



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
PRESENTA**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ALGUNAS CARACTERISTICAS CINETICAS  
DE LA ENZIMA NAD-GLICOHIDROLASA EN  
FANTASMAS DE ERITROCITOS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O**

**GRACIELA AURORA MENDEZ RAMIREZ**

**MEXICO, D. F. 1985**



## **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.

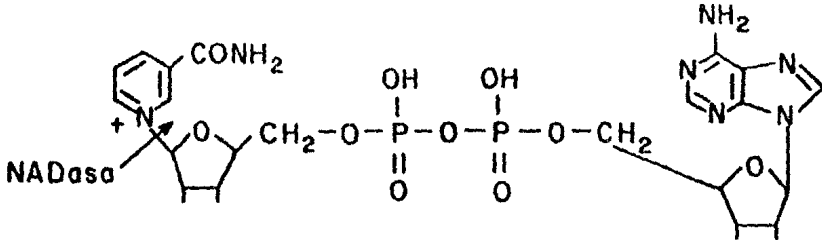
## INDICE

	pág
INTRODUCCION .....	1
ANTECEDENTES .....	1
PROPOSITOS .....	3
MATERIALES	
Reactivos .....	5
Soluciones .....	6
METODOLOGIA	
Obtención de la sangre .....	13
Medición del hematocrito .....	14
Obtención de glóbulos rojos lavados .....	15
Preparación de fantasmas de eritrocitos .....	15
Incubación para determinar la actividad NADasa .....	16
Medición del NAD	
A. Deshidrogenasa alcohólica .....	18
B. Cianuro de potasio .....	22
Determinación de proteínas .....	24
RESULTADOS	
Velocidad de la degradación del NAD catalizada por la sangre total y por los glóbulos rojos lavados .....	28
Efecto de la nicotinamida sobre la degradación del - NAD catalizada por los glóbulos rojos lavados .....	31

<b>Estabilidad del NAD durante la incubación sin enzima</b>	
a. Incubación a diferentes valores de pH desde 6.34 hasta 8.90 durante 30 min a 37°C .....	35
b. Incubación a diferentes temperaturas desde 15 hasta 45°C y a dos valores de pH de 6.6 y 7.6 .....	35
<b>Comparación de la degradación del NAD catalizada por la sangre total, los glóbulos rojos lavados y los fantasmas de eritrocitos</b>	
a. Incubación a pH alrededor de 6.60 .....	39
b. Incubación a pH alrededor de 7.60 .....	41
<b>Efecto del pH sobre la degradación del NAD catalizada por la sangre total, los glóbulos rojos lavados y los fantasmas de eritrocitos</b>	
a. Sangre total .....	44
b. Suspensión de glóbulos rojos lavados .....	44
c. Suspensión de fantasmas de glóbulos rojos lavados .....	45
<b>Comparación de la degradación del NAD a pH 6.6 y a pH 7.8 catalizada por la sangre total, los glóbulos rojos lavados y los fantasmas de eritrocitos</b>	
a. Datos tomados de los experimentos a diferentes temperaturas .....	55

## INTRODUCCION

La hidrólisis del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) es catalizada, entre otras enzimas, por la NAD glicohidrolasa (NAD nucleosidasa) (EC 3.2.2.5 y EC 3.2.2.6) (NADasa) que actúa rompiendo el enlace  $\beta$ -N-glicosídico que une el anillo de la nicotinamida con la porción ADPrribosa:



La actividad de esta enzima se puede determinar midiendo la cantidad de NAD que se degrada durante el tiempo de incubación y la concentración del dinucleótido en las muestras se obtiene reduciéndolo a NADH, con etanol en presencia de deshidrogenasa alcohólica o formando un complejo con KCN.

## ANTECEDENTES

Los primeros investigadores que demostraron en la sangre humana la presencia de la enzima NAD glicohidrolasa fueron Alivisatos y Denstedt (1951). Los glóbulos rojos lavados y los fantasmas, o estroma, preparados de los eritrocitos hemolizados por enfriamiento y descongelación, conservan esta actividad; pero no se le encuentra en el líquido del hemolizado libre de fantasmas ni tampoco en el suero. Al parecer la enzima está distribuida en la superficie externa de los glóbulos rojos y

la membrana de los mismos no es permeable al NAD. Unos años más tarde, Dickerman y Stolzenbach (1957) lograron extraer en forma soluble las actividades NAD glicohidrolasa, NADP glicohidrolasa y nicotinamida mononucleótido glicohidrolasa de los fantasmas de eritrocitos de sangre humana. Después, Grossman y Kaplan (1958) confirmaron la presencia de la actividad NADasa en los glóbulos rojos humanos y en los fantasmas desprovistos de contenido citoplásmico; estos últimos los prepararon por enfriamiento de los eritrocitos en un baño de acetona y hielo seco, seguido de descongelación y adición de agua destilada fría y finalmente los obtuvieron por centrifugación a 100,000 xg durante 30 min. En el trabajo de Hofmann y Noll (1961) se encuentran datos de la actividad NADasa en eritrocitos lavados íntegros y en los hemolizados preparados de sangre humana normal. Ravazzolo, Bruzzone, Garré y Ajmar (1976), extrajeron en forma soluble la enzima de la membrana del eritrocito humano usando Tritón-X 100 y mercaptoetanol y la purificaron parcialmente precipitándola con sulfato de amonio. Estudiaron la termoestabilidad de esta preparación y también determinaron la constante de Michaelis para el NAD. Solti y Friedrich (1979) demostraron que la actividad NAD glicohidrolasa se conserva en la preparación de glóbulos rojos de sangre humana, después de someterlos a la acción de un desintegrador ultrasónico. Goodman, Wyatt, Trepel y Neckers (1982), comprobaron que la enzima está localizada en

la superficie externa de la membrana de los glóbulos rojos de sangre humana y que el valor de la constante de Michaelis para el NAD es muy parecida entre los eritrocitos de varios mamíferos incluyendo al hombre; mientras que la velocidad máxima en los glóbulos rojos humanos es la más baja. Esto último lo explican, suponiendo que la membrana del eritrocito humano contiene un número relativamente bajo de estas moléculas, en comparación con los glóbulos rojos de otros animales.

En conclusión, se ha demostrado la presencia de la enzima NAD glicohidrolasa en la sangre humana total, en los glóbulos rojos intactos o hemolizados y en los fantasmas obtenidos de los eritrocitos humanos y se ha logrado extraerla en forma soluble. Se conocen algunas características cinéticas y termodinámicas de la enzima en los eritrocitos humanos, pero no se sabe si estas características se modifican al separar los glóbulos rojos de su plasma, al eliminarles el contenido citoplásmico o cuando se tiene la enzima en solución libre de otros componentes membranales.

### PROPOSITOS

El propósito del presente trabajo es comparar algunos aspectos de la actividad NADasa de la sangre humana total con la de los glóbulos rojos intactos y con la de los fantasmas. En particular, se estudiará la respuesta de esta enzima a dife-

rentes concentraciones de iones hidrógeno y a diversas temperaturas de incubación.

Se pretende contribuir así al conocimiento de la estabilidad o labilidad de la enzima de los glóbulos rojos humanos, durante los procesos de purificación.



## MATERIALES

### REACTIVOS

NOTA: La cifra entre paréntesis es el peso molecular del re-  
activo e incluye la pureza y las moléculas de agua de cristaliza-  
ción, según sea el caso.

1. Heparina sódica, Lipo-Hepin, Riker, S.A., México, 5,000 unidades de heparina sódica por mililitro.
2. NaCl, Merck 206404 (58.44)
3.  $\beta$ -NAD, Sigma N-7004, 98% de pureza con  $3H_2O$  (732.2)
4. Acido perclórico, Baker 9652, 70%, peso específico 1.67
5. Trizma-base, Sigma T-1503 (121.1)
6. Etanol absoluto, Merck 1/5853, 99.8%, densidad 0.79 (46.07)
7. Alcohol deshidrogenasa, Sigma A-7011, 30,000 unidades
8. Nicotinamida, Calbiochem 4813 (122.1)
9. Acido cítrico-monohidratado, Merck 244 (210)
10. EDTA, Sigma ED 2SS, sal disódica (336.2)
11. Fosfato monosódico monohidratado, Merck 206346 (138)
12. Fosfato disódico, Merck 206586 (142)
13. Glucosa (dextrosa), Sigma G5000 (180.2)
14. Citrato trisódico, Baker 3646, 99.26% con  $2H_2O$  (294)
15. KCN, Baker 3080, 96% (67.8)
16. Trietanolamina, Sigma T-1502 (185.6)
17.  $K_2CO_3$ , Baker M-33565, con 1  $H_2O$  (165)

18.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Baker 3692, 99.9% (106)
19. Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, Baker 3262, con  $4\text{H}_2\text{O}$ , 99.4% (282)
20. Reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu, Sigma, Lote 1082
21. Albúmina de suero de bovino, Sigma A-4378
22. Sulfato cúprico, Baker 1843, con  $5\text{H}_2\text{O}$  (250)
23. Siliclad, Clay Adams 1950

### SOLUCIONES

1. Solución anticoagulante de heparina (2,000 u/ml).- Se diluyen 0.20 ml de Lipo-Hepin con 0.30 ml de solución salina isotónica de NaCl.  

Se emplean 0.010 ml de esta dilución por cada 2 ml de sangre o sean 10 unidades por mililitro.
2. Solución anticoagulante ACD (fórmula A).- Se pesan 0.800 g de ácido cítrico monohidratado, 2.450 g de glucosa y 2.200 g de citrato trisódico. Se disuelven con agua bidestilada y se llevan a un volumen final de 100 ml (Farmacopea Nacional de los E.U.M., 1974).  

Se utiliza en la proporción de 75 ml de solución para 500 ml de sangre.
3. Solución salina de NaCl 0.85% (P/V).- Se disuelven 8.50 g de NaCl en agua bidestilada y se completa el volumen a un litro.

4. NAD 6 mM.- Se pesan 0,0480 g de  $\beta$ -NAD, se disuelven en unos 6 ml de solución salina isotónica. El pH se ajusta entre 6.5 y 7.5 con unos 0.9 ml de NaOH aproximadamente 0.1 N y se completa después el volumen a 10 ml en un frasco volumétrico.
5. Acido perclórico al 10 y 15% (P/V).- Se miden 21.50 y 32.25 ml de ácido perclórico al 70% (P/P) y se llevan a un volumen final de 250 ml con agua bidestilada en ambos casos.
6. Solución con amortiguador y sustrato para la deshidrogenasa alcohólica (Tris 0.6 M y etanol 1 M).- Se pesan 18.16 g de Trizma-base y se disuelven en agua bidestilada. Se agregan 14.70 ml de etanol absoluto y se completa el volumen a 250 ml con agua bidestilada.

El pH final de esta mezcla resulta 10.8 aproximadamente.

7. Dilución de deshidrogenasa alcohólica (1,000 unidades/ml).- Al frasco que contiene 30,000 unidades, se le agregan 3 ml de agua previamente hervida y fría, para tener 10,000 unidades por mililitro y una vez hecha la solución se guarda en el refrigerador. Cuando se va a utilizar se hace una dilución 1:10 con NaCl isotónico para tener 1,000 unidades en un mililitro. Esta dilución se centrifuga a temperatura ambiente durante 1 min a 2,600 rpm (900 xg). La actividad de la enzima así diluida es estable al menos una semana si se mantiene en refrigeración.

8. Amortiguadores isosmóticos de fosfatos, aproximadamente 0.310 osmolar a pH 6.45, 7.40, 8.15 y 8.70, respectivamente.-

Se preparan por separado las siguientes soluciones:

- a. 500 ml de fosfato disódico 0.103 M.- Se pesan - 7.311 g del fosfato, se disuelven con agua bidestilada y se lleva a un volumen de 500 ml.
- b. 100 ml de fosfato monosódico 0.155 M.- Se pesan 2.139 g del fosfato y se completa el volumen a 100 ml.

A la solución de 500 ml de fosfato disódico, que tiene un pH alrededor de 9, se le añade poco a poco la cantidad necesaria de la solución de fosfato monosódico para obtener el pH deseado.

Este amortiguador se mantiene en refrigeración.

9. Amortiguador 0.3 M citrato-0.3 M fosfato a diferentes valores de pH.- Se pesan 12.61 g de ácido cítrico monohidratado y 8.518 g de fosfato disódico, se disuelven juntos con agua bidestilada y se completa el volumen a 100 ml.

Se vacían 10 ml de esta solución a un vaso de precipitados y se ajusta al pH deseado, ya sea con NaOH o con HCl; por último se completa a 20 ml con agua bidestilada.

10. Amortiguador 0.3 M Tris-0.3 M fosfato a diferentes valores de pH.- Se pesan 8.517 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 7.266 g de Trizma-base, se disuelven juntos con agua bidestilada y se completa el volumen a 100 ml (solución 0.6 M).

Se vacían 10 ml de esta dilución a un vaso de precipitados y se ajusta al pH deseado, empleando NaOH o HCl; por último se añade agua bidestilada hasta tener 20 ml.

11. Amortiguador de fosfatos 0.6 M a diferentes valores de pH.-

Se preparan por separado las siguientes soluciones:

- a. 100 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.6 M .- Se pesan 8.518 g del fosfato, se disuelve en agua bidestilada y se completa a 100 ml.
- b. 25 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.6 M .- Se pesan 2.070 g del fosfato, se disuelve en agua bidestilada y se completa a 25 ml.

A los 100 ml de la solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  se le añade el volumen que se requiera de la solución  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  para llevarlo al pH deseado.

12. Amortiguador de fosfatos 0.5 M a pH 7.40.- Se preparan por separado las siguientes soluciones:

- a. 100 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.5 M.- Se pesan 6.90 g del fosfato, se disuelve en agua bidestilada y se completa a 100 ml.
- b. 100 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 M.- Se pesan 7.10 g del fosfato disódico, se disuelve en agua bidestilada y se completa a 100 ml.

A los 100 ml de la solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  se le añade el volumen que se requiera de la solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  para llevarla al pH de 7.40.

13. Amortiguador hiposmótico de fosfatos aproximadamente 0.020 osmolar a pH 7.40.- Se preparan por separado las siguientes soluciones:

a. 500 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.010 M.- Se pesan 0.690 g del fosfato monosódico, se disuelve en agua bidestilada y se completa a 500 ml.

b. 1,000 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.0066 M.- Se pesan 0.938 g del fosfato disódico, se disuelve en agua bidestilada y se completa a 1,000 ml.

A los 1,000 ml de la solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  se le añaden aproximadamente 245 ml de la solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  para obtener el pH 7.40.

14. Soluciones de nicotinamida 0.6 M a pH 7.40 y pH 8.70.- Se pesan 0.7326 g de nicotinamida, se disuelven en aproximadamente 5 ml de agua bidestilada, se ajusta al pH deseado y se añade agua para tener un volumen de 10 ml.

