

302827



**UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.** 13

ESCUELA DE QUIMICA 29

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

***MECANISMO DE ACCION DE LA GLUCOSA QUE  
EXPLICA PARCIALMENTE EL INCREMENTO EN  
LA ACTIVIDAD ALCALINA DE LA NADGLICOHI-  
DROLASA EN LA MEMBRANA DEL ERITROCITO  
HUMANO***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

**CARMEN HERNANDEZ NARVAEZ**

**FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1995



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Le doy gracias a Dios por todo lo que me ha dado, en especial por haberme permitido terminar este trabajo.

A mis padres por ser un gran ejemplo de honestidad y perseverancia.

A mi hermano gracias por ser un ejemplo de superación.

A mis hermanas por su gran cariño.

A la Madre Rosario C. superiora provincial, gracias por su paciencia y apoyo.

A la Masre Guadalupe Velazques superiora de mi comunidad, gracias por su confianza y apoyo que me ha brindado en todo momento.

Al Doctor Edmundo Calva gracias por la acertada dirección de este trabajo y por toda la ayuda que me ha brindado.

A la Doctora Rosario Núñez gracias por su gran ayuda en la elaboración de este trabajo.

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Edmundo Calva y de la Dra. Rosario Núñez.**

## INDICE

## Capítulo I

## 1. INTRODUCCION

1.1	Planteamiento del problema	1
1.2	Objetivo	2
1.3	Hipótesis	2

## Capítulo II

## 2. ANTECEDENTES

2.1	Enzima NADasa	3
2.2	Transporte de glucosa	5
2.3	Inhibidores de la glucólisis, del transporte de la glucosa y de la actividad NAD glicohidrolasa	7
2.1.1	Estructuras químicas de los inhibidores	12
2.3.2	Glucólisis	13

## Capítulo III

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1	Diagramas	14
3.1.1	Diagrama general	14
3.1.2	Eritrocitos tratados con fluoruro de sodio	15
3.1.3	Eritrocitos tratados con citocalasina B	16
3.1.4	Eritrocitos tratados con floretina	17

3.2	Material, Equipo y Reactivos	18
3.2.1	Material biológico	18
3.2.2	Material de laboratorio	18
3.2.3	Equipo	19
3.2.4	Reactivos	20
3.3	Metodología	21
3.3.1	Obtención de la sangre	21
3.3.2	Separación de eritrocitos y de plasma	21
3.3.3	Lavado de los eritrocitos	21
3.3.4	Preparación de un extracto ácido libre de proteínas para determinar glucosa en los eritrocitos	22
3.3.5	Determinación de la concentración de glucosa por el método enzimático con hexocinasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	22
3.3.6	Obtención del plasma libre de células sanguíneas	24
3.3.7	Purificación del plasma por calentamiento	25
3.3.8	Ensayo de la actividad NADasa	25
3.3.9	Incubación para el ensayo de la actividad NADasa de los eritrocitos resuspendidos en las distintas soluciones	25
3.3.10	Medición del hematocrito	26
3.3.11	Medición del NAD por el método de la deshidrogenasa alcohólica	27
3.3.12	Medición del NAD	27

## Capítulo IV

### **4. RESULTADOS Y DISCUSION**

4.1	Resultados	29
4.2	Discusión	59

## Capitulo V

5.	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>66</b>
	<b>APENDICE</b>	<b>70</b>

# CAPITULO I



## INTRODUCCION

### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enzima NAD glicohidrolasa (NADasa) se encuentra en la membrana del eritrocito humano, con su sitio activo orientado hacia el exterior; lo cual explica porque la enzima cataliza solamente la hidrólisis del NAD (dinucleótido de nicotinamida y adenina) del medio en que se encuentren los eritrocitos y no la del NAD contenido dentro de ellos.

Además la membrana del eritrocito no es permeable al NAD que es el sustrato de esta glicohidrolasa; por lo que, cuando se agrega NAD al medio de incubación, este sustrato exógeno llega directamente al sitio activo de la enzima sin mediar el paso a través de membrana alguna. Quizá ocurra lo mismo con los compuestos que activan o inhiben a esta enzima; excepto el caso de la nicotinamida que es un inhibidor que sí atraviesa la membrana del eritrocito.

La actividad de la enzima NADasa aumenta en un medio alcalino (pH 7.9) cuando los glóbulos rojos son resuspendidos en plasma o en solución de D-glucosa; pero no cuando se incuban resuspendidos en solución isotónica de fosfatos. Y en ninguna de estas condiciones cuando la incubación se hace en un medio ácido (pH 6.5). De todos los azúcares y algunos de sus derivados que se ensayaron, únicamente la D-glucosa y la D-fructosa, a concentración milimolar semejante, incrementaron la actividad alcalina de la NADasa de los eritrocitos humanos; sin embargo, la D-fructosa sólo la incrementó en un 50 % con respecto a la D-glucosa. Por otra parte, la L-glucosa, que es un enantiómero de la D-glucosa, no modificó la actividad de esta enzima.

En vista de que la D-glucosa aumenta la actividad de la NADasa de los eritrocitos lavados, conviene investigar los mecanismos a través de los cuales la glucosa ejerce esta acción.

## 1.2 OBJETIVO

Determinar a través de cuál de los siguientes mecanismos hipotéticos la D-glucosa incrementa la actividad de la NADasa alcalina de la membrana de los eritrocitos humanos.

## 1.3 HIPOTESIS

a) Si la D-glucosa actuara directamente sobre la enzima, es posible que se una a la porción externa de la molécula de la NADasa cuando esta proteína tenga la conformación determinada por el medio alcalino. Y ya unida la glucosa a la enzima se favorezca la acción catalítica sobre el NAD, por algún nuevo cambio conformacional.

b) Si la D-glucosa actuara indirectamente sobre la molécula NADasa, podría hacerlo a través de la proteína transportadora de la D-glucosa. El cambio conformacional de esta última proteína en el momento de transportar al azúcar al interior del eritrocito pudiera modificar, en alguna forma, a la conformación de la enzima determinada por el medio alcalino, tomando en cuenta que ambas proteínas son membranales.

c) Si la D-glucosa necesitara penetrar al interior del eritrocito para incrementar la actividad NADasa, la molécula de este azúcar, o la de alguno de sus metabolitos formados en la vía glucolítica o en la de las pentosas, pudiera ser la que actuara sobre la proteína NADasa, no directamente sino quizá a través de algún componente membranal.

# **CAPITULO**

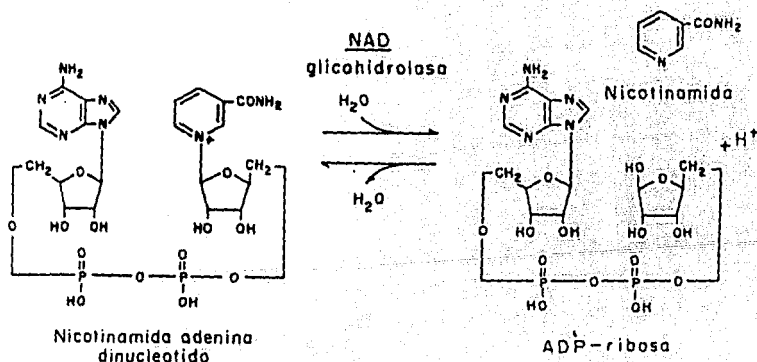
## **II**

## ANTECEDENTES

### 2.1 ENZIMA NADasa

La NAD glicohidrolasa o NAD nucleosidasa (EC 3.2.2.5) cataliza la ruptura de la molécula del dinucleótido de nicotinamida y adenina. Al ocurrir la hidrólisis del enlace  $\beta$ -N-glicosídico, que une el átomo de nitrógeno cuaternario de la nicotinamida con el átomo de carbono en la posición 1' de la ribosa, se liberan, una molécula de nicotinamida, una de ADP-ribosa y un protón. Virtualmente, esta enzima funciona no sólo como hidrolasa sino también como transglicosidasa, en cuyo caso cataliza la formación de NAD a partir de ADP-ribosa y de nicotinamida o la síntesis de dinucleótidos análogos al NAD o sea con una base pirimidinica diferente a la nicotinamida (17, 19 y 24).

### HIDROLISIS DEL NAD



Alivisatos y Denstedt observaron que el NAD agregado a una suspensión de glóbulos rojos lavados de sangre humana o a la preparación obtenida al hemolizar estos glóbulos rojos, era destruido catalíticamente; que esta actividad enzimática se encuentra en la membrana del eritrocito; que su sitio activo está orientado hacia la superficie externa de dicha membrana y que la inhibición producida por la nicotinamida es de tipo competitivo y casi resulta total a la concentración 10 mM del inhibidor (2).

Las enzimas NAD glicohidrolasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza; han sido encontradas en algunos microorganismos, en plantas superiores, en tejidos de mamíferos y en el veneno de serpientes (24).

Las NAD glicohidrolasas son poco conocidas desde el punto de vista de sus mecanismos de acción, sus mecanismos de regulación y su función bioquímica (27).

Alivisatos, Kashket y Denstedt establecieron que la actividad específica, expresada como el número de micromoles de NAD hidrolizado por hora y por miligramo de residuo seco o de proteína, era igual en la sangre completa que en la suspensión de eritrocitos lavados tres o cuatro veces. Por otra parte, comprobaron que la hemólisis de la sangre total o de los glóbulos rojos lavados, no altera la actividad NADasa con respecto a la preparación original correspondiente. También demostraron que la enzima está fuertemente ligada a la membrana, ya que lavando la preparación de membranas hasta tres veces, su contenido de NADasa no se modificó (3).

Ng, Donell y Bergren encontraron que los hemolizados preparados de eritrocitos lavados obtenidos de la sangre de un grupo de personas adultas afroamericanas, no manifestaron actividad NADasa en el 9% de la población analizada; en el 28% fue menor que en la de un grupo semejante de adultos euroamericanos y sólo en el restante 63% se hallaron valores comparables a los de este último grupo. Concluyeron que esta deficiencia puede ser determinada genéticamente y que la transmisión de este carácter es autosómica (23).

Kaplan y Colowick propusieron que la ruptura del enlace ribosa-nicotinamida del NAD, provocado por la nucleotidasa, resulta en la liberación de un protón, además de la nicotinamida; lo que indica que el N del anillo piridínico está en forma cuaternaria. Este mismo grupo aisló el compuesto adenosina difosfato ribosa (ADP-ribosa) de las mezclas de reacción en que ocurría la hidrólisis enzimática del NAD; con lo cual completaron los compuestos químicos participantes en esta reacción (15).

Los eritrocitos que después de ser lavados se someten a hemólisis, aunque conservan la actividad NADasa, no responden a la presencia de glucosa en el medio a pH alcalino (29).

## 2.2 TRANSPORTE DE GLUCOSA

La D-glucosa es transportada por difusión facilitada a través de una proteína integrada en la membrana plasmática.

Este sistema de transporte se caracteriza por su alto grado de especificidad química, por ser saturable, por ser inhibible, por la competencia de unión que se observa con distintos azúcares y porque la velocidad y dirección del flujo depende de la cuantía y del sentido del gradiente de concentración (9).

En los eritrocitos *in vitro*, la D-glucosa se mueve hacia adentro o hacia afuera de la célula, dependiendo de la dirección en que se haya establecido experimentalmente el gradiente de concentración; lo que demuestra la reversibilidad del sistema. A medida que la concentración de D-glucosa que será translocada aumenta, la velocidad de transporte aumenta y alcanza un máximo cuando la glucosa satura el transportador (9).

Los eritrocitos de la sangre humana y los de otros primates son muy permeables a la glucosa; mientras que los de otras especies son casi impermeables (bovinos, cerdos, conejos, cobayos, caballos, camellos y gatos). Los eritrocitos con un nivel muy bajo de glicólisis son los que parecen ser impermeables a la glucosa (caballos, bovinos y cerdos). Hay otros que muestran baja permeabilidad a la glucosa (ratas > conejos > perros=cobayos > cerdos) y en el mismo orden utilizan esta hexosa, excepto que los eritrocitos de los perros consumen más glucosa que los de los cobayos. En los eritrocitos de la sangre fetal de algunos de estos animales (cerdos, conejos, cobayos, ovinos y venados) la glucosa penetra a velocidades comparables a la de los eritrocitos humanos adultos y esto ya no ocurre a partir del nacimiento o sea que en los eritrocitos humanos persiste la alta permeabilidad a la D-glucosa en las etapas posteriores al nacimiento (31).

Los eritrocitos humanos tienen el más alto grado de transporte de la D-glucosa en comparación con el resto de las otras células del cuerpo humano, con la posible excepción de las células de la barrera hematoencefálica. La velocidad de transporte a través de la membrana plasmática rebasa con mucho la velocidad con la cual se metaboliza este sustrato en el eritrocito; por esta razón, las concentraciones de glucosa a ambos lados de la membrana se equilibran rápidamente (32).

En los eritrocitos humanos, el flujo de penetración de la D-glucosa, en un medio que tenga 10 mM de esta hexosa, es 1 femtomol/min, eritrocito y esta cifra es cerca de 250 veces mayor que la velocidad habitual de utilización de glucosa por los eritrocitos humanos (31).

