

**ACTIVIDADES ENZIMATICAS GLICOLITICAS ERITROCITARIAS
EN EL HOMBRE DE LAS GRANDES ALTURAS (LA PAZ-3.600 m.)
COMPARACION CON LOS VALORES OBTENIDOS EN TIERRAS BAJAS
(TOULOUSE-250 m.)**

- ARNAUD Jacques
- GUTIERREZ Nancy
- EGUEZ Celia, VERGNES H.

Instituto Boliviano, de Biología de Altura
- Centro de Hemotipología de Toulouse (Francia)

En la altura el primer problema que se plantea al organismo, es el de una oxigenación conveniente de los tejidos. Fuera de los distintos mecanismos fisiológicos, se observa una serie de importantes transformaciones bioquímicas, que tienen un efecto mucho más específico y eficaz.

Siendo el transporte de los gases respiratorios la función principal del glóbulo rojo, nos hemos dedicado a estudiarlo. La hemoglobina, pigmento respiratorio eritrocitario, encarga de las tres funciones siguientes:

- Captación
- Transporte
- Distribución del oxígeno,

posee propiedades moleculares muy especiales, que le permiten llevar a cabo su actividad. Su estructura tetramérica y su cinética alostérica, le

permite captar el máximo de oxígeno frente a fuerte PO_2 , y de liberar el máximo frente a PO_2 débiles, o sea respectivamente en los pulmones y tejidos periféricos.

Pero en la altura la cantidad de oxígeno captada en los pulmones y la liberada en los tejidos, sería más débil si la afinidad de la hemoglobina al oxígeno no estuviese modificada: Este es justamente el papel desempeñado por dos moléculas importantes del glóbulo rojo:

El A.T.P.

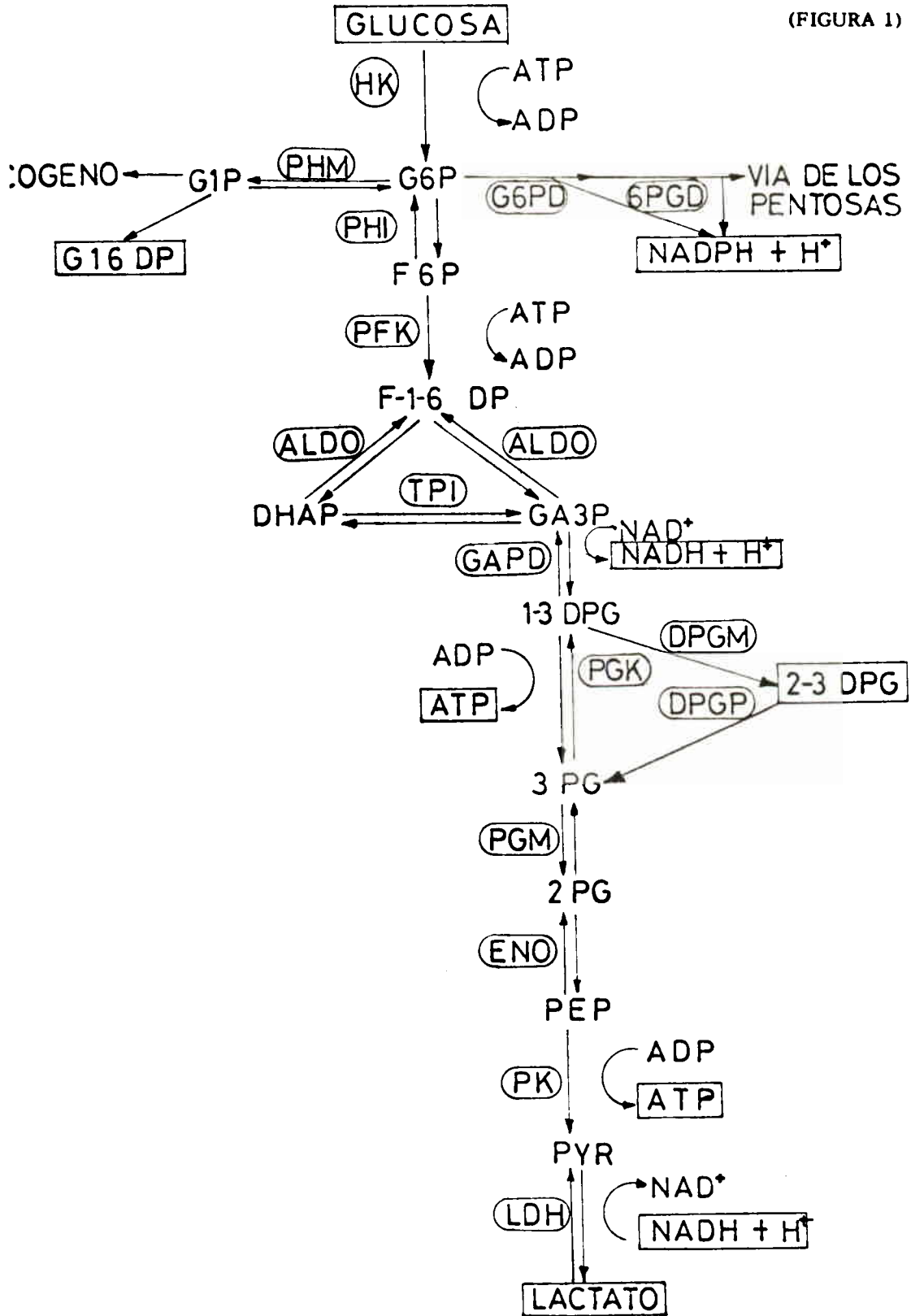
El 2-3-D.P.G.