15. Solución EDTA 60 mM.- Se pesan 0.2017 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , se disuelven en aproximadamente 5 ml de agua bidestilada, se ajusta al pH deseado y se completa hasta un volumen de 10 ml.

16. Trietanolamina 1 M.- Se pesan 18.56 g y se disuelven en agua bidestilada para tener un volumen final de 100 ml.

17.  $\text{K}_2\text{CO}_3$  5 M.- Se pesan 82.60 g y se disuelven en agua bidestilada para un volumen final de 100 ml.

18. Reactivos para la determinación de proteínas:

- a. Solución A.- Se disuelven 20.00 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 4.00 g de NaOH, 0.200 g de tartrato de sodio y potasio en agua bidestilada y se llevan a 1,000 ml.
- b. Solución B.- Se pesan 5.00 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , se disuelven y se llevan a 1,000 ml con agua bidestilada.
- c. Solución C.- Se prepara inmediatamente antes de usarse, agregando 1.0 ml de la solución B a 50 ml de la solución A.
- d. Dilución del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu.- Se hace una dilución 1:2.6 del reactivo concentrado de Folin con agua bidestilada. Se prepara inmediatamente antes de usarse (por ejemplo, 3.5 ml del reactivo más 5.6 ml de agua).
- e. Solución concentrada de albúmina (400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).- Se pesan 0.0100 g de albúmina, se disuelven y se llevan a 25 ml con solución salina 0.85%. Se mantiene en refrigeración.
- f. Solución tipo de albúmina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).- Se ponen 1.25 ml de la solución concentrada de albúmina en un matraz volumétrico de 10 ml y se completa el volumen con solución salina la 0.85%.

19. Dilución de Siliclad, para siliconizar el material de vidrio que estará en contacto con la sangre.- Se diluye 1 parte de Siliclad concentrado en 100 partes de agua bidestilada.

Los tubos o matraces de vidrio se lavan muy bien con agua bidestilada, después se llenan con la dilución de siliclad y se dejan durante 5 a 10 seg. Finalmente, se lavan repetidas veces con agua bidestilada.



## METODOLOGIA

### OBTENCION DE LA SANGRE

#### a. Donadores en el laboratorio

Las personas que se prestaron voluntariamente para donar sangre estaban en ayunas y eran supuestamente sanas.

La sangre se extraía de una de las venas del antebrazo con aguja siliconizada calibre 19 del equipo Asepto B-D.

Inicialmente se conectaba el tubo de salida de este equipo a una jeringa de vidrio de 5 ml también siliconizada y a la que previamente se le había puesto el volumen conveniente de la dilución de heparina (0.010 ml) para extraer 2 ml de sangre. Esta muestra se mezclaba y a continuación se usaba para determinar el hematocrito. En seguida, el tubo del equipo B-D se conectaba a otra jeringa de vidrio siliconizada, pero de 20 ml sin anticoagulante y la sangre extraída se vaciaba de inmediato en un tubo de policarbonato de 103 x 28.7 mm (A.H. Thomas 2610-D18) (50 ml de capacidad) que contenía la cantidad apropiada del anticoagulante ACD (3 ml). El tubo tapado con parafilm se invertía repetidas veces para hacer la mezcla.

En caso de necesitarse un volumen mayor de sangre, se repetía la extracción a través del tubo del equipo B-D, usando cada vez una jeringa de 20 ml limpia y seca.

b. Banco de sangre

El Banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez nos proporcionó bolsas que contenían 500 ml de sangre total con 70 ml de anticoagulante CPD (ácido cítrico 327 mg, citrato trisódico 2.63 g, fosfato sódico monobásico 222 mg y dextrosa 2.55 g - reactivos FNEUM - en 100 ml).

La sangre había sido extraída de los donadores 20 días antes y por lo mismo ya no era utilizable clínicamente.

MEDICION DEL HEMATOCRITO

El hematocrito se determinaba siempre tanto en la sangre total con heparina como en las diversas suspensiones de glóbulos rojos lavados.

En todos los casos se mezclaba muy bien la sangre o la sus pensión de glóbulos rojos y en seguida se llenaban los tubos para hematocrito Wintrobe con 1 ml de la muestra usando la - aguja especial.

Los tubos tapados con parafilm se centrifugaban a 2,600 rpm (900 xg), durante 30 min a temperatura ambiente, en la centrífuga clínica Chriss.

## OBTENCION DE GLOBULOS ROJOS LAVADOS

(Técnica de Dodge, Mitchell y Hanahan, 1963)

La sangre mezclada con el anticoagulante ACD se centrifugaba durante 20 min a 4°C y a 4,000 rpm (1,000 xg), en el rotor SS34 de la centrífuga Sorvall.

El plasma se separaba empleando un succionador de agua y luego con una pipeta Pasteur se eliminaba el plasma residual junto con la capa superficial de leucocitos y plaquetas y algunos glóbulos rojos de la porción subyacente.

El paquete de eritrocitos se lavaba 3 veces en la siguiente forma: se le añadía un volumen igual del amortiguador de fosfatos isosmolar de pH 7.40, se resuspendía con cuidado la mezcla invirtiendo el tubo unas 10 ó 15 veces y se centrifugaba a 4,000 rpm (1,000 xg) durante 20 min en frío. Al final, con una pipeta Pasteur se eliminaba el sobrenadante y la parte superior del paquete de eritrocitos.

Todos los paquetes de eritrocitos se vaciaban en un matraz siliconizado y se resuspendían en un volumen de amortiguador isosmolar frío igual al del total de los sedimentos.

## PREPARACION DE FANTASMAS DE ERITROCITOS

(Técnica de Dodge, Mitchell y Hanahan, 1963)

Se denominan fantasmas, estroma, membranas, envolturas o residuo post-hemolítico a los eritrocitos sometidos a choque

osmótico que han perdido la mayor parte de la hemoglobina y que al ponerlos en solución isosmótica recobran su forma biconcava original (Harris, 1963).

La hemólisis de los eritrocitos recién lavados se provocaba en la forma siguiente: se vaciaban 2 ml de la suspensión de glóbulos rojos en 28 ml del amortiguador hipotónico 20 mM a pH de 7.40 conservado en la heladera y luego de mezclar bien se dejaba la mezcla en reposo 30 min. Posteriormente se centrifugaban a 15,000 rpm (20,000 xg) durante 40 min, en el rotor SS34 de la Sorvall.

El sobrenadante se decantaba con cuidado y el sedimento de fantasmas de eritrocitos se resuspendía añadiendo más amortiguador hasta reconstituir el volumen original de 30 ml.

Los fantasmas se lavaban tres veces más en esta forma y al final el sobrenadante quedaba incoloro. El sedimento se resuspendía habitualmente en el doble de su volumen de amortiguador isosmótico de fosfatos.

#### INCUBACION PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD NADasa

Las mezclas de incubación se preparaban siempre por duplicado para cada ensayo y se usaban tubos de 15 x 125 mm. El volumen total era de 6 ml y por lo general contenía de 2 a 3 ml de sangre, de la resuspensión de glóbulos rojos lavados o de fantasmas. Cuando el NAD se midió tanto con la deshidrogenasa

alcohólica como con KCN, el volumen total fue 9 ml y el volumen añadido de la preparación de eritrocitos de 3 a 4.5 ml. Los demás componentes variaban de acuerdo al tipo de experimento que se quería realizar.

Antes de medir el volumen de sangre, de suspensión de glóbulos rojos o de fantasmas, la preparación se mezclaba bien y con cuidado para hacerla homogénea.

Los tubos con las mezclas de incubación sin sustrato - (5.50 ml) se preincubaban 8 min en el baño de agua a 37°C y la reacción se iniciaba añadiendo 0.50 ml de solución de NAD 6 mM. Inmediatamente se tapaba el tubo con parafilm, se invertía unas 15 veces y se extraían 2.0 ml de la mezcla, los cuales se vaciaban en un tubo de centrífuga de polialómero delgado, de 96 x 14.5 mm (12 ml de capacidad) (A.H. Thomas 2605-E30) que estaba en la hielera y que contenía 2.0 ml de ácido perclórico al 10%. El tubo se tapaba con parafilm, se agitaba y se colocaba nuevamente en hielo (muestra del tiempo 0).

Al final de la incubación se sacaba el tubo del baño unos 30 seg antes de cumplirse el tiempo escogido, su contenido se mezclaba por inversión unas 15 veces y exactamente a dicho tiempo se vaciaban 2.0 ml de la mezcla de incubación al tubo con ácido (muestra del tiempo 30).

En la porción restante de la mezcla de incubación se determinaba el pH usando el medidor potenciométrico Radiometer

modelo pH M22r. En los primeros experimentos el valor del pH se midió a temperatura ambiente, pero luego se obtuvo siempre a 37°C.

Los tubos con las proteínas precipitadas se centrifugaban a 2,600 rpm (900 xg) durante 10 min, en la centrífuga clínica Chriss a temperatura ambiente.

El sobrenadante se pasaba a un nuevo tubo de polialómero y se volvía a centrifugar en las condiciones anteriores hasta que se obtenía el extracto ácido libre de partículas.

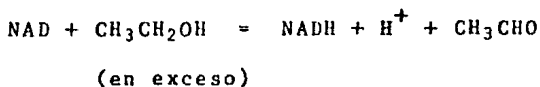
El contenido de NAD se medía en los extractos dejados a la temperatura ambiente.

#### MEDICION DEL NAD

##### Método de la deshidrogenasa alcohólica

##### Fundamento

La deshidrogenasa alcohólica (EC 1.1.1.1) cataliza la siguiente reacción:



El NADH que se forma tiene una absorbencia máxima a la longitud de onda de 340 nm y es equivalente al NAD originalmente presente en la muestra analizada.

### Medición

Las mediciones del NAD se hacían en celdas rectangulares de vidrio de 10 mm de distancia interior y 3.5 ml de capacidad.

Se ponían en la celda 2.0 ml del amortiguador con sustrato para la deshidrogenasa alcohólica y después 1.0 ml del extracto ácido que contenía el NAD por medir. La celda se tapaba con parafilm y se mezclaba su contenido invirtiéndola varias veces. En seguida, se lavaba por fuera introduciéndola en un vaso de precipitados de 20 ml que contenía agua bidestilada y sus paredes se secaban con papel Scott (Micro-wipes).

Las lecturas de la absorbencia se obtenían en el espectro fotómetro Beckman modelo 35, que tiene doble haz luminoso: uno que pasa por la celda de referencia y otro por la que contiene la solución problema.

Inicialmente el aparato se ajustaba a cero de absorbencia poniendo en cada uno de los dos lugares una celda llena de agua. Se dejaba la celda del fondo como referencia y la del frente se sustituía por la que contenía la solución por medir. Se tomaba la lectura de esta última (absorbencia inicial del tiempo 0) y luego se sustituía por la siguiente celda (absorbencia inicial del tiempo 30). El ajuste del cero se revisaba, como ya se describió anteriormente, cada par de lecturas. Estas maniobras se repetían y así se iban obteniendo las cifras de la ab absorbencia inicial de todas y cada una de las celdas con las

soluciones por medir. Al final de esta serie de lecturas, se agregaba a cada celda 0.050 ml de la dilución de la deshidrogenasa alcohólica (50 unidades), se mezclaba bien invirtiendo varias veces la celda tapada con parafilm y pasados 3 min se hacían las nuevas lecturas secuencialmente como se describió arriba (absorbencias finales de los tiempos 0 y de los tiempos 30).

La absorbencia neta para cada tiempo se obtuvo restando a la absorbencia final la absorbencia inicial.

La absorbencia neta en la muestra del tiempo 0 ( $A_0$ ) depende del contenido inicial de NAD en la mezcla de incubación y el de la muestra del tiempo 30 ( $A_{30}$ ) del contenido de NAD al final de la incubación.

El NAD hidrolizado durante la incubación se calcula de la diferencia de las absorbencias netas:

$$\Delta A = A_0 - A_{30}$$

La actividad enzimática específica que se expresa como el número de nanomoles de NAD hidrolizado en un minuto por mililitro de sangre o de suspensión de glóbulos rojos lavados (SGRL), con un volumen celular en ambos casos de 45 por ciento (hematocrito), se calcula como sigue:

$$\frac{\Delta A}{6.22 \times 10^{-3} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{3.05 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times \frac{4 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times \frac{6 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times \frac{45}{\text{Ht}} \times \frac{1}{30} =$$
$$A \times 4,413 \times \frac{1}{\text{Ht}} = \frac{\text{nmol NAD hidrolizado}}{\text{min, ml de sangre o de SGRL (45\% Ht)}}$$



En el caso de la suspensión de fantasmas de glóbulos rojos lavados (SFGRL):

$$\frac{\Delta A}{6.22 \times 10^{-3} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{3.05 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times \frac{4 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times \frac{6 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times \frac{1}{\text{mg proteína/ml}} \times \frac{1}{30}$$

$$\Delta A \times 98.1 \times \frac{1}{\text{mg proteínas/ml}} = \frac{\text{nmol NAD hidrolizado}}{\text{min, mg de proteínas de la SFGRL}}$$

$\Delta A$  = absorbencia neta del tiempo 0 menos absorbencia neta del tiempo 30

$6.22 \times 10^{-3} \times 1 \text{ cm}$  = coeficiente de absorbencia del NADH  
( $\text{cm}^{-1} \text{ ml nmol}^{-1}$ )  $\times 1 \text{ cm}$  de distancia interior de la celda del espectrofotómetro

3.05 ml = volumen final de la mezcla en la celda

1 ml = volumen del sobrenadante ácido puesto en la celda

4 ml = volumen total de la mezcla ácida

2 ml = volumen de la muestra de incubación agregado al ácido

6 ml = volumen total de la mezcla de incubación

2 ml = volumen de sangre, de la suspensión de glóbulos rojos lavados o de la suspensión de fantasmas añadido a la mezcla de incubación

45 = valor del hematocrito que se tomó como referencia

Ht = valor del hematocrito medido en la muestra usada

1/30 = para referir a la actividad enzimática a un minuto

mg proteína/ml = miligramos de proteínas contenidos en un mililitro de la suspensión de fantasmas de glóbulos rojos lavados (SFGRL)

## MEDICION DEL NAD

### Método del KCN

#### Fundamento

El cianuro de potasio reacciona con el carbono 4 del anillo de la nicotinamida del NAD o de sus derivados que como el NAD tengan el anillo piridinio o sea que el nitrógeno esté en forma catiónica. El complejo que se forma presenta un espectro de absorbencia con el valor máximo a 325 nm (Kaplan, 1960).

#### Neutralización del sobrenadante ácido que contiene el NAD

Se ponían muestras de 3.0 ml de cada uno de los extractos ácidos en sendos tubos de polialómero de 96 x 14.5 mm.

