

ESTUDIO DEL SISTEMA DIAFORASICO EN MESTIZOS-BLANCOS
RESIDENTES EN LA ALTURA (3.600 m)

Dra. Rosario Peñaloza I. - Dra. Nancy G. de Nallar
Dr. Jacques Arnaud - Lic. German LLanos R.

INTRODUCCION

La hemoglobina, molécula que se encuentra en el interior de los hematíes, es una molécula funcional únicamente bajo la forma de oxihemoglobina, en la que el hierro está al estado ferroso (Fe^{++}). La metahemoglobina (MetHb) en la cual el hierro está al estado férrico (Fe^{+++}), no tiene capacidad de fijar reversiblemente el oxígeno.

En los hematíes de los humanos la oxihemoglobina tiene tendencia a oxidarse espontáneamente en metahemoglobina - bajo diferentes circunstancias. El mecanismo por el cual se produce ésta oxidación normalmente in vivo no está claramente dilucidado. Sin embargo la tasa fisiológica de la metahemoglobina no excede del 1% de la hemoglobina total en los habitantes a nivel

del mar, lo que indicaría la existencia de sistemas de protección de la oxihemoglobina contra la oxidación. Estos sistemas son múltiples y pueden ser enzimáticos o no.

Entre éstos sistemas de desintoxicación tenemos: el de la catalasa, glutathion peroxidasa, el ácido ascórbico, los piridin-nucleótidos: NADH y NADPH metahemoglobina reductasa.

Las metahemoglobinemias - pueden ser clasificados en 3 grupos :

- Metahemoglobinemias toxicas.
- Metahemoglobinemias por anomalía molecular de la globina (Hemoglobina M).
- Metahemoglobinemias por déficit enzimático.

Dentro de éste último grupo, que es el que mas nos interesa, la sola causa de metahemoglobinemia por anomalía -

metabólica eritrocitaria es - el déficit en NADH-Metahemo--globina-reductasa. Los trabajos de Gibson (6) en 1948 condujeron a la hipótesis de la ausencia congénita de una metahemoglobina-reductasa y han sido Scott y Griffith (11) - quienes confirmaron ésta hipótesis.

ANTECEDENTES

La hipoxia hipobárica de las grandes alturas (3.000 m. sobre el nivel del mar) produce a nivel del eritrocito, modificaciones metabólicas (2,3) entre las cuales la elevación de la tasa de metahemoglobina es señalada por Gourdin (7) existiendo una relación entre éste aumento y la disminución de la actividad enzimática de la NADH-Diaforasa en la altura; correlación que ya fue vislumbrada por Vergnes (12).

Los anteriores estudios - han demostrado la existencia de una elevada concentración de metahemoglobina ($3.14\% \pm 0.89$) en Aymaras residentes - en La Paz (3.600 m) (1-4) poniéndose en evidencia, mediante el test de BREWER (10) una disminución de la actividad enzimática de la NADH y NADPH Diaforasas.

Se distinguen dos tipos - de metahemoglobina-reductasa:

- La o las NADH-Metahemoglobina-reductasa (s) y
- La o las NADPH-Metahemoglobina-reductasa (s)

Ambas están estrechamente ligadas a la glicolisis (Fig 1): las primeras a la vía de EMBDEN-MEYER HOFF a nivel del gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, donde se produce NADH y las otras al SHUNT de las PENTOSAS por el intermediario de la reacción de la Glucosa-6-Fosfato de hidrogenasa y de la 6-Fosfogluconato dehidrogenasa, donde el NADP es reducido en NADPH.

Estos dos sistemas enzimáticos intervienen en la reducción a nivel del eritrocito utilizando el NADH₂ y él reduciría el pigmento a condición de que el azul de metileno esté presente y necesitando el NADPH₂.

El propósito del presente trabajo es de demostrar que - en mestizos-blancos habitantes de La Paz (3.600 m) existen modificaciones de la actividad de los enzimas reguladores de transformación de metahemoglobina en hemoglobina - (la NADH-Metahemoglobina-reductasa o Diaforasa y eventualmente la NADH-Metahemoglo

