

Glicolisis del glóbulo rojo humano en la hipoxia crónica de altura

Jacques Arnaud Nancy Gutiérrez

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

ABSTRACT

We have found that glycolysis in human red blood cells under the hypoxic conditions found at high altitudes is connected with changes in enzyme activities and levels of various metabolic intermediates.

The sensitivity of the four kinases to hypoxia results in: 1) glycolytic hyper-activity leading to a higher intracellular energy state, and 2) accumulation of 2-3 DPG, whose role in the adaptation of red blood cell respiration to high altitude has been shown by previous research.

PEP, 3PG, and G6P appear to be the main regulating intermediates in glycolysis in this system. The reason for the large increase in GI 6DP is still not clear.

RESUMEN

Hemos encontrado que la glicólisis de los glóbulos rojos humanos bajo condiciones de hipoxia, está relacionado con los cambios en la actividad y niveles de enzima de varios intermedios metabólicos.

La sensibilidad de las cuatro kinasas a la hipoxia resulta en:

1) hiperactividad glicolítica hacia más alto estado de energía intracelular y 2) la acumulación de 2-3 DPG, cuyo rol en la adaptación de respiración del glóbulo rojo en la altura ya se ha mostrado en una investigación previa.

PEP, 3PG y G6P parecen ser los principales intermediarios reguladores en la glicólisis de este sistema. La razón del gran aumento en GI-6DP aún no está claro.

La respiración en los glóbulos rojos, depende de un equilibrio intracelular finamente controlado. La hipoxia encontrada en la altura perturba este balance y de esta manera la función respiratoria sólo se puede

conseguir por reajustes considerables en el metabolismo.

Estudios en grupos que viven en la altura, se pueden realizar en pocas partes del mundo. Los Andes tiene la ventaja de tener grandes cantidades de habitantes que viven a más de 3.500 mts. como también gente del mismo grupo étnico (quechuas) que viven en diferentes ambientes ecológicos. (Baker L.).

Este estudio se ha realizado en Bolivia en habitantes quechuas, establecidos, en Santa Cruz a 450 mts. o en La Paz a 3.600 mts. Hemos examinado la influencia de hipoxia en la glicólisis del eritrocito de estos dos grupos.

MATERIAL Y METODO

Los sujetos eran 108 adultos (29 ± 11 años, 65% hombres, 35% mujeres) que vivieron en La Paz por lo menos 7 años y que tenían un hematocrito promedio de $51.5 \pm 4.3\%$ y un promedio de hemoglobina de 16.4 ± 1.3 gm% ml Hb; 41 adultos quechuas (26 ± 10 años, 68% hombres, 32% mujeres) que vivieron en Santa Cruz por lo menos 6 años cuyo promedio de

hematocrito era de $42.1 \pm 4.5\%$ y de $13,2 \pm 2.1$ gm%/ml de hemoglobina.

La investigación bioquímica y hematológica, se procedió por:

- 1) Un estudio etnológico a largo plazo (G. Riviere) que caracterizó a los habitantes y habilitó una selección de indios del grupo quechua solamente.
- 2) Un exámen médico minucioso (J.C. Quilici) que eliminó a los individuos, cuya salud era pobre o dudosa.

Las dosificaciones (o medidas) se hicieron inmediatamente en muestras de sangre venosa tomadas del pliegue del codo.

La actividad glicolítica del glóbulo rojo se dosificó usando la técnica descrita por Cartier (1969), se tomó en cuenta el cambio de concentración de glucosa en Krebs-Ringer contenido en un volumen conocido de glóbulos rojos. El pH (7.40) y la temperatura (37°C) se mantuvieron constantes durante la incubación.

Las actividades de las enzimas en el ciclo glicolítico se midieron usando el proceso standard (Cartier et al. 1967 a). Las muestras se recogieron en ácido cítrico dextrosa, lavados con solución salina fisiológica y hemolizados por calor y shock hipotónico. La actividad enzimática se determinó por acoplamiento de las reacciones de óxido-reducción de los nucleótidos de piridina ($\text{NAD} + \text{NADH}$, $\text{NADP} + \text{NADPH}$) y el dosaje espectrofotométrico a 340 mm.

Los intermedios metabólicos se midieron por los procesos standard usados por Cartier et al (1976). Las muestras venosas recogidas en ácido perclórico frío. La solución fué neutralizada y los metabolitos fueron nucleótidos de piridina ($\text{NAD} + \text{NADH}$, $\text{NADP} + \text{NADPH}$) y por dosaje espectrofotométrico a 340 mm.