Las pentosas y las hexosas penetran al interior del eritrocito primordialmente en su forma beta D-piranosas. Aparentemente los puentes de hidrógeno que se establecen entre la molécula transportadora y los átomos de oxígeno de la glucosa localizados en los carbonos 1, 2, 3 y 5 de la conformación C-1 de la  $\beta$ -D-glucopiranosas, son necesarios para que la glucosa se una con alta afinidad a esta proteína (28).

El transportador de la glucosa es una proteína que se extiende a lo ancho de la membrana del eritrocito y está rodeada por la matriz lipídica; aparentemente tiene una oquedad hacia el medio extracelular, en la cual se fija la hexosa una vez reconocida por los grupos activos de la molécula transportadora. Al unirse el azúcar con el acarreador ocurre un cambio conformacional y la oquedad se cierra tras la molécula aceptada; para que enseguida se forme otra oquedad, similar a la primera, pero ahora orientada hacia el interior del eritrocito y, finalmente, el azúcar es liberado en el lado citosólico de la membrana. El cambio conformacional de la proteína mueve la hexosa una corta distancia, quizá 0.2-0.3 nm, y de esta manera, no es necesario que el transportador mueva físicamente a la molécula de glucosa toda la anchura de la membrana. Como la concentración del azúcar es mayor en el lado original que en el final, no se requiere que cambie la constante de disociación del complejo azúcar-transportador; requisito que sí es necesario cuando el traslado se hace hacia un medio de concentración mayor que la que tiene el medio inicial (1, 9 y 32).

La D-galactosa, la D-manosa y otros azúcares de la familia D, así como el glicerol, son también acarreados por el transportador de la D-glucosa, aunque con menor afinidad. Se ha propuesto un transportador especial para la D-fructosa, ya que el de la D-glucosa también tiene muy baja afinidad por esta cetosa (9).

### **2.3 INHIBIDORES DE LA GLUCOLISIS, DEL TRANSPORTE DE LA GLUCOSA Y DE LA ACTIVIDAD NAD-GLICOHIDROLASA**

**Ion fluoruro.-** El ion fluoruro interrumpe la glicólisis por la inhibición de la enzima enolasa, que cataliza la reacción en la cual el 2-fosfato-D-glicerato se transforma en fosfoenolpiruvato y se libera una molécula de agua (12 y 19). La inhibición de la enolasa requiere la presencia simultánea del ion fluoruro y del ion fosfato para que se forme el ion fluorofosfato que es el verdadero agente inhibidor, ya que es el que fija a los iones Mg, los cuales son indispensables para la actividad de la enolasa, ya que forman con ella un complejo, antes de que se una el sustrato (19).



**Floretina.** La floretina es un inhibidor del paso de los monosacáridos a través de la membrana de los eritrocitos mucho más potente que el glucósido florizina, por lo que, la glucosa que forma parte de la molécula de la florizina, parece no estar involucrada en esta actividad inhibidora (18).

La floretina tiene un peso molecular de 274 g/mol; es muy soluble en etanol, metanol o acetona y prácticamente insoluble en agua, a menos que a la mezcla se le adicione etanol (The Merck Index).

El dietilestilbestrol, que es un estrógeno sintético, muestra una potencia inhibidora del transporte de la glucosa 60% más alta que la floretina; a su vez, esta última, tiene cierta actividad estrogénica, sin embargo, el dienestrol, que es un poderoso estrógeno, es relativamente inerte en lo que se refiere al transporte de glucosa en los eritrocitos (18).

La floretina inhibe de manera competitiva la entrada de D-glucosa al eritrocito y no competitivamente la salida; en cambio, la citocalasina B no actúa competitivamente durante la entrada de glucosa, pero sí en la salida. Esto sugiere que la porción de la molécula del acarreador de la D-glucosa que está orientada hacia el exterior del eritrocito tiene un sitio de enlace para la floretina; mientras que este sitio está ausente en la porción que está hacia adentro; por su parte, la citocalasina B se une a la parte interna del acarreador (16). Otros autores sugieren que la citocalasina B sólo actúa en la porción citosólica del acarreador y que la floretina actúa tanto en la porción externa como en la citosólica (4, 5 y 6).

La constante de inhibición de la floretina para el transportador de la D-glucosa,  $K_i$ , es 8.73 micromolar, en presencia de 36.5 micromolar de floretina y 5 a 50 mM de D-glucosa (16).

Se ha demostrado que la fletina penetra rápidamente a los eritrocitos y se adsorbe firmemente a la membrana de estas células y a la hemoglobina (16 y 13).

**Citocalasina B.**- La citocalasina B, aislada de algunos hongos, es un inhibidor del transporte de la D-glucosa en los eritrocitos. Su peso molecular es 479 g/mol. En estado sólido es completamente estable y en condiciones ambientales normales. Es insoluble en agua, pero soluble en etanol (35.4 mg/ml), en dimetil-sulfóxido (DMSO) (371 mg/ml) y en dimetilformanida (DMF) (492 mg/ml). La solución en DMSO conserva su potencia inhibidora hasta por tres años si se conserva en el refrigerador (The Merck Index).

Generalmente se prepara una solución 2 mM (1 mg de citocalasina B por mililitro de DMSO) y de esta se añade el volumen conveniente al medio acuoso (8) o bien la solución se hace en etanol absoluto (6).

La citocalasina B inhibe, en forma reversible (21), el transporte de la D-glucosa en los eritrocitos humanos, al competir por el transportador en la superficie interna de la membrana plasmática; al parecer, no se han encontrado sitios de unión para este inhibidor en la porción del acarreador que ve hacia el exterior del eritrocito (8).

La constante inhibición aparente,  $K_i$ , de la citocalasina B, con respecto a la salida de D-glucosa de los eritrocitos humanos, es alrededor de 0.9 micromolar en ensayos hechos a 25°C (8), 0.24 a 0.50 micromolar a 16°C (6) y 0.12 micromolar a 37°C (28).

Se ha estimado que cada eritrocito tiene entre 180,000 y 330,000 sitios de transferencia para las hexosas (6).

La D-glucosa inhibe hasta en un 80 a 90% la unión de la citocalasina B a los sitios de alta afinidad que se encuentran en la membrana del eritrocito humano y la  $K_i$  correspondiente es 50 mM (28).

Se consideran análogos de la citocalasina B, en su efecto sobre el transportador de la D-glucosa, a la fenolftaleína, la hidrocortisona, la prednisona y la corticosterona, con base en las distancias entre los átomos de oxígeno de sus respectivas moléculas y, por otra parte, se ha demostrado que todos estos compuestos son inhibidores competitivos del transporte de la D-glucosa en los eritrocitos humanos, con valores de la  $K_i$  de 25, 220, 300 y 400 micromolar, respectivamente (28).

Se ha sugerido que hay una relación estructura-acción entre la citocalasina B y la beta-D-glucopiranososa, en lo que se refiere a la distribución espacial de los cuatro átomos de oxígeno, la cual es casi idéntica en ambas moléculas (14); esto explica, en parte, por qué la citocalasina B es un inhibidor muy efectivo del transporte de D-glucosa (28).

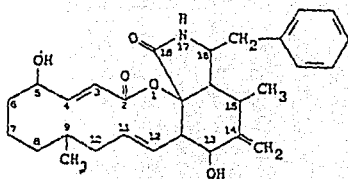
**Nicotinamida.** Se sabe (periodo 1965-1977) que este compuesto inhibe las siguientes enzimas o procesos biológicos con los valores de la  $K_i$ , o su equivalente, que se anotan: ADP-ribosa polimerasa (20  $\mu$ M); citocromo P-450 reductasa (10 mM); toxina diftérica, inhibición competitiva (210  $\mu$ M); IMP deshidrogenasa (38 mM); NAD glicohidrolasa de núcleos de hígado de ratas (0.5-10 mM), de microsomas de pulmón de rata (2 mM), de encéfalo de bovino (2.67 mM), de semen de bovino, inhibición no competitiva (200  $\mu$ M); actividad oxidativa de los microorganismos de hígado (50 mM); fosfodiesterasa, inhibición competitiva (15 mM); síntesis de poli-ADPribosa (1mM); metabolismo de la prostaglandina A1 (10 mM); t-RNA metilasa, inhibición no competitiva (5mM); xantina oxidasa (150  $\mu$ M) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, inhibición no competitiva (139 mM) (11).

Alivisatos y Kashket comprobaron que la nicotinamida es un inhibidor competitivo y que a la concentración de 20 mM inhibió completamente a la NADasa de los eritrocitos (2).

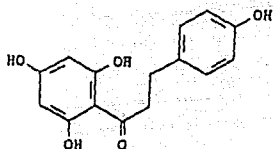
La degradación del NAD catalizada por los eritrocitos lavados de sangre humana se debió específicamente a la NADasa, ya que en las incubaciones hechas a pH 6.7 y 7.9 respectivamente, la hidrólisis del NAD fue inhibida totalmente por la nicotinamida (20).