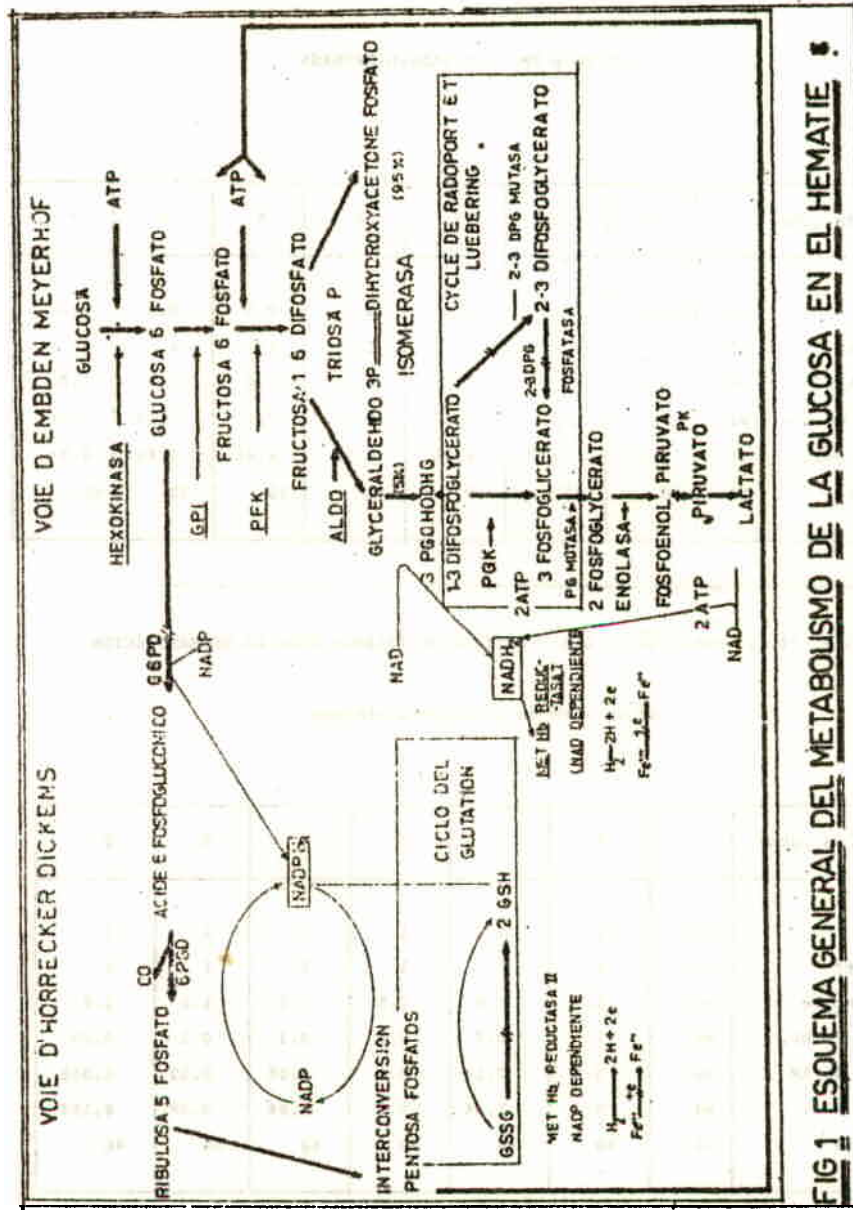


FIG 1 ESQUEMA GENERAL DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN EL HEMATIE

12 TABLA I : RELACION DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACION

DE V_m y K_m LA NADH-DIAFORASA

No. de tubos		1	2	3	4	5	6	7
EDTA	ml.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Buffer	ml.	1	1	1	1	1	1	1
$K_3(CN)_6$ Fe	ml.	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Sol. de hb.	ml.	1	0.7	0.5	0.3	0.1	0.08	0.06
Agua dest.	ml.	5.56	5.86	6.06	6.26	6.46	6.48	6.5
Sangre	ul.	40	40	40	40	40	40	40

TABLA II : RELACION DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACION

DE V_m y K_m DE LA NADPH-DIAFORASA

NR de tubos		1	2	3	4	5	6
EDTA	ml.	1	1	1	1	1	1
Buffer	ml.	1	1	1	1	1	1
$K_3(CN)_6$ Fe	ml.	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Sol. de Hb.	ml.	1	0.7	0.5	0.3	0.1	0.08
Sol. de AM	ml.	0.2	0.14	0.1	0.06	0.02	0.016
Agua dest.	ml.	5	5.36	5.6	5.84	6.08	6.104
Sangre	ul.	40	40	40	40	40	40

bina reductasa o Diaforasa). Se determinaran las constantes V_m y K_m de estas enzimas, cuales son los isoenzimas mas comunes de los NADH-Diaforasa y la tasa de MetHb en éstos sujetos; como examen complementario se efectuará Hemograma.