Los tubos se mantenían sumergidos en hielo y recibían 0.30 ml de trietanolamina (TEA) 1 M y 0.30 ml de  $K_2CO_3$  5 M. Ocasionalmente se les agitaba y después de 30 min se centrifugaban en frío a 4,500 rpm (1,580 xg) en el rotor SS34, durante 5 min. El sobrenadante tenía un pH entre 7.0 y 7.8 y se extraía cuidadosamente con pipeta Pasteur (extracto neutralizado).

#### Medición

Con objeto de conocer la absorbencia propia de cada celda, se les llenaba con 3 ml de agua bidestilada y luego de lavar y secar sus paredes, se leía a 325 nm la absorbencia comparada con la de otra celda llena de agua (absorbencia propia).

Se tuvo la precaución de no tocar sus paredes transparentes en el manejo posterior de estas celdas.

Una vez obtenida la cifra de la absorbencia propia, se secaba el interior de la celda aspirando el agua por succión. En seguida, se ponía 1.0 ml del extracto neutralizado y 2.0 ml de la solución de KCN (1.5 M) (más o menos a los 10 min después de haberse preparado esta solución), se tapaba la celda y se invertía varias veces. La lectura de la absorbencia se hacía - exactamente al minuto de haber añadido el KCN (absorbencia - final) (Nota: el complejo NAD-CN aumenta un poco su absorbencia con el tiempo).

El pH de la mezcla resultaba alrededor de 8.

La absorbencia neta de cada muestra se obtenía restando a la absorbencia final la absorbencia propia de la celda.

El cálculo de la actividad enzimática expresada como nanomoles de NAD hidrolizado por minuto por mililitro de sangre o de suspensión de glóbulos rojos lavados (SGRL), se hizo de la manera siguiente:

$$\frac{\Delta A}{6 \times 10^{-3} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{3 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times \frac{3.6}{3 \text{ ml}} \times \frac{6 \text{ ml}}{3 \text{ ml}} \times \frac{9 \text{ ml}}{3 \text{ ml}} \times \frac{45}{\text{Ht}} \times \frac{1}{30} =$$

$$\Delta A \times 5,400 \times \frac{1}{\text{Ht}} = \frac{\text{nmol NAD hidrolizado}}{\text{min, ml de sangre o de SGRL (45\% Ht)}}$$

$\Delta A$  = absorbencia neta del tiempo 0 menos absorbencia del tiempo 30

$6 \times 10^{-3} \times 1 \text{ cm}$  = coeficiente de absorbencia del complejo NAD-CN ( $\text{cm}^{-1} \text{ ml nmol}^{-1}$ ) (Kaplan, 1960) x 1 cm de distancia interior de la celda del espectrofotómetro

- 3 ml = volumen final de la mezcla en la celda
- 1 ml = volumen del sobrenadante neutralizado puesto en la celda
- 3.6 ml = volumen total del sobrenadante neutralizado
- 3 ml = volumen del sobrenadante ácido
- 6 ml = volumen total de la mezcla ácida
- 3 ml = volumen de la muestra de incubación agregada al ácido
- 9 ml = volumen total de la mezcla de incubación
- 3 ml = volumen de sangre, o de la suspensión de glóbulos rojos lavados o de la suspensión de fantasmas añadido a la mezcla de incubación
- 45 = valor del hematocrito que se tomó como referencia
- Ht = valor del hematocrito medido en la muestra usada
- 1/30 = para referir la actividad enzimática a un minuto
- mg proteína/ml = miligramos de proteínas en 1 ml de la suspensión de fantasmas de glóbulos rojos lavados (SFGRL)

#### DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY

(Oyama y Eagle, 1956)

La suspensión de fantasmas de glóbulos rojos lavados se diluía generalmente 1:10 con solución isotónica de NaCl para ajustar la concentración de sus proteínas a la sensibilidad del método de Lowry.

Se empleaban celdas cilíndricas de vidrio de 19 mm de diámetro externo y 105 mm de longitud, del espectrofotómetro Coleman.

La gráfica de referencia se obtenía siempre en cada serie de mediciones, usando volúmenes crecientes de la solución tipo de albúmina y completando a un mililitro con la solución salina isotónica (Tabla 1).

La dilución de la suspensión de fantasmas se analizaba por duplicado poniendo 0.10 y 0.20 ml en la celdas respectivas y añadiendo solución salina para tener un volumen de 1.0 ml - (Tabla 1).

A cada una de estas celdas se le transferían 5.0 ml de la solución C recién preparada y luego de mezclar bien, se dejaban reaccionar 10 min a temperatura ambiente.

En seguida se agregaban 0.50 ml de la dilución del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu con una pipeta volumétrica y al final se mezclaba bien invirtiendo la celda tapada con parafilm.

Una hora después se leía la absorbencia a 660 nm en el espectrofotómetro Coleman jr., primero de la celda 1 (Tabla 1) (testigo de reactivos) contra agua y luego contra esta última se leían las absorbencias de las celdas que tenían la solución tipo y las diluciones de la suspensión de fantasmas, respectivamente.

El factor para convertir la lectura de la absorbencia a cantidad de proteínas contenida en la celda respectiva, se obtenía de la pendiente de la gráfica de referencia:

$$\text{Factor} = \frac{\text{ug de albúmina tipo}}{\text{Absorbencia correspondiente}}$$

Tabla 1. Medición de proteínas por el método de Lowry usando albúmina de suero de bovino como referencia

Celdas (núm)	Solución tipo de albúmina (ml)      (µg)		Suspensión de fantasmas (ml)	NaCl al 0.85% (ml)
1	0	0	-	1.00
2	0.20	10	-	0.80
3	0.40	20	-	0.60
4	0.60	30	-	0.40
5	0.80	40	-	0.20
6	1.00	50	-	0
7	-	-	0.10	0.90
8	-	-	0.10	0.90
9	-	-	0.20	0.80
10	-	-	0.20	0.80

La concentración de proteínas de la suspensión original de fantasmas de eritrocitos en las muestras de 0.10 ml, se calculaba como sigue:

$$\text{Factor x Absorbencia problema x } \frac{1}{0.1} \times \frac{10}{1} \times \frac{1}{10^3}$$

de 0.1 ml

$$\text{Factor x Absorbencia problema x 0.10 =}$$

de 0.1 ml

$$\frac{\text{mg de proteínas}}{\text{ml de suspensión de fantasmas}}$$

En las muestras de 2.0 ml de suspensión de fantasmas, los cálculos se hacían así:

$$\text{Factor x Absorbencia problema x } \frac{1}{0.2} \times \frac{10}{1} \times \frac{1}{10^3} =$$

de 0.2 ml

$$\text{Factor x Absorbencia problema x 0.05 =}$$

de 0.2 ml

$$\frac{\text{mg de proteínas}}{\text{ml de suspensión de fantasmas}}$$

En donde:

10/1 = dilución que se hizo de la suspensión original de fantasmas

1/10<sup>3</sup> = factor para convertir microgramos a miligramos

## RESULTADOS

1. Velocidad de la degradación del NAD catalizada por la sangre total y por los glóbulos rojos lavados.

Se prepararon cuatro tubos para mezclas de incubación: dos con 5.0 ml de sangre total y los otros dos con 5.0 ml de la suspensión de glóbulos rojos lavados, provenientes ambos del mismo donador que se presentó al laboratorio.

A todos los tubos se les agregaron 6.25 ml del amortiguador isosmótico de fosfatos (aprox. 0.124 M) de pH 7.4 y 2.50 ml de NaCl 0.85%.

La reacción se inició al añadir 1.25 ml de NAD 6 mM. El volumen total de la mezcla de incubación fue 15 ml y la concentración final del amortiguador 0.050 M aproximadamente.

Se transfirieron 2.0 ml de la mezcla de incubación a los tiempos 0, 15, 30, 45 y 60 min, a tubos que contenían 2.0 ml de ácido perclórico al 10% frío. El pH de la mezcla de incubación fue 7.40 medido a temperatura ambiente. El valor del hematocrito fue para la sangre total 42 y para la suspensión de glóbulos rojos lavados 36 por ciento.

Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 1; el signo (-) significa que hubo error en la preparación de la mezcla de incubación, por lo que no se obtuvo el resultado por duplicado.

En el pie de las Tablas aparece una cifra que se refiere al número de registro del experimento en la libreta del laboratorio y corresponde a la fecha en que fue realizado.



Tabla 2. Velocidad de la degradación enzimática del NAD

Incubación a 37°C (min)	AA	Actividad Tubos			Actividad específica	
		1	2	$\bar{X}$		
Sangre total						
15	-	0.051	-	161	161	10.72
30	0.082	0.090	258	284	271	9.03
45	0.104	0.106	328	334	331	7.36
60	0.124	0.130	391	410	401	6.68
Glóbulos rojos lavados						
15	0.031	0.032	114	118	116	7.73
30	0.051	0.058	188	213	200	6.67
45	-	0.076	-	279	279	6.20
60	0.091	0.096	335	353	344	5.73

$\bar{X}$  = promedio aritmético del par de tubos para cada tiempo

La actividad es el número de nanomoles de NAD hidrolizado por mililitro de sangre total o de suspensión de glóbulos rojos ambos con 45 por ciento de hematocrito.

La actividad específica o velocidad es la actividad por minuto.

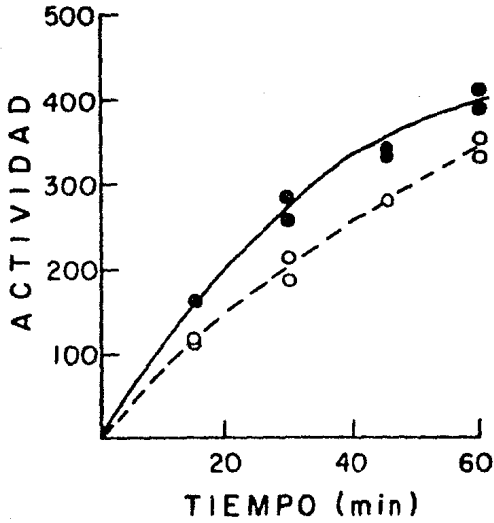


Fig. 1. Degradación enzimática del NAD durante la incubación a 37°C y a pH 7.40. La actividad está expresada en nanomoles de sustrato hidrolizado por un mililitro de sangre total (●) o de suspensión de glóbulos rojos lavados de la misma sangre (○) y en ambos casos referidos a un hematocrito de 45 por ciento

2. Efecto de la nicotinamida sobre la degradación del NAD catalizada por los glóbulos rojos lavados.

Se prepararon mezclas de incubación por duplicado, en la siguiente forma:

Tubo (número)	Amortiguador (ml)	NaCl 0.85% (ml)	Suspensión glóbulos rojos (ml)	Nicotinamida (ml)	NAD (ml)
0.3 M citrato - 0.3 M fosfato					
pH 6.35					
1	2.0	1.50	2.0	-	0.50
2	2.0	0.50	2.0	1.0	0.50
pH 7.43					
3	2.0	1.50	2.0	-	0.50
4	2.0	0.50	2.0	1.0	0.50
0.3 M Tris - 0.3 M fosfato					
pH 8.50					
5	2.0	1.50	2.0	-	0.50
6	2.0	0.50	2.0	1.0	0.50
pH 9.40					
7	2.0	1.50	2.0	-	0.50
8	2.0	0.50	2.0	1.0	0.50

La sangre provenía del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología.

La suspensión de los glóbulos rojos lavados tuvo un hematocrito de 42 por ciento.

La molaridad de los amortiguadores en la mezcla de incubación fue 0.10 M para cada uno de sus dos componentes.

La concentración de la nicotinamida en la mezcla final fue de 100 mM.

La incubación se hizo durante 30 min y se inactivaron 2.0 ml de mezcla con 2.0 ml de ácido perclórico.

Se neutralizó 1.0 ml del extracto ácido con 0.1 ml de TEA y de  $K_2CO_3$  para determinar el contenido de NAD por el método del KCN.

Los resultados se muestran en la Tabla 3 y en la Fig. 2; no se calculó la relación DHA/KCN en los experimentos en que se usó como inhibidor la nicotinamida, porque los pequeños cambios de absorbencia que se apreciaron corresponden a las variaciones aleatorias propias de estas técnicas.

Tabla 3. Efecto de la nicotinamida sobre la actividad NADasa de los glóbulos rojos lavados y en mezclas de incubación a diferentes valores de pH

Tubos (número)	pH a 37°C	TECNICA DESH. ALCONOLICA			TECNICA KCN			Relación DHA/ KCN
		ΔA	Actividad específica	inhibición %	ΔA	Actividad específica	inhibición %	
1	6.65	0.114	11.98	0	0.102	12.86	0	0.93
2	6.66	0.0065	0.68	94	0.010	1.26	90	
3	7.41	0.102	10.72	0	0.089	11.22	0	0.96
4	7.42	0.001	0.10	99	0.003	0.38	97	
5	7.90	0.088	9.25	0	0.067	8.45	0	1.09
6	7.91	+0.002	+0.21	102	0.001	0.13	98	
7	8.53	0.039	4.10	0	0.036	4.54	0	0.90
8	8.54	0.004	0.42	90	0.007	0.74	84	

El signo positivo indica que la lectura de la absorbencia al tiempo 30 fue mayor que la del tiempo 0.

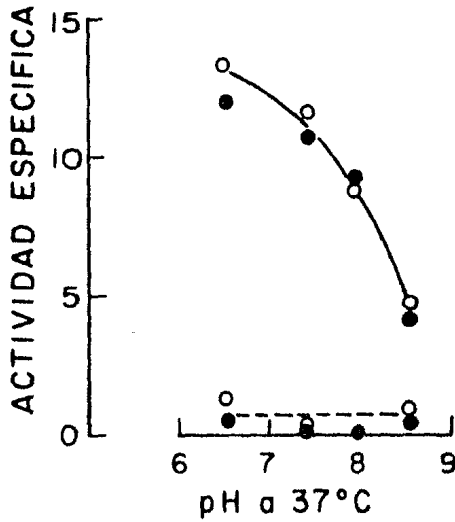


Fig. 2 . Efecto de la nicotinamida sobre la actividad NADasa de los glóbulos rojos lavados que se incubaron en mezclas a diferentes valores de pH. Medición del sustrato con deshidrogenasa alcohólica (●) y con cianuro de potasio (○); en ausencia (————) y en presencia (-----) de nicotinamida

3. Estabilidad del NAD durante la incubación sin enzima

- a. Incubación a diferente pH desde 6.34 hasta 8.90 durante 30 min a 37°C.

Se prepararon mezclas de incubación, por duplicado, con los siguientes contenidos: en el primer tubo 5.50 ml de amortiguador de fosfatos 0.5 M de pH 7.40 y en los restantes 2.0 ml de amortiguador 0.3 M citrato - 0.3 M fosfato 6 0.3 M Tris - 0.3 M fosfato al pH que se indica y en todos 3.50 ml de NaCl al 0.85%. La reacción se inició al añadir 0.50 ml de solución de NAD 6 mM.

- b. Incubación durante 30 min a diferentes temperaturas desde 15 hasta 45°C y a pH desde 6.73 hasta 6.63.