No entraremos a detallar el mecanismo de acción de estos dos elementos, sino más bien su formación en el seno de la glicólisis anaeróbica y más especialmente en la actividad de las enzimas que actúan en dicha vía (fig. 1, 2, 3).



GLICOLISIS ANAEROBICA DEL GLOBULO ROJO

(FIGURA 1)



ENZIMAS DE LA GLICOLISIS: ABREVIACIONES

HK	Hexo-Kinase
PHI	Fosfo-Hexo-Isomerasa
PFK	Fosfo-Fructo-Kinasa
ALDO	Aldolasa
TPI	Triosa-Fosfo-Isomerasa
GAPD	Gliceraldehido-Fosfo-Deshidrogenasa
PGK	Fosfo-Glicerato-Kinasa
PGM	Fosfo-Glicerato-Mutasa
ENO	Enolasa
PK	Piruvato-Kinasa
LDH	Lactico-Deshidrogenasa
PHM	Fosfo-Hexo-Mutasa
DPGP	Di-Fosfo-Glicerato-Fosfatasa
DPGM	Di-Fosfo-Glicerato-Mutasa

METODO DE DOSIFICACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ERITROCITARIAS

1. a.- -) $AH_2 + \frac{NAD^+}{NADP^+} \xrightarrow{E.D.H.} A + \frac{NADH + H^+}{NADPH + H^+}$
 -) Medida del aumento de la densidad óptica a 340 nm.
- b.- -) $A + \frac{NADH + H^+}{NADPH + H^+} \xrightarrow{E.D.H.} AH_2 + \frac{NAD^+}{NADP^+}$
 -) Medida de la disminución de la densidad óptica a 340 nm.
2. a.- -) La enzima es una DESHIDROGENASA
 -) $PYR + NADH + H^+ \xrightarrow{L.D.H.} LACTATO + NAD^+$
- b.- -) La enzima no es una DESHIDROGENASA
 -) $GLUCOSA + ATP \xrightarrow{H.K.} G6P + ADP$
 -) $G6P + NADPH + H^+ \xrightarrow{G6PD} 6PG + NADP^+$

Se sabe desde hace varios años que las concentraciones eritrocitarias de éstos dos elementos, se hallan muy incrementadas en las grandes alturas. Hemos hecho estas dosificaciones, utilizando las mismas técnicas en los dos laboratorios de TOULOUSE y de LA PAZ, es decir:

- Para el A.T.P.: Extracción en P.C.A. (Acido Perclorico) y dosificación enzimática (CARTIER).
- Para el 2-3-D.P.G.: Extracción en P.C.A. y dosificación enzimática (KEIT).

Los valores obtenidos en LA PAZ para el A.T.P. y el 2-3-D.P.G. representan respectivamente 145 o/o y 130 o/o de los valores obtenidos en TOULOUSE. (fig. 4).

COMPARACION DE LOS VALORES ERITROCITARIOS DE 2-3D.P.G. (FIGURA 4)Y A T P DE BAJAS TIERRAS Y GRAN ALTURA

	VALORES HALLADOS EN TIERRAS BAJAS TOULOUSE 250m. En nM/mlGR.	VALORES HALLADOS EN GRAN ALTURA LA PAZ 3.600m. En nM/mlGR	RELACION DE LAS CONCENTRACIONES $\frac{\text{GRAN ALTURA}}{\text{TIERRAS BAJAS}}$ %
A.T.P.	1369	1986	145
2 3 D.P.G.	4770	6193	130

ABRIL - JUNIO - 1974

Para las dosificaciones de las actividades enzimáticas hemos tomado muestras de sangre venosa de individuos adultos normales (40 / Ht / 57), residentes por tres años ó más en las grandes alturas. 80 o/o de estos individuos son mestizos aymarás ó quechuas, 20 o/o son individuos de raza blanca. 30 o/o de los mismos son de sexo femenino.