MATERIAL Y METODOS

Se tomaron 5 ml. de sangre venosa sobre heparina se ca a 30 estudiantes-mestizos-blancos de ambos sexos (20 varones y 10 mujeres), con una edad promedio de 25.07 ± 3.22 años que habitan en La Paz, - en los cuales se determinaron los siguientes parámetros:

A) Determinación del hematocrito

B) Dosaje de Hemoglobina por el método de DRABKIN.

C) Dosaje de Metahemoglobina por el método de EVELYN MALLOY (5)

D) Medida de la actividad enzimática de la NADH Diaforasa por el método de HEGESH (8). Medida de la actividad enzimática de la NADPH-Diaforasa con una técnica modificada de la anterior y estandarizada con el IBBA.

E) Determinación de las constantes V_m y K_m de éstos -

enzimas variando las concentraciones del sustrato como indican las tablas I y II.

Para calcular los valores de las constantes V_m y K_m empleamos la ecuación de LINEWEAVER-BURK :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{S}$$

Los resultados fueron comparados con la ecuación de HOFSTEE :

$$V = V_m - K_m \times \frac{V}{S}$$

F) Separación por electroforesis en gel de almidón de los isoenzimas de la NADH-Diaforasa, según el método de HOPKINSON (9) con una migración refrigerada a 4°C por espacio de 24 hs. a 120 voltios y 90 m amp.

RESULTADOS

A) La determinación de Hematocrito da un valor promedio de 51.72 ± 3.81 (Tabla III).

B) El dosaje de Hemoglobina da un valor de $17.93 \text{ g}/100 \text{ ml.} \pm 1.59$ (Tabla III).

C) La tasa de Metahemoglobina obtenida es de $2.13 \pm 0.46\%$ (Tabla III).

D) La actividad de la NADH-Diaforasa obtenida es de $2.54 \text{ UI/gHb.} \pm 0.46$; y de la NADPH-Diaforasa es de $0.99 \text{ UI/gHb} \pm 0.22$ (Tabla III).

E) El valor de la constante V_m de la NADH-Diaforasa obtenido es de $8.16 \times 10^{-2} \text{ moles/min} \pm 0.013$; y el valor de la constante K_m obtenido es de $1.15 \times 10^{-1} \text{ M} \pm 0.02$, con un coeficiente de correlación de 0.99 (Tabla III). Estos valores fueron obtenidos en base a la ecuación de Lineweaver-Burk (Fig 2) y comparados con la ecuación de Hofstee (Fig 3).

Los valores de las constantes V_m y K_m de la NADPH-Diaforasa no pudieron ser obtenidos porque la reacción que produce aparentemente no sigue el modelo de Michaelis-Menten.

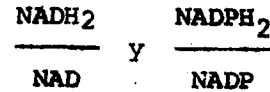
F) Los isoenzimas de la NADH-Diaforasa encontrados son: Dia. I en un 96.6% de los casos y Dia. II en un 3.3% de los casos. (Tabla IV). (Fig 4) La clasificación se realizó en base al diagrama de la Fig 5.

DISCUSION

Teniendo en cuenta que el eritrocito está en constante

lucha contra la oxidación de sus constituyentes principales de la Hemoglobina, la cual es protegida por una serie de sistemas reductores que utilizan los cofactores reducidos a nivel de la glicolisis, se puede considerar que:

- 1.- El aumento de la glicolisis y del Shunt de las pentosas favorece las relaciones



lo que permitiría a los eritrocitos luchar mejor contra las agresiones oxidantes.

