. - Hemoglobin function in stored blood. *J. Clin. Invest.*, 48:311, 1969.
- BUSTAMANTE, S.A. & SCOTT, K.E. - Failure of exchange transfusion to alter course or outcome of RDS in very low birth weight infant. *Pediatr. Res.*, 9:363, 1975.
- CALDWELL, P.R.B. & NAGEL, R.L. - The binding of 2,3-diphosphoglycerate as a conformational probe of human hemoglobin. *J. Mol. Biol.*, 74:605, 1973.
- ; FRITTS Jr., H.W.; COURNAND, A. - Oxyhemoglobin dissociation curve in liver disease. *J. Appl. Physiol.*, 20:316, 1965.
- ; JAFFE, E.R.; NAGEL, R.L. - "The contents of 2,3-diphosphoglycerate in human erythrocytes: effects of pH and oxygen and their role in anemia." In: GERLACH, E. et alii. *Erythrocytes, thrombocytes, leukocytes*. Stuttgart, George Thieme, 1973.p.157.
- CHANCE, B. et alii. - Localized fluorometry of oxidation-reduction states of intracellular pyridine nucleotide in brain and kidney cortex of anesthetized rat. *Science*, 136:325, 1962.
- CHANUTIN, A. & CURNISH, R.R. - Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 121:96, 1967.

- & HERMANN, E. - The interaction of organic and inorganic phosphates with hemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 131:180, 1969.
- CHAPMAN, R.G. et alii. - Erythrocyte metabolism. V. Levels of glycolytic enzymes and regulation of glycolysis. *J. Clin. Invest.*, 41:1249, 1962.
- CHRISTENSEN, E.H. & DILL, D.B. - Oxygen dissociation curves of bird blood. *J. Biol. Chem.*, 109:443, 1935.
- COCHRAN, W.D.; DAVIS, H.T.; SMITH, C.A. - Advantages and complications of umbilical artery catheterization in the newborn. *Pediatr.* 42:769, 1968.
- DARLING, R.C. & ROUGHTON, F.J.W. - The effect of methemoglobin on the equilibrium between oxygen and hemoglobin. *Am. J. Physiol.*, 137:56, 1942.
- DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. et alii. - The effect of exchange transfusion on altering mortality in infants weighing less than 1.300 grams at birth and its role in the management of severe respiratory distress syndrome. *Pediatr. Res.*, 6:408, 1972.
- & OSKI, F.A. - Developmental changes in the oxygen equilibrium curve of infants as related to the "functioning DPG fraction" and its alteration with disease. *Proc. Soc. Pediatr. Res.*, Atlantic city, N.J., Apr., 1970, p.85. (Abstract).
- ; MORROW, G.; 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. *J. Pediatr.*, 79:898, 1971.
- ; OSKI, F.A.; GOTTLEIB, A.J. - Oxygen-hemoglobin dissociation curve: effect of inherited enzyme defects of the red cell. *Science.*, 165:601, 1969.

- ; RONCEVIÉ, N.P.; OSKI, F.A. - Postnatal changes in oxygen transport of term, premature and sick infants: the role of adult hemoglobin and red cell 2,3-diphosphoglycerate. *Pediatr. Res.*, 5:235, 1971.
- et alii. - II. Effect of oxygen-hemoglobin affinity on tissue oxygen unloading following exchange transfusion of newborn piglets. *Fed Proc.*, 30(2), 1971. (Abstract).
- DEVERDIER, C.H. & GARBY, L. - 2,3-diphosphoglycerate and respiratory function of hemoglobin. *Biochim.*, 54:613, 1972.
- ; ---. - Low binding of 2,3-diphosphoglycerate to hemoglobin F: a contribution to the knowledge of the binding site and an explanation for the high oxygen affinity of foetal blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 23:149, 1969.
- DOUGLAS, C.G; HALDANE, J.S.; HALDANE, J.B.S. - The laws of combination of hemoglobin with carbon monoxide and oxygen. *J. Physiol.*, 44:275, 1912.
- DUC, G. & ENGEL, K. - Hemoglobin-oxygen affinity and erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate content in hyaline membrane disease and cardiac malformations. *Prog. Soc. Pediatr. Res.*, 79: , 1970. (Abstract).
- DUHM, J. - "Alfred Benzon Symposium". In: RORTH, M. & ASTRUP, P. - *Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid base status*. New York, Academic Press, 1972. 832 p. cap.4, p.539-51.
- . - "The effect of 2,3-DPG and other organic phosphates on the Donnan equilibrium and the oxygen affinity of human blood. In: RORTH, M. & ASTRUP, P. - *Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid base status*. Copenhagen, Munksgaard, 1972. p.583.