2-3 DPG y GI-6DP estos niveles se midieron en las muestras de ácido perclórico neutralizados GI-6DP se dosaron usando la técnica de Cartier y Tembine (1967)

que consistió en transformar las muestras en G6P por acción del ácido perclórico caliente y dosado como se indica más arriba, 2-3 DPG se dosó usando la técnica descrita por Keitt (1971).

Para análisis estadístico de muestras grandes se utilizó el test de T de students.

RESULTADOS

Tomamos como controles, valores obtenidos de los habitantes que viven a bajas alturas. Los valores del grupo de altas alturas son consecuentemente expresadas como porcentajes de estos parámetros de referencia.

Actividad Glicolítica

La hipoxia de las alturas conduce a un aumento muy significativo (+ 35%) de glucosa total consumida por el glóbulo rojo (Fig. 1, tabla 1).

Actividad de la Enzima

La actividad de las 11 enzimas en glicólisis anaeróbicas, fué alterada en forma significativa en la altura (Fig. 2, tabla 2) PHM que es el catalizador en el paso de G6P a GIP, aumentó bastante su actividad, de 0,17 IU/ml RBC (glóbulo rojo) en bajas alturas hasta 0.32 IU/ml RBC en la altura (S.D. = 0.30 IU/ml RBC).

Todas las actividades enzimáticas en los pasos iniciales de glicólisis (antes 1-3 DPG) fueron aumentadas, mientras que todas las actividades de enzimas más allá de este punto, se disminuyeron y todas las kinasas tuvieron una actividad considerablemente alterada. El punto de separación de enzimas cuyas actividades fueron disminuidas, frente a las que fueron aumentadas fué encontrado en el paso de 2-3 DPG (Ciclo de Report Luebering).

La actividad de DPGM, la primera enzima en el ciclo 2-3 DPG, se aumentó de 0.354 IU/ml RBC de bajos niveles S.N.M. a 0.128 IU/ml RBC de niveles altos S.N.M. (S.D. = 0, 05 IU/ml RBC).

T A B L A N° 1

		ACTIVIDAD GLICOLITICA						
		ATP	ADP	AMP	2-3 DPG	GI6DP		
Santa Cruz	X	1.210	139	25	1.100	89		
150 ms.	SD	1.000	14	1	360	11		
La Paz	X	1.510	87	32	5.800	120		
3.600 ms.	SD	1.500	12	1	360	16		
Estudio	P	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
Estadístico		HS	HS	HS	HS	HS	HS	

TABLA 2. DIFERENCIAS EN ACTIVIDADES GLICOLITICAS DE ENZIMAS (IU ml RBC)

	HK	PHI	PFK	ALDO	TPI	GAPDH	PGK	PGM	ENO	PK	LDH
Santa Cruz	X	0.21	0.56	0.34	269	14.7	26.0	5.6	2.86	3.96	22.3
450 M.	SD	0.03	0.14	0.05	31	3.4	3.0	0.6	0.34*	0.66	4.7
La Paz a	X	0.27	0.85	0.45	339	19.9	16.7	4.0	1.79	2.90	18.9
3.600 m.	SD	0.04	0.08	0.04	34	1.6	1.0	0.6	0.16	0.35	1.4
Estudio	P	<P.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Estadístico		H.S.	H.S.	H.S.	H.S.	H.S.	H.S.	H.S.	H.S.	H.S.	H.S.

TABLA 3. DIFERENCIAS EN INTERMEDIARIOS METABOLICOS (n mol ml RBC) EN GLOBULOS ROJOS

	GL1	G6P	F6P	FDP	DHAP	GASP	3PG	2PG	PEP	PYR-1	LACTI
Santa Cruz	X	4.738	32.5	9.5	3.9	16.4	2.4	59.3	10.9	18.4	89
450 m.	SD	315	2.4	1.1	0.5	1.2	0.3	2.1	0.9	2.0	5
La Paz	X	4.276	21.1	4.8	3.7	15.4	1.8	72.5	11.5	29.2	82
3.600 m.	SD	284	1.8	0.8	0.4	1.3	0.2	2.5	0.7	2.5	4
Estudio	P	<0.001	<0.001	<0.02	<0.001	<0.001	<0.01	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001
Estadístico		H.S.	H.S.	H.S.	S	H.S.	H.S.	S	H.S.	H.S.	H.S.