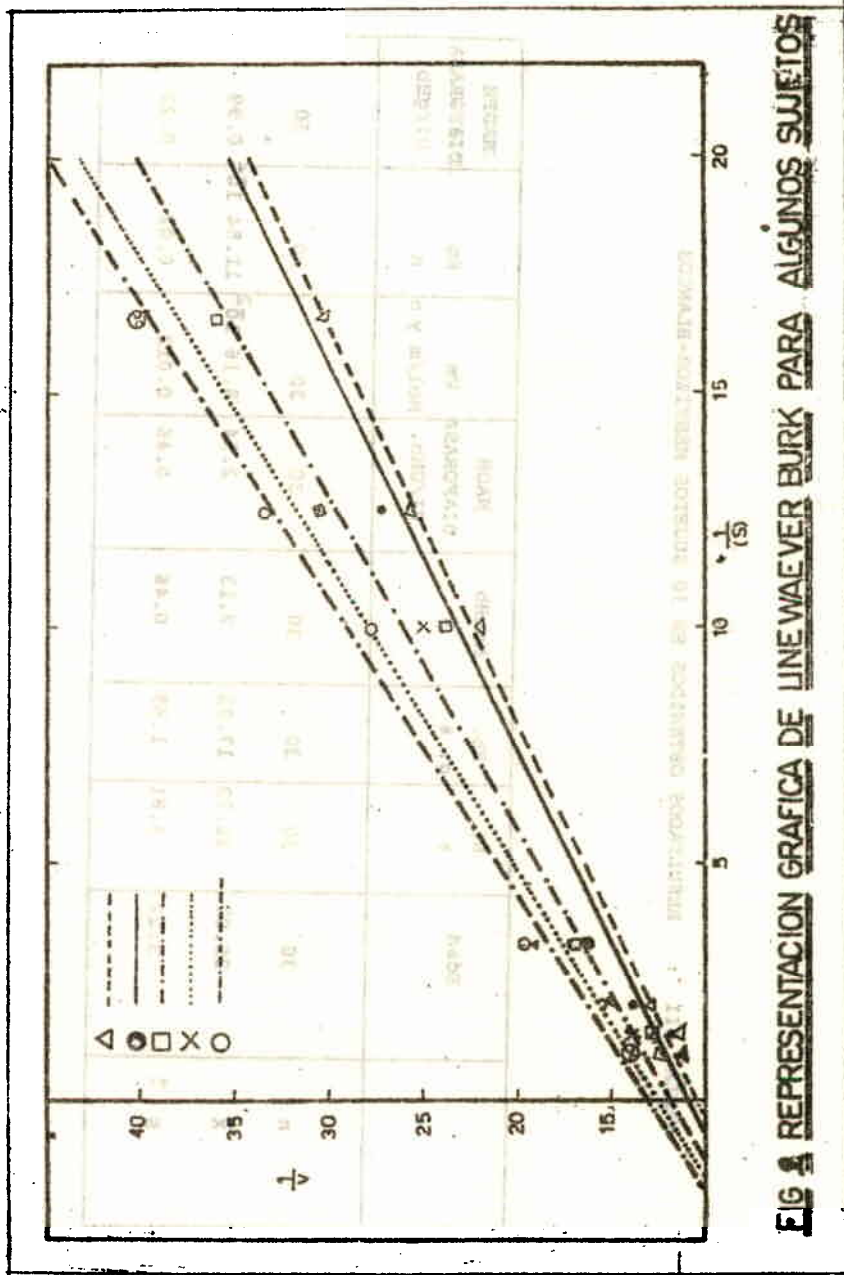
2.- La hipoxia de la altura eleva la tasa de metahemoglobina desplazando la curva de disociación de la hemoglobina hacia la izquierda, éste desplazamiento aumenta la afinidad de la Hb por el oxígeno y disminuye por lo tanto la oxigenación en los tejidos.

3.- En la hipoxia, la glicolisis a su vez, favorece el aumento de ATP, 2-3DPG y GSH, moléculas que desplazan la curva de disociación de la Hb. hacia la derecha estableciendo un equilibrio, que aumenta la oxigenación de los tejidos.

4.- El aumento de la tasa de metahemoglobina en los Aymaras

TABLA VII : RESULTADOS OBTENIDOS EN 30 SUJETOS MESTIZOS-BLANCOS

	Edad	Rt %	Hb. g. %	MetHb %	NADH DIAFORASA UI/GHb. Mol/m y n	Vm Km M	NADPH DIAFORASA UI/GHb.
n	30	30	30	30	30	30	30
X	25.07	51.72	17.93	2.13	2.54	8.16 · 10 ²	11.54 · 10 ²
S	3.22	3.81	1.59	0.46	0.46	0.013	0.22



