

El efecto de la altura en la actividad glicolítica en eritrocitos de nativos del altiplano andino

Jacques Arnaud - Nancy Gutierrez - Henri Vergnes

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

ABSTRACT

Glucose consumption by anaerobic glycolysis and the pentose pathway were studied in two Aymara populations living at different altitudes (3.600 m and 450 m.). The measurements were made both with and without methylene blue. We observed a effect for loth pathways which may explain the increase in 2-3 DPG and ATP levels found in blood samples from people living at high altitudes. The results in the presence of methylene blue showed a reduced activity of the methaemoglobin reductase system in the high altitudes group which may be partly responsible for their increased levels of methaemoglobin.

Altitude hypoxia. Native of the Andean Altiplano. Eritthrocyte metabolism, glycolytic activity.

RESUMEN

El consumo de glucosa por la glicólisis anaeróbica y la vía de las pentosas han sido estudiados en dos poblaciones aymaras que residen en diferentes alturas, (3.600 mts. y 450 mts.).

Las medidas se hicieron con y sin azul de metileno. Hemos observado el efecto Pasteur en ambas rutas lo que puede explicar el aumento en los niveles de 2-3 DPG y ATP encontrados en las muestras de sangre de individuos que viven en las alturas.

Los resultados en presencia del azul de metileno, muestran una actividad reducida del sistema reductasa-metahemoglobina en el grupo que vive en las alturas lo que en parte podría ser responsable de los niveles aumentados de la meta-hemoglobina.

Palabras Claves:

Hipoxia de altura
metabolismo del eritrocito

nativo del altiplano andino
actividad glicolítica

INTRODUCCION

En el metabolismo del eritrocito, la glucosa es la principal fuente de energía. Esta es principalmente metabolizada anaerómicamente por el ciclo de Embden-Meyerhof usualmente llamado glicólisis, el cual cede como primer producto el lactato. Aunque un pequeño porcentaje de glucosa es usado a través de Dicksens-Horecker desviado, o sea la vía de pentosa.

Este último trayecto puede ser estimulado por colorantes como el azul de metileno o el azul cresil.

En este trabajo, nosotros hemos estudiado el consumo de glucosa y producción de lactosa en eritrocitos incubados con o sin azul de metileno. El grupo estudiado, es una población de habla aymara, grupo que ha sido sujeto a numerosos estudios tanto antropológicos, como hemotipológicos.

Los aymaras viven principalmente en el altiplano Perú-Boliviano (Altiplanicies) que están a una altura de 4.000 mts. sobre el nivel del mar. Por más de 10 años el Instituto Boliviano de Colonización, ha estado trasladando a pequeños grupos de aymaras a zonas de 500 mt. sobre el nivel del mar. Nuestros sujetos

han sido escogidos de ambas poblaciones que viven en ambas alturas. Las muestras fueron:

- un grupo de 85 aymaras hombres adultos (edad = 22 ± 3 años), nativos del altiplano boliviano que residían en La Paz por lo menos un año (3.600 mts.)
- un grupo de 80 nativos de altura, (aymaras) hombres adultos (edad = 23 ± 7 años) trasladados a Yapacaní (norte de Santa Cruz, altura de 450 mts.) y que vivían en el lugar por lo menos 3 años.

METODOS

La actividad glicolítica se mide fácilmente con una mínima cantidad de equipo, el cual es de considerable importancia en el campo de trabajo. Sin embargo, la técnica necesita un control constante de varios factores como ser el pH y la temperatura que tiene influencia en la velocidad de la glicólisis. Nosotros hemos seguido la técnica descrita por Cartier (6).

La sangre venosa se extrajo por medio de un tubo al vacío (vacutainer) con heparina seca.

Después de eliminar los leucocitos, los eritrocitos fueron lavados con solución de Krebs-Ringer. El paquete de células rojas, fueron diluidas con igual cantidad de solución de Krebs-Ringer y su pH ajustado a 7.40.

Una primera fracción fué incubada bajo constante agitación por tres horas. La segunda fracción tratada de la misma manera pero en presencia de azul de metileno.