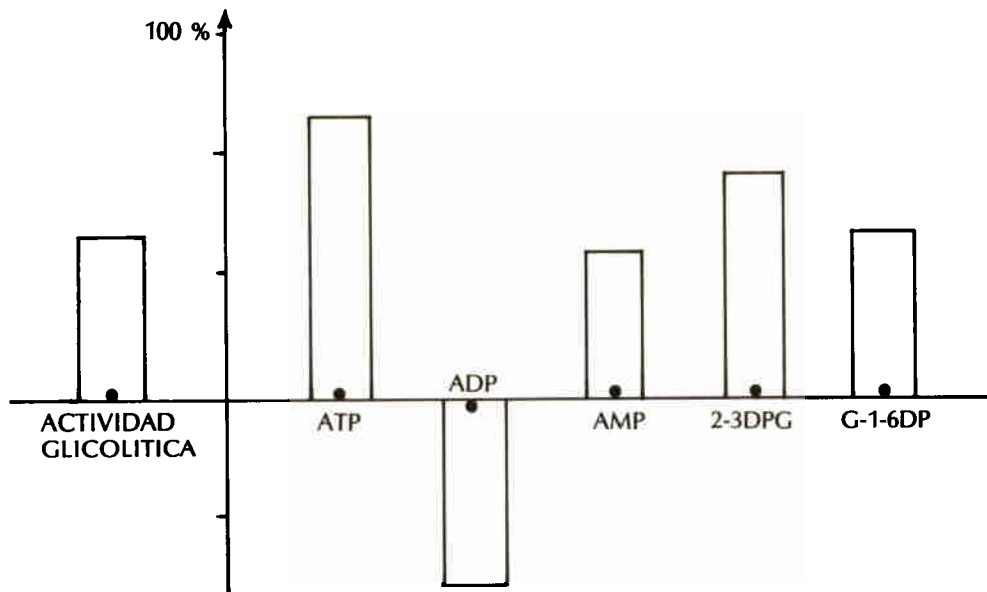


Fig. 1. Diagrama de diferencias, en adenosinas fosforiladas (ATP, ADP, y AMP, 2-3DPG y G16DP) y actividad glicolítica de glóbulos rojos, entre sujetos que vi-

ven a 150 m.s.n.m. (100% para cada parámetro) y sujetos que viven a una altura elevada (3.600 ms.)