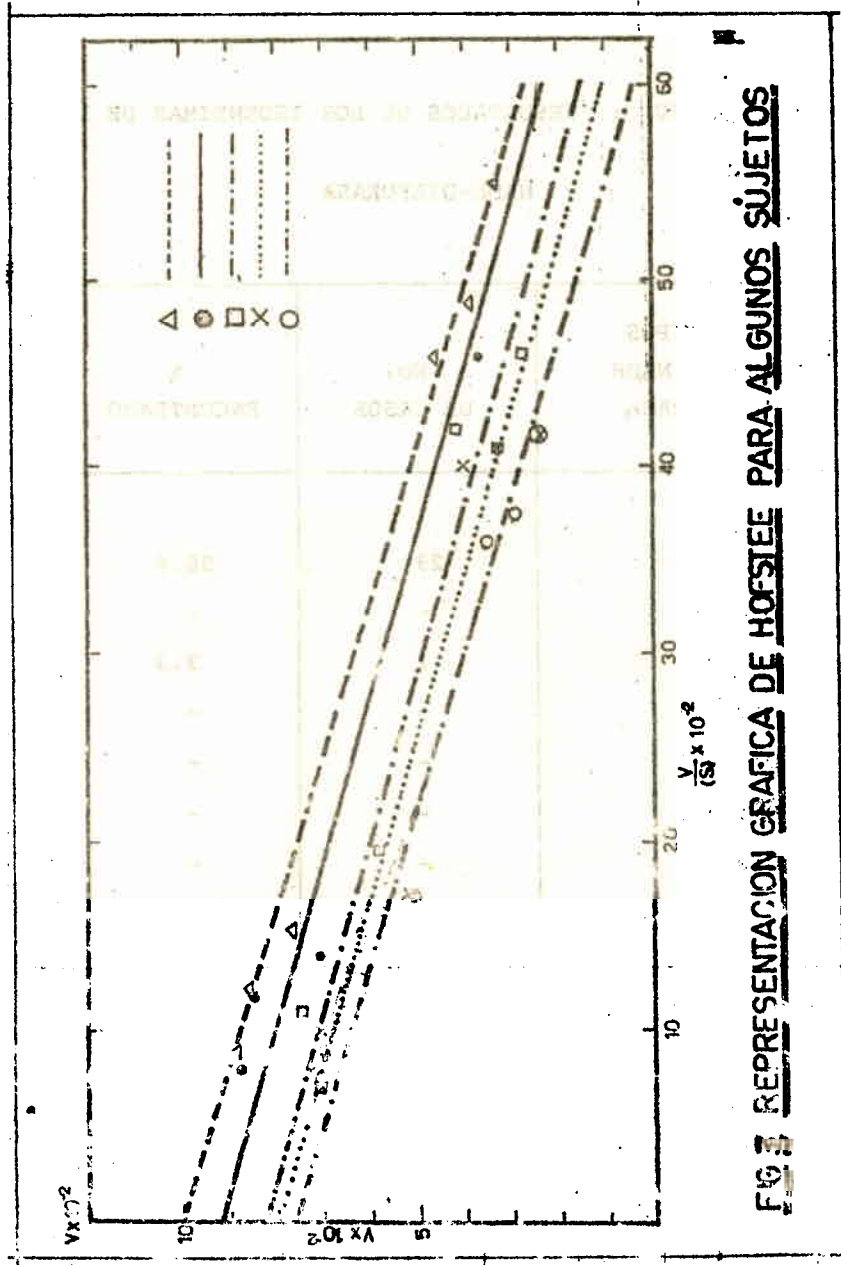
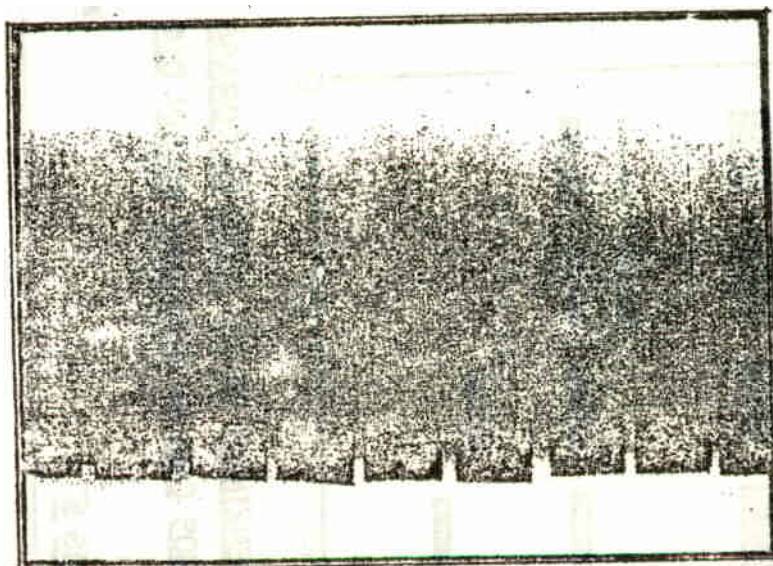


FIG. 3 REPRESENTACION GRAFICA DE HOFSIEE PARA ALGUNOS SUJETOS

TABLA IV : RESULTADOS DE LOS ISOENZIMAS DE LA

NADH-DIAFORASA

FENOTIPOS DE LA NADH DIAFORASA	No. DE CASOS	% ENCONTRADO
Día 1	29	96.6
Día 2-1	-	-
Día 2	1	3.3
Día 3-1	-	-
Día 4-1	-	-
Día 5-1	-	-
Día 6-1	-	-