Las muestras han sido tomadas sobre anticoagulantes A.C.D. (Acido citrico dextrosa); los glóbulos rojos son aislados, lavados en suero fisiológico, luego hemolisados por "Shock" hipotónico y termico. Sobre el hemolisado así obtenido, las enzimas son dosificadas a 25°C, a pH 7,60 con las concentraciones en substratos purificados y co-factores suficientes para obtener las

velocidades máximas de acción de las enzimas. Las reacciones son entonces, generalmente, del orden cero: $V = k$.

El principio de éstas dosificaciones está basado en las tres desahidrogenasas utilizando nucleótidos como co-factores, es decir:

La G.6.P.D. con N.A.D.P.⁺

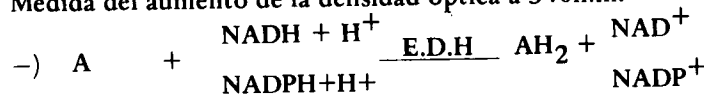
La G.A.P.D. con N.A.D.⁺

La L.D.H. con N.A.D.⁺

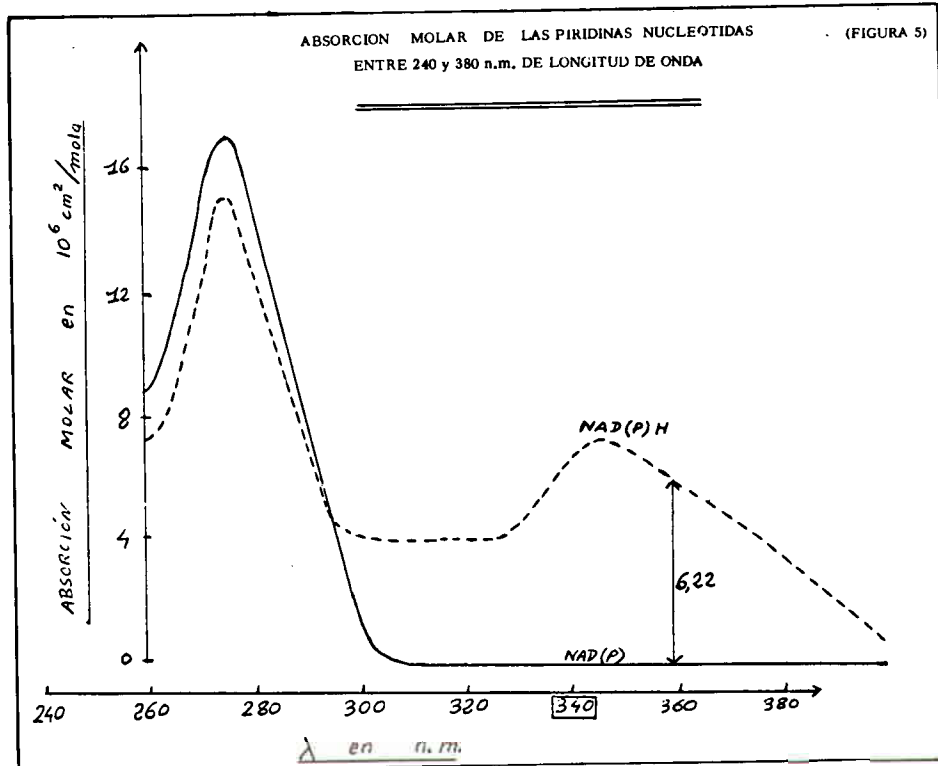
Las piridinas nucleotidas tienen un espectro de absorción diferente según sean estas reducidas ó no. (fig. 5). En este caso, el método de dosificación de las actividades enzimáticas eritrocitarias es el siguiente:



Medida del aumento de la densidad optica a 340n.m.



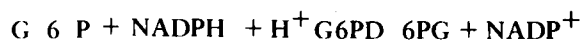
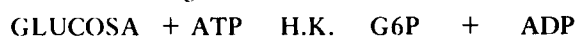
Medida de la disminución de la densidad optica a 340 n.m.



Cuando la enzima es una deshidrogenasa, la dosificación es directa:



Cuando la enzima no es una deshidrogenasa, a partir de la enzima a dosificar hasta la deshidrogenasa es necesario proveer todas las enzimas, los sustratos y co-factores en cantidades suficientes a fin de que estos no sean limitantes de la reacción general:



Los resultados obtenidos comportan pues 50 individuos normales y adultos. Han sido comparados con aquellos obtenidos en tierras bajas, en TOULOUSE (250 m), utilizando las

mismas técnicas de dosificaciones. Las actividades son expresadas en Unidad Internacional por ml. de glóbulo rojo, es decir que una U.I. representa la actividad enzimática que transforma un micromol de sustrato por minuto a 25°C.