### 2.3.1 ESTRUCTURAS QUIMICAS DE LOS INHIBIDORES

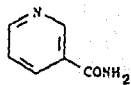
#### Citocinasina B



#### Floretina



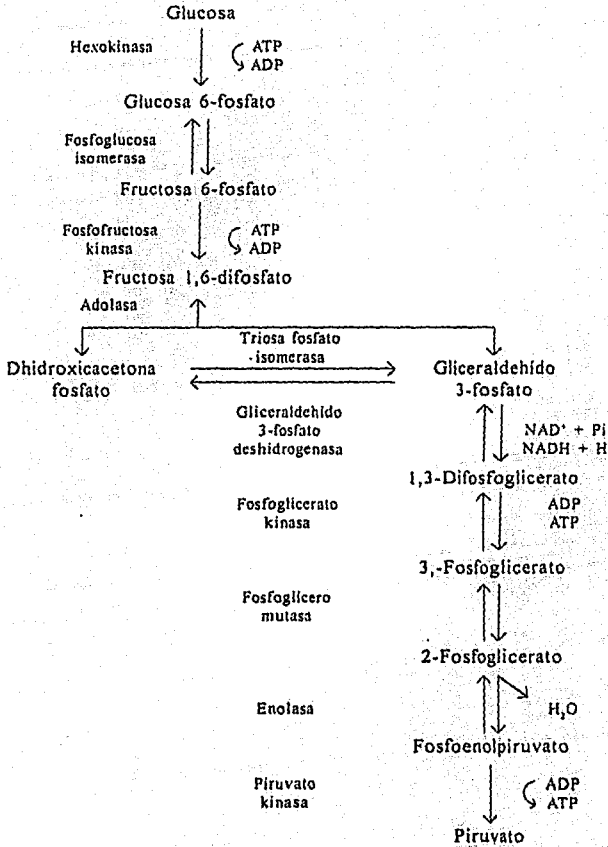
#### Nicotinamida



#### Fluoruro de sodio



## 2.3.2 GLUCOLISIS



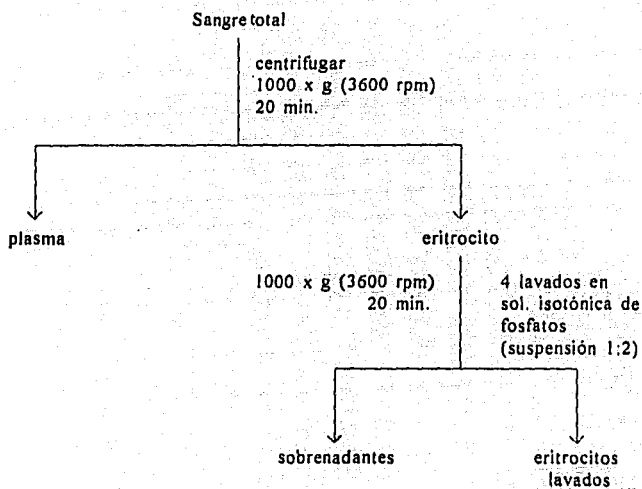
# CAPITULO

## III

## PARTE EXPERIMENTAL

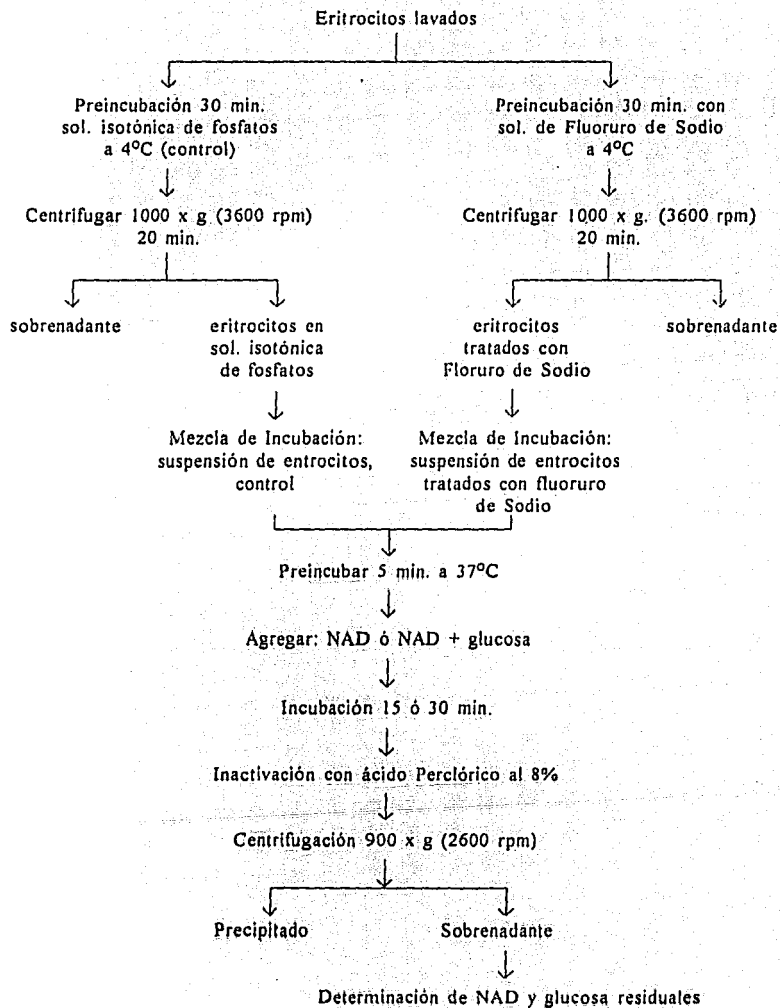
### 3.1 Diagramas

#### 3.1.1 DIAGRAMA GENERAL



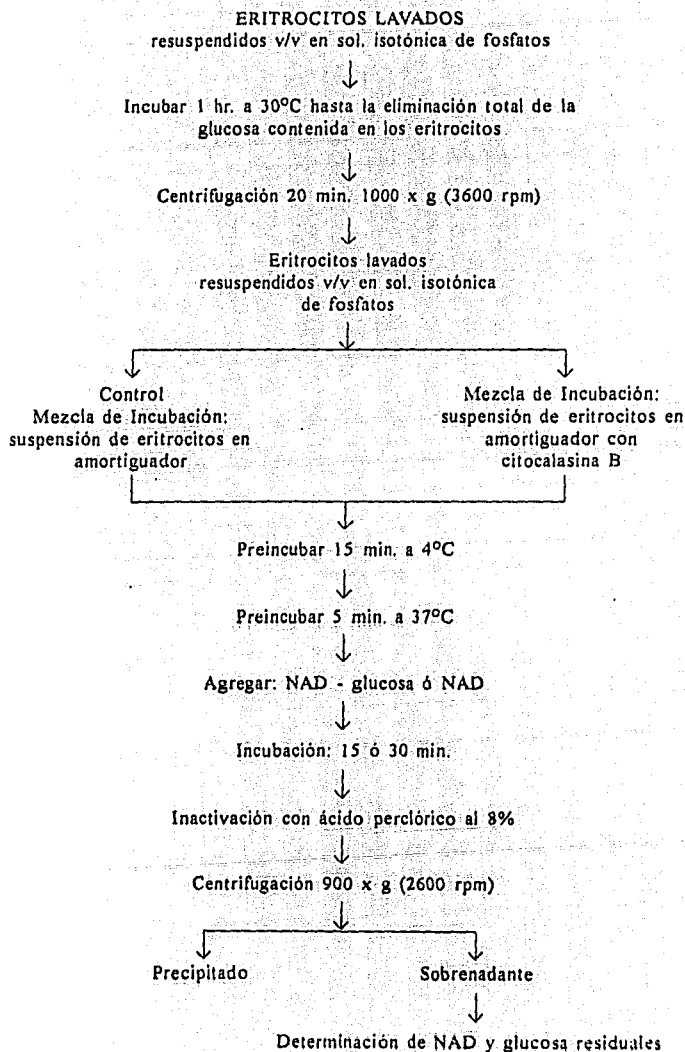


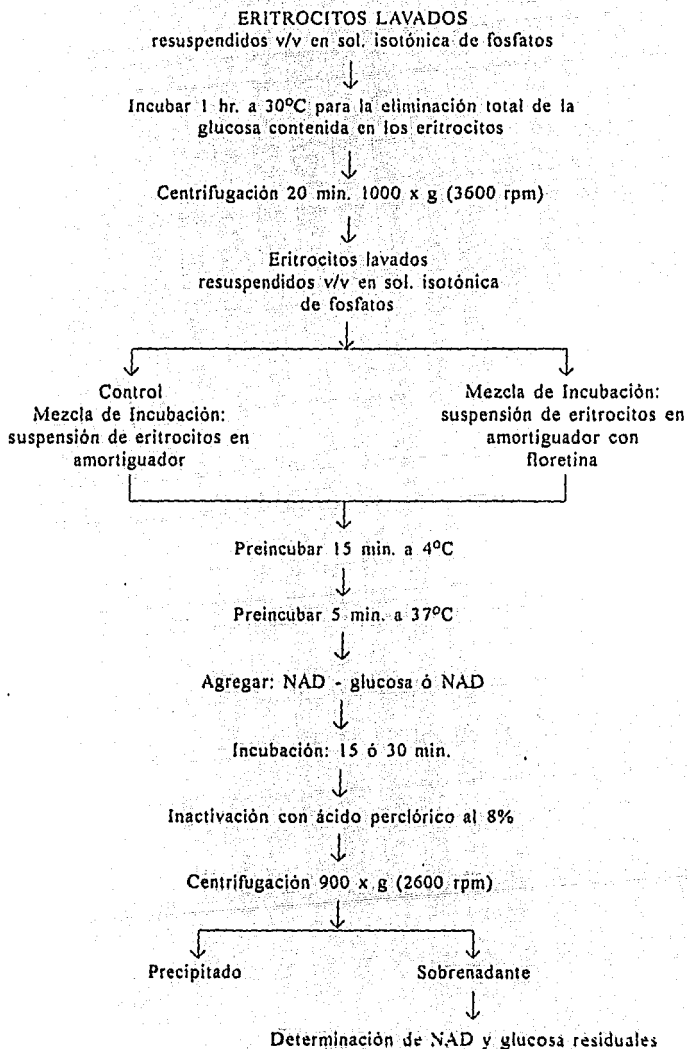
### 3.1.2 ERITROCITOS TRATADOS CON FLUORURO DE SODIO



### 3.1.3 ERITROCITOS TRATADOS CON CITOCALASINA B

16





## 3.2 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

### 3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Sangre humana. Se obtenían bolsas de sangre del banco del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez descartadas por haber sobrepasado el límite de su utilidad clínica.

La bolsa del equipo Fenwell tenía 70 ml de anticoagulante citrato-fostato-dextrosa-adenina (CPDA-1) para 500 ml de sangre.

### 3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

- Pipetas semiautomáticas Gilson
- Pipetas Mohr (1, 2, 5, y 10 ml)
- Pipetas Pasteur
- Vasos de precipitados (5, 10, 250, y 500 ml)
- Matraces aforados (5, 10, 25, 100 y 1000 ml)
- Matraces Erlenmeyer (10, 50, y 100 ml)
- Tubos de ensayo
- Agitadores de vidrio
- Probetas (10 ml, 50 ml)
- Cubetas rectangulares de 3 ml para el espectrofotómetro
- Tubos capilares de 75 mm de longitud
- Embudos
- Parrilla eléctrica
- Hielera
- Gradilla
- Tubos de policarbonato (50 ml, Thomas Scientific 2610-D16)
- Tubos de policarbonato (16 x 10 m.m Cole Parmer L-06329-31)
- Termómetro
- Microjeringas Hamilton (25 ul, 60 ul, 100 ul)
- Parafilm

### 3.2.3 EQUIPO

- Balanza analítica E. Mettler type H 5, capacidad 160 g
- Balanza analítica E. Mettler type H 51 Ar, capacidad 160 g
- Balanza granataria Gauss
- Potenciómetro para medir pH, Radiometer PH M22 r, con una escala de sensibilidad de 0.01 en el amplificador PHA630 Pa.
- Microcentrifuga Beckman Microfuge E TM
- Centrifuga Clínica Christ
- Espectrofotómetro Beckman DU-65
- Centrifuga IEC modelo Microcapilar MB
- Centrifuga J2 - HS Beckman
- Rotor Beckman JA-20 de 7 cm de radio medio para la centrifuga J2-HS
- Disco microcapilar Reader IEC modelo 2201

### 3.2.4 REACTIVOS

- Cloruro de sodio, Baker 3624
- D-glucosa, Sigma G-5250
- Ac. Cítrico, Merck 244
- Citrato trisódico, Baker 3646-01
- Fosfato monosódico  $H_2O$ , Baker 3818-01
- Fosfato disódico Baker 3828-01
- NAD (nicotinamida adenina dinucleótido), Sigma N-7004
- Deshidrogenasa alcohólica, Sigma A-7011
- Trizma Base, Sigma T-1503
- Alcohol etílico, Merck 15853
- Acido perclórico 60%, Merck 518
- Fluoruro de sodio, Merck 6449
- Citocalasina B, Sigma C-6762
- Floretina, Sigma P-7912
- EDTA, (etilendiamino acetato disódico), Sigma E-9884
- Heparina, Sigma H-7005
- Dimetil sulfoxido, Baker 9224
- Diagnostic Kit glucose, Sigma No. 16 UV (HK) 50

### 3.3 METODOLOGIA

#### 3.3.1 OBTENCION DE LA SANGRE

Las bolsas de sangre, donadas por el banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, contenían 70 ml de anticoagulante CPDA-1, cantidad suficiente para recibir 500 ml de sangre del donador; pero la mayoría no tenían los 500 ml sino sólo 240 a 365 ml de sangre o sea que contenían un exceso relativo de anticoagulante.

#### 3.3.2 SEPARACION DE ERITROCITOS Y DE PLASMA

La sangre contenida en las bolsas se mezcló muy bien y la muestra extraída se centrifugó a  $1,000 \times g$  (4000 rpm) en el rotor JA-20 de 7 cm de radio medio, a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 20 min. Al final con pipeta Pasteur se transfirió el plasma a un matraz de Erlenmeyer. La interfase entre el plasma y los eritrocitos se desechó con el fin de descartar la mayor parte de los leucocitos y las plaquetas.

#### 3.3.3 LAVADO DE LOS ERITROCITOS (10)

A los eritrocitos sedimentados, separados del plasma, se les agregó un volumen igual de solución isotónica de fosfatos. Los tubos se taparon con parafilm y se invirtieron suavemente hasta resuspender totalmente los eritrocitos. La suspensión de glóbulos rojos se centrifugó a  $1,000 \times g$  (4000 rpm), durante 20 min, a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se eliminó con una pipeta Pasteur, junto con la capa blanquecina de leucocitos y de plaquetas si ésta era aparente.

En el transcurso de los experimentos se detectó que al lavar los eritrocitos, además de quitar residuos de plasma y de otras células sanguíneas, se extraía la glucosa endógena de los glóbulos. Consecuentemente los eritrocitos se lavaron las veces que fue necesario para quitar toda la glucosa endógena, lo cual se logró en la mayoría de las ocasiones al cuarto lavado. Los eritrocitos una vez lavados se pusieron en un frasco de Erlenmeyer.

### **3.3.4 PREPARACION DE UN EXTRACTO ACIDO LIBRE DE PROTEINAS PARA DETERMINAR GLUCOSA EN LOS ERITROCITOS**

A un mililitro de paquete de eritrocitos, resuspendidos en un mililitro de solución de Dodge, se le agregaron 2 ml de ácido perclórico al 8%; se agitó y se dejó la mezcla en hielo 10 min. Luego se centrifugó a 900 xg (2600 rpm) en una centrifuga clínica Christ, a temperatura ambiente, durante 10 min. El sobrenadante libre de proteínas precipitadas se pasó a otro tubo para centrifugarlo nuevamente y así obtener una solución libre de partículas visibles (concentración del perclórico en el extracto ácido aproximadamente 4%).

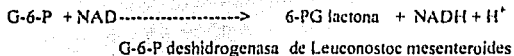
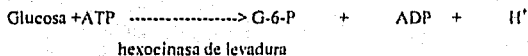
### **3.3.5 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA POR EL METODO ENZIMATICO CON HEXOCINASA Y GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA**

Las determinaciones de glucosa se llevaron a cabo en muestras de soluciones acuosas de glucosa, en el extracto térmico y en los extractos ácidos de eritrocitos o de la mezcla de incubación.

### **FUNDAMENTO**

La técnica se basa en la fosforilación de la glucosa por el ATP en presencia de la hexocinasa. La glucosa 6-fosfato formada es oxidada por el NAD a 6-fosfoglucono- $\delta$ -lactona en presencia de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Durante esta oxidación una cantidad equimolar de NAD es reducido a NADH. El NADH presenta su máxima absorbancia a la longitud de onda de 340 nm. El incremento en la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.





Cada frasco de reactivos (Sigma Diagnostic Kit Glucose No. 16-UV HK 50) contiene:

NAD	1.5 mM
ATP	1.0 mM
Hexocinada de levadura	1,000 unidades/litro
G-6-P deshidrogenasa de Leuconostoc mesenteroides	1,000 unidades /litro
iones magnesio	2.1 mM
Amortiguador	pH 7.5 ± 0.1
Azida de sodio	0.05% (preservativo)

Los reactivos del frasco original se disolvieron con 50 ml de agua desionizada y la mezcla se hizo por inversión.

La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente. Habitualmente se ponían 1.50 ml de la solución de los reactivos Sigma en una cubeta rectangular del espectrofotómetro, de 3 ml de volumen y de 10 mm de anchura interior, y se midió su absorbancia a 340 nm, comparándola contra la del agua puesta en otra cubeta. Una vez obtenida la lectura inicial, se agregó a la cubeta, con una pipeta Hamilton, 10 µl de muestra; se mezcló bien y luego de 10 min, cuando la absorbancia ya fue estable, se tomó la lectura final.