- & GERACH, E. - On the mechanisms of the hypoxia induced in - crease of 2,3 diphosphoglycerate in erythrocytes. Studies on rat erythrocytes in vivo and on human erythrocytes in vitro. *Pllogers Arch.*, 326:254, 1971.
- EATON, J.W. & BREWER, G.J. - The relationship between red cell 2,3-diphosphoglycerate and levels of hemoglobin in the human. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 61:756, 1968.
- ; ---; FAULKNER, J.A. - Response of the human red cell to muscular activity. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 132:886, 1969.
- ; ---; GROVER, R.F. - Role of the red cell 2,3-diphosphoglycerate in the adaptation of man to altitude. *J. Lab. Clin. Med.*, 73:603, 1969.
- EDWARDS, M.J. & CANON, B. - Normal levels of 2,3-diphosphoglycerate in red cell despite severe hypoxemia of chronic lung disease. *Chest, suppl.* 61:25S, 1972.
- ; ---. - Oxygen transport during erythropoietic response to moderate blood loss. *New Engl. J. Med.*, 282:1219, 1970.
- & RIGAS, D.A. - Eletrolyte labile increase of oxygen affinity during in vivo aging of hemoglobin. *J. Clin. Invest.*, 46:1579, 1967.
- et alii. - Improved osygen release: adaptation of mature red cells to hypoxia. *J. Clin. Invest.*, 47:1851, 1968.
- FAULKNER, J.A.; BREWER, G.J.; EATON, J.W. - "Adaptation of the red blood cell to muscular exercise". In: BREWER, G. - *Red cell metabolism and function*. New York, Plenum, 1970. p.213.
- FERREIRA, Aurelio Buarque de Hollanda. - *Pequeno dicionário brasileiro da língua portuguesa*. 11.ed. São Paulo, Ed.Nacional, 1972.

- FIORI, R.M. et alii. - Effect of admixed adult red cells on the position of the oxygen dissociation curve of fetal blood. *Proc. Pediatr. Res.*, Atlantic City, N.J., Apr., 1970. p.223.
- GARBY, L. & DEVERDIER, C.H. - Affinity of human hemoglobin A to 2,3-diphosphoglycerate. Effect of hemoglobin concentration and of pH. *J. Clin. Lab. Invest.*, 27:345, 1971.
- GLUCK, L. & KULOVICH, M.V. - Fetal lung development. *Pediatr. Clin. North Am.*, 20:367, 1973.
- et alii. - Biochemical development of surface activity in mammalian lung. IV. Pulmonary lecithin synthesis in the human fetus, and newborn and etiology of the respiratory distress syndrome. *Pediatr. Res.*, 6:81, 1972.
- GOTTUSO, M.A. et alii. - The role of exchange transfusion in the management of infants with severe respiratory distress syndrome. *Pediatr. Res.*, 9:365, 1975.
- 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.
- GREENWALT, T.J. & AYERS, V.E. - The phosphate partition of erythrocytes of normal newborn infants and of infants with hemolytic disease. *J. Clin. Invest.*, 35:1404, 1956.
- GREGG, R.H. & BERNSTEIN, J. - Pulmonary hyaline membranes and the respiratory distress syndrome. *Am. J. Dis. Child.*, 102,871, 1961.
- GUEST, G.M. - Organic phosphates of blood and mineral metabolism of hemoglobin oxygen affinity in acidosis and alkalosis. *Am. J. Dis. Child.*, 64:401, 1942.