Hemos establecido las relaciones de las actividades enzimáticas obtenidas en LA PAZ y en TOULOUSE y las hemos expresado en porcentajes.

No hemos observado, sin embargo ninguna variación marcada en función de la edad, del sexo, ó de la raza; solo la variación de altura parece ser un parámetro de variabilidad.

Constatamos pues que: (fig. 6)

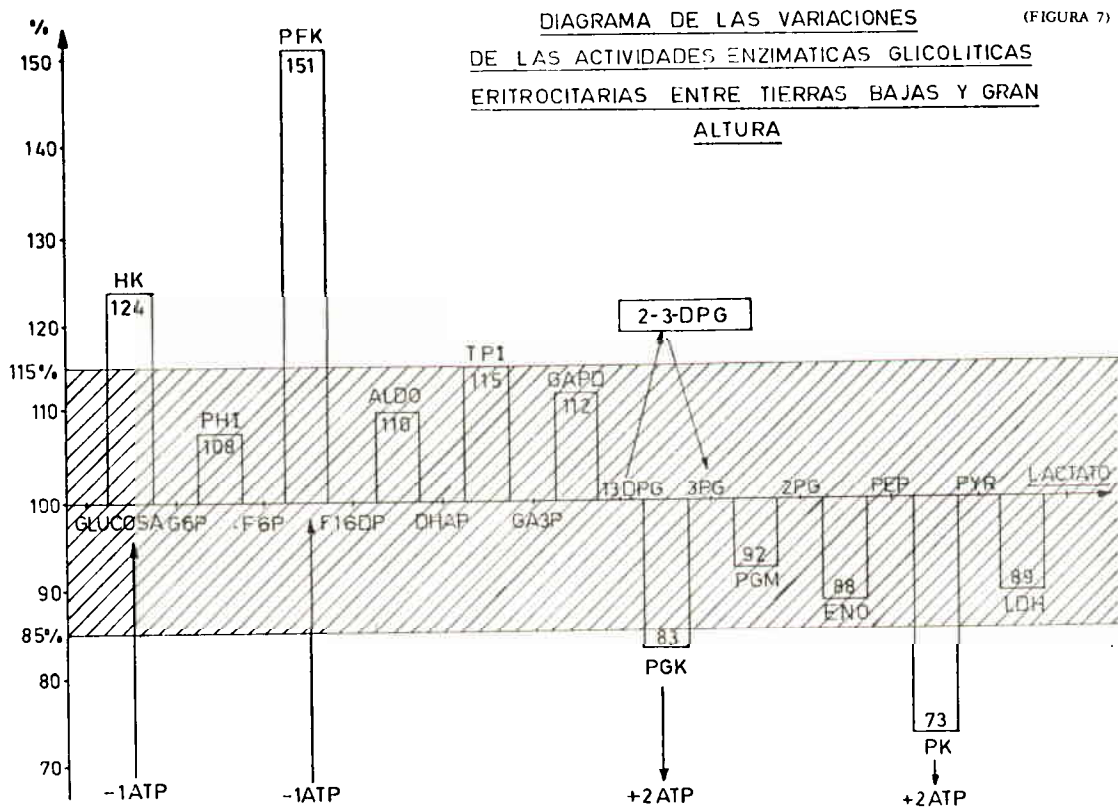
COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS GLICOLITICAS (FIGURA 6)
ERITROCITARIAS DE TIERRAS BAJAS Y GRAN ALTURA

ENZIMAS	ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN TIERRAS BAJAS TOULOUSE - 250 m.		ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN TIERRAS A GRAN ALTURA LA PAZ - 3 600 m.		RELACION DE LAS ACTIVIDADES EN ZIMATICAS GRAN ALTURA EN% TIERRAS BAJAS
	EN VI./mlGR	± DESVIACION STD.	EN VI./mlGR	± DESVIACION STD.	
P H M	0,296	0,086	0,316	0,032	107
H K	0,210	0,030	0,260	0,034	124
P H I	7,500	0,800	8,077	0,719	108
P F K	0,560	0,140	0,847	0,070	151
A L D O	0,400	0,090	0,439	0,070	110
T P I	290,121	51,981	334,981	33,393	115
G A P D	17,820	4,100	19,918	1,610	112
P G K	19,860	3,790	16,473	0,940	83
P G M	4,318	0,675	3,976	0,705	92
E N O	1,945	0,474	1,720	0,122	88
P K	3,960	0,342	2,894	0,328	73
L D H	21,276	4,272	18,994	1,261	89

- De la H.K. a la G.A.P.D. las actividades enzimáticas presentan todas, una tendencia al aumento.