ELECTROFORESIS EN GEL DE ALMIDON
CON ISOENZIMAS DE ALGUNOS SUJE-
TOS

FIG 4

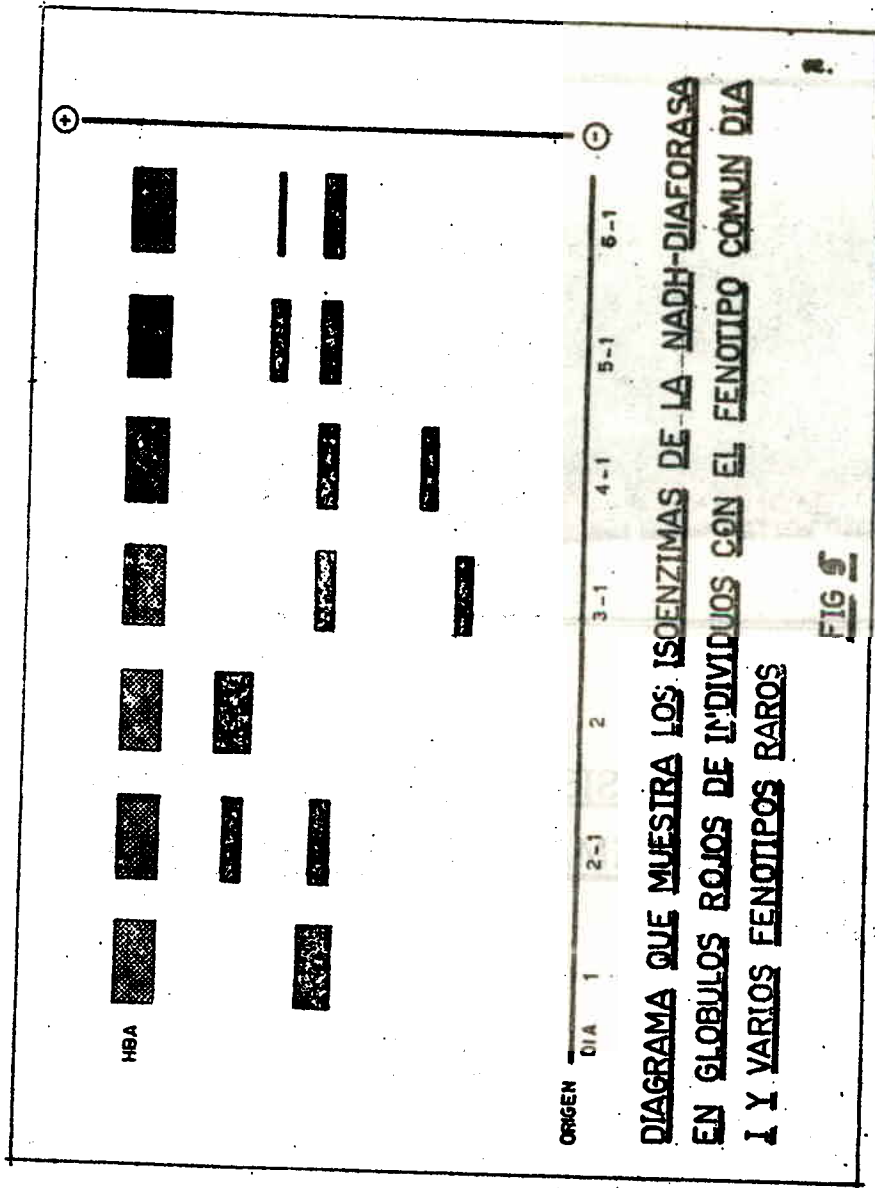


TABLE V : VALORES DE NADPH. Y ACTIVIDADES DIAFORASICAS EN

TRES RAZAS DIFERENTES

R A Z A S	MetHb %	NADH DIAFORASA UI/g Hb.	NADPH DIAFORASA UI/g Hb.
AYMAPAS (3600 m.)	n	30	30
	\bar{x}	1.675	0.470
	S ±	0.383	0.103
MESTIZOS BLANCOS (3600 m.)	n	30	30
	\bar{x}	2.13	2.54
	S ±	0.46	0.99
EUROPEOS (250 m.)	n	30	30
	\bar{x}	2.04	3
	S ±	0.89	1.10

!