Para obtener el cambio de absorbancia ( $\Delta A$ ) se le restó a la lectura final ( $A_2$ ) la lectura inicial ( $A_1$ ).

La concentración de glucosa se expresa en los miligramos contenidos en un decilitro de la muestra analizada y se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\text{Glucosa (mg/dl)} = \frac{\Delta A \times VT \times PM \times 100}{\Delta A \times 437} \\ = \frac{6.22 \times 10^3 \times PL \times VM}{\text{cm}^{-1} \text{ mmol}^{-1} \text{ ml cm ml}} \text{ mg/dl}$$

Donde:

$\Delta A$	=	cambio de absorbancia = $A_2 - A_1$
VT	=	volumen total de la mezcla de reacción en la cubeta (1.51 ml)
PM	=	Peso molecular de la glucosa (180.16 mg/mmol)
100	=	Conversión de mililitros a decilitros (ml/dl)
$6.22 \times 10^3$	=	Coefficiente de absorbancia del NADH ( $\text{cm}^{-1} \text{ mmol}^{-1} \text{ ml}$ )
PL	=	Paso de luz en la cubeta (1 cm)
VM	=	Volumen de la muestra analizada (0.01 ml)

### 3.3.6 OBTENCIÓN DEL PLASMA LIBRE DE PARTÍCULAS BIOLÓGICAS

El plasma obtenido de la centrifugación de la sangre total, recibida en solución anticoagulante, se ultracentrifugó y se microfiltró para eliminar restos de eritrocitos, de leucocitos y de plaquetas, ya que todos ellos contienen actividad NAD glicohidrolasa.

La ultracentrifugación se realizó a 7800 xg (10000 rpm) en el rotor JA-20 de radio medio 7 cm, a 4°C, durante 20 min y el sobrenadante se pasó luego a través de un microfiltro de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro.

### 3.3.7 PURIFICACION DEL PLASMA POR CALENTAMIENTO

Los tubos conteniendo porciones de 30 ml de plasma libre de partículas biológicas, se pusieron en un baño de agua que estuvo a la temperatura de ebullición. Cuando se igualó la temperatura del plasma con el agua del baño se dejó 30 min. Al término de este tiempo, los tubos se enfriaron poniéndolos en una hielera. El contenido pastoso se disgregó con una espátula y se pasó a otros tubos para centrifugarse a 22600 xg (17000 rpm) en el rotor JA-20 de radio medio de 7 cm, durante 2 horas a 4°C. El sobrenadante obtenido se pasó por un filtro de 0.20  $\mu$ m y se guardó en un frasco que había sido esterilizado (extracto térmico).

### 3.3.8 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD NADasa

Los eritrocitos lavados se resuspendieron habitualmente en cada una de las siguientes soluciones:

- 1.- Solución de Dodge (solución idealmente isotónica de fosfatos)
- 2.- Solución de glucosa
- 3.- Extracto térmico

### 3.3.9 INCUBACION PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD NADasa DE LOS ERITROCITOS RESUSPENDIDOS EN LAS DISTINTAS SOLUCIONES

En los ensayos se incluían siempre dos controles: uno consistente en una suspensión de eritrocitos en la solución de Dodge y otro de eritrocitos suspendidos en el extracto térmico. Cada ensayo se realizó por duplicado tanto a pH ácido como a pH alcalino. La mezcla de incubación contenía lo siguiente:

- 1.50 ml de eritrocitos suspendidos en la solución correspondiente
- 1.00 ml de amortiguador de fosfatos 0.3 M
- 0.25 ml de agua
- 0.25 ml de NAD
- 3.00 ml de volumen total

El amortiguador de fosfatos 0.3 M se preparó a pH 6.25-6.28 para la actividad ácida y a pH 8.70-8.93 para la actividad alcalina respectivamente.

La mezcla se preincubó 5 minutos en el baño a 37°C y la reacción se inició al añadir 0.25 ml de una solución de NAD 6 mM. Inmediatamente se tapó el tubo y se invirtió 10 veces (aproximadamente 20 segundos). En seguida se tomó 1 ml de la mezcla y se vació a un tubo que contenía 1 ml de ácido perclórico al 8% puesto en la hielera. El tubo con la mezcla ácida se agitó vigorosamente y se volvió a poner en frío al menos por 10 minutos. Esta muestra correspondía al tiempo 0.

El tubo con la mezcla de incubación restante se regresó inmediato al baño a 37°C y se incubó 14 minutos más.

Al minuto 14 se sacó el tubo, se mezcló su contenido y nuevamente se tomó 1 ml de muestra que se vació al minuto 15 en otro tubo que contenía 1 ml de ácido perclórico frío. Esta muestra correspondía al tiempo 15.

A la porción restante de la mezcla de incubación se le midió el pH a 37°C.

### 3.3.10 MEDICION DEL HEMATOCRITO

El hematocrito se determinó en todas las suspensiones de eritrocitos. Se usaron capilares de 75 mm de longitud, 1.1-1.2 de diámetro y 0.2 mm de grosor de la pared. La suspensión de eritrocitos se dejó subir por el capilar manteniendo inclinado el tubo hasta llenar 3/4 partes del mismo. El capilar se selló en el extremo no ocupado por la sangre, fundiendo el vidrio con una flama de gas, evitando que la sangre se dañara.

Los capilares se centrifugaron 3 minutos, a 18,460 x g, en la centrifuga IEC modelo Microcapilar MB y los sedimentos se leyeron en el disco Microcapillary Reader IEC modelo 2201.

### 3.3.11 MEDICION DEL NAD POR EL METODO DE LA DESHIDROGENASA ALCOHOLICA

#### FUNDAMENTO

La deshidrogenasa alcohólica cataliza la siguiente reacción:



El equilibrio se desplaza completamente hacia la derecha cuando la reacción ocurre a pH alcalino y en presencia de un exceso de etanol.

El dinucleótido reducido de nicotinamida y adenina (NADH) tiene una absorbancia máxima a 340 nm, mientras que el dinucleótido oxidado (NAD) no absorbe la luz a esta longitud de onda; por lo que la absorbancia que se lee corresponde al NADH presente en la muestra, el cual equivale al NAD presente en la mezcla de incubación que ha sido reducido por el etanol en presencia de la deshidrogenasa alcohólica.

### 3.3.12 MEDICION DEL NAD

En cubetas rectangulares de 3 ml, se pusieron 2.00 ml de amortiguador de la deshidrogenasa alcohólica y 1.00 ml del extracto ácido. Luego de tapar con parafilm, se mezcló bien su contenido invirtiéndola varias veces. La absorbancia a 340 nm se leyó contra otra cubeta con agua (lectura inicial). Después se agregó con una pipeta automática Gilson, 0.05 ml de la dilución de la deshidrogenasa alcohólica y, luego de tapar la cubeta, se mezcló bien su contenido y se leyó la absorbancia 2 ó 3 minutos después, también contra agua (lectura final).

La absorbancia neta se obtuvo restando a la lectura final la lectura inicial. La diferencia de absorbancia  $\Delta A$  se obtuvo restando a la absorbancia neta del tiempo 0 la absorbancia neta del tiempo 15.

Cálculos para obtener el valor de la actividad específica:

$$1.- \Delta A \times \frac{1}{6.22 \times 10^{-3}} \times \frac{3.05}{1.0} \times \frac{2.0}{1.0} \times \frac{3.0}{1.5} \times \frac{1}{15} = \Delta A \times 130.76$$

nmol de NAD consumido  
min, ml de sangre o de suspensión de  
eritrocitos en cualquiera de las soluciones  
usadas.

$$2.- \Delta A \times 130.76 \times \frac{100\%}{\text{hematocrito}} = \frac{A \times 13076}{\text{hematocrito}} = \text{nmol de NAD consumido}$$

min, ml de eritrocitos

3.- La unidad de actividad de actividad enzimática es la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 nmol de NAD por minuto en las condiciones que se especifican.

4.- La actividad específica es el número de unidades contenidas en 1 ml de eritrocitos.

Significado de los términos de la ecuación anterior.

$6.22 \times 10^{-3}$  = coeficiente de absorbancia del NADH expresado en  $\text{cm}^{-1} (\text{nmol/ml})^{-1}$

3.05 = mililitros en la cubeta del espectrofotómetro

1.0 = mililitros del sobrenadante ácido puestos en la cubeta del espectrofotómetro.

2.0 = mililitros de la mezcla del ácido perclórico y de la muestra de la mezcla de incubación

1.0 = mililitros de la muestra de incubación tomados al tiempo 0 ó al tiempo 15

3.0 = mililitros de la mezcla de incubación

1.5 = mililitros de sangre o de suspensión de eritrocitos en la mezcla de incubación

15 = minutos de incubación

Hematocrito = hematocrito de la sangre total o de las suspensiones de eritrocitos en las diferentes soluciones.

# **CAPITULO**

## **IV**

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 RESULTADOS

Con cualquiera de las tres soluciones anticoagulantes que se usaron (CPDA-1, Heparina y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), para recibir la sangre, los eritrocitos lavados mostraron siempre mayor actividad NADasa a pH alcalino en presencia de extracto térmico que en su ausencia. Y el incremento observado en cada caso fue muy semejante (tablas 1, 2 y 3). Además el incremento de la actividad NADasa alcalina fue siempre ligeramente mayor cuando los eritrocitos estuvieron resuspendidos en el extracto térmico que cuando estaban en la sangre (tablas 1, 2 y 3). En lo que se refiere a la actividad NADasa medida en el medio ácido, ésta siempre fue menor que en el medio alcalino tanto en el caso de los eritrocitos presentes en la sangre como en la suspensión de éstos en el extracto térmico; a su vez entre estas dos condiciones no hubo diferencia prácticamente (tablas 1, 2 y 3).

En el caso de las suspensiones de eritrocitos hechas en la solución isotónica de fosfatos, la actividad NADasa fue sensiblemente igual que la alcalina y estas cifras fueron a su vez muy semejantes a las observadas en el medio ácido cuando se usó la sangre o la resuspensión de eritrocitos en extracto térmico (tablas 1, 2 y 3).

La actividad específica NADasa en los eritrocitos lavados con el procedimiento de Dodge y resuspendidos en la solución isotónica de fosfatos (medio de Dodge) fue casi igual a pH ácido que a pH alcalino; mientras que los resuspendidos en plasma mostraron 2.25 veces más actividad a pH alcalino que a pH ácido. A su vez, el incremento en la actividad específica en el medio alcalino fue de 18 con respecto a la actividad medida en ausencia de plasma y en el medio ácido, la actividad casi no se modificó por la presencia del plasma (tabla 4).



En algunas preparaciones desde el tercer lavado el contenido de glucosa fue cero, tanto en el paquete de eritrocitos como en el líquido sobrenadante (experimento 1); en otros, aun después del cuarto lavado, el contenido, aunque bajo, no fue cero (experimento 2) (tabla 5).

Al usar el ácido perclórico a una concentración en la mezcla final mayor de 2.5%, para precipitar las proteínas de los eritrocitos, el pH que resultó en el medio de incubación para determinar glucosa fue menor de 7.40; sobre todo si la muestra agregada fue mayor de 20  $\mu$ l para 1.50 ml de la solución de los reactivos puesta en la cubeta del espectrofotómetro (tabla 6).

Cuando el pH del medio de incubación para determinar glucosa fue menor de 7.4, el cambio de absorbancia a los 10 minutos de iniciada la reacción fue menor entre menor era la cifra del pH y esto fue más marcado cuando el volumen de la muestra fue mayor de 20  $\mu$ l para 1.50 ml de solución de reactivos (tabla 7).

Las cifras obtenidas midiendo soluciones puras de D-glucosa a concentraciones mayores de 5 mg/dl, son confiables, ya que correspondieron al 97-98% de lo esperado; en cambio a concentraciones menores, las cifras obtenidas fueron relativamente bajas (80%, tabla 8).

En una mezcla de incubación que contenía 26.6 mg de glucosa y 12.5 ml de paquete de eritrocitos lavados por decilitro, los eritrocitos consumieron 0.90  $\mu$ g de glucosa por mililitro de mezcla de incubación y por minuto, durante la primera media hora de incubación a 37°C y pH 7.40 y 1.37  $\mu$ g/ml, min, en la segunda media hora (tabla 9). Si se toma la cifra promedio de estos consumos, resulta el valor de 9.1  $\mu$ g de glucosa consumida por mililitro de eritrocitos y por minuto, en las condiciones de incubación especificadas (tabla 9).

En otro experimento, en que la mezcla de incubación tenía 31.0 mg de glucosa/dl, pero con una cantidad de eritrocitos del doble del experimento anterior (25 ml de paquete de eritrocitos por cada decilitro), los eritrocitos consumieron 1.77  $\mu\text{g/ml, min}$  en la primera media hora de incubación y 3.20  $\mu\text{g/ml, min}$  en la segunda media hora (tabla 10). Si se toma la cifra promedio de estos consumos resulta el valor de 9.9  $\mu\text{g}$  de glucosa consumida por mililitro de eritrocitos y por minuto, en las condiciones de incubación especificadas (tabla 10).