- De la P.G.K. a la L.D.H. las actividades enzimáticas presentan todas una tendencia a la disminución.

De todas maneras, teniendo en cuenta (fig. 7) el coeficiente de error efectuado en las dosificaciones de enzimas, que es de más ó menos del 10 al 15 o/o, se ve resaltar específicamente 4 enzimas.



La H.K. y la P.F.K. que tienen una actividad marcadamente más fuerte y la P.G.K. y la P.K. que tienen una actividad marcadamente más débil.

Es interesante observar que:

- Las dos enzimas de actividad aumentada están situadas por encima del ciclo de Rapoport-Luebering.

- Las dos enzimas de actividad disminuida están situadas por debajo del ciclo de Rapoport-Luebering.

- La P.G.K. de actividad disminuida se halla dentro del ciclo de Rapoport-Luebering en un punto clave.

- Las 4 enzimas de actividades enzimáticas fuertemente perturbadas son kinasas que tienen todas una reacción directa con el nivel de A.T.P.

ENSAYO DE INTERPRETACION(fig. 8)

1.- La penetración de la glucosa en el glóbulo rojo está ligada a un fenómeno activo que necesi-

ta transportadores y sobre todo A.T.P. en la membrana. Este mecanismo es de una eficacia superior a una simple difusión, es decir que la cantidad de glucosa que puede entrar en el glóbulo rojo es superior a la utilizada por la glicolisis. Entonces la entrada de la glucosa en el glóbulo rojo, no es un factor limitante de la glicolisis.

2.- El lactato formado durante la glicolisis se difunde en el plasma en el cual la concentración permanece constante al estado normal, por el hecho de su utilización, por el tejido hepático. En la altura no se observa aumento en la concentración del lactato en la sangre. Luego la concentración del lactato sanguíneo no puede influenciar la actividad glicolítica.

3.- Se constata, por otra parte en la altura un consumo de glucosa incrementado.

Está ligado a la disminución de la oxigenación que por un pseudo efecto PASTEUR que actuaría sobre las propiedades particulares de la P.F.K., enzima alosterica, aumentaría la actividad Glicolítica anaeróbica.

La activación de la P.F.K. trae consigo una disminución de la concentración globular en F. 6P. Esto desplaza el equilibrio establecido por la P.H.I. a expensas del G.6P. Esto tiene como efecto disminuir la inhibición de éste último sobre la H.K. y por lo tanto de consumir glucosa.

4.- El aumento de la glicólisis anaeróbica del glo-
bulo rojo tiene por consecuencia el aumento de la relación (A.T.P.)/(A.D.P.)

Hemos observado que la concentración en A.T.P. estaba ampliamente incrementada (145 o/o). Esta relación es una de las más importantes en la regulación de la glicólisis y del ciclo de Rappoport-Luebering. Las necesidades energéticas del glo-
bulo rojo son limitadas y no necesitan de tal aumento.

5.- La importante relación (A.T.P.)/(A.D.P.) tiene numerosas consecuencias:

- La primera es una inhibición de dos kinasas catalizadoras de reacciones que produce A.T.P. Es decir la P.K. y la P.G.K. Estas inhibiciones tienen como consecuencia la desviación de la glicólisis por el ciclo de Rappoport-Luebering.

La inhibición de P.K. se traduce por una acumulación de 3 P.G. que es un co-factor de la D.P.G.M., y que inhibe la D.P.G.P.. De ésta manera, esto favorece la acumulación de 2-3-D.P.G.. Además la actividad fosfátásica es mucho más débil que la de la mutasa en el ciclo de 2-3-D.P.G.

- La segunda es una regulación de la actividad de la H.K. y sobre todo de la P.F.K.. Poseyendo esta última un sitio de regulación en su molécula, para el A.T.P.; cuando existen fuertes concentraciones la P.F.K. es inhibida.

- La tercera es una activación de las dos enzimas del ciclo de Rappoport-Luebering.

6.- El importante nivel en 2-3-D.P.G. que resulta de esta nueva glicólisis tiene numerosos efectos reguladores:

- Inhibición de la H.K. y de la P.F.K.
- Inhibición de la D.P.G.M.
- Activación de la P.G.M. que disminuye la concentración en 3.P.G. y que desinhibe la D.P.G.M.

7.- El balance de ésta regulación es por lo tanto:

- Un gran consumo de glucosa
- Una fuerte producción de A.T.P.
- Una fuerte producción de 2-3-D.P.G.