La glucosa y lactato de cada una de las fracciones se efectuó antes y después de la incubación, como también lo fué en la solución de Krebs-Ringer que servía como control. La glucosa se dosificó enzimáticamente: hexokinasa-glucosa-6- fosfato dehidrogenasa NADP/NADPH a 340 mm. El lactato también fué medido enzimáticamente: lactato dehidrogenasa NAD/NADH a 340 mm.

La incubación fué a 37°C de temperatura y el pH 7.40 que fueron mantenidos durante la incubación.

T A B L A I

VALORES HEMATOLOGICOS EN DOS POBLACIONES AYMARAS QUE VIVEN A 3.600m. Y 450m. DE ALTURA SOBRE EL NIVEL DEL MAR

		Ht en %	Hb en g/100ml	GLOBULOS ROJOS en 10 ⁶ /mm ³	RETICULOCITOS en % de glóbulos rojos
GRUPO A	n	85	85	85	85
	\bar{x}	51.75	18.23	5.74	1.27
La Paz 3.600 m	S.D.	2.93	1.09	0.33	0.43
GRUPO B	n	80	80	80	80
	\bar{x}	41.20	14.54	4.40	1.43
Santa Cruz 450 m.	S.D.	4.12	1.42	0.48	0.47
Análisis	P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	> 0.05
Estadístico		H.S.	H.S.	H.S.	N.S.

RESULTADOS

Los datos hematológicos están reunidos en la tabla N° 1. El consumo de glucosa y producción de lactato son expresados en moles por hora de incubación y por el ml de glóbulos rojos (Tabla II)

Los resultados han sido expresados de esta mane-

ra debido a las diferencias muy significativas en los valores hematológicos entre los dos grupos, debido a la altura, 10, 8, 1, 2.

En la tabla III, los efectos de altura en la actividad glicolítica con y sin azul de metileno demuestran como promedios.

T A B L A II
 CONSUMO DE GLUCOSA Y LACTATO PRODUCIDO EN LA GLICOLISIS DEL ERITROCITO
 (umol/hr/ml DE GLOBULOS ROJOS)

		Con Azul Metileno		Sin Azul Metileno	
		Consumo de Glucosa	Producción de Lactato	Consumo de Glucosa	Producción de Lactato
AYMARA	\bar{x}	1.943	3.501	4.019	5.416
La Paz		0.198	0.430	0.342	0.547
(3.600 m)	S.D.				
n = 85					
AYMARA	\bar{x}	1.469	2.650	3.812	3.904
YAPACANI		0.244	0.466	0.279	0.274
(450 m)	S.D.				
n = 80					
Análisis		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Estadístico	p	H.S.	H.S.	H.S.	H.S.

DISCUSION

Los dos grupos aymaras son comparables en edad, sexo y origen geográfico. Nosotros hemos observado una diferencia altamente significativa en el número de eritrocitos, en el hematocrito y en la hemoglobina dependiendo en la altura como se muestra en la tabla I. No se observan reticulocitos en ninguna de las alturas.

En nuestro experimento, la glicólisis fué estudiada bajo condiciones fisiológicas normales y en presencia del azul de metileno, el cual estimula el sistema accesorio de reducción en los eritrocitos (NADPH2 metahemoglobina-reductasa). Los resultados sugieren los siguientes comentarios:

- a) Actividad glicolítica bajo condiciones normales: Bajo condiciones normales el consumo de glucosa total fué significativamente aumentado en la altura (Tabla II).

$$\frac{\text{consumo de glucosa a altitud alta}}{\text{consumo de glucosa a altitud baja}} = 1.32$$

Esto corresponde a lo que se ha venido llamando el "efecto pseudo Pasteur" debido a los varios parámetros que intervienen, los cuales son modificados por la disminución de PO2

glicolisis anaeróbico trayecto de pentosa fué de 9 (Fig. I) para

ambos grupos, lo que nos conduce a las hipótesis:

- Ya sea que la hipoxia actúa de manera idéntica e independiente en cada una de las vías.
- Que únicamente actué en el estado enzimático inmediatamente antes de dividirse las dos vías, por ejemplo: antes de G6P.