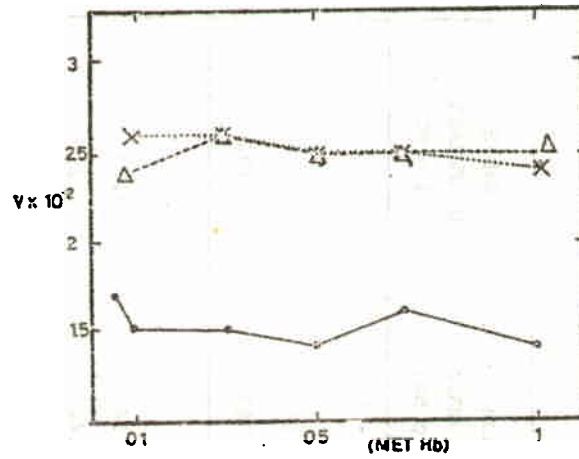


FIG 1-REPRESENTACION GRAFICA DE LA VELOCIDAD DE REACCION VERSUS CONCENTRACION DE Met Hb

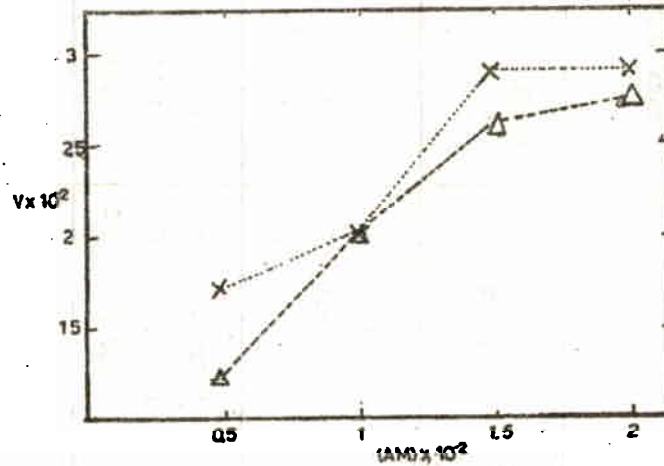


FIG 2-REPRESENTACION GRAFICA DE LA VELOCIDAD DE REACCION VERSUS CONCENTRACION AM

está relacionado con una disminución de la actividad de los sistemas diaforásicos.

5.- La metahemoglobina es considerada como:

- Reserva de hemoglobina en caso de necesidad.

- Reguladora de los fenómenos de liberación de oxígeno a los tejidos.

- Reguladora de todos los procesos de aclimatación del eritrocito a la hipoxia de altura.

6.- Considerando el inciso anterior y teniendo en cuenta que los Aymaras son habitantes del Altiplano, hace muchos siglos atrás, están mejor adaptados a la altura y se los toma como un ejemplo de los valles, que habitan recientemente el Altiplano son un ejemplo de "aclimatación".

7.- En mestizos-blancos hemos encontrado, valores de actividad enzimática de las diaforasas y de Metahemoglobina, intermedios entre los de los Aymaras y de los Europeos de tierras bajas (Tabla V). No hemos observado ninguna variación marcada en función de la edad ni del sexo.

8.- Referente a la determinación de los valores de las constantes V_m y K_m de la NADPH-Diaforasa, no han podido

ser determinados porque se observó que disminuyendo la concentración del sustrato (la MetHg) no hay disminución de velocidad de reacción, lo que nos hace suponer que probablemente ésta reacción no sigue el modelo de Michaelis-Menten (Fig 6).

Por otra parte, realizando un ensayo, en el que se varía la concentración de azul de metileno manteniendo constante la concentración de Met Hb, se observa que existe una relación aproximadamente lineal entre dicha concentración (AM) y la velocidad (Fig 7). Es decir que si se aumenta la concentración de AM la velocidad también lo hace en proporción directa.

Sin embargo, se ha observado que disminuyendo la concentración de sustrato y la concentración de azul metileno al mismo tiempo, existe una disminución de la velocidad de reacción, lo que condujo a realizar un tratamiento estadístico para establecer una posible relación de interdependencia entre la velocidad de reacción y las concentraciones de Azul de Metileno y MetHb. Dicho tratamiento, consiste en una regresión múltiple para establecer un modo

lo matemático que represente la cinética de reacción, el cual arroja resultados bastante satisfactorios, ya que el coeficiente de correlación - 0.96 encontrado, es bastante alto (10).

CONCLUSIONES

1.- Por los valores hematimétricos encontrados podemos decir que los sujetos encuestados son normales.

2.- Los valores de MetHb y de las actividades de los sistemas diaforásicos hacen suponer que los Mestizos-blancos no están bien adaptados a la altura, esto explicaría el por qué de su propensión a desarrollar poliglobulia.

3.- El valor de Km obtenido, por ser alto (1.15×10^{-1}) sugiere una baja afinidad del enzima (NADH-Diaforasa) por el sustrato (MetHb).