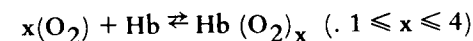
Un equilibrio en el que la mayoría de la glicólisis pasaría por el ciclo de Rappoport-Luebering, pues por ésta derivación, cada vez que una molécula de glucosa es quemada, no se forma ninguna molécula de A.T.P.

8.- Otro punto interesante del importante nivel en 2-3-D.P.G. es la inhibición de la A.M.P. DESAMINASA, lo que evita la destrucción del A.M.P. en el I.M.P. y mantiene elevado el "POOL" de las Adenidas Nucleótidas.

9.- Esta regulación de la glicólisis se establece toda vez que el consumo de la glucosa se halla perturbado.

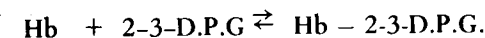
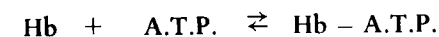
En la altura el indicador parece ser pues el oxígeno en cantidad disminuida. Una nueva actividad glicolítica se instala.

El equilibrio:



Se encuentra desplazado hacia el primero.

Esto favorece la formación de las asociaciones de la hemoglobina con el A.T.P. y el 2-3-D.P.G.



Estas asociaciones tienen como consecuencia una bajada del nivel de A.T.P. y 2-3-D.P.G. que evita las inhibiciones producidas en la H.K. y la P.F.K., aumentando por lo tanto la glicólisis.

Esta regulación así establecida en las condiciones de gran altura permite explicar los importantes niveles globulares en A.T.P. y en 2-3-D.P.G., pero posee un límite. Hemos efectuado las dosifi-

caciones tales que obtenemos las velocidades máximas, evitando de esta manera todos los fenómenos activadores así como inhibidores.

Hemos constatado que estas actividades enzimáticas se hallan modificadas y podemos proponer dos hipótesis que aún no han sido verificadas:

1o. Las modificaciones son concernientes a individuos que viven en la altura desde 3 años ó más; y que por lo tanto han tenido tiempo de renovar su población eritrocitaria en las nuevas condiciones.

Podemos suponer un efecto del osígeno sobre los sistemas reguladores de la biosíntesis proteínica y principalmente de éstas enzimas.

2o. En los métodos utilizados para efectuar las dosificaciones enzimáticas solamente un parámetro importante no ha sido controlado, siendo este diferente en tierras bajas y en altura: se trata de la PO₂.

Esta puede tener un efecto directo sobre las actividades enzimáticas y establecer su actividad re-

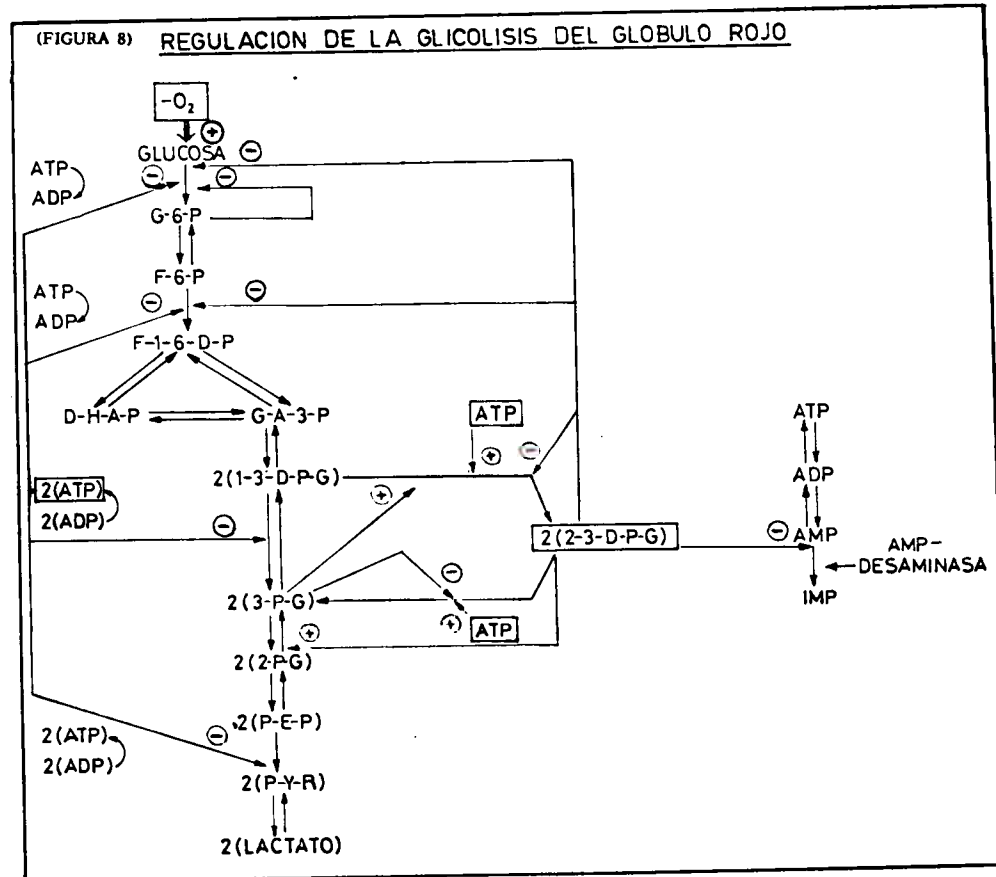
guladora en el propio seno de la cubeta de dosificación, sobre las enzimas.