Cartier (6) al reportar los trabajos de Aisemberg y Potter, menciona una acción inhibitoria del oxígeno a nivel de hexokinasa. La altura podría reducir esta inhibición. Esto estaría de acuerdo con la segunda hipótesis particularmente tal como hemos mostrado que la actividad de hexokinasa está aumentada con la altura.

Murphy (11) ha mostrado una relación entre una actividad reducida del trayecto de la pentosa y una reducción en la concentración de oxígeno.

El aumento de la actividad glicolítica extiende y confirma nuestras observaciones de las actividades enzimáticas en la glicólisis anaeróbica y ésto podría explicar el nivel alto de 2-3 DPG y de ATP en los eritrocitos de las poblaciones que viven a altas alturas. La actividad glicolítica aumentada es responsable por el aumento en el promedio ATP/ADP, lo cual induce a una acumulación de 2-3 DPG lo que también es favorecida por la baja actividad del PK en altitud baja.

- b) Actividad glicolítica en presencia del azul de metileno, los resultados se muestran en la tabla I. El consumo total de glucosa fué significativamente aumentando en presencia del azul de metileno (2.07 unidades en nivel alto y de 2.59 en nivel bajo. Tabla III).

T A B L A III

CONSUMO DE LA GLUCOSA POR AMBAS VIAS,
CON Y SIN AZUL METILENO, A ELEVADA Y BAJA ALTURA

		CONSUMO TOTAL DE GLUCOSA u mol/hr/ml RBC	CONSUMO DE GLUCOSA EN GLI- COLISIS ANAERO- BICA u mol/hr/ml RBC	CONSUMO DE LA GLUCOSA DE LA VIA PENTOSA u mol/hr/ml RBC
AYMARA	Sin azul de metileno	1.943 ± 0.198	1.751 ± 0.215	0.192 ± 0.026
LA PAZ	Con azul de metileno	4.019 ± 0.342	2.708 ± 0.274	1.311 ± 0.192
3.600 m.				
Con azul de metileno		"2.07"	"1.55"	"6.83"
Sin azul de metileno				
AYMARA	Sin azul de metileno	1.469 ± 0.244	1.325 ± 0.233	0.144 ± 0.022
YAPACANI	Con azul de metileno	3.812 ± 0.279	1.952 ± 0.137	1.860 ± 0.184
450 m				
Con azul de metileno		"2.59"	"1.47"	"12.92"
Sin azul de metileno				
Radio:				
LA PAZ	Sin azul de metileno	"1.32"	"1.32"	"1.33"
YAPACANI	Con azul de metileno	"1.05"	"1.39"	"0.70"

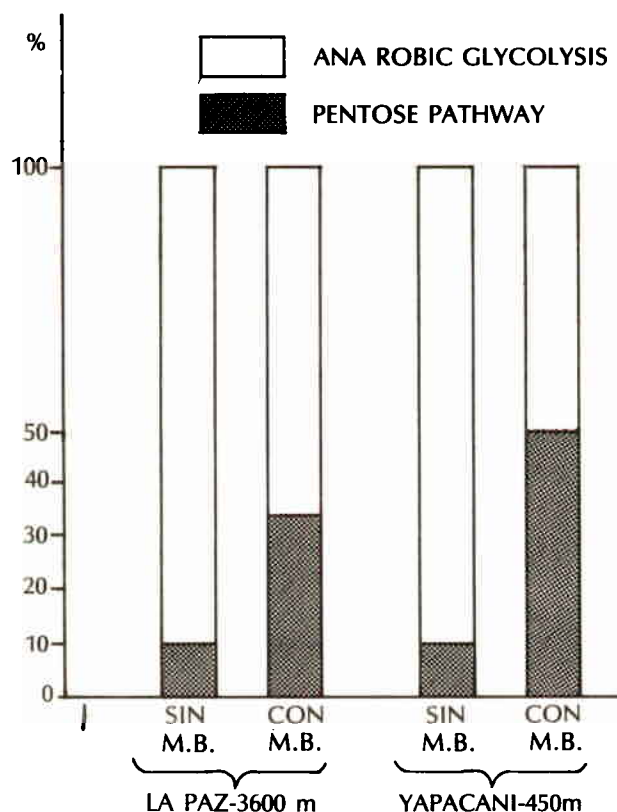
El promedio de consumo total de glucosa en nivel alto con la del grupo de nivel bajo fué de 1.32 sin azul de metileno; asimismo hemos observado que este promedio es de 1.05 en presencia del azul de metileno. Este resultado nos muestra que la acción del azul de metileno es mucho más efectiva en el nivel bajo; donde la concentración de oxígeno podría ser factor determinante: el consumo de glucosa en la glicólisis anaeróbica también está aumentada en la presencia del azul de metileno. El resultado o valor más alto ha sido observado en el nivel alto (1.55) comparada con aquella de nivel bajo de (1.47). Estos resultados sugieren una acción reducida de azul de metileno en la glicólisis anaeróbica en altitud baja, debida tal vez a la presencia de oxígeno. Es así que el promedio de consumo de glucosa a través de la glicólisis, entre altitudes alta y baja con azul de metileno, es de 1.39. A pesar de que el aumento de glucosa a través de la glicólisis anaeróbica en sí ya no presenta el 90 % del consumo total siendo ésta solo de 67.4% en el grupo del nivel alto y de 51.2% en el baja. Fig. 1.