Los eritrocitos lavados resuspendidos en solución de fosfatos, cuando se incubaron en el medio ácido en presencia de 3.3 mM de D-glucosa casi no consumieron este azúcar y la actividad NADasa fue baja; en contraste, los eritrocitos incubados en el medio alcalino, en donde la actividad NADasa fue mayor que la ácida, consumieron 7 mg de D-glucosa por decilitro de mezcla de reacción y en 30 minutos (tabla 11).

La velocidad de consumo de D-glucosa por los eritrocitos lavados de sangre humana fue casi la misma (alrededor de 10  $\mu\text{g}$  por mililitro de eritrocitos y por minuto; cifras límites 7.9 y 14.6) independientemente de la cuantía de las concentraciones de glucosa usadas que fueron de 24.6, 49.2 y 92.8 mg/dl de mezcla de reacción respectivamente, y a pH 7.8 a 37°C y con 60 minutos de incubación. Por otra parte, la velocidad de consumo de glucosa parece ser la misma en la primera y en la segunda mitad del período de incubación (7.9 y 9.8; 13.3 y 8.8; 10.6 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$  de eritrocitos, min) (tabla 12).

Los eritrocitos lavados de sangre humana que fueron incubados con D-glucosa mostraron mayor actividad específica NADasa alcalina que los incubados sin este azúcar y la respuesta de esta actividad a diferentes concentraciones de D-glucosa fue casi la misma a partir de 0.4 mM y hasta 7.3 mM de glucosa (tabla 13) (figura 1).

Cuando el medio de suspensión fue el extracto térmico preparado del plasma, que por supuesto contiene glucosa y otros componentes que se han identificado como péptidos, los eritrocitos mostraron un incremento de la actividad específica NADasa alcalina que rebasó notablemente al provocado por la solución pura de D-glucosa en solución isotónica de fosfatos (tabla 14) (figura 1). Además este incremento aumentó continuamente en relación con las mayores concentraciones del extracto en la mezcla de incubación, en contraste con lo observado con las soluciones de D-glucosa pura, en donde la respuesta, como se hizo notar antes, fue la misma independientemente de las concentraciones de D-glucosa usadas (figura 1).

Los eritrocitos que se incubaron en presencia de D-glucosa mostraron una mayor actividad NADasa alcalina que los eritrocitos resuspendidos en solución que sólo contenía fosfatos, y las diferencias provocadas por este azúcar variaron porcentualmente en cada uno de los cuatro experimentos (tabla 15).

Por otra parte, la actividad NADasa de los eritrocitos hemolizados que se resuspendieron en solución D-glucosa no respondió a la presencia de esta hexosa (tabla 15). Al comparar la actividad NADasa alcalina de los eritrocitos resuspendidos en la solución sola de fosfatos, tanto los intactos como los hemolizados tuvieron casi la misma actividad; pero, en los eritrocitos resuspendidos en solución de D-glucosa, la actividad NADasa en los hemolizados fue notablemente menor (tabla 15).

El ion fluoruro a la concentración 3 mM en la mezcla de incubación aparentemente no modificó la actividad NADasa, tanto ácida como alcalina, de los eritrocitos incubados en presencia de 5 y 8 mM de D-glucosa, respectivamente; como lo muestra el hecho de que los valores de esta actividad fueron casi los mismos en ausencia y en presencia de fluoruro (tabla 16).

El fluoruro a la concentración 3 mM inhibió completamente el consumo de glucosa por los eritrocitos, desde los 15 primeros minutos de incubación (tabla 17).

El etanol a la concentración 1 M en la mezcla de incubación no modificó el consumo de glucosa ni la actividad específica de la NADasa alcalina (tabla 18).

La presencia de floretina, inhibidor del transportador de la D-glucosa en el eritrocito, a la concentración de 0.83 mM en la mezcla usada para medir el NAD en la cubeta del espectrofotómetro, aumentó el valor inicial habitual de la absorbancia leída a 340 nm de la muestra analizada. Además este valor no fue estable, sino que disminuyó al paso del tiempo a razón de casi 0.030 de cambio por cada intervalo de 30 minutos durante los 90 minutos de incubación (tabla 19). Sin embargo, las lecturas netas de la absorbancia a 340 nm, correspondientes a los diversos tiempos transcurridos después de la adición de la alcohol deshidrogenasa, revelaron que las diferencias correspondientes fueron casi idénticas (en este caso, alrededor de 0.107) (tabla 20). Con esta observación, descartamos que la presencia de floretina fuera capaz de modificar las diferencias de las lecturas de la absorbancia correspondientes a la formación del NADH en la muestra medida.

La D-glucosa a la concentración 3.3 mM en la mezcla de reacción incrementó, como se ha observado siempre, la actividad específica NADasa alcalina (4, 2 y 3 unidades/ml de eritrocitos, respectivamente, en los experimentos 1, 2 y 3 de la tabla 21. Y los incrementos provocados por el extracto térmico fueron a su vez, 5 y 6 unidades por mililitro de eritrocitos (exp. 2 y 3, tabla 21). Por otra parte, en presencia de floretina disminuyó el consumo de glucosa notablemente tanto en las resuspensiones de eritrocitos hechas en solución de D-glucosa como en las preparadas en extracto térmico; sobre todo a la concentración de este inhibidor de 12.5 mM.

Además, sorpresivamente, disminuyó el incremento de la actividad NADasa alcalina provocado por la presencia de D-glucosa o del extracto térmico (tabla 21).

La citocalasina B, otro inhibidor del transporte de la D-glucosa en los eritrocitos, a la concentración de 0.1 mM en la mezcla de incubación, inhibió poco más del 40% el consumo de D-glucosa y casi no modificó la actividad NADasa alcalina de los eritrocitos lavados e incubados tanto en presencia como en ausencia de D-glucosa (tabla 22).

La nicotinamida, inhibidor de la actividad NADasa y de otras muchas enzimas, inhibió a la actividad NADasa de los eritrocitos lavados, a partir de la concentración 0.01 en la mezcla de incubación y la inhibición llegó a ser del 100% a la concentración 0.20 M. Por otra parte, y sorpresivamente, el consumo de D-glucosa por los eritrocitos disminuyó notablemente en el medio de incubación que contenía 0.15 M de nicotinamida y sobre todo en el que tenía 0.20 M de este inhibidor; en este último, el consumo fue sólo el 20% del mostrado por los eritrocitos incubados sin este inhibidor (tabla 23).

**TABLA 1. ACTIVIDAD NAD<sub>asa</sub> DE LOS ERITROCITOS LAVADOS DE SANGRE RECIBIDA EN SOLUCION DE CITRATO-FOSFATO-DEXTROSA ADENINA (CPDA-1)**

<i>MUESTRA</i>	<i>pH</i>	<i>MEDIO ACIDO</i> <i>Actividad Especifica</i>	<i>pH</i>	<i>MEDIO ALCALINO</i> <i>Actividad Especifica</i>
Sangre Total	6.48	21	7.79	28
Suspensión de eritrocitos:				
En solución de fosfatos	6.69	17	7.95	19
En extracto térmico	6.65	19	8.07	33

La actividad específica está expresada en nanomoles de NAD hidrolizado por minuto y por mililitro de eritrocito en las condiciones de incubación descritas en el texto.

**TABLA 2. ACTIVIDAD NADasa DE LOS ERITROCITOS LAVADOS DE SANGRE RECIBIDA EN SOLUCION DE HEPARINA**

<i>MUESTRA</i>	<i>MEDIO ACIDO</i>		<i>MEDIO ALCALINO</i>	
	<i>pH</i>	<i>Actividad específica</i>	<i>pH</i>	<i>Actividad específica</i>
Sangre Total	6.53	19	7.87	30
Suspensión de eritrocitos:				
En solución de fosfatos	6.69	19	7.96	18
En extracto térmico	6.64	23	8.07	36

La actividad específica está expresada en nanomoles de NAD hidrolizado por minuto y por mililitro de eritrocito en las condiciones de incubación descritas en el texto.

Se usó una solución de heparina (Sigma H-7005) con 2000 unidades/ml, en proporción de 0.1 ml por cada 20 ml de sangre.

**TABLA 3. ACTIVIDAD NADasa DE LOS ERITROCITOS LAVADOS DE SANGRE RECIBIDA EN SOLUCION DE EDETATO DISODICO**

<i>MUESTRA</i>	<i>pH</i>	<i>MEDIO ACIDO</i> <i>Actividad</i> <i>especifica</i>	<i>pH</i>	<i>MEDIO ALCALINO</i> <i>Actividad</i> <i>especifica</i>
Sangre Total	6.54	23	7.48	28
Suspensión de eritrocitos:				
En solución de fosfatos	6.69	19	7.98	17
En extracto térmico	6.64	20	8.09	37

La actividad especificada está expresada en nanomoles de NAD hidrolizado por minuto y por mililitro de eritrocito en las condiciones de incubación descritas en el texto.

Se uso 0.4 ml de solución al 5% (p/v) de edetato disódico por cada 20 ml de sangre.



**TABLA 4.- ACTIVIDAD NAD<sub>252</sub> EN LOS ERITROCITOS LAVADOS CON LA TECNICA DE DODGE Y COLABORADORES**

<i>MEDIO DE SUSPENSION DE LOS ERITROCITOS</i>	<i>MEDIO ACIDO</i>		<i>MEDIO ALCALINO</i>		<i>INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD A pH ALCALINO</i>
	<i>pH</i>	<i>Actividad especifica</i>	<i>pH</i>	<i>Actividad especifica</i>	
Medio de Dodge	6.73	19	7.96	18	0
Plasma	6.72	16	8.02	36	18

El contenido de glucosa de los eritrocitos usados corresponden a los del experimento 1 de la tabla 5.

**TABLA 5. CONTENIDO DE GLUCOSA EN LOS ERITROCITOS LAVADOS Y EN EL LIQUIDO SOBRENADANTE**

<i>Número de lavados</i>	<i>Eritrocitos (mg/dl)</i>	<i>Líquido sobrenadante (mg/dl)</i>
<b>Experimento 1</b>		
0	508	557
1	52	57
2	5	16
3	0	0
4	0	0
<b>Experimento 2</b>		
0	326	354
1	128	124
2	50	40
3	28	14
4	12	4

**TABLA 6. VALOR DEL pH DE LA MEZCLA DE INCUBACION PARA MEDIR GLUCOSA ENZIMATICAMENTE EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DEL ACIDO QUE SE USO PARA PRECIPITAR LAS PROTEINAS DE LA SUSPENSION DE ERITROCITOS**

<i>Acido Perclórico</i> <i>% (p v)</i>		<i>pH de la mezcla de reacción</i> <i>para medir glucosa</i>	
<i>Solución</i> <i>Original</i>	<i>en la</i> <i>mezcla</i>	<i>Volúmen de la Muestra analizada</i> <i>20 ul</i>	<i>50 ul</i>
5	2.5	7.40	7.25
8	4.0	7.30	6.94
10	5.0	7.27	6.63

Un volumen de 4.5 ml del paquete de eritrocitos se añadió a 4.5 ml de extracto térmico diluido 1:5 y a 2 ml de esta suspensión se les añadieron 2 ml de la dilución correspondiente del ácido perclórico. En dos cubetas del espectrofotómetro que contenían 1.50 ml de la solución de reactivos para medir glucosa enzimáticamente, se pusieron 20 y 50 ul del extracto ácido correspondiente a cada concentración del ácido perclórico, respectivamente.

**TABLA 7. EFECTO DEL pH DEL EXTRACTO ACIDO SOBRE LA CIFRA DE GLUCOSA DETERMINADA ENZIMATICAMENTE EN MUESTRAS DE DICHO EXTRACTO**

<i>Solución Original</i>	<i>Acido perclórico % (p/v)</i> <i>En la mezcla</i>	<i>Concentración de glucosa (mg/dl)</i>	
		<i>Volúmen de la muestra analizada (ul)</i>	
		<i>20 ul</i>	<i>50 ul</i>
5	2.5	35.6	32.9
8	4.0	34.3	31.1
10	5.0	33.0	28.7

Un volumen de 4.0 ml del paquete de eritrocitos se mezcló con 4.0 ml de solución isotónica de glucosa (100 mg/dl) en fosfatos isotónicos. La mezcla de incubación se preparó con 1.25 ml de esta suspensión de eritrocitos para un volumen final de 2.50 ml. Un volumen de 1.0 ml de esta mezcla se vació sobre 1.0 ml de la dilución correspondiente del ácido perclórico. En dos cubetas del espectrofotómetro que contenían 1.50 de solución de reactivos para medir glucosa enzimáticamente, se pusieron 20 y 50 ul del extracto ácido correspondiente a cada concentración del ácido perclórico, respectivamente.

**TABLA 8. SENSIBILIDAD DEL METODO ENZIMATICO USADO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION DE GLUCOSA. EN EXTRACTOS ACIDOS DE LA SUSPENSION ERITROCITOS**

<i>Soluciones de D-glucosa (mg/dl)</i>	<i>Volumen de la muestra medida<sup>a</sup> (ul)</i>	<i>Absorbancia a 340</i>	<i>Concentración mg/dl</i>	
			<i>Experimental</i>	<i>Valor Porcentual<sup>b</sup></i>
2.5	20	.023	2.0	80
5.0	50	.055	4.9	98
50.0	50	.220	48.5	97

<sup>a</sup>Se usó en cada caso 1.50 ml de la dilución de los reactivos.