Las mezclas de incubación preparadas por duplicado contenían: 2.50 ml de amortiguador isosmótico de fosfatos (aprox. 0.124 M) a pH 7.40 (esta solución representa el volumen de sangre que habitualmente se emplea en la mezcla de incubación), 2.0 ml de amortiguador 0.3 M citrato - 0.3 M fosfato a pH 6.36 y 1.00 ml de NaCl 0.85%. La reacción se iniciaba al agregar 0.50 ml de solución NAD 6 mM.

Se agregaron a esta serie dos tubos que contenían 0.3 M Tris - 0.3 M fosfato a pH 7.90 en vez del amortiguador citrato-fosfato, para observar la estabilidad del NAD a 37 y 40.5°C y a pH alrededor de 7.5.

- c. Inactivación y cálculos

Se sacaban muestras de 2.0 ml de la mezcla de incubación y se inactivaban con 2.0 ml de ácido perclórico a los tiempos 0 y 30 min.

La cantidad de NAD degradado se calculó con la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta A}{6.22 \times 10^{-3}} \times \frac{3.05}{1} \times \frac{4}{2} \times \frac{1}{30} =$$

$$\Delta A \times 32.69 = \frac{\text{nmol NAD hidrolizado}}{\text{min, ml de mezcla de incubación}}$$

Los resultados se muestran en las Tablas 4 y 5.



Tabla 4. Estabilidad del NAD durante 30 min de incubación a 37°C en tres amortiguadores a diferentes valores de pH

Tubo (número)	pH		ΔA			NAD degradado*
	Amortiguador a 23°C	Mezcla de incubación a 37°C	1	2	$\bar{x}$	
FOSFATOS 0.46 M						
1	7.40	7.40	0	0.009	0.0045	0.15
0.1 M CITRATO - 0.1 M FOSFATO						
2	6.19	6.34	0.003	0.004	0.0035	0.11
3	6.34	6.46	0.002	0.002	0.002	0.065
4	7.36	7.40	+0.002	+0.008	+0.005	+0.16
5	7.46	7.48	0.008	0.005	0.0065	0.21
0.1 M TRIS - 0.1 M FOSFATO						
6	7.42	7.26	0.006	0.004	0.0045	0.15
7	7.83	7.54	+0.005	+0.004	+0.0045	+0.15
8	8.21	7.82	0.005	+0.003	0.001	0.32
9	8.52	8.12	0.002	0.004	0.003	0.10
10	8.92	8.46	0.008	0.001	0.0045	0.15
11	9.38	8.90	0.001	0.004	0.0025	0.082

El signo positivo indica que la lectura final de la absorbencia fue mayor que la inicial

\* nmol de NAD hidrolizado/min, ml de mezcla de incubación

010682  
250682

Tabla 5. Estabilidad del NAD durante la incubación a dos valores de pH y a diferentes temperaturas

Tubo (n <sup>o</sup> )	T (°C)	Incubación (min)	pH mezcla de incubación a 37°C	$\Delta A$			NAD degradado
				1	2	$\bar{x}$	
0.1 M CITRATO - 0.1 M FOSFATO							
1	15	90	6.73	+0.003	+0.008	+0.0055	+0.18
2	18	60	6.73	0.007	+0.009	+0.001	+0.033
3	21	60	6.72	0.010	+0.008	0.001	0.033
4	24	45	6.68	0.004	+0.005	+0.0005	+0.016
5	27	30	6.68	0.003	+0.008	+0.0025	+0.082
6	30	30	6.68	+0.001	+0.006	+0.0035	+0.11
7	34	30	6.68	0.004	+0.001	0.0015	0.049
8	37	30	6.67	+0.006	+0.001	+0.0035	+0.11
9	40	15	6.65	0.002	0.016	0.009	0.29
10	45	15	6.63	+0.011	+0.004	+0.0075	+0.24
0.1 M TRIS - 0.1 M FOSFATO							
11	37	30	7.58	0.006	0.007	0.0065	0.21
12	40.5	20	7.51	0.007	0.004	0.0055	0.18

130982

- 38 -

4. Comparación de la degradación del NAD catalizada por la sangre total, los glóbulos rojos lavados y los fantasmas de eritrocitos

a. Incubación a pH alrededor de 6.60

Se prepararon mezclas de incubación por duplicado, en las siguiente forma:

Tubo (núm)	Preparación (ml)	Amortiguador fosfatos 0.5 M a pH 6.00 (ml)	NaCl 0.85 % (ml)	NAD 6 mM (ml)
1 y 2	Sangre total 3.00	2.0	0.50	0.50
3 y 4	Suspensión glóbulos rojos 3.50	2.0	-	0.50
5 y 6	Suspensión fantasmas 3.00	2.0	0.50	0.50

Las preparaciones provienen de sangre donada por el Instituto Nacional de Cardiología.

La molaridad del amortiguador en la mezcla de incubación fue 0.167 M.

El valor del hematocrito en la sangre total y en la suspensión de glóbulos rojos fue 43 por ciento.

La concentración de proteínas en la suspensión de fantasmas fue 1.18 mg por mililitro.

El tiempo de incubación 30 min.

Se inactivaron 2.0 ml de mezcla de incubación con 2.0 ml de ácido perclórico. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación de la degradación del NAD a pH alrededor de 6.60

Tubo (núm)	Preparación	pH a 37°C	$\Delta A$	Actividad específica Valores	$\bar{x}$
1 y 2	Sangre total	6.57	0.110	7.53	7.87
			0.120	8.21	
3 y 4	Suspensión glóbulos rojos	6.72	0.110	6.45	6.39
			0.108	6.33	
5 y 6	Suspensión fantasmas	6.52	0.055	3.05	3.27
			0.063	3.49	

La actividad específica está referida a las nanomoles de NAD hidrolizado por minuto y por mililitro de sangre o suspensión de glóbulos rojos con hematocrito de 45 por ciento y por miligramo de proteína para la suspensión de fantasmas.

b. Incubación a pH alrededor de 7.60

Se comparó la actividad NADasa en los tres tipos de preparaciones, pero incubadas a pH alrededor de 7.60.

Tubo (n <sup>o</sup> m)	Preparación (ml)	Amortiguador fosfatos 0.5 M a pH 7.80 (ml)	NaCl 0.85 % (ml)	NAD 6 mM (ml)
1 y 2	Sangre total 3.50	3.0	1.75	0.75
3 y 4	Suspensión glóbulos rojos 3.50	3.0	1.75	0.75
5 y 6	Suspensión fantasmas 5.25	3.0	-	0.75

Las preparaciones provienen de sangre donada por el Instituto Nacional de Cardiología.

La molaridad del amortiguador en la mezcla de incubación fue 0.167 M.

El valor del hematocrito en la sangre total y en la suspensión de glóbulos rojos fue 46 por ciento.

El tiempo de incubación fue 30 min.

Se inactivaron 3.0 ml de mezcla de incubación con 3.0 ml de ácido perclórico.

El contenido de NAD se determinó con etanol-deshidrogenasa alcohólica (Tabla 7) y con KCN (Tabla 8). Se neutralizaron 2.0 ml del extracto ácido con trietanolamina y con  $K_2CO_3$ .

Tabla 7. Comparación de la degradación del NAD a pH alrededor de 7.60

Tubo (número)	Preparación	pH a 37°C	$\Delta A$	Actividad específica Valores	$\bar{X}$
1 y 2	Sangre total	7.46	0.096	7.89	7.52
			0.087	7.15	
2 y 3	Suspensión glóbulos rojos	7.65	0.078	6.41	6.90
			0.090	7.40	
4 y 5	Suspensión fantasmas	7.77	0.056	3.14	3.00
			0.051	2.86	

La actividad específica está referida a las nanomoles de NAD hidrolizado por minuto y por mililitro de sangre o suspensión de glóbulos rojos con hematocrito de 45 por ciento y por mililitro de suspensión de fantasmas respectivamente.

Tabla 8. Comparación de la degradación del NAD a pH alrededor de 7.60

Determinación del NAD con KCN

Tubo (número)	$\Delta A$	Actividad Valores	específica $\bar{X}$	Relación DHA/ KCN
1 y 2	0.073	7.20	6.80	1.11
	0.065	6.41		
3 y 4	0.063	6.22	6.27	1.10
	0.064	6.32		
5 y 6	0.050	3.36	3.20	0.94
	0.045	3.03		

100383

5. Efecto del pH sobre la degradación del NAD catalizada por la sangre total, los glóbulos rojos lavados y los fantasmas de eritrocitos.

a. Sangre total

Se prepararon mezclas de incubación, por duplicado, en la siguiente forma: 3.0 ml de sangre total, 2.0 ml de amortiguador 0.3 M citrato - 0.3 M fosfato o de fosfatos - 0.6 M al pH elegido y 0.50 ml de NaCl 0.85%.

Se agregaron 0.50 ml de NAD 6 mM para iniciar la reacción.

El hematocrito fue de 44 por ciento.

El amortiguador tenía en la mezcla la concentración 0.1 M de cada componente.

La sangre fue proporcionada por el Instituto Nacional de Cardiología.

La incubación se hizo por 30 min (Tablas 9 y 10, Fig. 3).

b. Suspensión de glóbulos rojos lavados

Las mezclas de incubación contenían: 2.0 ml de suspensión de glóbulos rojos lavados, 2.0 ml de amortiguador 0.3 M citrato - 0.3 M fosfato ó 0.3 M Tris - 0.3 M fosfato al pH elegido y 1.50 ml de NaCl 0.85%.

La reacción se iniciaba al añadir 0.50 ml de NAD.



El hematocrito de la suspensión de glóbulos rojos lavados fue 36 por ciento.

La sangre provenía de un donador que se presentó al laboratorio.

La incubación se hizo por 30 min (Tablas 11 y 12, Fig. 4).

c. Suspensión de fantasmas

Las mezclas contenían: 3.0 ml de suspensión de fantasmas de eritrocitos, 2.0 ml de amortiguador 0.3 M citrato - 0.3 M fosfato ó 0.6 M de fosfatos al pH elegido y 0.50 ml de NaCl 0.85%.

La reacción se inició con 0.50 ml de NAD 6 mM.

La suspensión de fantasmas contenía 3.16 mg de proteínas por mililitro.

La sangre fue proporcionada por el Instituto Nacional de Cardiología.

La incubación se hizo por 30 min (Tablas 13 y 14, Fig. 5).

Tabla 9. Efecto del pH sobre la degradación del NAD catalizada por la sangre total

Tubo (número)	pH		ΔA	
	Amortiguador a 24°C	Mezcla de incubación a 37°C	Tubos 1	2
0.1 M CITRATO - 0.1 M FOSFATO				
1	4.66	5.21	0.186	0.182
2	5.21	5.67	0.207	0.216
3	5.59	6.01	0.219	0.221
4	6.04	6.36	0.230	0.228
5	6.47	6.70	0.228	0.226
6	6.91	7.07	0.245	0.251
7	7.45	7.41	0.264	0.255
8	8.34	7.66	0.256	0.264
0.2 M FOSFATOS				
9	6.25	6.58	0.237	0.231
10	7.07	7.19	0.236	0.242
11	7.75	7.58	0.260	0.256
12	8.91	7.92	0.265	0.272
13	9.80	8.22	0.252	0.248
14	9.98	8.34	0.231	0.238
15	10.07	8.51	0.217	0.205
16	10.15	8.71	0.195	0.192

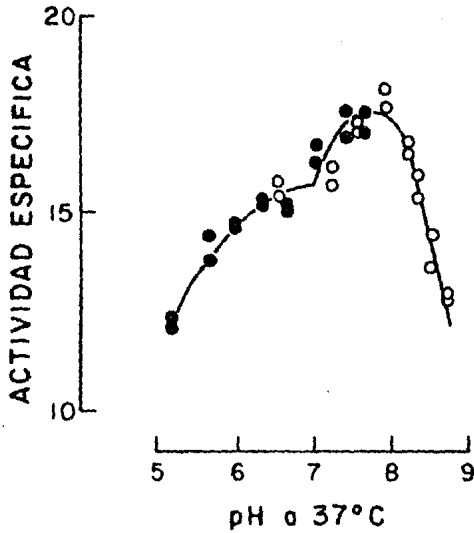


Fig. 3. Efecto del pH sobre la actividad NAD glicohidrolasa de la sangre total. La actividad específica está expresada como nanomoles de NAD consumido por minuto por mililitro de sangre con hematocrito de 45 por ciento. Amortiguadores: citrato-fosfato (●) o fosfatos (○).

Tabla 10. Actividad específica de la sangre total para la degradación del NAD a diferentes valores de pH

Tubo (núm)	Actividad específica		
	Tubos		
	1	2	$\bar{X}$
0.1 M CITRATO - 0.1 M FOSFATO			
1	12.4	12.2	12.3
2	13.8	14.4	14.1
3	14.6	14.8	14.7
4	15.4	15.2	15.3
5	15.2	15.1	15.2
6	16.4	16.8	16.6
7	17.6	17.0	17.4
8	17.1	17.6	17.4
0.2 M FOSFATOS			
9	15.8	15.4	15.6
10	15.8	16.2	16.0
11	17.4	17.1	17.2
12	17.7	18.2	18.0
13	16.8	16.6	16.7
14	15.4	15.9	15.6
15	14.5	13.7	14.1
16	13.0	12.8	12.9

La actividad específica está expresada en nmoles de NAD degradado por minuto y por mililitro de sangre total con 45 por ciento de hematocrito.

Tabla 11. Efecto del pH sobre la degradación del NAD catalizada por la suspensión de glóbulos rojos lavados

Tubo (n <sup>úm</sup> )	pH		$\Delta A$	
	Amortiguador a 24°C	Mezcla de incubación a 37°C	Tubos 1	2
0.1 M CITRATO - 0.1 M FOSFATO				
1	4.26	4.80	0.042	0.037
2	4.68	5.20	0.049	0.056
3	5.05	5.54	0.063	0.066
4	5.42	5.87	0.070	0.070
5	5.87	6.30	0.072	0.077
6	6.19	6.53	-	0.076
7	6.56	6.76	0.072	0.073
8	6.95	7.05	0.077	0.072
9	7.36	7.34	0.084	0.078
10	7.74	7.51	0.082	0.078
0.1 M TRIS - 0.1 M FOSFATO				
11	6.58	6.79	0.076	0.082
12	7.83	7.48	0.077	0.079
13	8.21	7.75	0.070	0.075
14	8.63	8.14	0.082	0.068
15	8.92	8.36	0.075	0.072
16	9.34	8.60	0.062	0.048
17	9.53	8.68	0.056	0.048

A partir del tubo 15 se corrigió por la degradación no enzimática del NAD en el medio alcalino.

