

Enzimas eritrocitarios y cambios metabólicos en el hombre habitante en las grandes alturas

Jacques Arnaud,* Henri Vergnes,** Dominique Gourdin**
y Nancy Gutierrez*

SUMMARY

Data concerning the glycolytic and oxido reductive metabolism of erythrocyte in Amerindians natives of high altitude are presented and compared with the values of the same parameters usually found in the normal surrounding conditions. The most relevant modifications affect some steps of anaerobic glycolysis, specially the kinases HK, PFK and the 2,3-DPG, ATP and methaemoglobin rate among the subjects living permanently at high altitude (3.800 m). Possible explanations of metabolic changes are discussed. It seems likely that chronic hypoxia induces regulatory mechanisms at enzyme level in circulating red blood cells.

RESUMEN

Se presentan valores relativos al metabolismo glicolítico y oxido-reductor del eritrocito en el hombre nativo de la altura y se comparan con valores de los mismos parámetros, generalmente hallados en condiciones ambientales normales. Las modificaciones más importantes se observan en algunos pasos de la glicolisis anaeróbica, especialmente en el grupo de las kinasas: HK, PFK, PK; 2, 3-DPG, ATP y la tasa de metahemoglobina en sujetos que viven permanentemente en gran altura (3.800 m). Se discuten posibles explicaciones sobre estos cambios metabólicos. Parece ser que la hipoxia crónica induce mecanismos reguladores del nivel enzimático en los eritrocitos de la sangre circulante.

INTRODUCCION

Durante los últimos años se han realizado progresos importantes en el conocimiento del metabolismo de los hematíes humanos. En los hematíes maduros, los requerimientos metabólicos son ampliamente satisfechos por la conversión de glucosa a lactato por la vía de Embden-Meyerhof y por la derivación oxidativa de la vía hexosa-monofosfato. La síntesis de la alta energía necesaria se sustenta sobre el entramado que forma la conversión de fosfatos a la forma de ATP y la generación de piridin-nucleótidos (NADPH, NADH), dependientes de la utilización de la

glucosa. Además, la producción de compuestos fosforilados tales como 2,3-DPG, que desempeña un papel fundamental en la función respiratoria de la hemoglobina, depende de vías o mecanismos estrechamente relacionados. Debido al prominente papel de la glicolisis en el metabolismo intermediario de los hematíes, parece interesante investigar algunos aspectos bioquímicos en relación con esta cadena, bajo condiciones de baja tensión de oxígeno. Tal situación ocurre en las personas que viven en las grandes alturas. Se comunican aquí los resultados.

MATERIAL Y METODOS

Sujetos

Los resultados se han obtenido en indios americanos del altiplano boliviano, en la región de La Paz. Todos los sujetos eran sanos, adultos de ambos sexos, nacidos en las grandes alturas (3.800 m). Sus antecesores habían vivido en este ambiente desde muchas generaciones. Se tomaron muestras de sangre de cincuenta indios no emparentados en la ciudad de La Paz, situada a 3.800 m sobre el nivel del mar. Los valores de los diferentes parámetros examinados se han comparado con los obtenidos en treinta europeos adultos oriundos del sud de Francia, habitantes en Toulouse (212 m sobre del nivel del mar), donantes de sangre del Banco de Sangre Regional.

Enzimas glicolíticos

En ambos grupos se han analizado los siguientes enzimas involucrados en el catabolismo de la glucosa: fosfohexomutasa (PHM: E.C. 2.7.5.1), hexokinasa (HK: E.C. 2.7.1.1.); fosfohexosaísmersa (PHI: E.C. 5.3.1.9); fosfofructokinasa (PFK: E.C. 2.7.1.11); aldolasa (Aldo: E.C. 4.1.2.13); triosafosfatoisomerasa (TPI: E.C. 5.3.1.1.); gliceraldehido fosfato dehidrogenasa (GAPD: E.C. 1.2.1.12); fosfoglicerato kinasa (PGK: E.C. 2.7.2.3); fosfoglicerato mutasa (PGM: E.C. 2.7.5.3.); enolasa (Eno: E.C. 4.2.1.11); piruvato kinasa (PK: E.C. 2.7.1.40); lactato dehidrogenasa (LDH: E.C. 1.1.1.27); glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PD: E.C.1.1.1.49); 6-fosfogluconato dehidrogenasa (6PGD: E.C. 1.1.1.44). Las determinaciones enzimáticas se realizaron de acuerdo con el procedimiento de Cartier y colaboradores^{1,5}. Las actividades se expresan en micromoles de sustrato transformado por minuto y por ml de eritrocitos.