<sup>b</sup>Con respecto a la concentración teórica

**TABLA 9. CONSUMO DE GLUCOSA POR LOS ERITROCITOS LAVADOS  
SUSPENDIDOS EN UNA SOLUCION DE GLUCOSA EN FOSFATOS  
ISOTONICOS (hematocrito 12.5%)**

<i>Incubación a 37°C y pH 7.8 (min)</i>	<i>Glucosa en la mezcla de incubación (mg/dl)</i>	<i>Consumo de glucosa Absoluto Velocidad (mg/dl) (ug/ml, min)</i>		
0	26.6	0		
30	23.9	2.7	0	0.90
60	19.8	4.1		1.37

Un volumen de 2.0 ml de paquete de eritrocitos lavados se añadió a 6.0 ml de solución de glucosa en fosfatos isotónicos. La mezcla de incubación se preparó con 1.25 ml de esta suspensión de eritrocitos para un volumen final de 2.50 ml. Un volumen de 0.5 ml de mezcla se vació en 0.5 ml de ácido paerciórico al 5%. En cubetas del espectrofotómetro que contenían 1.50 ml de reactivos para medir glucosa enzimáticamente, se pusieron 20 ul del extracto ácido por analizar.

**TABLA 10. CONSUMO DE GLUCOSA POR LOS ERITROCITOS LAVADOS  
SUSPENDIDOS EN UNA SOLUCION DE GLUCOSA EN FOSFATOS  
ISOTONICOS (hematocrito 25%)**

<i>Incubación a 37°C y pH 7.8 (min)</i>	<i>Glucosa en la mezcla de incubación (mg/dl)</i>	<i>Consumo de glucosa Absoluto      Velocidad (mg/dl)      (ug/ml,min)</i>	
0	31.0	0	
30	25.7	5.3	0 1.77
60	16.1	9.6	3.20

Un volumen de 4.0 ml de paquete de eritrocitos lavados se añadió a 4.0 ml de solución de glucosa en fosfatos isotónicos. La mezcla de incubación se preparó con 1.25 ml de esta suspensión de eritrocitos para un volumen final de 2.50 ml. Un volumen de 0.5 ml de esta mezcla se vació sobre 0.5 ml de ácido perclórico al 5%. En cubetas del espectrofotómetro que contenían 1.50 ml de reactivos para medir glucosa enzimáticamente se pusieron 20 µl del extracto ácido por analizar.

**TABLA 11. CONSUMO DE D-GLUCOSA POR LOS ERITROCITOS EN EL MEDIO DE LA INCUBACION ACIDO Y EN EL ALCALINO USADOS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD NADasa**

<i>Medio de suspensión de los eritrocitos</i>	<i>pH</i>	<i>Medio ácido</i> <i>Actividad específica</i>	<i>pH</i>	<i>Medio alcalino</i> <i>Actividad específica</i>
D-glucosa 3,3 mM en sol de fosfatos	6.70	9.70	7.83	18.0
Consumo de D-glucosa (mg/dl) de mezcla, 30 min.		.50		7.0



**TABLA 12. EFECTO DE VARIAS CONCENTRACIONES DE D-GLUCOSA SOBRE EL CONSUMO DE ESTA HEXOSA POR LOS ERITROCITOS LAVADOS DE SANGRE HUMANA Y MEDIDO A DOS TIEMPOS DE INCUBACION (hematocrito 22%)**

<i>Incubación a 37°C y a pH 7.8 (min)</i>	<i>D-Glucosa</i>								
	<i>Serie I</i>			<i>Serie II</i>			<i>Serie III</i>		
	<i>Cn</i>	<i>Cs</i>	<i>Vel</i>	<i>Cn</i>	<i>Cs</i>	<i>Vel</i>	<i>Cn</i>	<i>Cs</i>	<i>Vel</i>
0	24.6	0		49.2	0		92.8	0	
30	19.4	5.2	7.9	40.4	8.8	13.3	85.8	7.0	10.6
60	12.9	11.7	9.8	34.6	14.6	8.8	79.2	13.5	10.0

Cn= Concentración de glucosa (mg/dl de mezcla de reacción)

Cs= Consumo de glucosa a los 30 y 60 min, respectivamente (mg/dl de mezcla de reacción)

Vel = Velocidad de consumo de glucosa en el primer y segundo intervalo de 30 min, respectivamente (ug/ml de eritrocitos, min).

**TABLA 13. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE D-GLUCOSA  
DISUELTA EN SOLUCION ISOTONICA DE FOSFATOS SOBRE LA  
ACTIVIDAD NADasa ALCALINA DE LOS ERITROCITOS LAVADOS DE  
SANGRE HUMANA**

<i>TUBO núm.</i>	<i>D-glucosa</i>		<i>pH</i>	<i>NAD-asa Actividad especifica</i>	<i>Incremento sobre la Actividad basal al tiempo cero</i>
	<i>(mg/dl)</i>	<i>(mM)</i>			
1	0	0	8.05	20	-
2	3.2	0.18	8.03	30	10
3	7.6	0.42	8.02	34	14
4	11.0	0.63	8.01	34	14
5	15.0	0.85	8.01	32	12
6	33.0	1.9	8.03	33	13
7	49.0	2.7	8.02	33	13
8	64.0	3.6	8.03	33	13
9	81.0	4.5	8.00	35	15
10	105.0	5.8	8.00	35	15
11	132.0	7.3	8.00	36	16

Tiempo de incubación 10 min a 37°C.

La actividad específica en el medio ácido (pH 6.65) de los eritrocitos suspendidos en solución de fosfatos isotónica sin glucosa fue 21.

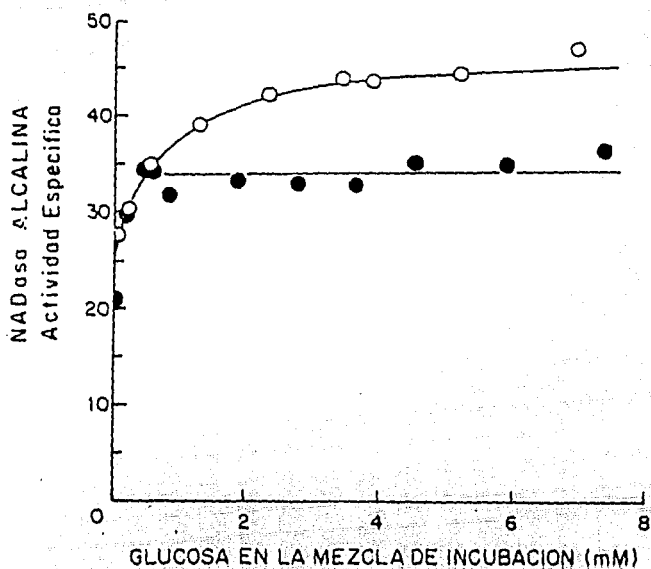


Fig. 1. Respuesta de la actividad NADasa alcalina de los eritrocitos humanos a concentraciones crecientes de D-glucosa (○) y a volúmenes también crecientes de extracto térmico preparado de plasma (●)

**TABLA 14. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA CONTENIDA EN EL EXTRACTO TERMICO DE PLASMA SOBRE LA ACTIVIDAD NADasa ALCALINA DE LOS ERITROCITOS LAVADOS DE SANGRE HUMANA**

<i>Tubo núm.</i>	<i>D-glucosa en el extracto L.</i>		<i>NADasa</i>		<i>Incremento sobre la actividad basal al tiempo cero</i>
	<i>(mg/dl)</i>	<i>(mM)</i>	<i>pH</i>	<i>Actividad esp.</i>	
1	0	0	8.04	20	-
2	4.3	0.24	8.02	30	10
3	9.6	0.53	8.04	35	15
4	23.0	1.3	8.10	39	19
5	42.0	2.3	8.10	42	22
6	61.0	3.4	8.08	44	24
7	69.0	3.8	8.09	44	24
8	93.0	5.1	8.12	45	25
9	124.0	6.9	8.12	47	27

Tiempo de incubación 10 min a 37°C

La actividad específica en el medio ácido (pH 6.58) fue 22.

**TABLA 15. EFECTO DE LA HEMOLISIS SOBRE LA RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD NADasa DE LOS ERITROCITOS A LA PRESENCIA DE D-GLUCOSA EN EL MEDIO DE INCUBACION**

Exp. núm.	<i>NADasa</i>					
	<i>Sin glucosa</i>		<i>Con D-glucosa</i>		<i>Diferencia</i>	
	<i>pH</i>	<i>Actividad</i>	<i>pH</i>	<i>Actividad</i>	<i>Absoluta</i>	<i>por ciento (%)</i>
<i>Mezcla de incubación</i>						
<b>Eritrocitos intactos</b>						
1	7.79	15.0	7.79	23.0	8.0	53.0
2	7.80	9.4	7.82	13.0	3.6	38.0
3	7.80	14.0	7.81	19.0	5.0	36.0
4	7.79	17.0	7.80	21.0	4.0	23.0
<b>Eritrocitos Hemolizados</b>						
1	7.89	15.0	7.88	10.0	-5.0	-33.0
2	7.92	6.70	7.92	7.0	0.3	4.0
3	7.92	14.0	7.93	14.0	0	0
4	7.92	14.0	7.91	14.0	0	0

**TABLA 16. EFECTO DEL FLUORURO SOBRE LA ACTIVIDAD NADasa DE LOS ERITROCITOS LAVADOS DE SANGRE HUMANA**

<i>Medio de suspensión de los eritrocitos</i>	<i>Medio ácido</i>		<i>Medio Alcalino</i>	
	<i>pH</i>	<i>Actividad específica</i>	<i>pH</i>	<i>Actividad específica</i>
<u>Experimento A</u>				
Control (fosfatos)	6.72	25	7.88	29
D-Glucosa 5mM (en fosfatos)	6.70	26	7.85	35
D-Glucosa + NaF 3mM	6.68	28	7.85	31
<u>Experimento B</u>				
Control (fosfatos)	-	-	7.82	19
D-Glucosa 8mM (en fosfatos)	6.58	20	7.81	26
D-Glucosa + NaF 3mM	6.60	16	7.77	23
<u>Experimento C</u>				
Control (fosfatos)	6.61	16	7.72	16
D-Glucosa 5 mM (en fosfatos)	6.60	18	7.75	23
D-Glucosa + NaF 3mM	6.60	18	7.78	22

**TABLA 17. EFECTO DEL FLUORURO SOBRE EL CONSUMO DE D-GLUCOSA POR LOS ERITROCITOS, LAVADOS DE SANGRE HUMANA**

<i>Incubación a 37°C y pH 7.8</i>	<i>Velocidad de Consumo (<math>\mu\text{g}/\text{min. ml de eritrocitos}</math>)</i>	
	<i>D-Glucosa</i>	<i>Medios de incubación D-Glucosa + NaF</i>
	Experimento A	
0	0	-
15	11	0
60	8.4	0
	Experimento B	
0	0	-
15	9.2	0
60	6.7	0
	Experimento C	
0	0	-
15	21	0
60	9	0

Estos datos corresponden a las preparaciones a las que se refiere la tabla anterior.

**TABLA 18. EFECTO DEL ETANOL (USADO COMO SOLVENTE DE LA FLORETINA) SOBRE EL CONSUMO DE D-GLUCOSA Y SOBRE LA ACTIVIDAD NAD GLICOHIDROLASA DE LOS ERITROCITOS LAVADOS**

<i>Medio de suspensión de los eritrocitos</i>	<i>NADasa</i>		<i>Consumo de D-Glucosa (mg/dl mezcla, 30 min)</i>
	<i>pH</i>	<i>Actividad Específica</i>	
Sol. Fosfatos	7.81	12.0	-
Glucosa 3.3 mM en sol. de fosfatos	7.76	16.0	5.7
Glucosa 3.3 mM en sol. de fosfatos con etanol 1M.	7.78	17.0	5.7



**TABLA 19. CAMBIOS DE ABSORBANCIA PROVOCADOS POR LA PRESENCIA DE FLORETINA EN LA MEZCLA DE INCUBACION USADA PARA MEDIR EL NAD ENZIMATICAMENTE**

<i>Tiempo de la mezcla (min)</i>	<i>Absorbancia a 340 nm</i>	<i>Cambios de absorbancia en 30 min</i>	<i>Promedio de los cambios en 30 min</i>
0	0.561		
30	0.525	0.036	
60	0.500	0.025	0.030
90	0.472	0.028	

Se preparó una mezcla de incubación semejante a la usada para medir actividad NADasa, pero en la forma siguiente: 4.11 mg de floretina se disolvieron en 0.25 ml de etanol. A esta solución se le añadió 1.0 ml del amortiguador 0.3 M de fosfatos a pH 7.4, 1.50 ml de paquete de eritrocitos lavados y 0.25 ml de solución 6 mM de NAD (volumen 3 ml y concentración final de floretina 5 mM). Un mililitro de esta mezcla se vació sobre 1.0 ml de ácido perclórico al 8% y 0.5 ml del sobrenadante así obtenido se pasó a la cubeta del espectrofotómetro que contenía 1.0 ml del amortiguador usado para el sistema etanol-deshidrogenasa. No se añadió la deshidrogenasa y la absorbancia se empezó a registrar inmediatamente después de hacer la mezcla. La concentración de la floretina en esta mezcla fue 0.83 mM.