Tabla 12. Actividad específica de los glóbulos rojos para la degradación del NAD a diferentes valores de pH

Tubo (núm)	Actividad		específica $\bar{x}$
	Tubos		
	1	2	
0.1 M CITRATO - 0.1 M FOSFATO			
1	5.15	4.54	4.84
2	6.00	6.86	6.44
3	7.72	8.09	7.91
4	8.58	8.58	8.58
5	8.83	9.44	9.13
6	-	9.32	9.32
7	8.83	8.95	8.89
8	9.44	8.83	9.13
9	10.30	9.56	9.93
10	10.05	9.56	9.81
0.1 M TRIS - 0.1 M FOSFATO			
11	9.32	10.30	9.68
12	9.44	9.68	9.56
13	8.58	9.19	8.89
14	10.05	8.34	9.19
15	9.19	8.83	9.01
16	7.60	5.88	6.74
17	6.86	5.88	6.37

La actividad específica está expresada en nmoles de NAD degradado por minuto y por mililitro de suspensión de glóbulos rojos con hematocrito de 45 por ciento.

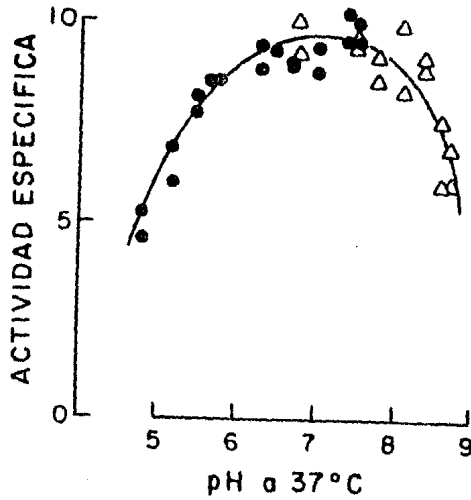


Fig. 4. Efecto del pH sobre la actividad NAD glicohidrolasa de la suspensión de glóbulos rojos lavados. La actividad específica está expresada como nanomoles de NAD hidrolizado por minuto por mililitro de suspensión de glóbulos rojos con hematocrito de 45 por ciento. Amortiguadores: citrato-fosfato (●) o Tris-fosfato (Δ).

Tabla 13. Efecto del pH sobre la degradación del NAD catalizada por la suspensión de fantasmas de eritrocitos

Tubo (número)	pH		AA	
	Amortiguador a 24°C	Mezcla de incubación a 37°C	1	2
0.1 M CITRATO - 0.1 M FOSFATO				
1	4.66	5.02	0.080	0.068
2	5.21	5.57	0.095	0.100
3	5.59	5.95	0.108	0.109
4	6.04	6.29	0.116	0.109
5	6.47	6.64	0.117	0.111
6	6.91	7.04	0.109	0.106
7	7.45	7.40	0.113	0.118
8	8.34	7.82	0.091	0.095
0.2 M FOSFATOS				
9	6.25	6.48	0.114	0.110
10	7.07	7.15	0.110	0.110
11	7.75	7.70	0.096	0.094
12	8.10	7.88	0.086	0.091
13	8.50	8.08	0.082	0.077
14	8.91	8.17	0.066	0.077
15	9.31	8.40	0.049	0.047



Tabla 14. Actividad específica de los fantasmas de eritrocitos para la degradación del NAD a diferentes valores de pH

Tubo (número)	Actividad específica		$\bar{X}$
	1	2	
0.1 M CITRATO - 0.1 M FOSFATO			
1	1.66	1.41	1.53
2	1.97	2.07	2.02
3	2.23	2.26	2.24
4	2.40	2.26	2.33
5	2.42	2.30	2.36
6	2.26	2.19	2.22
7	2.34	2.44	2.39
8	1.88	1.96	1.92
0.2 M FOSFATOS			
9	2.36	2.28	2.32
10	2.28	2.28	2.28
11	1.99	1.94	1.96
12	1.78	1.88	1.83
13	1.70	1.59	1.64
14	1.36	1.59	1.48
15	1.01	0.97	0.99

La actividad específica se expresa en nmoles - de NAD degradado por minuto y por miligramo de proteína.

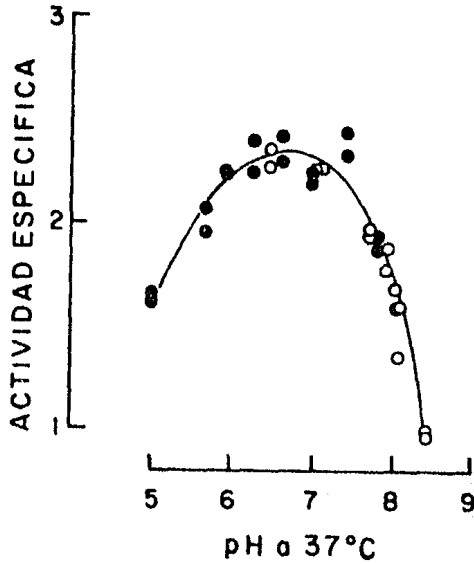


Fig. 5. Efecto del pH sobre la actividad NAD glicohidrolasa de la suspensión de fantasmas de eritrocitos lavados. La actividad específica está expresada como nanomoles de NAD degradado por minuto por miligramo de proteína. Amortiguadores: citrato-fosfato (●) o fosfatos (○).

6. Comparación de la degradación del NAD a pH 6.6 y a pH 7.8 catalizada por la sangre total, los glóbulos rojos lavados y los fantasmas de eritrocitos.

a. Datos tomados de los experimentos a diferentes temperaturas

Se calculó la actividad específica a la temperatura de 37°C de los experimentos 070683, 090683 y 130383 respectivamente y los resultados se presentan en la Tabla 15.

b. Datos tomados de los experimentos a diferentes valores de pH

Se calculó la actividad específica a pH 6.60 y a pH 7.80 con datos tomados de las Figuras 3, 4 y 5 (experimentos 031183, 080682 y 120184) (Tabla 15).

En estas comparaciones se tomaron los valores de la actividad específica de un mismo donador para el pH ácido y para el alcalino.

Los valores para la sangre total, la suspensión de eritrocitos y de fantasmas provienen de experimentos con diferentes donadores. Además debe tomarse en cuenta que en el caso de los fantasmas de eritrocitos la actividad está referida a miligramo de proteínas y no a mililitro de sangre o de suspensión de glóbulos rojos con hematocrito de 45 por ciento.

Tabla 15. Comparación de la degradación del NAD a un pH ácido y a un pH alcalino en las diferentes preparaciones de eritrocitos

Preparación	pH a 37°C	Actividad específica	Relación porcentual	Fecha experimento
Datos de los experimentos del efecto de la temperatura				
Sangre total	6.60	7.35	100	
	7.90	14.10	192	070683
Eritrocitos lavados	6.66	5.70	100	
	7.80	4.70	82	090683
Fantasmas de eritrocitos	6.60	3.43	100	
	7.90	2.78	81	180383
Datos de los experimentos del efecto del pH				
Sangre total	6.60	15.60	100	
	7.90	17.50	112	031183
Eritrocitos lavados	6.60	9.50	100	
	7.90	9.10	96	080682
Fantasmas de eritrocitos	6.60	2.35	100	
	7.90	1.84	79	120184

7. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por la sangre total, la suspensión de glóbulos rojos lavados y la suspensión de fantasmas de eritrocitos

A. Sangre total

a. Incubaciones a pH alrededor de 6.60

Se prepararon mezclas de incubación por duplicado en la forma siguiente: 3.0 ml de sangre, 2.0 ml de amortiguador 0.3 M citrato - 0.3 M fosfato a pH 6.32 y 0.50 ml de NaCl 0.85%. Se añadieron 0.50 ml de solución 6 mM de NAD para iniciar la reacción.

La sangre fue proporcionada por el Instituto Nacional de Cardiología.

Los tiempos de incubación fueron más prolongados en las bajas temperaturas.

Las muestras de 2.0 ml se inactivaron con 2.0 ml de ácido perclórico.

El hematocrito fue de 43 por ciento.

Los resultados se muestran en la Tabla 16 y en la Fig. 6 y en las Tablas 36, 37, 38, 39 y 40 se anotan las cifras obtenidas en este único experimento y se comparan con las de los otros tipos de preparaciones de eritrocitos humanos.

Tabla 16. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por la sangre total incubada a pH entre 6.56 y 6.64

Tubo (n <sup>o</sup> )	Temperatura (°C)	Temperatura (K)	Tiempo (min)	pH* a t °C	Δ As	Actividad específica ( $\frac{\text{nmol}}{\text{min, ml}}$ )
1	18	291.16	120	6.62	0.059	1.01
2					0.050	0.86
3	21	294.16	120	6.64	0.080	1.37
4					0.082	1.40
5	23	296.16	60	6.64	0.059	2.02
6					0.057	1.95
7	25	298.16	60	6.63	0.076	2.60
8					0.070	2.39
9	27	300.16	45	6.63	0.063	2.87
10					0.054	2.46
11	30	303.16	45	6.61	0.096	4.38
12					0.097	4.42
13	33	306.16	30	6.61	0.085	5.82
14					0.072	4.93
15	37	310.16	30	6.56	0.104	7.12
16					0.111	7.59
17	40	313.16	20	6.58	0.088	9.03
18					0.087	8.93

\*El pH se midió a la correspondiente temperatura de incubación

070683

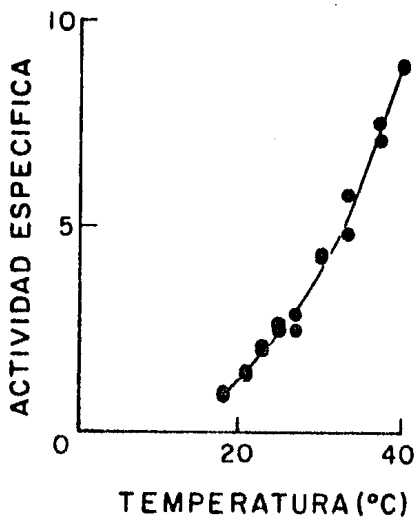


Fig. 6. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por la sangre total incubada en un medio con pH alrededor de 6.60. La actividad específica está expresada en nanomoles de NAD hidrolizado por minuto por mililitro de sangre con hematocrito de 45 por ciento.

La energía aparente de activación de Arrhenius ( $E_a'$ ) del complejo enzima-sustrato en el estado de transición ( $ES^\ddagger$ ) se calculó con la gráfica trazada de acuerdo con la forma logarítmica de la ecuación empírica de Arrhenius (Alberty, 1983) (pág. 617):

$$\ln k = - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} + \ln A$$

En donde,

$R = 8.314$  Julio/grado, mol

$A =$  factor preexponencial

En vista de que por el momento no se conoce el valor de la constante de la velocidad de la reacción ( $k$ ), se usó en su lugar la actividad específica ( $a$ ), pero referida a un segundo en vez de un minuto como aparece en los cálculos anteriores de este trabajo. Se escogió el segundo porque es la unidad básica de tiempo del Sistema Internacional de Unidades (SI) (11a. Conferencia General de Pesas y Medida, 1960) (Alberty, 1983) (pág. 797) y además es la unidad de tiempo que se emplea en los cálculos cinéticos y termodinámicos de las reacciones biológicas.

En todos los casos, la energía se expresa en julios y no en calorías porque la caloría no corresponde al sistema SI de unidades.

La energía aparente de activación de Arrhenius ( $E_a'$ )



del complejo enzima-sustrato en el estado de transición se calculó de las pendientes de la gráfica  $\ln a$  contra  $1/T$  - (Tabla 17) (Fig. 7):

$$E'a = -8.314 \times \text{la pendiente}$$

Tabla 17. Valores calculados para la gráfica de Arrhenius  
Sangre total incubada a pH alrededor de 6.60

Tubo (número)	$(1/T)10^5$	$a$ $(\frac{\text{nmol}}{\text{seg, ml}})$	$\ln a$
1	343.4	0.0168	-4.085
2		0.0142	-4.251
3	340.0	0.0228	-3.781
4		0.0234	-3.756
5	337.7	0.0336	-3.392
6		0.0325	-3.426
7	335.4	0.0433	-3.139
8		0.0399	-3.221
9	333.2	0.0479	-3.039
10		0.0410	-3.193
11	329.9	0.0730	-2.618
12		0.0737	-2.607
13	326.6	0.0969	-2.334
14		0.0821	-2.500
15	322.4	0.1186	-2.132
16		0.1266	-2.067
17	319.3	0.1505	-1.894
18		0.1488	-1.905

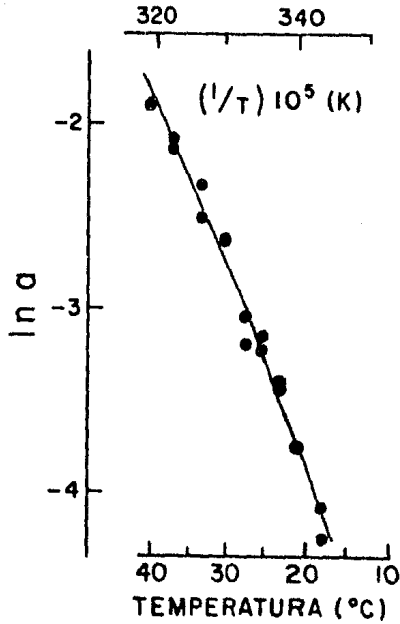


Fig. 7. Gráfica de Arrhenius. Sangre total incubada en un medio con pH alrededor de 6,60. Las constantes de la recta correspondiente al intervalo entre 18 y 27 $^{\circ}C$  fueron  $m = -10,600$ ,  $b = 32.4$  y  $r = -0.97$  y para la del intervalo 27 a 40 $^{\circ}C$ ,  $m = -8,360$ ,  $b = 24.9$  y  $r = -0.97$ .

La energía libre (o energía de Gibbs) aparente de activación ( $\Delta G^{\ddagger}$ ) del complejo enzima-sustrato en el estado de transición en condiciones estándar, se calculó para cada temperatura con la siguiente ecuación:

$$\Delta G^{\ddagger} = -RT \ln \left( \frac{h}{k_B} \frac{a}{\kappa} \frac{1}{T} \right)$$

(velocidad absoluta de la reacción, Daniels y Alberty, 1966, pág. 612-613).

R = 8.314 J/grado, mol

h = constante de Plank =  $6.626 \times 10^{-34}$  J·seg

$k_B$  = constante de Boltzman =  $1.381 \times 10^{-23}$  J/grado·molécula

a = actividad específica (nmol/seg, ml) = k (constante de velocidad)

$\kappa$  = coeficiente de transmisión = 1

$$\therefore \Delta G^{\ddagger} = -8.314 T \ln \left( 4.798 \times 10^{-11} \frac{a}{T} \right)$$

Los valores  $\Delta G^{\ddagger}$  se dibujaron en función de la temperatura absoluta (Tabla 18) (Fig. 8, a) y cada recta está representada por la ecuación:

$$\Delta G^{\ddagger} = \Delta H^{\ddagger} + \Delta S^{\ddagger} T$$

La entalpía aparente de activación ( $\Delta H^{\ddagger}$ ) se obtuvo del punto en que la recta correspondiente corta al eje - de las ordenadas y la entropía aparente de activación ( $\Delta S^{\ddagger}$ ) de las pendientes de las rectas.