Cofactores y metabolitos

En ambos grupos experimentales, definidos arriba, se midieron dos derivados fosforilados, ATP y 2,3-DPG,

ligados a la función respiratoria de la hemoglobina, siguiendo los métodos de Cartier y colaboradores² y Keitt⁹. Además, se ha determinado el nivel de glutatión reducido (GSH) usando el procedimiento de Kaplan y Dreyfus⁸ con ácido 5-5' ditiobis 2 nitrobenzoico.

Las concentraciones de ATP y 2,3-DPG se expresaron en nanomoles por ml de eritrocitos; los valores de GSH se dan en mg por 100 ml de hemáties.

Metabolismo oxido-reductor

Se han estudiado dos parámetros incluidos en el metabolismo redox: la metahemoglobin reductasa (F.C. 1.6.99.2) ligada al NADH, de acuerdo con Hegesh y colaboradores⁷ y la metahemoglobina, usando el método espectrofotométrico de Evelyn y Malloy³.

Se efectuaron determinaciones de rutina en todas las muestras de sangre.

RESULTADOS

Los resultados de las medidas enzimáticas se muestran en el cuadro 1.

CUADRO I
ACTIVIDAD DE ENZIMAS GLICOLITICAS EN LOS DOS GRUPOS EXPERIMENTADOS

ENZIMAS	PHM	HK	PHI	PFK	ALDO	TPI	GAPD	PGK	PGM	ENO	PK	LDH	G6PD	6PGD
Grupo europeo (Toulouse) n = 30	\bar{m} 0.176 SD 0.028	0.228 0.065	7.70 1.14	0.559 0.118	0.332 0.057	267.73 30.06	15.06 3.57	25.56 5.13	5.58 0.51	2.98 0.62	3.96 0.66	25.46 3.08	1.57 0.24	0.94 0.11
Grupo indios americanos (La Paz) n = 50	\bar{m} 0.316 SD 0.031	0.259 0.033	8.06 0.718	0.846 0.069	0.442 0.045	335.10 32.93	19.07 1.50	16.46 0.93	5.96 0.70	1.72 0.11	2.00 0.32	18.96 4.26	1.50 0.15	0.93 0.09
Análisis estadístico	p<0.001	p<0.01	NS	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	NS	NS

\bar{m} . valor medio: SD. desviación standard: NS, no significativa.

Las variaciones de ATP, 2,3-DPG, GSH, metahemoglobina y NADH metahemoglobin-reductasa (o NADH diaforasa) se incluyen en el Cuadro II.

CUADRO II
VARIACIONES DE LOS NIVELES DE ATP, 2,3-DPG, GSH, MetHb Y DE LA ACTIVIDAD DE LA NADH DIAPHORASA ENTRE LOS INDIOS AMERICANOS DE LAS GRANDES ALTURAS Y EUROPEOS A BAJA ALTITUD

	ATP (nanomol/ml RBC)	2,3-DPG (nanomol/ml RBC)	GSH (mg/100 ml RBC)	MetHb (%)	NADH diaforasa (UI/g Hb)
Grupo europeo (Toulouse) (n = 24)	\bar{m} 1.369 SD 165.66	(n = 21) \bar{m} 4.442 SD 487.80	(n = 52) \bar{m} 70.14 SD 6.22	(n = 79) \bar{m} 2.04 SD 0.89	(n = 82) \bar{m} 3 SD 1.10
Grupo indios americanos (La Paz) (n = 75)	(n = 75) \bar{m} 2.031 SD 251	(n = 75) \bar{m} 6.134 SD 319	(n = 75) \bar{m} 79.16 SD 7.49	(n = 75) \bar{m} 3.30 SD 1.25	(n = 50) \bar{m} 1.66 SD 0.53
	Altamente significat.	Altamente significat.	p<0.001	p<0.001	p<0.001

La evaluación estadística de los datos se realizó utilizando la prueba de distribución de Student.