Esto nos muestra que la glicólisis anaeróbica es afectada por el azul de metileno. Es así que este último tiene un efecto activador en las enzimas que requieren NADH₂ y particularmente de NADH₂ reductasa de metahemoglobina.

El trayecto de la pentosa es más sensible a la acción del azul de metileno el que utiliza 32.6% de la glucosa consumida en altitud alta y de 48.8% en altitud baja. La activación del proyecto de pentosa es mayor en altitud baja como lo indican los promedios de 12.92 y de 6.83, respectivamente. El nivel alto tiene un efecto estimulante en la ausencia de azul de metileno, (el promedio de consumo de glucosa entre altitud alta y baja es de = 1.33), pero esta acción es débil comparada en presencia del azul de metileno, cuyo promedio es de 0.70.

Un efecto activante del azul de metileno sobre enzimas que usan NADPH₂ ha sido reportado. Este está, sin embargo, bastante disminuído en el grado de hipoxia encontrado en los eritrocitos de altitud alta.

El azul de metileno pone en acción el sistema accesorio de reducción de metahemoglobina; NADPH₂ reductasa de metahemoglobina. La enzima azul de metileno complejo activo es inhibido en altitud alta (3.600 mts.) por hipoxia mencionada por el promedio $12.92/6.83 = 1.89$. Nosotros ya hemos reportado una actividad de este complejo en altitud alta y este actual estudio confirma nuestros resultados previos.



CONCLUSION

Nuestras primeras observaciones en los niveles de ATP, 2-3 DPG y metahemoglobina, como también la actividad enzimática en la energía y la reducción de trayectos (4), sugieren una alteración completa en el metabolismo del eritrocito en altitud alta. Este estudio confirma aquellos resultados. El nivel bajo de PO₂ en altitud alta, conduce a cambios bioquímicos y biofísicos en los eritrocitos.

Estas alteraciones son seguidas por un consumo de glucosa aumentada, como muestran nuestros resultados en actividad glicolítica bajo condiciones normales. Esto también fue indicado en nuestros resultados previos de actividad aumentada en aquellas enzimas como HK y PKF con un consecuente aumento en el nivel de ATP por la vía de la regulación glicolítica como también la reducida actividad de PK y de PGK.

Consecuentemente, la hiperactividad glicolítica observada en altitud alta es responsable de la acumulación de ATP y de 2-3 DPG.

Esta última molécula es un regulador bien establecido de la afinidad de la hemoglobina en el oxígeno.

Los colorantes como el azul de metileno, han sido ampliamente usados en el estudio de la glicólisis debido a su acción en ambos el NADE y el NADPH₂ reductasa de metahemoglobina. La activación del trayecto de la pentosa por azul de metileno es regulada

por el promedio NADP/NADPH₂ el cual depende de la actividad de NADH reductora de metahemoglobina. Nosotros hemos reportado previamente de la actividad reducida de estas enzimas de altitud alta. Esto puede explicar la influencia reducida del azul de metileno en el trayecto de la pentosa en altura (2). El cambio de consumo de glucosa por la vía de pentosas en la altura, es un reflejo de la actividad de NADPH reductora de metahemoglobina, ya que las actividades de G6PD y 6 PGD quedan sin cambio y la actividad de reductasa glutatone es aumentada en la altura.