Tabla 18. Valores de la energía libre aparente de activación del complejo enzima-sustrato en el estado de transición en condiciones estándar a diferentes temperaturas

Sangre total incubada a pH alrededor de 6.60

Tubo (número)	T (K)	$\Delta G^{\ddagger}$ (kJ/mol)
1	291.16	81.140
2		81.541
3	294.16	81.256
4		81.196
5	296.16	80.868
6		80.953
7	298.16	80.804
8		81.007
9	300.16	81.113
10		81.497
11	303.16	80.887
12		80.860
13	306.16	80.990
14		81.412
15	310.16	81.561
16		81.393
17	313.16	81.754
18		81.784

b. Incubaciones a pH alrededor de 7.90

Este experimento se realizó con la misma sangre que se empleó en el anterior y las mezclas de incubación fueron semejantes excepto que se usó amortiguador de fosfatos 0.6 M a pH 8.70.

Los resultados se muestran en las Tablas 19, 20 y 21 y en las Figuras 8, 9 y 10 (b).

En las Tablas 36, 37, 38, 39 y 40 se muestran los promedios de dos experimentos realizados bajo estas condiciones y se comparan con los restantes.

Tabla 19. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por la sangre total incubada a pH entre 7.83 y 8.01

Tubo (n <sup>o</sup> m)	Temperatura (°C)	Temperatura (K)	Tiempo (min)	*pH t°C	Δ As	Actividad específica ( $\frac{\text{nmol}}{\text{min, ml}}$ )
1	18	291.16	120	7.94	0.116	1.98
2					0.120	2.05
3	21	294.16	120	7.94	0.149	2.55
4					0.153	2.62
5	23	296.16	60	7.94	0.113	3.87
6					0.113	3.87
7	25	298.16	60	8.01	0.131	4.48
8					0.154	5.27
9	27	300.16	45	7.90	0.126	5.75
10					0.133	6.07
11	30	303.16	45	7.89	0.177	8.07
12					0.162	7.39
13	33	306.16	30	7.90	0.162	11.08
14					0.162	11.08
15	37	310.16	30	7.83	0.201	13.75
16					0.211	14.44
17	40	313.16	20	7.84	0.183	18.78
18					0.161	16.52

\*El pH se midió a la correspondiente temperatura de incubación

070683

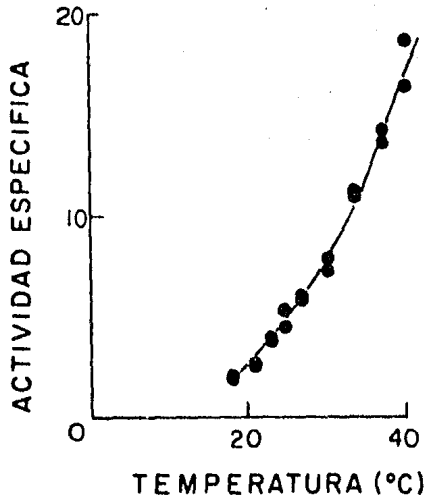


Fig. 8. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por la sangre total incubada en un medio con pH alrededor de 7.90. La actividad está expresada en nanomoles de NAD hidrolizado por minuto por mililitro de sangre con hematocrito de 45 por ciento.



Tabla 20. Valores calculados para la gráfica de Arrhenius  
Sangre total incubada a pH alrededor de 7.90

Tubo (número)	$(1/T)10^5$	$a$ $(\frac{\text{nmol}}{\text{seg, ml}})$	$\ln a$
1	343.4	0.0331	-3.409
2		0.0342	-3.375
3	340.0	0.0425	-3.159
4		0.0436	-3.132
5	337.7	0.0644	-2.742
6		0.0644	-2.742
7	335.4	0.0747	-2.594
8		0.0878	-2.433
9	333.2	0.0958	-2.346
10		0.1011	-2.292
11	329.9	0.1346	-2.006
12		0.1232	-2.094
13	326.6	0.1847	-1.689
14		0.1847	-1.689
15	322.4	0.2292	-1.473
16		0.2406	-1.425
17	319.3	0.3130	-1.162
18		0.2754	-1.290

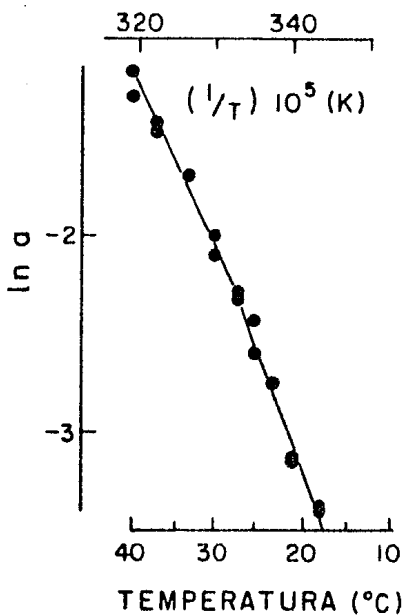


Fig. 9. Gráfica de Arrhenius, Sangre total incubada en un medio con pH alrededor de 7.90. Las constantes de la recta entre 18 y 27 $^{\circ}C$  fueron  $m = -10,800$ ,  $b = 33.8$  y  $r = -0.98$  y entre 27 y 40 $^{\circ}C$ ,  $m = -7,860$ ,  $b = 23.9$  y  $r = -0.99$

Tabla 21. Valores de la energía libre aparente de activación del complejo enzima-sustrato en el estado de transición en condiciones estándar a diferentes temperaturas

Sangre total incubada a pH alrededor de 7.90

---

Tubo (n <sup>o</sup> )	T (K)	$\Delta G^{\ddagger 1}$ (kJ/mol)
1	291.16	79.503
2		79.421
3	294.16	79.735
4		79.670
5	296.16	79.268
6		79.268
7	298.16	79.454
8		79.053
9	300.16	79.383
10		79.248
11	303.16	79.345
12		79.568
13	306.16	79.348
14		79.348
15	310.16	79.862
16		79.737
17	313.16	79.848
18		80.182

---

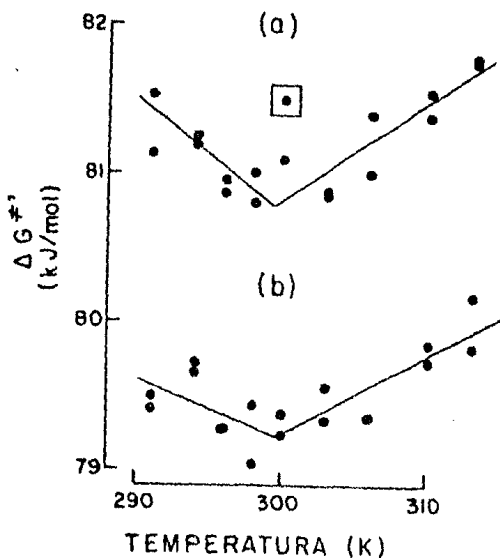


Fig. 10. Energía libre aparente de activación en función de la temperatura en experimentos con sangre total

- (a) Medio de incubación con pH alrededor de 6.60. Las constantes de la recta entre 18 y 25°C fueron  $m = -0.073$ ,  $b = 24.5$ , y  $r = -0.83$  y entre 30 y 40°C,  $m = 0.0870$ ,  $b = 13.0$  y  $r = 0.93$ . Los puntos encerrados en el cuadro no se incluyeron en el cálculo de estas constantes.
- (b) Medio de incubación con pH alrededor de 7.70. Las constantes fueron  $m = -0.00784$ ,  $b = 21.3$  y  $r = 0.54$  para la recta entre 18 y 27°C y  $m = 0.0132$ ,  $b = 15.0$  y  $r = 0.89$  para la recta de 27 a 40°C.

B. Suspensión de glóbulos rojos lavados

a. Incubaciones a pH alrededor de 6.75

Se prepararon mezclas de incubación por duplicado en la forma siguiente: 2.50 ml de suspensión de glóbulos rojos lavados, 2.00 ml de amortiguador 0.3 M citrato -0.3 M fosfato a pH 6.34 y 1.0 ml de NaCl 0.85%. Se añadieron 0.50 ml de NAD 5 mM para iniciar la reacción.

La sangre provenía de un donador que se presentó en el laboratorio.

La suspensión tuvo un hematocrito de 38.5 por ciento.

Los resultados se muestran en las Tablas 22, 23 y 24 y en las Figuras 11, 12 y 15 (a).

Los promedios de dos experimentos aparecen en las Tablas 36, 37, 38, 39 y 40.

Tabla 22. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por la suspensión de glóbulos rojos lavados incubada a pH entre 6.65 y 6.81

Tubo (n <sup>o</sup> m)	Temperatura °C	K	Tiempo (min)	pH* a t °C	Δ As	Actividad específica ( $\frac{\text{nmol}}{\text{min, ml}}$ )
1	15	288.16	90	6.81	0.033	1.01
2					0.035	1.07
3	18	291.16	60	6.80	0.033	1.51
4					0.028	1.28
5	21	294.16	60	6.76	0.053	2.43
6					0.048	2.20
7	24	297.16	45	6.76	0.051	3.12
8					0.058	3.55
9	27	300.16	30	6.75	0.060	5.50
10					0.059	5.41
11	29.5	302.66	30	6.75	0.070	6.42
12					0.076	6.97
13	34	307.16	30	6.70	0.092	8.44
14					0.100	9.17
15	37	310.16	30	6.69	0.114	10.45
16					0.120	11.00
17	40	313.16	15	6.69	0.066	12.10
18					0.073	13.39
19	45	318.16	15	6.65	0.102	18.71
20					0.110	20.17

\* El pH se midió a la correspondiente temperatura de incubación

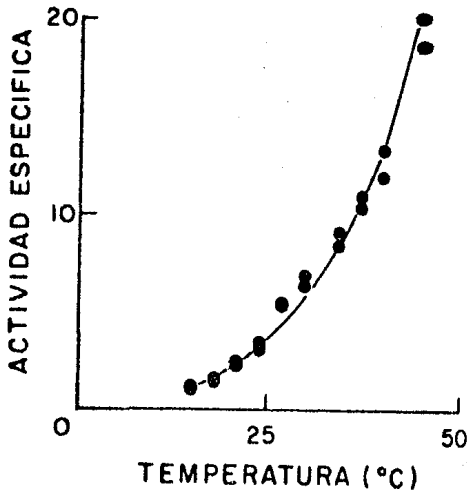


Fig. 11. Efecto de la temperatura sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los glóbulos rojos lavados incubados en un medio con pH alrededor de 6.75. La actividad específica está expresada en nanomoles de NAD hidrolizado por minuto por mililitro de suspensión de glóbulos rojos con hematocrito de 45 por ciento.

Tabla 23. Valores calculados para la gráfica de Arrhenius  
Glóbulos rojos lavados incubados a pH alrededor de 6.75

Tubo (n <sup>o</sup> m)	$(1/T)10^5$	$a$ $(\frac{\text{nmol}}{\text{seg, ml}})$	$\ln a$
1	347.0	0.0168	-4.086
2		0.0178	-4.027
3	343.5	0.0252	-3.680
4		0.0214	-3.844
5	340.0	0.0405	-3.206
6		0.0367	-3.306
7	336.5	0.0520	-2.957
8		0.0591	-2.829
9	333.2	0.0917	-2.389
10		0.0902	-2.406
11	330.4	0.1070	-2.235
12		0.1162	-2.152
13	325.6	0.1406	-1.962
14		0.1528	-1.878
15	322.4	0.1742	-1.747
16		0.1834	-1.696
17	319.3	0.2017	-1.600
18		0.2231	-1.500
19	314.3	0.3118	-1.165
20		0.3362	-1.089



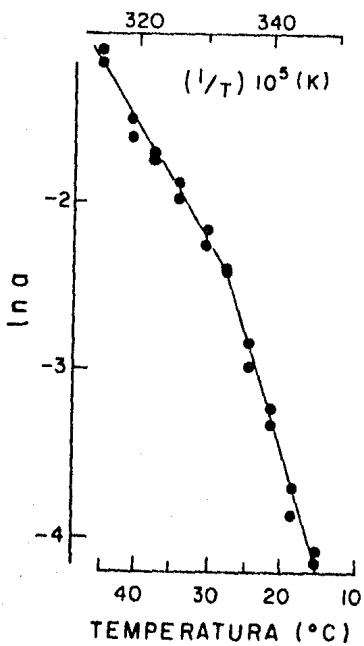


Fig. 12. Gráfica de Arrhenius. Glóbulos rojos lavados incubados en un medio con pH alrededor de 6.75. Las constantes de la recta en el intervalo de 15 a 27°C fueron  $m = -12,400$ ,  $b = 38.8$  y  $r = -0.99$  y para los límites entre 27 y 45°C,  $m = -6,560$ ,  $b = 19.4$  y  $r = -0.99$ .

Tabla 24. Valores de la energía libre aparente de activación del complejo enzima-sustrato en el estado de transición en condiciones estándar a diferentes temperaturas

Glóbulos rojos lavados incubados a pH alrededor de 6.75

Tubo (n <sup>o</sup> )	T (K)	$\Delta G^\ddagger$ (k J/mol)
1	288.16	80.280
2		80.139
3	291.16	80.159
4		80.557
5	294.16	79.852
6		80.094
7	297.16	80.076
8		79.758
9	300.16	79.492
10		79.534
11	302.66	79.787
12		79.580
13	307.16	80.313
14		80.100
15	310.16	80.569
16		80.437
17	313.16	80.992
18		80.729
19	318.16	81.176
20		80.976

b. Incubaciones a pH alrededor de 7.70

Se prepararon las mezclas de incubación como en el experimento anterior, con la diferencia que se empleó amortiguador 0.3 M Tris - 0.3 M fosfato a pH 7.92.

La sangre provenía de un donador diferente al anterior.

La suspensión de glóbulos rojos tuvo un hematocrito de 40 por ciento.

Los resultados aparecen en las Tablas 25, 26 y 27 y en las Figuras 13, 14 y 15 (b).

Los promedios de dos experimentos aparecen en las Tablas 36, 37, 38, 39 y 40.