DISCUSION

Los presentes resultados confirman dos hechos previamente mencionados. El contenido eritrocítico de ATP y 2,3-DPG aumenta significativamente en las grandes altitudes^{4,10}. Similarmente, los niveles de metahemoglobina y GSH están incrementados en la población que habita las alturas^{3,6}.

Pero queríamos subrayar algunos nuevos hallazgos, no descritos hasta ahora, los cuales abren, en nuestra opinión, interesantes perspectivas para futuras investigaciones sobre la fisiología eritrocitaria en un ambiente deficiente en oxígeno. Entre los indios americanos la actividad de NADH metahemoglobin-reductasa está marcadamente reducida ($p < 0.001$). Los valores observados no son significativamente diferentes de aquellos comunicados por Hegesh y colaboradores⁷ en los hematíes del recién nacido normal. Esta relativa deficiencia podría explicar parcialmente la mayor cantidad de metahemoglobina detectada en los hematíes de los indios americanos. En la cadena de utilización de la glucosa, algunos pasos enzimáticos muestran variaciones significativas. Las diferencias más destacadas aparecen en dos puntos de la secuencia de Embden-Meyerhof, a saber, el paso de la hexosa fosfato y de la triosa fosfato. Este comportamiento en estos dos puntos está claramente invertido en los indios americanos que viven en grandes alturas, por comparación con los europeos a baja altitud y realmente las actividades de HK a GAPD son más altas en los indios americanos (con excepción de PHI). Por el contrario, desde PGH a LDH las tasas enzimáticas están particularmente descendidas ($p < 0.001$). En el ciclo de las pentosas las dehidrogenasas (G6PD y 6PGD) no presentan diferencia alguna en ambos grupos.

Otros problemas se refieren a las fluctuaciones de las cuatro kinasas glicolíticas (HK, PFK, PGK y PK). Las reacciones catalizadas por esas enzimas son reguladas por las concentraciones intracelulares de 2,3-DPG y ATP¹². Estos dos fosfoderivados y su relación más alta, producen algunos efectos inhibitorios sobre las kinasas citadas arriba. Sin embargo, esta inhibición parece aquí limitada. Una explicación podría ser el menor aumento de la concentración de 2,3-DPG en comparación con el ATP. Tal desequilibrio en los compuestos orgánicos de fosfato compensaría parcialmente su acción sobre los pasos HK y PFK.

La influencia de la anemia sobre las tasas de enzimas glicolíticas eritrocitarias debe ser desechada. En efecto, todos los sujetos mostraban hematocrito y niveles de hemoglobina normales, así como normales recuentos de hematíes.

Hay pocos trabajos que se ocupan de los cambios totales de la cadena glicolítica en los eritrocitos humanos bajo condiciones de hipoxia. Debemos mencionar el trabajo de Mandelbaum y colaboradores¹¹ sobre las poblaciones africanas y europeas adaptadas a la altura (área de Kivu Lake en Zaire). Estudiando cuatro enzimas de la vía de la utilización de la glucosa (HK, PK, G6PD y 6PGD), los autores han notificado su aumento significativo entre los residentes de las alturas en comparación con los sujetos control del mismo grupo étnico que vivían al nivel del mar. En nuestros propios resultados sólo se ha detectado la activación de la actividad HK. Sin embargo, la altura en en ambos experimentos no es similar: de 1.500 a 2.000 m. para los individuos estudiados por los autores belgas y de 3.800 para nuestros sujetos.

Por último, la significación biológica del aumento del contenido de metahemoglobina en los hematíes de las personas que viven en la altura se ha discutido en otro lugar⁶. La ferrihemoglobina puede actuar en pacientes anémicos como un factor regulador en la cinética de la saturación de la hemoglobina, contrabalanceando los efectos de los esteres fosfóricos por desplazamiento de la curva de disociación hacia la izquierda.

