

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

Jacques ARNAUD \*, Henri VERGNES \*\*, Dominique GOURDIN \*\*, Nancy GUTIERREZ \*



SNGRA. 23(6), 817-822, 1978  
Sangre

Arnaud, J.; Vergnes, H.; Gourdin, D.; Gutiérrez, N.

ENZIMAS ERITROCITARIOS Y CAMBIOS METABOLICOS EN EL HOMBRE HABITANTE EN LAS GRANDES ALTURAS. (*Erythrocyte enzymes and metabolic changes in man living at high altitude.*)

*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 PK and the 2,3-DPG, ATP and methaemoglobin rate among the subjects living permanently at high altitude (3800 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.*

Reprints: Centre d'Hématologie CNRS. CHU de Purpan 31052. Toulouse Cedex. France.

## 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 glicólisis 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.

\* Instituto Boliviano de Biología de Altura. La Paz, Bolivia. \*\* Centre d'Hématologie du CNRS. CHU de Purpan. Toulouse, Francia.

Este trabajo fue sufragado por el Centre National de la Recherche Scientifique (RCP núm. 293) y el Instituto Boliviano de Biología de Altura).

Recibido para publicación en 25 enero 1978.

## 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 sur de Francia, habitantes en Toulouse (212 m sobre el nivel del mar), donantes de sangre del Banco de Sangre Regional.

### *Enzimas glicolíticas*

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); fosfohexosaisomerasa (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); gliceraldehído 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<sup>1,5</sup>. 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 colaboradores<sup>2</sup> y KEITT<sup>3</sup>. Además, se ha determinado el nivel de glutatión reducido (GSH) usando el procedimiento de KAPLAN y DREYFUS<sup>4</sup> 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 hematíes.

### *Metabolismo oxido-reductor*

Se han estudiado dos parámetros incluidos en el metabolismo redox: la metahemoglobin reductasa (E.C.1.6.99.2) ligada al NADH, de acuerdo con HEGESH y colaboradores<sup>7</sup>, y la metahemoglobina, usando el método espectrofotométrico de EVELYN y MALLOY<sup>8</sup>.

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

## RESULTADOS

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

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

La evaluación estadística de los datos se realizó utilizando la prueba *t* 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<sup>4,10</sup>. Similarmente, los niveles de metahemoglobina y GSH están incrementados en la población que habita las alturas<sup>3,6</sup>.

CUADRO I  
ACTIVIDAD DE ENZIMAS GLICOLITICAS EN LOS DOS GRUPOS EXPERIMENTADOS

Enzimas	PFM	HK	PHI	PFK	Alido	TPI	GAPD	PGK	PGM	Ero	PK	LDH	G6PD	6PGD
Grupo europeo (Toulouse) n = 30	0.176 0.328	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 3.15	5.38 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	0.516 0.051	0.259 0.035	8.06 0.718	0.846 0.069	0.442 0.045	355.10 32.95	19.87 1.50	16.46 0.93	3.96 0.70	1.72 0.11	2.88 0.32	18.96 1.26	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

m̄, valor medio; SD, desviación standard; NS, no significativ.

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 diaphorasa (U/l/g Hb)
Grupo europeo (Toulouse) . . . . .	(n = 24) 1.369 165.66	(n = 21) 4.442 487.80	(n = 52) 70.14 6.22	(n = 79) 2.04 0.89	(n = 82) 3 1.10
Grupo indios americanos (La Paz) . . . . .	(n = 75) 2.031 251	(n = 75) 6.134 319	(n = 75) 79.16 7.49	(n = 75) 3.30 1.25	(n = 50) 1.68 0.55
	Altamente significat.	Altamente significat.	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001

Pero querríamos 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 meta-hemoglobina-reductasa está marcadamente reducida ( $p < 0,001$ ). Los valores observados no son significativamente diferentes de aquellos comunicados por HEGESTH y colaboradores<sup>7</sup> en los hematíes del recién nacido normal. Esta relativa deficiencia podría explicar parcialmente la mayor cantidad de meta-hemoglobina 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 PGK 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 ATP<sup>12</sup>. 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 hematócrito y niveles de hemoglobina normales, así como normales recuentos de hematíes.

Hav pocos trabajos que se ocupen de los cambios totales de la cadena glicolítica en los eritrocitos humanos bajo condiciones de hipoxia. Debemos mencionar el trabajo de MANDELBAUM y colaboradores<sup>11</sup> 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 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 meta-hemoglobina en los hematíes de las personas que viven en la altura se ha discutido en otro lugar<sup>6</sup>. 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 ésteres 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 glicólisis, las cuales están prácticamente ausentes entre los indios americanos<sup>11</sup>. 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.

## RESUMEN

Se presentan valores relativos al metabolismo glicolítico y oxidorreductor 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 glicólisis 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.

## REFERENCIAS

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 des intermédiaires de la glycolyse dans les tissus. *Ann. Biol. Clin.* 25: 791, 1967.
3. DELRUE, G.; VISCHER, A., y BOUCKAERT, J. P.: Modifications du taux du Glutathion sanguin durant le séjour à haute altitude. *C.r. Séanc. Soc. Biol.* 113: 942, 1933.
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.* 73: 603, 1969.
5. EVELYN, K. A., y MALLOY, H. T.: Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulf-hemoglobin in a single sample of blood. *J. Biol. Chem.* 126: 655, 1938.

6. GOURDIN, D.; VERGNES, H., y GUTIÉRREZ, N.: Methaemoglobin 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 érythrocytaire par un disulfure aromatique nitré: l'acide 5'5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque). *Bull. Soc. Chim. Biol.* 46: 775, 1964.
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. Physns.* 82: 121, 1969.
11. MANDELBAUM, I. M.; FONDU, P.; HEYDER-BRUCKNER, Ch.; VAN STEIRTEGHEM, A., y KABEYAMUDIAY, S.: Erythrocyte enzymes and altitude. *Biomedicine.* 11: 517, 1973.
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. Hémat.* 124, 1967.