Tabla 25. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por los glóbulos rojos lavados incubados a pH alrededor de 7.70

Tubo (n <sup>o</sup> )	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	pH <sup>*</sup> a t °C	Δ As	Actividad específica ( $\frac{\text{nmol}}{\text{min. ml}}$ )
1	15	120	7.95	0.032	0.71
2	18	120	7.92	0.064	1.41
3				0.059	1.30
4	21	90	7.79	0.063	1.85
5				0.052	1.53
6	24	60	7.70	0.048	2.12
7				0.056	2.47
8	27	45	7.68	0.054	3.18
9				0.064	3.77
10	30	30	7.65	0.050	4.41
11				0.056	4.94
12	34	30	7.58	0.071	6.27
13				0.076	6.71
14	37	30	7.50	0.087	7.68
15				0.074	6.53
16	40.5	20	7.46	0.062	8.21
17				0.067	8.87

\* El pH se midió a la correspondiente temperatura de incubación

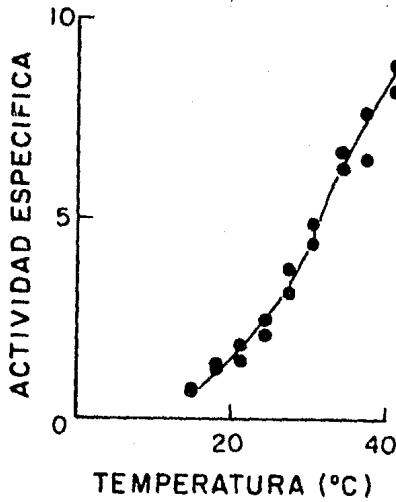


Fig. 13. Efecto de la temperatura sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los glóbulos rojos lavados incubados en un medio con pH alrededor de 7.70. La actividad específica está expresada en nanomoles de NAD hidrolizado por minuto y por mililitro de suspensión de glóbulos rojos con un hematocrito de 45 por ciento.

Tabla 26. Valores calculados para la gráfica de Arrhenius  
Glóbulos rojos lavados incubados a pH alrededor de 7.92

Tubo (número)	$(l/T)10^5$	$a^*$	$\ln a$
1	347.03	.0118	-4.442
2	343.4	.0235	-3.749
3		.0217	-3.830
4	340.0	.0309	-3.477
5		.0255	-3.669
6	336.5	.0353	-3.344
7		.0412	-3.190
8	333.2	.0530	-2.938
9		.0628	-2.768
10	329.9	.0736	-2.610
11		.0824	-2.496
12	325.6	.1044	-2.259
13		.1118	-2.191
14	322.4	.1280	-2.056
15		.1088	-2.218
16	319.3	.1368	-1.989
17		.1478	-1.912

\* actividad específica expresada en nmol/seg, ml

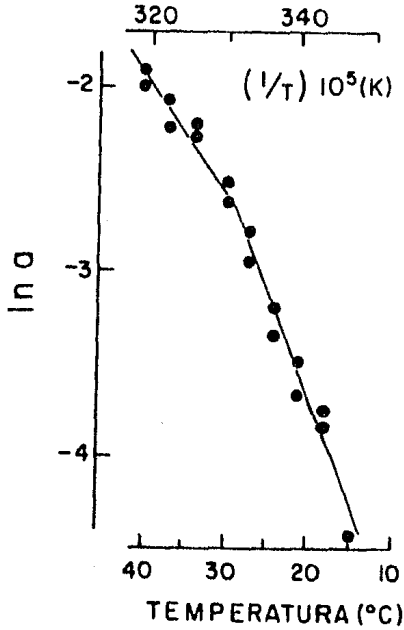


Fig. 14. Gráfica de Arrhenius. Glóbulos rojos lavados incubados en un medio con pH alrededor de 7.70. Las constantes de la recta para la zona de 15 a 27 $^{\circ}C$  fueron  $m = -10,230$ ,  $b = 31.2$  y  $r = -0.97$  y para el intervalo de 27 a 40.5 $^{\circ}C$ ,  $m = -6,180$ ,  $b = 17.8$  y  $r = -0.96$ .

Tabla 27. Valores de la energía libre aparente de activación del complejo-enzima sustrato en el estado de transición en condiciones estándar a diferentes temperaturas

Glóbulos rojos lavados incubados a pH alrededor de 7.92

Tubo (n <sup>o</sup> )	T (K)	$\Delta G^{\ddagger}$ (k J/mol)
1	288.16	81.135
2	291.16	80.326
3		80.523
4	294.16	80.514
5		80.983
6	297.16	81.030
7		80.650
8	300.16	80.862
9		80.438
10	303.16	80.867
11		80.581
12	307.16	81.072
13		80.898
14	310.16	81.365
15		81.782
16	313.66	82.138
17		81.936



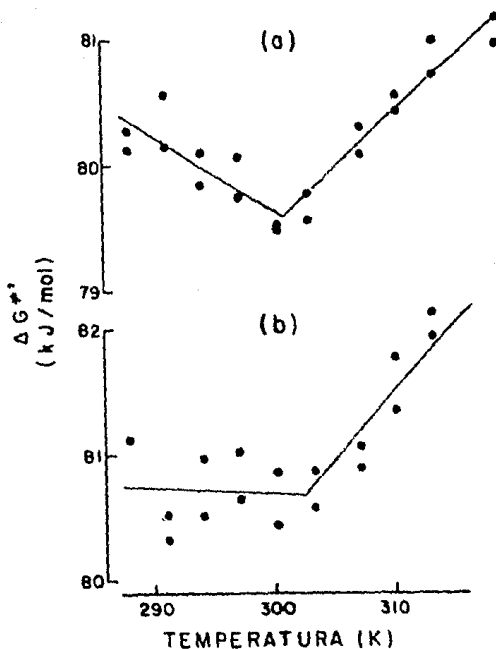


Fig. 15. Cambio aparente de la energía libre de activación en función de la temperatura en los glóbulos rojos lavados.

- (a) Medio de incubación con pH alrededor de 6.75. Las constantes de la recta entre 15 y 27°C fueron  $m = -0.0150$ ,  $b = 23.5$  y  $r = -0.82$  y entre 27 y 45°C,  $m = 0.0218$ ,  $b = 12.5$  y  $r = 0.97$
- (b) Medio de incubación con pH alrededor de 7.70. Las constantes fueron  $m = -0.0178$ ,  $b = 18.8$  y  $r = 0.12$  para la recta entre 18 y 25°C y  $m = 0.0258$ ,  $b = 11.5$  y  $r = 0.92$  para la recta de 30 a 40°C.

C. Suspensión de fantasmas de glóbulos rojos

a. Incubaciones a pH alrededor de 6.60

Se prepararon mezclas de incubación por duplicado de la manera siguiente: 6.0 ml de suspensión de fantasmas, 4.0 ml de amortiguador 0.3 M citrato - 0.3 M fosfato a pH 6.27 y 1.0 ml de NaCl 0.85%. Se añadió 1.0 ml de solución 6 mM de NAD para iniciar la reacción.

La concentración de proteínas en la suspensión de fantasmas fue 1.06 mg/ml.

Se inactivaron 4.0 ml de la mezcla de incubación con 4.0 ml de ácido perclórico al 10%.

La mitad del sobrenadante ácido se utilizó para medir el NAD con la deshidrogenasa alcohólica y la otra parte con KCN.

En la técnica con KCN se neutralizaron 3.0 ml del sobrenadante ácido con 0.30 ml de trietanolamina 1 M y - 0.30 ml de  $K_2CO_3$  5 M. Al final se ponía en la celda del espectrofotómetro 1.0 ml del extracto neutralizado y se le añadían 2.0 ml de KCN 1.5 M.

La sangre fue proporcionada por el Instituto Nacional de Cardiología.

Los resultados se muestran en las Tablas 28, 29, 30 y 31 y en las Figuras 16, 17 y 20(a).

En las Tablas 36, 37, 38, 39 y 40 se muestran los promedios de cuatro experimentos realizados bajo estas condiciones y se comparan con los restantes.

Tabla 28. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por la suspensión de fantasmas de glóbulos rojos lavados incubados a pH alrededor de 6.60

Tubo (núm)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	pH* a t°C	Δ As	Actividad específica ( $\frac{\text{nmol}}{\text{min, mg}}$ )
1	15	120	6.61	0.036	0.56
2				0.032	0.49
3	18	90	6.60	0.023	0.47
4				0.032	0.66
5	21	90	6.60	0.043	0.88
6				0.040	0.82
7	24	60	6.61	0.048	1.48
8				0.042	1.30
9	27	30	6.56	0.038	2.34
10				0.041	2.53
11	30	30	6.56	0.042	2.59
12				0.041	2.53
13	33.8	30	6.56	0.049	3.02
14				0.046	2.84
15	37	30	6.54	0.059	3.64
16				0.063	3.88
17	40	20	6.58	0.054	5.00
18				0.056	5.18

\* El pH se midió a la temperatura de incubación correspondiente

Tabla 29. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por la suspensión de fantasmas de glóbulos rojos lavados incubados a pH alrededor de 6.60

Medición del NAD con KCN

Temperatura (°C)	$\Delta$ As promedios	Actividad específica ( $\frac{\text{nmol}}{\text{min,mg}}$ )	Relación DHA/KCN
15	0.030	0.56	0.94
18	0.024	0.59	0.96
21	0.030	0.74	1.15
24	0.034	1.26	1.10
27	0.022	1.63	1.49
30	0.027	2.00	1.28
33.8	0.042	3.11	0.78
37	0.049	3.63	1.04
40	0.038	4.22	1.21

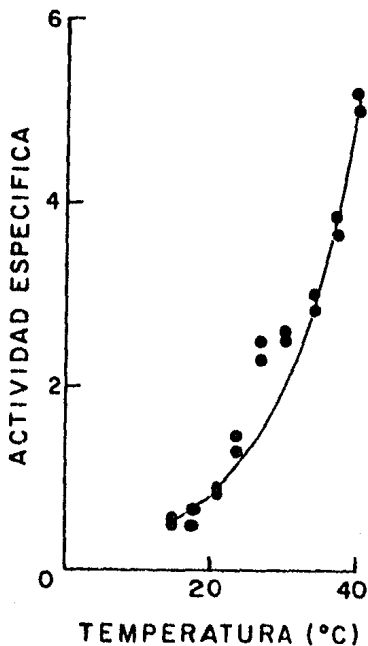


Fig. 16. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por la suspensión de fantasmas de glóbulos rojos incubados en un medio con pH alrededor de 6.60. La actividad está expresada en nanomoles de NAD hidrolizado por minuto y por miligramo de proteína.

Tabla 30. Valores calculados para la gráfica de Arrhenius  
Fantasmas de glóbulos rojos incubados a pH alrededor de 6.60

Tubo (número)	$(1/T)10^5$	$a^*$	$\ln a$
1	347.0	0.0092	-4.683
2		0.0082	-4.801
3	343.5	0.0079	-4.843
4		0.0110	-4.513
5	340.0	0.0147	-4.218
6		0.0137	-4.229
7	336.5	0.0247	-3.702
8		0.0216	-3.836
9	333.2	0.0391	-3.243
10		0.0421	-3.167
11	329.0	0.0432	-3.143
12		0.0421	-3.167
13	325.6	0.0504	-2.988
14		0.0473	-3.052
15	322.4	0.0606	-2.803
16		0.0648	-2.737
17	319.3	0.0832	-2.486
18		0.0863	-2.450

\* Actividad específica expresada en nmol/seg, mg

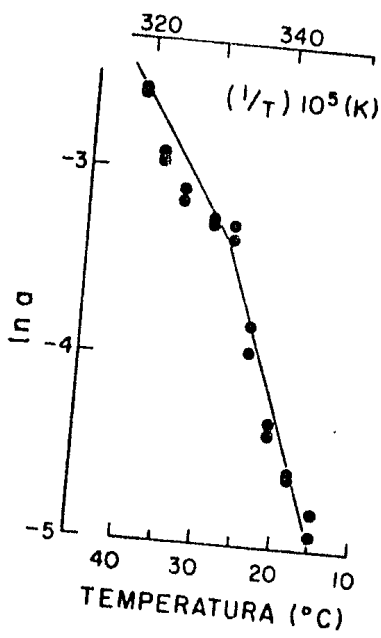


Fig. 17. Gráfica de Arrhenius. Fantasmas de glóbulos rojos incubados en un medio con pH alrededor de 6.60. Las constantes de la recta que une los puntos en la zona de 15 a 27°C fueron  $m = 10,950$ ,  $b = 33.0$  y  $r = -0.98$  y para la recta del intervalo 27 a 40°C,  $m = -5,240$ ,  $b = 14.1$  y  $r = -0.95$ .



Tabla 31. Valores de la energía libre aparente de activación del complejo enzima-sustrato en el estado de transición en condiciones estándar a diferentes temperaturas

Fantasma de glóbulos rojos lavados incubados a pH alrededor de 6.60

Tubo (n <sup>o</sup> )	T (K)	$\Delta G^{\ddagger}$ (k J/mol)
1	288.16	81.711
2		81.994
3	291.16	82.975
4		82.176
5	294.16	82.325
6		82.502
7	297.16	81.916
8		82.246
9	300.16	81.622
10		81.432
11	303.16	82.210
12		82.271
13	306.96	82.879
14		83.040
15	310.16	83.291
16		83.122
17	313.16	83.296
18		83.202

b. Incubaciones a pH alrededor de 8.00

Se prepararon las mezclas de incubación como en el experimento anterior, con la diferencia que se empleó amortiguador 0.3 Tris - 0.3 M fosfato a pH 8.16.

La sangre fue proporcionada por el Instituto Nacional de Cardiología.

La concentración de proteínas fue 1.68 mg por mili litro de suspensión de fantasmas.

Los resultados aparecen en las Tablas 32, 33, 34 y 35 y en las Fig. 18, 19 y 20(b).

En las Tablas 36, 37, 38, 39 y 40 se muestran los promedios de tres experimentos realizados bajo estas condi ciones y se comparan con los restantes.

Tabla 32. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por la suspensión de fantasmas de glóbulos rojos lavados incubados a pH alrededor de 8.00

Tubo (número)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	pH* a t°C	ΔA	Actividad específica $\left(\frac{\text{nmol}}{\text{min, mg}}\right)$
1	18	120	8.28	0.048	0.47
2				0.052	0.51
3	21	120	8.21	0.057	0.55
4				0.052	0.51
5	24	120	8.12	0.061	0.60
6				0.052	0.51
7	28	45	8.02	0.059	1.53
8				0.062	1.61
9	31	31	7.97	0.043	1.62
10				0.048	1.81
11	34	30	7.91	0.056	2.18
12				0.060	2.34
13	37	30	7.82	0.072	2.80
14				0.077	3.00
15	40	20	7.80	0.058	3.39
16				0.049	2.86

\*El pH se midió a la temperatura de incubación correspondiente

Tabla 33. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por la suspensión de fantasmas de glóbulos rojos lavados incubados a pH alrededor de 8.00

Medición del NAD con KCN

Temperatura (°C)	$\Delta A$ promedios	Actividad específica ( $\frac{\text{nmol}}{\text{min,mg}}$ )	Relación DHA/KCN
18	0.054	0.63	0.78
21	0.048	0.56	0.95
24	0.042	0.49	1.12
28	0.043	1.34	1.17
31	0.038	1.72	1.00
34	0.047	2.20	1.03
37	0.058	2.71	1.07
40	0.042	2.94	1.06

190483

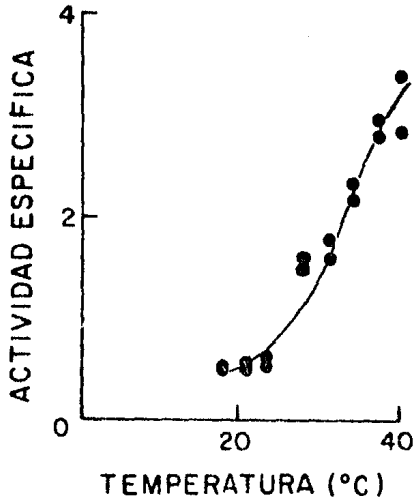


Fig. 18. Efecto de la temperatura sobre la degradación del NAD catalizada por la suspensión de fantasmas de glóbulos rojos incubados en un medio con pH alrededor de 8.00. La actividad específica está expresada en nanomoles de NAD hidrolizado por minuto y por miligramo de proteínas.