El medio para eliminar ó confirmar una de éstas hipótesis sería estudiar algunos individuos que no hayan venido nunca a la altura, transplantados solo por algunas horas a las nuevas condiciones de oxigenación.

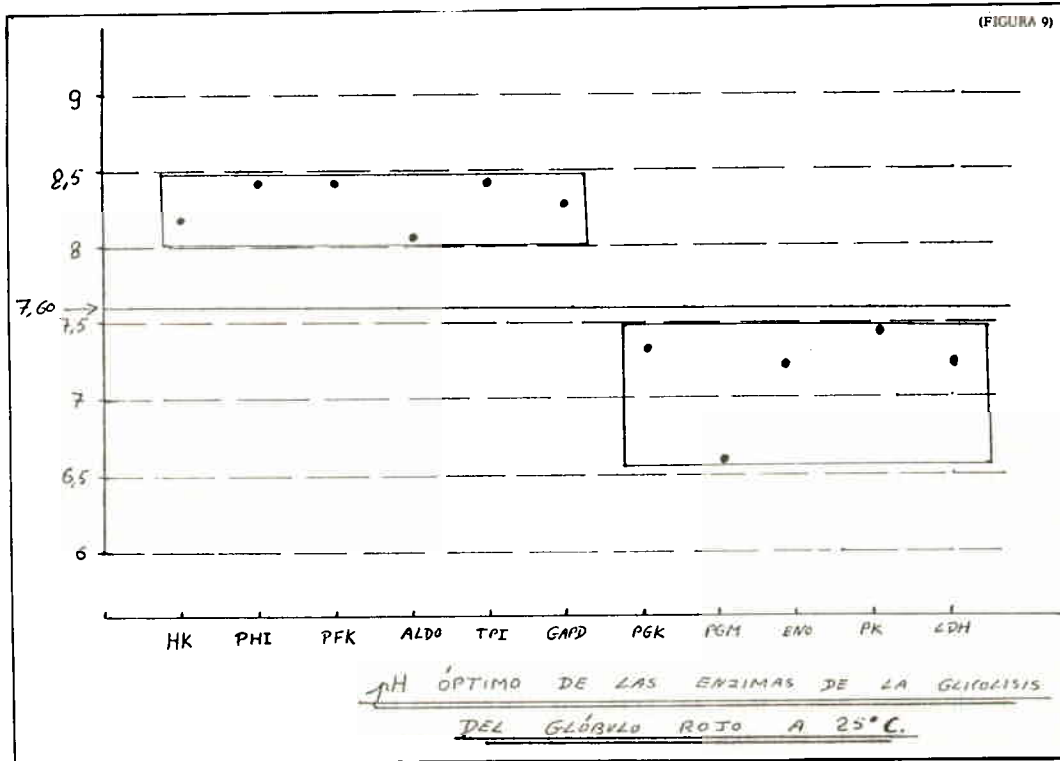
Si se observan variaciones idénticas, la primera hipótesis podría ser descartada.

Si no se observa ninguna variación, podría ser descartada la segunda hipótesis.

En el caso de éstas hipótesis, el efecto de la falta de oxígeno parecería ser una disminución de inhibición en todas las enzimas desde la H.K. hasta la G.A.P.D., con un máximo para la H.K. y sobre todo para la P.F.K.. En cambio el efecto sería contrario es decir una inhibición más fuerte para las enzimas de la P.G.K. hasta la L.D.H. con una máxima para la P.G.K. y para la P.K.



Se observa de ésta manera dos grupos tro: Los pH óptimos de actividades de la enzima ya fueron encontrados para un otro paráme- mas glicolíticas, (fig' 9).