CONCLUSION

La hipoxia crónica promueve dentro de los hematíes algunos mecanismos reguladores extremadamente complejos. Los datos obtenidos dan primeramente comprensión de los cambios metabólicos de los eritrocitos circulantes. La deficiencia de oxígeno induce procesos de modulación en la cadena glicolítica. Pero los ajustes bioquímicos de la adaptación celular a la hipoxia entre los nativos de las grandes alturas plantean todavía muchos problemas. Algunos de ellos son de naturaleza genética. Las duras condiciones ecológicas de las altas montañas han acarreado durante milenios una severa selección entre los nativos. Diferentes genes, responsables de trastornos innatos del metabolismo, tolerados en otros ambientes, han sido eliminados en las zonas de los Andes.

Este es especialmente el caso de las deficiencias enzimáticas de la glicolisis, las cuales están prácticamente ausentes entre los indios americanos¹¹. Teniendo en cuenta el papel fundamental de la utilización de la glucosa en las funciones de los hematíes, uno comprende fácilmente que tal suerte de desfavorables mutaciones habrían sufrido la influencia de presiones selectivas severas.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a Mr. H. Constans y Miss M.H. Barrau su valiosa asistencia técnica.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- CARTIER P., LEROUX J.P. Y MARCHAND J.C.: Techniques de dosage des enzymes glycolytiques tissulaires. *Ann. Biol. Clin.* 25: 109, 1967.
- 2.- CARTIER P., LEROUX J.P. Y TEMKINE H.: Techniques de dosage intermediaires de la glycolyse dans les tissus. *Ann. Biol. Clin.* 25, 792, 1967.
- 3.- DELRUE G., VISCHER A. Y BOUCKAERT J.P.: Modifications du taux du Glutathion sanguin durant le séjour a haute altitude. *C.r. Seanc. Soc. Biol.* 113:942. 1955.
- 4.- EATON J.W., BREWER G.J. y GROVER R.F.: Role of red cell 2-3 diphosphoglycerate in the adaptation of man to altitude. *J. Lab. Clin. Med.* 75: 603, 1969.
- 5.- EVELYN K.A. y MALLOY H.T.: Microdetermination of oxyhemoglobin methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *J. Biol. Chem.* 126: 655, 1938.
- 6.- GOURDIN D., VERGNES H. y GUTIERREZ N.: Methemoglobin in man living at high altitude. *Brit. J. Haemat.* 29: 243, 1975.
- 7.- HEGESH E., CALMANOVICI N. y AVRON M. New method for determining ferrihemoglobin reductase (NADH-methemoglobin reductase) in erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.* 72: 339, 1968.
- 8.- KAPLAN J.C. y DREYFUS J.C.: Dosage du Glutathion erythrocytaire par un disulfure aromatique nitré; l'acide 5'5' - dithiobis - (2-nitrobenzoique). *Bull. Soc. Chim. Biol.* 46: 775-1984.
- 9.- KEITT A.S.: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide linked analysis of 2-3 diphosphoglycerate acid: spectrophotometric and fluorometric procedures. *J. Lab. Clin. Med.* 77:470, 1971.
- 10.- LENFANT C., TORRANCE J.D. y FINCH C.A.: The regulation of hemoglobin affinity for oxygen in man. *Trans. Ass. Am. Physins.* 82, 121, 1969.
- 11.- MANDELBAUM J.M., FONDU P., HEYDER-BRUCKNER, CH., VAN STERITEGHUM A. y KABERAMUDIAY S., Erythrocyte enzymes and altitude. *Biomedicine* 77: 517, 1975.
- 12.- PONCE J., ROTH S., y HARKNESS D.R., Kinetic studies on the inhibition of glycolytic kinases of human erythrocytes by 2-3 diphosphoglyceric acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 63: 74, 1971.
- 13.- VERGNES H. y LARROUY G.. Les déficits en G6PD dans les populations des Andes Boliviennes. *Nouv. Revue Fr. Hemat.* 124, 1967.