- & RAPOPORT, S. - Role of acid-soluble phosphorus compounds in red blood cells. *Am. J. Dis. Child.*, 58:1072, 1939.
- HIDAS, S.; LABIE, D.; KAPLAN, J.C. - 2,3-diphosphoglycerate content and oxygen affinity as a function of red cell age in normal individuals. *Blood*, 38:463, 1971.
- HAKIM, J. et alii. - Red cell 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate levels in patients with polycythemia vera. *Rev. Eur. Étud. Clin. Biol.*, 17:99, 1972.
- HASSELBALCH, K.A. - Wasserstoffzahl und Sauerstoffbindung des Blutes. *Biochem. Z.*, 82:282, 1917.
- HJELM, M. - The content of 2,3-diphosphoglycerate and some other phosphocompounds in human erythrocytes during the neonatal period. *Försvarsmedicin*, 5:195, 1969.
- . - The content of 2,3-diphosphoglycerate and some other phosphocompounds in human erythrocytes from healthy adults and subjects with different kinds of anemia. *Försvarsmedicin*, 5:219, 1969.
- & WADMAN, B. - Erythrocyte-DPG and creatine in polycythemia. *New Engl. J. Med.*, 287:45, 1972.
- HOBEL, C.J. et alii. - Early correction of neonatal acidemia in the pre-term low birth weight infant. *Am. Pediatr. Soc. and the Soc. Pediatr. Res.*, N.J., Apr., 1970, p.85 (Abstract)
- et alii. - Early treatment of neonatal acidosis in low birth weight infants in relation to respiratory distress syndrome. *Am. Pediatr. Soc. and the Soc. Pediatr. Res.*, N.J., Apr., 1971 (Abstract).
- HUEHNS, E.R. & BELLINGHAM, A.J. - Diseases of function and stability of haemoglobin. *Br. J. Haematol.*, 17:1, 1969.

- & SHOOTER, E.M. - The properties and reactions of haemoglobin F, and bearing on the dissociation equilibrium of haemoglobin. *Biochem. J.*, 101:852, 1966.
- HURT, G.A. & CHANUTIN, A. - Organic phosphate compounds of erythrocytes from individuals with cirrhosis of the liver. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 118:167, 1965.
- KEITT, A.S. - Pyruvate kinase deficiency and related disorders of red cell glycolysis. *Am. J. Med.*, 41:762, 1966.
- KENNEDY, A.C. & VALTIS, D.J. - The oxygen dissociation curve in anemia of various types. *J. Clin. Invest.*, 33:1372, 1954.
- KEYS, A. & SNELL, A.M. - Respiratory properties of the arterial blood in normal man and in patients with disease of the liver; position of the oxygen dissociation curve. *J. Clin. Invest.*, 17:59, 1938.
- ; HALL, F.G.; BARRON, E.S.G. - The position of the oxygen dissociation curve of human blood at high altitudes. *Am. J. Physiol.*, 115:292, 1936.
- KRIMSKY, I. - "D-2,3-diphosphoglycerate". In: BERGMEYER, H.H. - *Methods of enzymatic analysis*. New York, Academic Press, 1963. p. 238.
- LENFANT, C. et alii. - Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobin and on organic phosphate levels. *J. Clin. Invest.*, 47:2652, 1968.
- et alii. - Effect of chronic hypoxia on the O₂-Hb-dissociation curve and respiratory gas transport in man. *Respir. Physiol.*, 7:7, 1969.
- et alii. - Role of in vivo pH in the decreased hemoglobin affinity for oxygen at altitude. *Fed. Proc.*, 29:851, 1970.