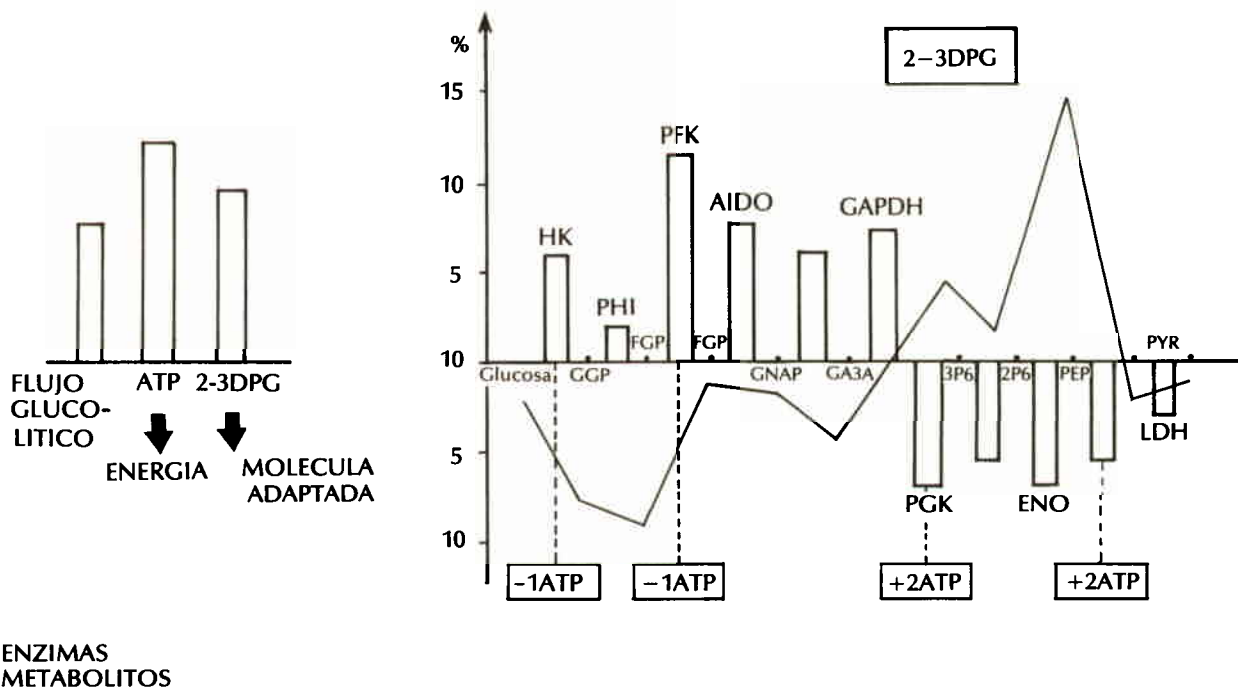


Fig. 2. Diagrama de diferencias de la actividad enzimática de glóbulos rojos y concentraciones glicolíticas

intermediarias entre sujetos que viven a 150 ms. (100% para cada parámetro) y sujetos que viven a 3.600 ms.

Metabolitos intermediarios

Trece intermediarios en la glicólisis anaeróbica como también de la adenosina fosforilada ATP, ADP, y AMP fueron medidas. Todas se alteraron, en forma significativa por la hipoxia, aunque la FDP y 2PG fueron solamente cambiadas en forma moderada (Fig. 1.2 - Tablas 1-3).

Los cambios observados fueron:

- 1.- Concentraciones de intermediarios glicolíticos de glucosa a GA3P como también de piruvato a lactato.
- 2.- Concentraciones aumentadas de los intermediarios de 3PG a PEP.
- 3.- Cambios considerables en el paso de las kinasas.

Hubieron dos puntos de separación entre intermediarios que aumentaron y aquellos que bajaron por la hipoxia. Uno de ellos estaba en el nivel del ciclo Rapoport Luibering donde el 2-3 DPG es sintetizado y el otro fué en el nivel de PK, una enzima reguladora muy importante. También hemos observado acumulación de 2-3 DPG y GI-6DP en el glóbulo rojo, y un aumento de ATP y AMP con disminución de ADP. Los niveles de reticulocitos en la altura son de 12.7 ± 4.2 % RBC, lo que confirma los resultados de Garruto (1973).

DISCUSION

Activación de glicólisis y metabolismo energético

El consumo aumentado de glucosa, que es la primera consecuencia de la hipoxia y es comparable al Efecto Pasteur, no ha sido afectado en la disminución de concentración de glucosa en la sangre ($\pm 10\%$, Fig.2)

La glucosa es la única fuente de energía para los eritrocitos.

HK la enzima glicolítica menos activa tiene una concentración saturada de substrato lo que no permite que sea el factor limitante en la glicólisis sin la ayuda del mecanismo regulante (Cartier, 1969). Aunque es fuertemente inhibido por ATP (Rijlsen y Stall, 1976 A) por 2-3 DPG (Brewer, 1969) y G6P (Rose y O'Connell, 1964) de manera que tiene propiedades reguladoras en los glóbulos rojos.

En la hipoxia de las alturas la disminución del nivel de G6P (-35%; Fig. 2), altera parcialmente la inhibición como el aumento del ATP (+56%, Fig. 1), y los niveles de 2-3 DPG (+43%; Fig. 1) no pueden ser restauradas.

El aumento de concentración de Mg² en el eritrocito, encontrado en los residentes de La Paz comparado con la de los que viven en Santa Cruz (Henrotte y al. 1970-1972) podría ser un factor contribuyente en la activación de la glicólisis en los pasos de HK y de PFK, conduciendo así a la acumulación de ATP.

PFK una enzima alostérica en una posición clave, en el comienzo de la glicólisis, es considerablemente activada en la altura (+51%, Fig. 2). Esto lleva a la disminución del nivel de F6P (49%, Fig. 2). Aunque PFK es más sensible a la hipoxia (Passonneau y Lowry' 1962) que los otros reguladores (Fig. 3) ya que la inhibición atribuida al ATP es contrarrestada por el nivel alto de Mg² en la hipoxia. (Etiemble y al. 1981) y la inhibición debida al 2-3 DPG es contrarrestada por la producción de mayores cantidades del complejo Hb 2-3 DPG en la hipoxia (Arnaud, 1979).