**TABLA 20. MEDICION DEL CONTENIDO DE NAD EN LA MUESTRA DE LA MEZCLA DE INCUBACION QUE CONTENIA FLORETINA**

<i>Tiempo de incubación a 37°C (min)</i>	<i>Absorbancia a 340 nm antes de añadir la alcohol deshidrogenasa</i>	
0	0.495	
30	0.472	

<i>Tiempo de la adición (min)</i>	<i>Absorbancia a 340 nm después de añadir la alcohol deshidrogenasa</i>	
	<i>Muestra 0 min</i>	<i>Muestra 30 min</i>
3	1.068	0.937
30	1.041	0.912
60	1.029	0.899

<i>Lecturas netas</i>	<i>Abs. con enzima</i>	<i>Abs. sin enzima</i>	<i>Diferencias</i>
3	0.573	0.465	0.108
30	0.546	0.440	0.106
60	0.534	0.427	0.107

**TABLA 21. INHIBICION CON FLORETINA DEL CONSUMO DE D-GLUCOSA Y DE LA ACTIVIDAD NAD GLICOHIDROLASA EN LOS ERITROCITOS LAVADOS**

Medio de suspensión de los eritrocitos	Exp. (núm)	Sin floretina			Con floretina		
		pH	Actividad específica <sup>a</sup>	Consumo de D-glucosa <sup>b</sup>	pH	NADasa Actividad específica <sup>a</sup>	Consumo de D-glucosa <sup>b</sup>
Sol. de fosfatos	1	7.81	12.0				
	2	7.82	10.0				
	3	7.75	11.0				
Glucosa 3.3 mM en sol. de fosfatos	1	7.76	16.0	5.7	7.74 <sup>c</sup>	12.0	0.84
	2	7.83	12.0	7.6	7.82 <sup>c</sup>	9.3	5.8
	3	7.71	14.0	11.0	7.73 <sup>d</sup>	8.6	1.3
Extracto térmico	1	-	-	-	-	-	-
	2	7.77	15.0	12.0	7.70 <sup>c</sup>	11.0	6.8
	3	7.71	17.0	9.7	7.62 <sup>d</sup>	9.5	0.9

a= nmol de NAD/min, ml de eritrocitos.

b= mg/dl de mezcla de reacción, 30 min

c=floretina 5 mM

d= floretina 12.5 mM

**TABLA 22. EFECTO DE LA CITOCALASINA B SOBRE EL CONSUMO DE D-GLUCOSA Y SOBRE LA ACTIVIDAD NAD GLICOHIDROLASA DE LOS ERITROCITOS LAVADOS**

<i>Medio de suspensión de los eritrocitos</i>	<i>NADasa</i>		<i>Consumo de D-Glucosa (mg/dl mezcla, 30 min)</i>
	<i>pH</i>	<i>Actividad especifica</i>	
Sol. de fosfatos	7.84	13.0	-
Citocalasina B 0.1 mM en sol. de fosfatos	7.86	14.0	-
D-glucosa 5 mM en sol. de fosfatos	7.82	26.0	12.0
Citocalasina B 0.1 mM. en sol de fosfatos con D-glucosa 5 mM	7.82	24.0	7.0

**TABLA 23. ACCION DE LA NICOTINAMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD NAD GLICOHIDROLASA Y SOBRE EL CONSUMO DE D-GLUCOSA EN ERITROCITOS LAVADOS INCUBADOS EN MEDIO ALCALINO (HEMATOCRITO 22.55%)**

<i>Medio de suspensión de los eritrocitos</i>	<i>NADasa</i>			<i>D-Glucosa</i>		
	<i>pH</i>	<i>Actividad específica</i>	<i>Inhibición (%)</i>	<i>Consumo<sup>a</sup></i>	<i>Velocidad<sup>b</sup></i>	<i>Inhibición (%)</i>
Sol. de fosfatos	7.73	9.4	-	-	-	-
D-glucosa 3.4 mM en sol. de fosfatos	7.67	12.0	0	6.25	9.3	0
+ Nam (M)						
0.01	7.69	4.1	66	5.5	8.2	2
0.05	7.68	3.2	73	6.1	9.1	2
0.10	7.64	2.3	81	6.1	9.1	2
0.15	7.65	1.9	84	4.6	6.8	27
0.20	7.60	0	100	1.3	1.9	80

a= Consumo (mg de glucosa/dl de mezcla de reacción).

b= Velocidad (ug de glucosa/ml de eritrocitos, min).

Incubación a 37°C y durante 30 min.

## 4.2 DISCUSION

La actividad NADasa de los eritrocitos incubados en presencia del extracto térmico, preparado del plasma, fue siempre mayor en el medio alcalino que en el ácido, independientemente de la composición química del anticoagulante utilizado para recibir la sangre del donador. Esto último demuestra que el incremento de la actividad NADasa observado en presencia de la preparación semipurificada del plasma sanguíneo, que llamamos extracto térmico, no se debe a alguno de los componentes de las soluciones anticoagulantes sino a los del extracto térmico, ya que dicho incremento no se observó en los eritrocitos resuspendidos en la simple solución isotónica de fosfatos y cualquiera que hubiese sido el anticoagulante usado (tablas 1, 2 y 3). En la actualidad sabemos que casi la mitad de este incremento lo produce la D-glucosa presente en el extracto térmico y la otra mitad parece ser debida a supuestos péptidos presentes también en el extracto térmico. (30).

La mayor actividad NADasa alcalina observada cuando los eritrocitos lavados fueron resuspendidos en extracto térmico, comparada con la actividad medida en muestras de sangre total de la cual provenían, parece deberse a dos circunstancias: una, se sabe que los eritrocitos de sangre que tiene algunos días de almacenada, luego que son lavados muestran una mayor actividad NADasa alcalina cuando son nuevamente suspendidos en su plasma original y otra, que el plasma de diferentes donadores provoca incrementos de diferente valor en los eritrocitos de un mismo donador; probablemente porque la concentración de los componentes del plasma que incrementan a la NADasa alcalina, en particular los componentes que no son glucosa, están a diferente concentración en los diversos donadores (29); en el experimento que aquí se presenta concurren las dos circunstancias, la sangre había sido almacenada algunos días y los eritrocitos, una vez lavados, se resuspendieron en el extracto térmico preparado del plasma de un donador diferente (tablas 1, 2 y 3).

Los diversos componentes del plasma incrementaron la actividad NADasa solamente cuando los eritrocitos fueron incubados en un medio alcalino (pH alrededor de 8) y no cuando el medio era ácido (pH alrededor de 6.6) (tabla 4).

El lavado de los eritrocitos, preparados de sangre humana almacenada, no sólo sirvió para restaurar la capacidad de la NADasa para responder, en el medio alcalino, a los componentes del plasma, sino también para extraerles la glucosa que contenían. Consideramos que siempre es conveniente determinar, en cada preparación de eritrocitos, el contenido de glucosa al final de la serie de lavados, en vista de que en algunos casos bastan tres, pero en otros es necesario más de cuatro lavados y también es frecuente que no se logre con los solos lavados reducir a cero el contenido de glucosa (tabla 5).

Para determinar el contenido de glucosa en las suspensiones de los eritrocitos, fue necesario eliminar las proteínas, especialmente la hemoglobina, por lo cual se utilizó un agente precipitante que fue el ácido perclórico. La cifra del contenido de glucosa que tenían los eritrocitos de una misma preparación, fue aparentemente mayor entre menos concentrado estaba el ácido perclórico y entre menos fuera el volumen de la muestra agregada a la mezcla de reactivos usada para determinar glucosa o sea entre más cercano se encontraba el valor del pH al valor óptimo (pH 7.5, según Sigma Chen. Co.) Esto revela que la capacidad amortiguadora de la mezcla de los reactivos usados en el equipo comercial, no fue suficiente para neutralizar la acidez del extracto preparado de los eritrocitos (tabla 6). El pH relativamente más bajo provocó el que la cifra de glucosa fuera aparentemente menor entre más se alejara el pH considerado considerado óptimo (tabla 7).

Por otra parte, el método utilizado para determinar la glucosa mostró que a partir de la concentración de 5 mg/dl y hacia cifras mayores, los resultados coincidían con las concentraciones de las soluciones preparadas con D-glucosa químicamente pura; mientras que a concentraciones menores las cifras fueron menores (tabla 8).

Los eritrocitos lavados que se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y a pH 7.8, en presencia de alrededor de 30 mg de D-glucosa por 100 mililitros (1.7 mM), consumieron glucosa en forma casi proporcional al tiempo de incubación, al menos durante los primeros sesenta minutos. Además el consumo de este azúcar fue directamente proporcional al número de eritrocitos presentes en la mezcla de incubación (tablas 9 y 10). A pH 7.8 el consumo de glucosa fue de 9 a  $10\ \mu\text{g}$  por minuto y por mililitro de eritrocitos, durante la primera hora de incubación, en cambio, los eritrocitos incubados a pH 6.7 apenas consumieron alrededor de  $0.8\ \mu\text{g}$  por minuto y por mililitro de eritrocitos (tabla 11).

El menor consumo de glucosa en el medio ácido pudiera deberse a que el transportador de la glucosa, la vía glicolítica o la de las pentosas, o estos tres procesos, sean menos eficientes en el pH ácido que en el alcalino (tabla 11).

Seitz (25) menciona que el consumo de glucosa por los eritrocitos humanos es 4.5 a 6.5 microgramos por minuto y por mililitro de células y Mollison (22) da una cifra similar ( $5.9\ \mu\text{g}$  por minuto y por mililitro de eritrocitos). Los valores que encontramos en nuestro trabajo fueron un poco mayores, esto probablemente se deba a dos causas: una es que usamos eritrocitos exhaustivamente lavados y otra que el pH del medio de incubación fue alrededor de 8. Sen y Widdas (26) encontraron que la transferencia máxima de glucosa en los eritrocitos, expresada por el valor de la constante K, disminuye cuando se disminuye el pH del medio de incubación. Sus experimentos los realizaron usando medios de incubación con valores de pH 5.4 y 8.4, a  $37^{\circ}\text{C}$ .

A la concentración 10 mM de D-glucosa, el flujo de entrada a los eritrocitos es de  $810\ \mu\text{g}$  por minuto y por mililitro de estas células (31). Esto significa que la velocidad de penetración de este azúcar es mucho mayor que la velocidad de consumo metabólico. Si relacionamos este dato del flujo de entrada con la velocidad de consumo que encontramos en las condiciones muy especiales de nuestros experimentos (9 a  $10\ \mu\text{g}$  por minuto y por mililitro), resulta que el flujo de entrada sería alrededor de 80 veces mayor que la velocidad de consumo.



Los eritrocitos mostraron una velocidad de consumo de D-glucosa a pH 7.8 y a 37°C, muy parecida, tanto a 30 como a 60 minutos de incubación y fue independiente de las concentraciones de glucosa en el medio de incubación, las cuales fueron entre 25 y 100 mg por decilitro (1.4 a 5.6 mM). Esto significa que la velocidad del metabolismo de la glucosa en el eritrocito es el factor limitante y no lo son, ni la velocidad de transporte ni el gradiente de concentración de la D-glucosa, entre el medio de incubación y el interior del eritrocito (tabla 12).

El incremento de la actividad NADasa alcalina provocado por la D-glucosa fue casi la mitad del provocado por el extracto térmico plásmatico (extracto que por supuesto contiene glucosa, entre otros componentes), por lo que, si los efectos son aditivos, el restante 50% se debe a componentes que no son glucosa y que en nuestro laboratorio encontramos que, supuestamente, son en su mayoría péptidos de bajo peso molecular (30). Otra cosa que hacemos notar, es que a bajas concentraciones de extracto térmico solamente la glucosa parece estimular a la actividad NADasa alcalina, en vista de que el efecto de los otros componentes del plasma sólo se hizo aparente a concentraciones de extracto térmico que contenían mas de 1.5 mM de glucosa (tabla 13 y 14) (fig. 1).

La actividad NADasa alcalina se conservó en los eritrocitos hemolizados; pero la enzima en esas condiciones no incrementó su actividad en respuesta a la adición de D-glucosa. Esto sugiere que para que ocurra dicha respuesta es necesario que la estructura de la membrana del eritrocito no esté alterada (tabla 15).

Se sabe que el ion fluoruro interrumpe la glicólisis al inhibir la enzima enolasa; pero también inhibe otras muchas enzimas (12). Se ha sugerido que además el fluoruro inhibe a la glicólisis indirectamente, al interrumpir la síntesis de ATP, el cual es necesario para el funcionamiento de la hexocinasa y de la fosfofructocinasa. Como en nuestros experimentos el fluoruro no inhibió la respuesta de la NADasa alcalina a la D-glucosa, concluimos que este incremento de la actividad enzimática no depende del funcionamiento de la vía glicolítica (tablas 16 y 17).

La floretina sólo es soluble en agua que contenga etanol. Nosotros demostramos que el etanol, a la concentración necesaria para mantener soluble a la floretina en la mezcla de incubación, no afectó el incremento de la actividad NADasa alcalina provocado por la presencia de D-glucosa ni el consumo de este azúcar (tabla 18).