Más aún, nuestros resultados indican una influencia de azul de metileno en la glicólisis anaeróbica, lo cual no ha sido reportado hasta la fecha. Puede ser que actúe en NADH reductasa de hemoglobina. La reoxidación de NADPH por este colorante, puede ser que active la glicólisis en el nivel de GAPDH.

Así pues, NADH reductasa de metahemoglobina puede jugar un rol complejo en la regulación de los promedios de metahemoglobina y en el control de desaturación de oxígeno de la hemoglobina. Este transcurso de actividad puede también ser mayor en el eritrocito de la gente que vive en la altura.

RESUMEN

En este trabajo se miden los consumos de glucosa mediante la glicólisis y la vía de las pentosas. La prueba se verifica con o sin azul de metileno en unas muestras de sangre sacadas de dos poblaciones aymaras residentes en dos alturas diferentes 3.600 m. y 450 m.

Este estudio permite contar un efecto Pasteur en las dos vías, lo que contribuye el aumento de las concentraciones en 2-3 DPG y ATP en altitud. Las medidas hechas en presencia del azul de metileno comprueban la disminución de actividad de los sistemas metahemoglobina reductasa accesorios en altitud que puede contribuir en parte el aumento de la tasa de metahemoglobina.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestra gratitud a las FF.AA. por su amable contribución y en particular al Regimiento Rangers de Montero, al Regimiento de la Fuerza Aérea y de la Naval de La Paz, a los diferentes oficiales y al personal médico.

Este estudio fue financiado por el Centro National de la Recherche Scientifique (RCP 293, ATP 1317).

LISTA DE ABREVIACIONES

2-3 DPG	=	2-3 di fosfo glicerato
A.T.P.	=	Adenosina tri fosfato
NADPH ₂	=	Nicotinamida Adenina, Dinucleotido Fosfato, forma reducida.
PO ₂	=	Presión parcial de oxígeno
G6P	=	Glucosa 6 fosfato
HK	=	Hexokinasa

NADP	= Nicotinamida adenina denucleótido fosfato en forma oxidada.	H.S.	= Altamente significativo
PK	= Piruvato Kinasa	N.S.	= No significativo
PGK	= Fosfato glicerato Kinasa	A D P	= Adenosina de fosfato
R.B.C.	= Glóbulos rojos	PFK	= Fosfato-fructo-kinasa
W.C.	= Sangre total	GADPH	= Gliceraldehido - 3 - fosfato deshidrogenasa
M.B.	= Azul de Metileno		

BIBLIOGRAFIA

1. - ARNAUD J. Fonction respiratoire du globule rouge humain en haute altitude. Anthropobiologie moléculaire de l'adaptation a la haute altitude. These de Doctoral d'Etat de Sciences N° 881. Toulouse, France, 1979.
2. - ARNAUD J., J.C. QUILICI G. RIVIERE High altitude haemotology. Quichua-aymara comparisons, Ann. Hum. Biol. 573-578, 1981.
3. - ARNAUD J., J.C. QUILICI, VERGNES N., N. GUTIERREZ, J. BEARD. Methaemoglobin and erythrocyte reducing systems in high altitude natives. Ann. Hum. Biol. 6: 585-592, 1979.
4. - ARNAUD J., H. VERGNES., N. GUTIERREZ. Fonction respiratoire et metabolismes erythrocytaires en haute altitude. In Anthropologie des Populations andines INSERM 63: 505-522, 1976.
5. - ARNAUD J., H. VERGNES, N. GUTIERREZ. Función respiratoria en el glóbulo rojo en la altura. Sangre, 22: 219-224, 1977.
6. - CARTIER P. La glycolyse du globule rouge normal et pathologique Exposé a Biochim, méd. 29: 25-75, 1969.
7. - CARTIER P., J.P. LEROUX H. TEMKINE. Techniques de dosage des intermédiaires de la glucolyse dans les tissus. Annal. Biol. clin., 25: 791-813- 1967.