Esta modificación en dos grupos ayuda así a los sistemas reguladores y explica de la mejor manera los altos niveles en A.T.P. y 2-3-D.P.G. La Primera parte de la glicólisis está así ayudada y el consumo de glucosa está incrementado. La segunda parte disminuída permite una mejor regulación y favorece el ciclo de Rappoport-Luebering y la formación de 2-3-D.P.G. Se puede ver pués, que en la altura el oxígeno está al origen de numerosas perturbaciones de la glicólisis anaeróbica eritrocitaria, en relación con la función respiratoria del glóbulo rojo:

- Actuando directamente sobre las actividades enzimáticas ó sobre la Biosíntesis de éstas enzimas.
- Actuando indirectamente, modificando las concentraciones globulares en A.T.P. y 2-3-D.P.G. que tiene como consecuencia trastornar todos los sistemas reguladores de la glicólisis anaeróbica.

BIBLIOGRAFIA

- J. ARNAUD. Fonction Respiratoire du Globule Rouge en Haute Altitude. (A Paraitre)
- J. BENTEGEAT, P. VERGER, C. de JOIGNY, M. BOISSEAU, F. ROULAUD. Variations Dans L'expression du deficit erythrocytaire en pyruvate kinase. Nouv. Rev Fr. D'hemat., Tomes 8, No. 6, Nov-Dec, 1968, 856/863.
- P. CARTIER. La Glycolyse du Globule Rouge Normal et Pathologique. Exposes Annuels de Biochimie Medicale 29 eme. serie - 1969 - 25/75.
- P. CARTIER, J.P. LEROUX, J. CL. MARCHAND. Techniques de Dosage des Enzymes Glycolytiques tissulaires. Ann. Biol. Clin. 1967, 25, 1-2, 109/136.

- P. CARTIER, J.P. LEROUX, H. TEMKINE, A. NAJMAN, R. ANDRE. Etude Biochimique de deux cas de Deficits Congenitaux en pyruvate Kinase. *Nouv. Rev. Fr. D'Hemat.*, Tome 8, No. 6, Nov-Dec, 1968 - 854/856.
- P. CARTIER, A. NAJMAN, J.P. LEROUX, H. TEMKINE. Les Anomalies de la Glycolyse au cours de L'Anemie Hemolytique par Deficit du Globule Rouge en Pyruvate - kinase. *Clin. Chim. Acta*, 22 - 1968 - 156/181.
- P. CARTIER, J.P. LEROUX. Les Enzymes des Erythrocytes. *Ann. Biol. Clin.* No. 3-4 1962 - 273/294.
- P. CARTIER, M. TEMKINE. Le 2-3 D.P.G. et le G.1-6-D.P. Du Globule Rouge: Techniques de Dosage. *Ann. Biol. Clin.* 1967, 25, 10-12 (1119 - 1128).
- P. CARTIER, D. LABIE, J.P. LEROUX, A. NAJMAN, F. DEMAUGERE. Deficit Familial en D.-Phosphoglycetate- Mutase: Etude Hematologique et Biochimique. *Nouv. Rev. Fr. D'Hemat.* 1972 - Tome 12 - No. 3 - 269/288.
- J. W. EATON, G.J. BREWER, R. F. GROVER. Role of cell 2-3-D.P.G. in the Adaptation of man to altitude. *J. Lab. Clin. Med.* April 1969 - Vol 73 - No. 4 603/609.
- A.S. KEIT. Reduced Nicotnamide Adenine Dinucleotide - Linked analysis of 2-3 Diphosphoglyceric Acid: Spectrophotometric and Fluorometric Procedures. *J. Lab. Clin. Med.* 1971. Laboratory methods - Vol 77 No. 3 470/475.
- J.P. LEROUX, A. NAJMAN. Biochimie et Physiologie Du 2-3-D.P.G. *Ann. Biol. Clin.* 1971-29 279/295.
- Y. MADEC, J.C. DUBIN, J. GUENEL, J. GUIBRETIERRE, S. BERNARD. Sur la signification diagnostique et pronostique des variations de Quelques activites enzymatiques erythrocytaires au cours de - divers syndromes anemiques. *Ann. Biol. Clin.* 1967, 25, 7-9 889/901.
- A. VAN STREIRTEGNEI, S. KABEYA MUNDIAY, E.M. MANDELBAUM, P. FONDU C.H. HEYDER BRUCHNER. Erythrocyte enzymes and altitude Biomedicine - Vol 19 - No. 12 10/10/1973-517/530.
- C.F. POYART, E. BURSAUX, A FREMINET. Courbe de Dissociation de L'oxyhemoglobine et Glycolyse erythrocytaire Le poumon et le coeur Tome XXVII No. 7 - 1971 - 655/662.
- L. VOYAN, A ORSINI. Activite Enzymatique intra - erythrocytaire. A L'Etat normal et pathologique. Le poumon et le coeur. Tome XXVII No. 7 - 1971 - 673/682.