- LICHTMAN, M.A. et alii. - Reduced red cell glycolysis, 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate concentration and increased hemoglobin-oxygen affinity caused by hypophosphatemia. *Ann. Inter. Med.*, 74:562, 1971.
- MARGARIA, R. - The contribution of hemoglobin to acid-base equilibrium of the blood in health and disease. *Clin. Chem.*, 3:306, 1957.
- McCONN, R. & DERRICK, J.B. - The respiratory function of blood transfusion and blood storage. *Anesthesiol.*, 36:119, 1972.
- MILLER, W.W. et alii. - Oxygen releasing factor in hyperthyroidism. *JAMA*, 211,1824, 1970.
- MILLS, G.C. et alii. - Ion exchange analysis of organic phosphate compounds of erythrocytes from individuals with neoplastic diseases. *J. Lab. Clin. Med.*, 58:725, 1961.
- MINAKAMI, S. - Effect of oxygen tension on glycolysis in erythrocytes. *Försvarsmedicin*, 5:181, 1969.
- & YOSHIKAWA, H. - Studies on erythrocytes glycolysis. III. The effects of active cation transport, pH, and inorganic phosphate concentration on erythrocyte glycolysis. *J. Biochem.*, 59:145, 1966.
- MORSE, M.; CASSELS, D.E.; HOLDER, M. - The position of the oxygen dissociation curve of the blood in cyanotic congenital heart disease. *J. Clin. Invest.*, 29:1098, 1950.
- MURHEAD, H.; COX, J.M.; MAZZARELLA, L. - Structure and function of haemoglobin. III. A three-dimensional Fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at 5,5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 28:117, 1967.
- & PERUTZ, M.F. - Structure of haemoglobin. *Nature*, 199:633, 1963.

- MULHAUSEN, R.; ASTRUP, P.; KJELDTSEN, K. - Oxygen affinity of hemoglobin in patients with cardiovascular diseases, anemia, and cirrhosis of the liver. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 19:291, 1967.
- MUNK, P.; FREEDMAN, M.H.; LEVISON, H. - Effect of bicarbonate on oxygen transport in juvenile diabetic ketoacidosis. *J. Pediatr.*, 84:510, 1974.
- NELSON, N.M. - On the etiology of hyaline membrane disease. *Pediatr. Clin. North Am.*, 17:943, 1970.
- NORMAND, I.C.S. et alii. - Flow and concentration lymph from lungs of lambs developing hyaline membrane disease. *Arch. Dis. Child.*, 43:334, 1968.
- NOVY, M.J. et alii. - Changes in cord blood oxygen affinity after intrauterine transfusions for erythroblastosis. *New Engl. J. Med.*, 285:589, 1971.
- ORZALESI, M. & HAY, W.W. - The effect of intrauterine anemia on the oxygen affinity (P_{50}) of fetal blood. *Pediatr. Res.*, 9:369, 1975.
- ; ---. - The regulation of oxygen affinity of fetal blood. I. In vitro experiments and results in normal infants. *Pediatrics*, 48:857, 1971.
- OSKI, F.A. - The unique fetal red cell and its function. *Pediatrics*, 51:494, 1973.
- & DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. - The red cell 2,3-diphosphoglycerate, and tissue oxygen release. *J. Pediatr.*, 77:941, 1970.
- et alii. - The effects of deoxygenation of adult and fetal hemoglobin on the synthesis of red cell 2,3-diphosphoglycerate and its in vivo consequences. *J. Clin. Invest.*, 49:400, 1970.

- et alii. - Red cell 2,3-diphosphoglycerate and hypoxia - an alteration in the neonate's response. *Pediatr. Soc. Pediatr. Res.*, Atlantic City, N.J., Apr., 1970. p.46.
- et alii. - Red cell 2,3-diphosphoglycerate levels in subjects with chronic hypoxemia. *New Engl. J. Med.*, 280:1165, 1969.
- et alii. - Exercise with anemia. The role of the left-shifted or right-shifted oxygen-hemoglobin equilibrium curve. *Ann. Intern. Med.*, 74:44, 1971.
- PARER, J.T. - Reversed relationship of oxygen affinity in maternal and fetal blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 108:323, 1970.
- PARKER, J.P. et alii. - Androgen-induced increase in red cell 2,3-diphosphoglycerate. *New Engl. J. Med.*, 287:381, 1972.
- PERUTZ, M.F. - Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. *Nature*, 228:726, 1970.
- & LEHMANN, H. - Molecular pathology of human haemoglobin. *Nature*, 219:902, 1968.
- RAPOPORT, S. - On the metabolic regulation of glycolysis in erythrocytes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 52:1169, 1970.
- & GUEST, G.M. - The decomposition of diphosphoglycerate in acidified blood: its relationship to reactions of the glycolytic cycle. *J. Biol. Chem.*, 129:781, 1939.
- & alii. - "Control of glycolysis in the erythrocyte on the level of 1,3-DPG". In: RORTH, M. & ASTRUP, P. - *Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid-base status*. Copenhagen, Munksgaard, 1972. p. 527.
- REYNOLDS, E.O.R. - Hyaline membrane disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 106:780, 1970.