Hemos observado una correlación muy cercana entre el aumento en la actividad glicolítica (+ 35%) y actividad de PFK (+35%) con disminución del nivel de G6P (-35%) (P 0.01) como también entre el aumento de la actividad de PFK (+ 51%) y la disminución de los niveles de F6P (- 49%) (P 0.01). Estas correlaciones sugieren que el flujo glicolítico es controlado por HK, el cual depende de los niveles de G6P (Moore y Brewer, 1980) y que en la hipoxia la glicólisis es activada por PFK, el cual regula los niveles de G6P a través de PHI, el que actúa como modulador (Arnaud, 1979).

La consecuencia inmediata de la activación glicolítica es el aumento en el promedio de ATP/ADP, el mismo que de acuerdo a nuestros cálculos es de 8.92 a baja altura y de 22.70 en la altura. A pesar que este aumento no sólo se puede deber a la conversión de ADP en ATP en la célula. En efecto, las cantidades totales de ATP, ADP y AMP., están aumentadas en la altura (+ 47%). Una de las razones podría ser la inhibición elevada del AMP-DA por el 2-3 DPG (Cartier, 1969, Fig. 3), como el último aumento con la altura (+43%, Fig. 1). El pool adenosina fosfato, consecuentemente, no está alterado por este mecanismo. También es posible que la activación de la síntesis del fosfato adenosina se produzca en el eritrocito maduro, el cual aún retiene la enzima biosintética necesaria (Cartier, 1969).

Bajo estas condiciones el estado de energía del glóbulo rojo no puede caracterizarse solamente por el promedio de ATP/ADP.

El coeficiente de la carga energética (CE) establecido empíricamente por Atkinson (1968) es definido como:

$$CE = 1/2 \times (ADP + 2 ATP) / (AMP + ATP)$$

lo que da una mejor idea del estado de energía de la célula.

El requerimiento bajo de energía del glóbulo rojo hace que el (CE) sea alto. De ahí que las kinasas HK y el PFK vienen a ser los principales reguladores del flujo glicolítico vía nivel de la G6P (Fig. 3). En las alturas bajas la CE es de 0.933/0.005 mientras que en las alturas es de 0.963/0.005 ($1 < 0.001$).

Estos resultados son consistentes con un estado de energía aumentando en los glóbulos rojos en la altura.

REGULACION DE LA CLICOLISIS Y ACUMULACION DE 2-3 DPG

Los mecanismos de regulación glicolítica (Ataullkhanow et al. 1981; Leroux y Najman, 1971; Cartier