4.- El modelo matemático que mejor representa las observaciones experimentales de la velocidad en función de las concentraciones de metahemoglobina y azul de metileno obtenido por un trabajo de regresión y computación es el -

siguiente :

$$V = 1.137 AM \text{ MetHb}^{-0.2}$$

donde V es la velocidad de reacción AM y MetHb son las concentraciones de azul de metileno y metahemoglobina respectivamente. La ecuación indica que la velocidad de reacción sería de orden 1 con respecto al azul de metileno y de orden -0.2 con respecto a la MetHb.

RESUMEN

El eritrocito humano sometido a una hipoxia permanente es el sitio de modificaciones metabólicas, especialmente del sistema oxido-reductor.

Entre estas modificaciones se ha podido comprobar en aymaras habitantes de la altura un gran consumo de glucosa una fuerte producción de ATP, 2-3 DPG y GSH. Además de una elevada tasa de metahemoglobina, la cual se atribuye a una disminución de la actividad de los sistemas diaforásicos (3).

En el presente trabajo se realiza un estudio de la actividad enzimática de la NADH y NADPH diaforasa en mestizos-blancos, habitantes de La Paz

a 3.600 m.

También se efectúa en éstos sujetos la determinación de las constantes V_m y K_m de éstos enzimas, la identificación de los isoenzimas de la NADH-Diaforasa y una cuantificación de MetHb.

Los resultados obtenidos en esta población son intermedios entre los de los aymaras y de los europeos, considerándose satisfactorios.

SUMMARY

The human erythrocyte exposed to chronic hypoxia undergoes many metabolic changes, especially in the oxydation - reduction system.

It has been possible to show that the erythrocytes of aymaras born and living at high altitude consume a great amount of glucose and produce large quantities of ATP, 2-3 DPG and GSH. The level of methemoglobin is also increased which is attributed to a decrease of the activity of the diaforasic systems (3).

The present paper is a study of the enzymatic activity of NADH and NADPH diaforasa in mestizo white in habitants of La Paz (3.600 m). In these subjects the constants

V_m and K_m of these enzymes were also determined, the isoenzymes of the NADH-Diaforasa were identified and methemoglobin was quantified.

The results obtained in this population are intermediate between those obtained in aymaras europeans and are considered to be satisfactory.

BIBLIOGRAFIA

1. ARNAUD J. - GUTIERREZ N. QUILICI J.C. - VERGNES H. Metahemoglobinemia de Altura - Metahemoglobina y NADH-Diaforasa. I.B.B.A.
2. ARNAUD J. - GUTIERREZ N. QUILICI J.C. : Función - respiratoria y Metabolismo del Eritrocito en Altitudes Extremas. IBBA 23, Vol. 5 No. 4, Abril-JUNIO 1974, 19-25.
3. ARNAUD J. - GUTIERREZ N. EGUEZ C. - VERGNES H.: Actividades Enzimáticas Glucolíticas Eritrocitarias en el hombre de las Grandes Alturas (La Paz 3.600 m). Comparación con los valores obtenidos Vol. V, No. 4, Abril-Junio 1974, 27-36.

4. BREWER G.J. - TARLOV A.R. ALVING A.S. : Methemoglobin reduction test. A new simple in vitro test for identifying prima sensitivity. Bull Ned Health Org 1960.
5. EVELYN K.A. - MALLOY A.T. Microdetermination of oxidized hemoglobin, Methemoglobin and sulfhemoglobin in a simple sample of blood; - J. Bid. Chem. 1938, 126, 655.
6. GIBSON Q.H. : The reduction of Methemoglobin in red blood cells and studies on the cause of idiopathic methemoglobinemia. Biochem. S. 1948, 42, 13.
7. GOURDIN D. - VERGNES H. - GUTIERREZ N. : Methemoglobin in man living at a high altitude. B.J. Hematologie 1973, 29, 243.
8. HEGESH E. : New method for determining ferrihemoglobin-reductase (NADH-Methemoglobin reductase) in erythrocytes. The S. of Lab. an Clin. Med. 72, - 339, 1965.
9. HORKINSON D.A. - CORNEY G. COOK P.J.L. - RIBSON E.B. - HARRIS H. : Genetically determined electrophoretic variants of human red cell NADH Diaphorase. Ann. Hum. Genet 1975, 34, 1.
10. RIVERA R.H. : Departamento de Matematicas, Facultad de C.P. y N. de la UMSA 1979, La Paz, Bolivia.
11. SCOTT E.M. et GRIFFITH I. V. : The enzymatic defect of hereditary methemoglobinemia, diaphorase. Biochem. Biophys. Acta 1959, 34, 584.

==+==+==