- RICHARDS Jr., D.W. & STRAUSS, M.L. - Oxyhemoglobin dissociation curves of whole blood in anemia. *J. Clin. Invest.*, 4:105, 1927.
- RODRIGUEZ, J.M. & SHAHIDI, N.T. - Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate in adaptive red-cell-volume deficiency. *New Engl. J. Med.*, 285:479, 1971.
- RÖRTH, M. - Dependence of oxyhemoglobin dissociation and intraerythrocytic 2,3-DPG on acid-base status of blood. I. In vitro studies on reduced and oxygenated blood. *Försvarsmedicin*, 5:57, 1969.
- . - Effect of pH on T_{50} and 2,3-diphosphoglycerate in human erythrocytes in vitro. *Försvarsmedicin*, 5:205, 1969.
- . - Hemoglobin interactions and red cell metabolism. *Ser. Hematol.*, 5:1, 1972.
- & BILLE BRAHE, N.E. - 2,3-diphosphoglycerate and creatine in the red cell during human pregnancy. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 28:271, 1971.
- ; NYGAARD, S.F.; PARVING, H.H. - Effect of exposure to simulated high altitude on human red cell phosphates and oxygen affinity of hemoglobin. Influence of exercise. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 29:329, 1972.
- ROSE, I.A.; O'CONNELL, E.L. - The role of glucose-6-phosphate in the regulation of glucose metabolism in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 239:12, 1964.
- & WARMS, J.V.B. - Control of glycolysis in the human red blood cell. *J. Biol. Chem.*, 241:4848, 1966.
- ; ---; O'CONNELL, E.L. - Role of inorganic phosphate stimulating the glucose utilization of human red blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15:33, 1964.

- ROSE, Z.B. - The purification and properties of diphosphoglycerate mutase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 243: 4810, 1968.
- RUBENSTAIN, S.D. et alii. - Effect of exchange transfusion with fresh settled red blood cells in tissue oxygen transport of low birth weight infants. *Pediatr. Res.*, 9:326, 1975.
- RUDOLPH, A.J. & SMITH, C.A. - Idiopathic respiratory distress syndrome of the newborn. *J. Pediatr.*, 57:905, 1960.
- RUDOLPH, A.M. & YUAN, S. - Response of the pulmonary vasculature to hypoxia and H ion concentration changes. *J. Clin. Invest.*, 45:399, 1966.
- SHAPPELL, S.D. et alii. - Adaptation to exercise: role of hemoglobin affinity for oxygen and 2,3-diphosphoglycerate. *J. Appl. Physiol.*, 30:827, 1971.
- SCHROEDER, W.A. et alii. - Hemoglobin F₁, and acetyl-containing hemoglobin. *Biophys. Acta*, 63:532, 1962.
- SCHRÖTER, W. & HEYDEN, H. - Kinetik des 2,3 disphosphoglucerasatzes in mensch lindrem erythrocyten. *Biochem, Z.*, 341 : 387, 1965.
- & WINTER, P. - Der 2,3 Disphosphoglycerat-Stoffwechsel in den erythrocyten neugeborener und erwachsener. *Klin. Wschr.*, 45:225, 1967.
- SHAFER, A.W.; TAGUE, L.L.; WELCH, M.H. - 2,3-diphosphoglycerate in red cells stored in acid-citrate-dextrose: implications regarding delivery of oxygen. *J. Lab. Clin. Med.*, 77:433, 1971.
- SHELDON, G.F. - Hyperphosphatemia, hypophosphatemia, and the oxyhemoglobin dissociation curve. *J. Surg. Res.*, 14:367, 1972.