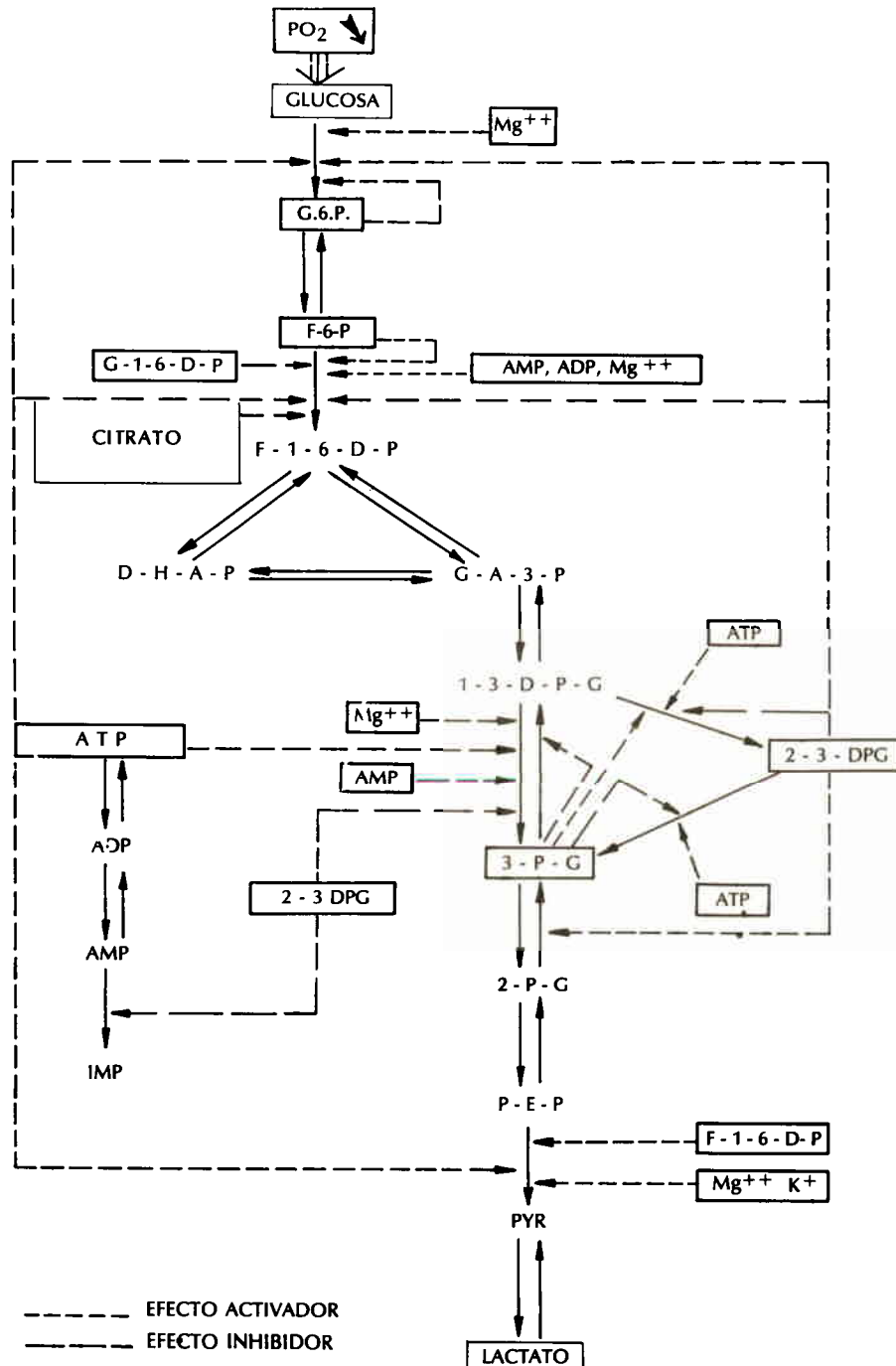
1969, Yoshikawa y Ninami, 1968; Rose y Warns, 1966) pueden explicar el aumento de niveles de 2-3 DPG encontrados en los glóbulos rojos en la hipoxia de las alturas (Fig. 3).

La disminución de actividad de PK (- 27%), (Fig. 2) añadida a la inhibición debida al promedio alto de ATP/ADP induce a la acumulación de triosa fosfatos antes del paso de 2-3 DPG (Fig. 2)

La concentración alta resultante de 3PG induce a una activación de DPGM el que es elevado en la hipoxia (+ 22%), la inhibición de DPG y la interrupción

de la reacción Catalizada por PGK impidiendo la regeneración de ATP y reduciendo la actividad de PGK en 36% durante la hipoxia.

Debido a estos cambios de 1-3 DPG la glicólisis es desviada a la síntesis de 2-3 DPG cuando el promedio de ATP/ADP es alto y la energía por la glucólisis iguala a la energía consumida. Esto está acompañado por la acumulación de 2-3 DPG y es sabido que esto estimula la respiración en la altura (Leufant y Sullivan, 1971; Eaton et al. 1964). También la cantidad extra de 1-3 DPG es usada de otra manera. Su degradación provocada por PGK es reducida, mientras que la actividad



del ciclo Rapoport-Luebering es aumentada y mayor cantidad es disponible para la síntesis de G1-6DP (Tembine, 1968). La reacción que transforma el 1-3 DPG en 3PG induce a la síntesis de G1-6DP sin regeneración de ATP o 2-3 DPG lo cual es favorecido por la fuerte activación de PHM en la altura (+ 86%, Fig. 2).

En las primeras semanas de aclimatación a la altura, la hipoxia crónica conduce a una más o menos alcalosis respiratoria severa (Lefrancois et al. 1976; Davenport, 1971; Lenfant et al, 1971). El proceso glicolítico completo queda consecuentemente afectado en el glóbulo rojo (Cartier, 1969). Sin embargo, la alcalosis respiratoria no se encuentra en los sujetos que viven permanente en la altura (Cymerman y et al. 1976). Esto es debido por un lado a la ausencia de hiperventilación y por otro lado a la capacidad mediadora (Buffering aumentada de la sangre) (Lefrancois et al. 1970), que resulta de la hiperhemoglobulinemia (Arnaud et al. 1984).