La presencia de floretina modificó los valores habituales de la absorbancia en el sistema de medición del NAD que utilizamos; pero esta modificación no se reflejó al calcular la diferencia de las cifras de absorbancia; por lo cual fue posible cuantificar el NADH formado en la mezcla de incubación con la alcohol deshidrogenasa (tablas 19 y 20).

La floretina inhibió el consumo de D-glucosa y paralelamente evitó la respuesta de la NADasa alcalina a la presencia de D-glucosa (tabla 21). Estos resultados revelan una posible relación entre el funcionamiento de la proteína transportadora de la D-glucosa y la molécula de la enzima NADasa, ambas proteínas localizadas en la membrana del eritrocito (Tabla 21).

El otro inhibidor que utilizamos, la citocalasina B, a la concentración 0.1 mM, disminuyó el consumo de D-glucosa, pero no el incremento de la NADasa alcalina provocado por este azúcar. Es necesario utilizar la citocalasina B a mayores concentraciones, así como otros inhibidores del transporte de la D-glucosa, para tratar de corroborar la posible relación funcional entre el transportador de glucosa y la molécula de la NADasa (tabla 22).

El hecho de que la nicotinamida, que es un inhibidor conocido de la NADasa, haya disminuido en el eritrocito humano tanto la actividad de la NADasa como el consumo de D-glucosa, apoya la conclusión de que es posible que exista un nexo funcional entre estas dos proteínas (tabla 23).

# **CAPITULO**

## **V**

## CONCLUSIONES

Se analizaron experimentalmente los tres mecanismos hipotéticos que se plantearon, en esta tesis, para explicar el mecanismo de acción de la D-glucosa sobre el incremento de la actividad NADasa alcalina de los eritrocitos humanos.

Los datos obtenidos con la floretina, que es uno de los inhibidores del transportador de la D-glucosa, y con la nicotinamida, que inhibe a la NAD glicohidrolasa, así como el hecho de que el fluoruro, que inhibe la glucólisis, pero que no afectó a la actividad de la NADasa medida en el medio alcalino en presencia de glucosa, nos permiten concluir que el mecanismo, más probable, por el cual la D-glucosa incrementa la actividad alcalina de la NADasa de la membrana del eritrocito humano, es, que este azúcar al ser introducido al interior del eritrocito por el transportador, provoca un cambio de conformación en la molécula misma del transportador, cambio que a su vez causa una modificación en la conformación que la enzima NADasa tiene en el medio alcalino, traduciéndose estos cambios, finalmente, en mayor eficiencia catalítica de esta enzima membranar.

Es necesario proseguir este estudio utilizando distintas concentraciones de los inhibidores floretina y citochalasina B, respectivamente, para determinar con precisión la concentración mínima suficiente para causar la falta de respuesta de la NADasa alcalina a la D-glucosa. Así mismo, es necesario, para corroborar el efecto de estos inhibidores sobre la respuesta de la NADasa a la glucosa, utilizar otros tipos de inhibidores del transportador de la glucosa.

La sangre humana que se almacena en los bancos de los hospitales sufre cambios, muchos de los cuales se encuentran descritos en la literatura correspondiente; pero uno, que se demostró en el laboratorio en donde se realizó este estudio, es el que se manifiesta como la pérdida, durante el almacenamiento, de la respuesta de la enzima NADasa de la membrana de los eritrocitos a algunos de los componentes del plasma, entre ellos a la D-glucosa y supuestamente a algunos péptidos plasmáticos. Aunque por

el momento no sabemos qué trascendencia clínica pueda tener esta alteración, conviene estudiar el mecanismo por el cual estos componentes del plasma ejercen su acción sobre la enzima NADasa, con el objeto de que en el futuro se pueda impedir dicha alteración, mediante la adición de algún compuesto químico a la sangre que se va a almacenar.

Las mediciones espectrofotométricas utilizadas en el presente trabajo son un método analítico confiable, tanto para determinar la actividad de la enzima NADasa como la concentración de glucosa, dada la especificidad y la sensibilidad que caracteriza a estos métodos; por lo que su uso es habitual en los trabajos de investigación de laboratorio.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Ralf, M., Roberts, K., y Watson, J.D. Molecular Biology of the Cell, 2da. edición, pág. 303-304, Garland Pu., New York (1989).
- 2.- Alivisatos, S.G.A. y Denstedt, O.F. Lactic deshydrogenase and DPNase activity of blood. Science 114: 281-283 (1951).
- 3.- Alivisatos, S.G.A., Kashket S. y Denstedt O.F. The metabolism of the erythrocyte: IX.-Diphosphorydine nucleotidase of erythrocytes. Canad. J. Biochem 34: 46-60 (1956).
- 4.- Baldwin, J.M.; Lienhard, G.E. y Baldwin, S.A. The monosaccharide transport system of the human erythrocyte.- Orientation upon reconstitution. Biochim. Biophys. Acta 599: 699-7714 (1980).\*
- 5.- Basketter, D. A. y Widdas, W.F. Competitive inhibition if hexose transfer in human erythrocytes by cytochalasin B. J.Physiol. (London) 265: 39-40 (1977).
- 6.- Basketter, D.A. y Widdas, W.F. Asymmetry of the hexose transfer system in human erythrocytes. Comparison of the effects of cytochalasin B, phloretin and maltose as competitive inhibitors. J.Physiol. (London) 278: 389-401 (1978).
- 7.- Beutler, E. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods, 3a. Ed., pág. 8, Grune & Stratton, Inc., Orlando, FA. (1984).
- 8.- Devés, R. y Krupka, R.M. Cytochalasin B and the kinetics of inhibition of biological transport. A case of asymmetric binding to the glucose carrier. Biochim. Biophys. Acta 510: 339-348 (1978).

- 9.- Devlin, T.M. Biological Membranes: Structure and Membrane Transport, en el libro, Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, editor T.M. Devlyn, Capítulo 5, John Wiley & Sons, New York (1992).
- 10.- Dodge, J.T., Mithell, C. y Hanahan, D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 100: 119-130 (1963).
- 11.- Jain, M.K. Handbook of Enzyme Inhibitors (1965-1977), John Wiley & Sons, New York (1982).
- 12.- Jain, S.K. Hiperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells J. Biol. Chem. 264: 21340-21345 (1989).
- 13.- Jennings, M.L. y Solomon, A.K. Interaction between phloretin and the red blood cell membrane. J. Gen. Physiol. 67: 381-397 (1976).
- 14.- Jones, M.N. y Nickson, J.K. Monosaccharide transport proteins of the human erythrocyte membrane. Biochim Biophys. Acta 650: 1-20 (1981).
- 15.- Kaplan, N.O., Colowick, S.P. y Nason, A. Neurospora diphosphopyridine nucleotidase. J. Biol. Chem. 191: 473-483 (1951).
- 16.- Krukpa, R.M. Asymmetrical binding of phloretin to the glucose transport system of human erythrocyte. J. Membrane Biol. 83: 71-80 (1985).
- 17.- Lee, M., Yang, S., Park, B. y Kim, D. Inactivation of erythrocyte membrane bound NAD glycohydrolase by lysine-modifying reagent. Korean J. Biochem. 20: 1-8 (1988).

- 18.- LeFevre, P.G. Molecular structural factors in competitive inhibition of sugar transport. Science 130: 104-105 (1959).
- 19.- Lehninger, A.L. Principles of Biochemistry, Worth Publishers Inc., New York (1982).
- 20.- Méndez G.A. Algunas características cinéticas de la enzima NAD glicohidrolasa, en fantasmas de eritrocitos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. Edmundo Calva y la Dra. Rosario Núñez, CINVESTAV (1985).
- 21.- Zocoli, M.A., Baldwin S:A. y Lienhard, G.E.: The monosaccharide transport system of the human erythrocyte. J. Biol. Chem. 253: 6923-6930 (1978).
- 22.- Mollison, P.L. Blood Transfusion in Clinical Medicine, pág. 49., 3a. Edición, Blackell Scientific Publications, Oxford (1972).
- 23.- Ng, W.G., Donnell, G.N. y Bergren, W.R. Deficiency of erythrocyte nicotinamide adenine dinucleotide nucleosidase (NADasa) activity in the negro. Nature 217: 64-65 (1968).
- 24.- Pekala, P.H. y Anderson, B.M. Non-Oxidation-Reduction Reactions of Pyridine Nucleotides, en el libro, The Pyridine Nucleotide Coenzymes, editado por J. Everse, B; Anderson y Kwan-Sa You. Cap. 10, parte X, p. 352-367, Academic Press, New York (1982).
- 25.- Seitz J.F. The biochemistry of the cells of blood and bone marrow. 3a. Edición, pág. 15, Charles C. Thomas Publisher U.S.A. (1969).



- 26.- Sen, A.K. y Widdas, W.F. Determination of the temperature and pH dependence of glucose transfer across the human erythrocyte membrane measured by glucose exit. J. Physiol. London 160: 392-403 (1962).
- 27.- Slama, J.T. y Simmons, A.M. Synthesis and properties of photolabile labels for the pyridine dinucleotide binding site of NAD glycohydrolase. Biochemistry 30: 2527-2534 (1991).
- 28.- Taylor, N.F. y Gagneja, G.L. A model for the mode of action of cytochalasin B inhibition of D-glucose transport in the human erythrocyte. Can. J. Biochem. 53: 1078-1084 (1975).
- 29.- Urban, M.C. Caracterización de los factores del plasma responsables de la activación de la NAD glicohidrolasa de los glóbulos rojos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. Edmundo Calva y de la Dra. Rosario Núñez, en el Departamento de Bioquímica del CINVESTAV (1989).
- 30.- Valencia, C. Identificación de los componentes del plasma humano que activan a la NAD glicohidrolasa del eritrocito humano. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en la especialidad de bioquímica, CINVESTAV-IPN. Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica bajo la dirección del Dr. Edmundo Calva (1994).
- 31.- Whittam, R. Transport and Diffusion in Red Blood Cells, Edward Arnold Pu., London (1964).
- 32.- Widdas, W.F. Old and new concepts of the membrane transport for glucose in cells. Biochim. Biophys. Acta. 947: 385-404 (1988).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## APENDICE

### SOLUCION UTILIZADA PARA RECIBIR LA SANGRE.

Anticoagulante CPDA-1 (Citrato-fosfato-dextrosa-adenina) (Beutler, 1984; pág. 8). Se pesaron 3.27 g de ácido cítrico ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ), 26.30 g de citrato de sodio ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ ), 31.90 g de dextrosa ( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ ), 2.22 g de fosfato monosódico ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ), 0.275 g de adenina y se disolvieron en agua bidestilada para obtener 1000 ml.

### SOLUCION UTILIZADA PARA LAVAR LOS ERITROCITOS.

Solución idealmente isotónica de fosfatos (310 mOsm ideal) (Dodge, Mitchell y Hanahan, 1963) (solución de Dodge).- Se pesaron 14.62 g de  $Na_2HPO_4$  y se disolvieron en 1000 ml de agua bidestilada (0.103 M) (solución alcalina). Por otra parte se pesaron 5.348 g de  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  y se disolvieron en 250 ml de agua bidestilada (0.1.55 M) (solución ácida).

La solución isotónica de Dodge (310 miliosmolal) se preparó agregando a los 1000 ml de la solución alcalina un volumen suficiente de la solución ácida para obtener un pH de 7.40 a temperatura ambiente.

### SOLUCIONES UTILIZADAS EN EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD NADasa.

1.- Amortiguador de fosfatos 0.30 M a pH 6.10-6.28.- A una solución 0.30 M de  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (solución ácida) se le añadió el volumen necesario de solución de  $Na_2HPO_4 \cdot 0.30 M$  (solución alcalina) para obtener un pH alrededor de 6.2 a temperatura ambiente.

2.- Amortiguador de fosfatos 0.30 M a pH 8.70-8.93.- A una solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.30 M (solución alcalina) se le agregó la cantidad necesaria de solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (solución ácida) para disminuir el pH aproximadamente a 8.8 a temperatura ambiente.

3.- Solución isotónica de cloruro de sodio.- Se disolvieron 8.5 g de NaCl en agua y se completó el volumen a un litro.

4.- Solución a pH entre 7.0 y 7.4 de NAD 6mM en agua.- Se pesaron 48 mg de NAD (Sigma N-7004) y se disolvieron en 7 ml de agua. El pH se ajustó entre 7.0-7.4 a temperatura ambiente con NaOH 0.1 N. Al final el volumen se completó a 10 ml.

#### **SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA MEDICIÓN ENZIMÁTICA DEL NAD.**

1.- Solución de deshidrogenasa alcohólica con 1000 unidades por mililitro.- La solución concentrada preparada con 10,000 unidades/ml (Sigma A-7011 disuelto en 3 ml de agua estéril) se diluyó 1:10 con la solución isotónica de NaCl. Esta dilución se conservó en el refrigerador hasta por una semana y se centrifugó antes de usarse si estaba turbia (1 a 2 mm a 900 x g (2600 rpm) en la centrifuga clínica)

2.- Amortiguador para la mezcla de reacción de la deshidrogenasa alcohólica.- Se disolvieron 18.16 g de Trizma Base (Sigma T-1503) en unos 150 ml de agua y se vaciaron cuantitativamente a una matraz volumétrico de 250 ml. Luego se añadieron 14.7 ml de etanol absoluto (Merek 15833) y se completó el volumen con agua. El pH final de esta solución fue 10.8 aproximadamente a temperatura ambiente