- SIMPSON, H. - "Respiratory problems of the preterm infant". In: COCKBUM, F. & DRILLUM, C.M. - *Neonatal medicine*. Oxford, Blackwell, 1974, p.180.
- SINCLAIR, J.C. - Prevention and treatment of the respiratory distress syndrome. *Pediatr. Clin. North Am.*, 13:711, 1966.
- SLAWSKY, P. & DESFORGES, J.F. - Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate in iron deficiency. *Arch. Intern. Med.*, 129:914, 1972.
- SNYDER, L.M. & REDDY, W.J. - Mechanism of action of thyroid hormones on erythrocyte 2,3-diphosphoglyceric acid synthesis. *J. Clin. Invest.*, 49:1993, 1970.
- STAHLMAN, M. - "Acute respiratory disorders in the newborn". In: AVERY, G.B. - *Neonatology*. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1975. p. 221.
- STAMATOYANNOPOULOS, G.; PARER, J.T.; FINCH, C.A. - Implications of a hemoglobin with decreased oxygen affinity. *New Engl. J. Med.*, 281:915, 1969.
- STEARNS, G. & WARWEG, E. - Studies of phosphorus of blood. I. The partition of phosphorus in whole blood and serum, the serum calcium and plasma phosphatase from birth to maturity. *J. Biol. Chem.*, 102:749, 1932.
- SUGERMAN, H.J. et alii. - The basis of defective oxygen delivery from stored blood. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 131:733, 1970.
- THOMAS, H.M.; LEFRAK, S.S.; FRITTS Jr., H.W. - Blood oxygen affinity and acid-base status in patients with alcoholic liver disease and in normals. *Fed. Proc.*, 29:329, 1970.
- THOMAS, H.M. et alii. - The oxyhemoglobin dissociation curve in health and disease. Role of 2,3-diphosphoglycerate. *Am. J. Med.*, 57:331, 1974.

- TORRANCE, J.D. et alii. - Intraerythrocytic adaptation to anemia. *New Engl. J. Med.*, 283:165, 1970.
- et alii. - Oxygen transport mechanisms in residents at high altitudes. *Resp. Physiol.*, 11:1, 1970.
- TRAVIS, S.F. et alii. - Alterations of red cell glycolytic intermediates and oxygen transport as a consequence of hypophosphatemia in patients receiving intravenous hyperalimentation. *New Engl. J. Med.*, 285:763, 1971.
- TYUMA, I. & SHIMIZU, K. - Different response to organic phosphates of human fetal and adult hemoglobins. *Arch. Biochem.*, 129:404, 1969.
- USHER, R. - Reduction of mortality from respiratory distress syndrome of prematurity with early administration of intravenous glucose and sodium bicarbonate. *Pediatr.*, 32:966, 1963.
- VALERI, C.R. & FORTIER, N.L. - Red cell 2,3-diphosphoglycerate and creatine levels in patients with red cell mass deficits or with cardiopulmonary insufficiency. *New Engl. J. Med.*, 281:1452, 1969.
- ; ZAROULIS, C.G.; FORTIER, N.L. - "Peripheral red cells as a functional biopsy to determine tissue oxygen tension". In: RORTH, M. & ASTRUP, P. - *Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid-base status*. Copenhagen, Munksgaard, 1972. p. 650.
- VALTIS, D.J. & KENNEDY, A.C. - Effective gas transport of stored red blood cells. *Lancet*, 266:119, 1954.
- WEATHERALL, D.J. - Polycythemia resulting from abnormal hemoglobins. *New Engl. J. Med.*, 280:604, 1969.

WEISS, E.B. & DESFORGES, J.F. - Oxyhemoglobin affinity in bronchial asthma: chronic stable state, acute and status asthmaticus. *Chest*, 62:709, 1972.

WRANNE, B.; WOODSON, R.D.; DETTER, J.C. - Bohr effect: interaction between H^+ , CO_2 , and 2,3-DPG in fresh and stored blood. *J. Appl. Physiol.*, 32:749, 1972.

YOSHIKAWA, H. & MINAKAMI, S. - Regulation of glycolysis in human red cells. *Folia Haematol.*, 89:357, 1968.