Vale la pena notar que la diferencia que hemos detectado en las dos diferentes alturas han sido medidas a un pH constante (7.60) en el sistema de toma de muestras. La actividad glicolítica puede entonces compararse directamente y podemos ahora concluir que la altura causa una energía intracelular alta y este

estado conduce a la acumulación de 2-3 DPG (Moore y Brewer, 1980).

CONCLUSIONES

Podemos concluir que en la altura la caída de PO₂ tiene una influencia directa en las enzimas glicolíticas del eritrocito. Esto se puede considerar análogo a la elevación del pH en la sangre. El trabajo de (Lenfant et al. 1971) en sujetos en fase de aclimatación (más de 6 días) ha demostrado que la inhibición por acetazolamida del efecto de alcalosis también impide las adaptaciones bioquímicas. No hay aumento de 2-3 DPG y P50.

Este efecto directo del oxígeno en las enzimas glicolíticas conducen a la activación de la glicólisis, estimulación de HK y PFK, inhibición de PK y PFK y acumulación de ATP, 2-3 DPG y G1-6DP. Durante la aclimatación este efecto reemplaza los efectos de alcalosis respiratoria, el cual desaparece gradualmente. La disminución en el reflejo de hiperventilación a hipoxia induce a un reequilibrio de pH en la sangre.

AGRADECIMIENTOS

Quedamos muy agradecidos al Dr. J.C. Quilici y G. Riviere, por su interés en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. - J. ARNAUD, N. GUTIERREZ. Función Respiratoria del Glóbulo Rojo en gran Altura 1976 - Revista del Instituto Boliviano de Biología de Altura. N° 23
2. - J. ARNAUD, H. VERGNES, N. GUTIERREZ. Respiratory Function and Erythrocyte Metabolism at High Altitude. Hematology, 6, N° 23-24, 83/87, 1976.
3. - J. ARNAUD, H. VERGNES, D. GOURDIN, N. GUTIERREZ. Erythrocytes Enzymes and Metabolism Changes in man Living at high Altitude. Anthropologie des Populations Andines. Inserm. Vol. 63, 505/522, 1976.
4. - J. ARNAUD, J.C. QUILICI, H. VERGNES, N. GUTIERREZ. Methemoglobine at Systemes Reducteurs de L'erythrocyte en Haute Altitude. Instituto Boliviano de Biología de Altura N° 25, 62-69, 1981.
5. - BRIN M. - YONEMATO r/ J. Biol. Chem. 1958 - 230 - 307.
6. - P. CARTIER. La Glycolyse su Globule Rouge Normal et Pathologique. Exposés annuels de Biochimie Médicale - 29° Série - 1969 - 25/75.
7. - D. GOURDIN. Le Cycle des Pentoses de L'erythrocyte en presence de Bleu de Methylene. These C/N/R/S RCP 87 - Toulouse 1970.
8. - J.R. Murphy. J. Lab. Clin. Med. 1960 - 55 - 286.
9. - J.C. QUILICI. Les Altiplanides du Corridor Anterandin Etude Hémostypologique. Centre d'Hémostypologi - C.N.R.S. - 1968.
10. - J. RUFFIE. Hemotypologie et Evolution du Groupe Humain - Monographie du centre d'Hémostypologie du C.N.R.S. - Toulouse 1966.
11. - J. RUFFIE - G. LARROUY - H. VERGNES. Hemotypologie Comparee des Populations Amerindiennes de Boliviv et Phenomenes Adaptatifs. Nouv. Rev. Franc. D'Hematologie 6, 4, 1966, 544.
12. - J. RUFFIE, H. VERGNES, TH. HOBBE. Sur La Reversibilite de la Methemoglobinisation des Hematies chez les Populations Indigenes du Corridor Interandin/Essai D'Interpretation. C.R. Acad. des Sciences. 262, 2966, 1956/1958.
13. - J.A. VELLARD. Principaux Types Raciaux des Andes de la Bolivie/C.R. Acad. Sc. Paris 1965, 261, 227/229.
14. - J.A. VELLARD. Civilisation des Andes. Gallinard - Paris - 1962.