Tabla 34. Valores calculados para la gráfica de Arrhenius  
Fantasmas de glóbulos rojos lavados incubados a pH  
alrededor de 8.00

---

Tubo (número)	$(1/T)10^5$	$a^*$	$\ln a^*$
1	343.5	0.0078	-4.855
2		0.0084	-4.775
3	340.0	0.0092	-4.683
4		0.0084	-4.775
5	336.5	0.0099	-4.611
6		0.0084	-4.781
7	332.0	0.0255	-3.668
8		0.0268	-3.619
9	328.8	0.0270	-3.612
10		0.0301	-3.502
11	325.6	0.0363	-3.315
12		0.0389	-3.246
13	322.4	0.0467	-3.064
14		0.0500	-3.000
15	319.3	0.0564	-2.874
16		0.0477	-3.043

---

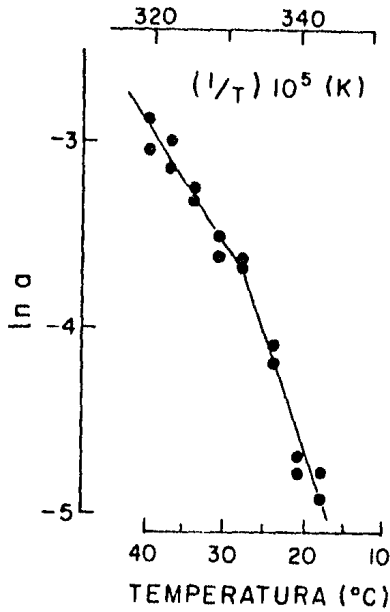


Fig. 19. Gráfica de Arrhenius. Fantasmas de glóbulos rojos la vados incubados en un medio con pH alrededor de 8.00. Las constantes de la recta para el intervalo 18 a 28°C fueron  $m = -11,200$ ,  $b = 33.4$  y  $r = -0.97$  y para la zona de 28 a 40°C,  $m = -5,970$ ,  $b = 16.1$  y  $r = -0.96$

Tabla 35. Valores de la energía libre aparente de activación del complejo enzima-sustrato en el estado de transición en condiciones estándar a diferentes temperaturas

Fantasma de glóbulos rojos lavados incubados a pH alrededor de 8.00

---

Tubo (número)	T (K)	$\Delta G^\ddagger$ , (k J/mol)
1	291.16	83.004
2		82.810
3	294.16	83.464
4		83.689
5	297.16	84.161
6		84.581
7	301.16	82.967
8		82.843
9	304.16	83.676
10		83.398
11	307.16	83.768
12		83.592
13	310.16	83.963
14		83.790
15	313.16	84.308
16		84.747

---



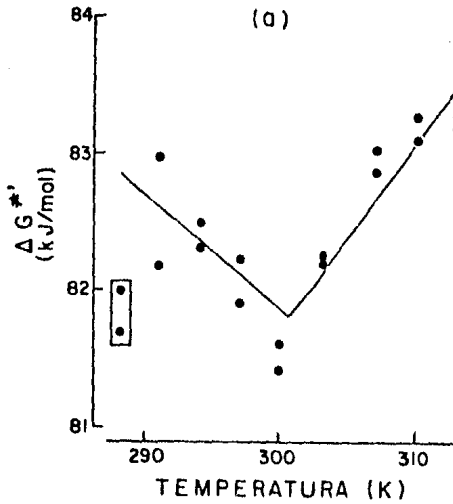


Fig. 20. Cambio aparente de la energía libre de activación en función de la temperatura en experimentos con fantasmas de glóbulos rojos.

(a) Medio de incubación con pH alrededor de 6.60. Las constantes de la recta entre 18 y 27°C fueron  $m = -0.0280$ ,  $b = 27.9$  y  $r = 0.84$  y entre 27 y 40°C,  $m = 0.321$ ,  $b = 9.95$  y  $r = 0.94$ . Los puntos encerrados en el cuadro no se incluyeron en el cálculo de estas constantes.

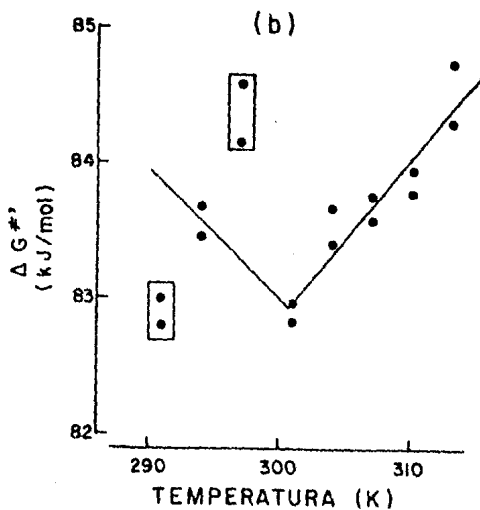


Fig. 20. Cambio aparente de la energía libre de activación en función de la temperatura en experimentos con fantasmas de glóbulos rojos.

(b) Medio de incubación con pH alrededor de 8.00. Las constantes fueron  $m = -0.0226$ ,  $b = 26.6$  y  $r = -0.82$  para la recta entre 21 y 28°C y  $m = 0.0287$ ,  $b = 11.2$  y  $r = 0.94$  para la recta entre 28 y 40°C.

Tabla 36. Valores promedio y desviación estándar de la energía aparente de activación de Arrhenius del complejo enzima-sustrato en el estado de transición en los diferentes tipos de preparaciones de eritrocitos humanos

Preparación	pH a 37°C	Ea' (kJ/mol)		Rela- ción	Dife- rencia	Valor de p
		bajas*	Temperaturas altas**			
Sangre Total	6.61	89.874 (1)	57.150 (1)	1.57	33	-
	7.80	84.700 ± 1.07 (2)	55.288 ± 1.05 (2)	1.53	29	>0.001
Glóbulos rojos	6.74	95.765 ± 6.40 (2)	56.228 ± 1.20 (2)	1.70	40	>0.01
	7.80	87.842 ± 3.92 (2)	41.075 ± 4.07 (2)	2.14	47	>0.001
Fantasmas	6.62	81.734 ± 17.46 (3)	42.252 ± 1.60 (3)	1.93	39	>0.01
	7.91	87.934 ± 10.00 (3)	48.412 ± 3.24 (3)	1.82	40	>0.001

\* 15 a 27°C

\*\* 30 a 40°C

Las cifras entre paréntesis indican el número de experimentos

Tabla 37. Valores promedio y desviación estándar de la energía libre estándar aparente del complejo enzima-sustrato en el estado de transición en los diferentes tipos de preparaciones de eritrocitos humanos

Preparación	pH a 37°C	$\Delta G^{\ddagger}$ (kJ/mol)		
		17°C	37°C	alrededor de 27°C *
Sangre total	6.61	81.50 (1)	81.50 (1)	80.78 (26.1)
	7.80	79.62 (1)	80.45 ± 0.95 (2)	79.55 ± 0.47 (26.4) (2)
Suspensión glóbulos rojos	6.74	80.91 ± 0.95 (2)	81.30 ± 1.19 (2)	80.45 ± 1.22 (27.4) (2)
	7.80	80.74 (1)	82.11 ± 0.80 (2)	81.14 ± 0.66 (29.0) (2)
Suspensión fantasmas	6.62	82.69 (1)	83.18 ± 0.075 (3)	81.89 ± 0.10 (27.6) (2)
	7.90	83.19 ± 0.67 (3)	83.89 ± 0.14 (3)	82.59 ± 0.31 (27.5) (3)

\* La temperatura precisa figura entre paréntesis y corresponde al punto en que se cruzan las rectas en las gráficas  $\Delta G^{\ddagger}$  contra T.

Tabla 38. Valores promedio y desviación estándar de la entalpía estándar aparente del complejo enzima-sustrato en el estado de transición en los diferentes tipos de preparaciones de eritrocitos humanos

Preparación	pH a 37°C	$\Delta H^{\ddagger}$ (kJ/mol)	
		Temperaturas bajas	altas
Sangre total	6.61	101.7 (1)	60.7 (1)
	7.80	91.6 (1)	55.2 ± 11.2 (2)
Suspensión glóbulos rojos	6.74	93.5 ± 6.3 (2)	54.0 ± 3.0 (2)
	7.80	82.4 (1)	40.0 ± 1.8 (2)
Suspensión fantasmas	6.62	106.6 (1)	39.8 ± 1.7 (3)
	7.90	100.6 ± 9.8 (3)	45.9 ± 3.2 (3)

Tabla 39. Valores promedio y desviación estándar de la entropía estándar aparente del complejo enzima-sustrato en el estado de transición en los diferentes tipos de preparaciones de eritrocitos humanos

Preparación	pH a 37°C	$\Delta S^{\ddagger}$ (Julio/mol, grado) Temperaturas altas
Sangre total	6.61	0.0671 (1)
	7.80	0.08135 ± 0.0391 (2)
Suspensión glóbulos rojos	6.74	0.08788 ± 0.00577 (2)
	7.80	0.13580 ± 0.0084 (2)
Suspensión fantasmas	6.62	0.13984 ± 0.00581 (3)
	7.90	0.1225 ± 0.0102 (3)

Tabla 40. Significación estadística de las diferencias entre los promedios de la energía aparente de activación de Arrhenius comparando la misma preparación a pH ácido y a pH alcalino en incubaciones a bajas y a altas temperaturas

Preparación*	pH a 37°C	Ea <sup>±</sup> (kJ/mol)	
		Temperaturas bajas	Temperaturas altas
Glóbulos rojos	6.74	95.765 ± 6.40 (2)	56.228 ± 1.20 (2)
	7.80	87.842 ± 3.92 (2)	41.075 ± 4.07 (2)
		p > 0.8	p > 0.02
Fantasmas	6.62	81.734 ± 17.46 (3)	42.252 ± 1.60 (3)
	7.91	87.934 ± 10.00 (3)	48.412 ± 3.24 (3)
		p > 0.6	p > 0.02

\* No se hizo esta comparación en la incubación con sangre total (Ver el texto)

Tabla 41. Significación estadística de las diferencias entre los promedios de la energía aparente de activación de Arrhenius comparando entre sí los distintos tipos de preparaciones a bajas y altas temperaturas y en medio ácido y alcalino, respectivamente

pH a 37°C	Ea' (kJ/mol)			Valor de p
	Sangre Total	Glóbulos rojos	Fantasmas	
<u>Temperaturas bajas</u>				
6.6		95.765 ± 6.40 (2)	81.734 ± 17.46 (3)	>0.3
	84.700 ± 1.07 (2)	87.842 ± 3.92 (2)		>0.3
7.8	84.700 ± 1.07 (2)		87.934 ± 10.00 (3)	<0.7
		87.842 ± 3.92 (2)	87.934 ± 10.00 (3)	>0.9
<u>Temperaturas altas</u>				
6.6		56.228 ± 1.20 (2)	42.252 ± 1.60 (3)	>0.001
	55.288 ± 1.05 (2)	41.075 ± 4.07 (2)		<0.05
7.8	55.288 ± 1.05 (2)		48.412 ± 3.24 (3)	>0.05
		41.075 ± 4.07 (2)	48.412 ± 3.24 (3)	>0.10



## DISCUSION

La velocidad de hidrólisis del NAD catalizada por la sangre total o por la suspensión de glóbulos rojos lavados, disminuyó continuamente desde los primeros minutos de la incubación hecha a 37°C y a pH 7.40, con amortiguador de fosfatos 0.05 M y a los 60 min era alrededor del 64% de la velocidad inicial en el caso de la sangre total y 72% con los glóbulos rojos. La concentración del NAD en la mezcla de incubación al tiempo cero fue 367 µM en el tubo con la sangre y 558 µM en el que contenía los eritrocitos y a los 60 min bajó a 443 y 466 µM, respectivamente; de lo que resulta que se consumió el 22 y el 17% del sustrato en una y otra de las mezclas.

La velocidad  $v$  correspondiente a cada una de las concentraciones de sustrato, se calculó con la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V [S]}{K_m + [S]} = \frac{V}{\frac{K_m}{[S]} + 1}$$

La velocidad máxima  $V$  se consideró como 100% y el valor de la  $K_m$  que se usó fue 20 µM que corresponde al sustrato NAD y a la enzima de la sangre humana (Beltrán, 1981).

La velocidad inicial con la sangre total fue el 96.6% de la velocidad máxima y a los 60 min el 95.7%. En la suspensión de glóbulos rojos la velocidad al principio fue el 96.5% de la máxima y a los 60 min el 95.85%. En otras palabras, la dis-

minución en la concentración del sustrato no afectó sensiblemente a la velocidad de degradación de éste; consecuentemente, no parece ser la responsable de la depresión de la velocidad.

La nicotinamida se libera en cantidad equivalente al sustrato utilizado, si la acción catalítica se debe a la enzima NAD glicohidrolasa y la nicotinamida inhibe esta enzima (Mann y Quastel, 1941; Beltrán, 1981). Se utilizó la siguiente ecuación (Dawes, 1969), para apreciar cuantitativamente el efecto de este inhibidor al cabo de 60 min de incubación:

$$v_i = \frac{v}{1 + \frac{[i]}{K_i}}$$

En esta ecuación  $v$  es la velocidad en ausencia de inhibidor calculada con la ecuación de Michaelis-Menten;  $[i]$  es la concentración de la nicotinamida en la mezcla de incubación y  $K_i$  es la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor que tiene un valor de 1,100  $\mu$ M para el caso de la sangre humana-nicotinamida (Beltrán, 1981): a los 60 min de incubación la nicotinamida fue responsable del 9.7% de la inhibición en la mezcla que contiene la sangre total y del 7.4% en el caso de los glóbulos rojos.

En resumen, la baja de sustrato y la presencia de nicotinamida reprimieron el 10.6 y el 8.1% de la velocidad en el

tubo con sangre y con glóbulos rojos, respectivamente. Ahora bien, como la depresión de la velocidad a los 60 min fue de 36 y de 28%, la diferencia de 25 y de 20%, para uno y otro tubo, pudiera deberse a inactivación de la enzima producida por el calentamiento a 37°C, durante los 60 min de incubación.

En la mezcla que contenía la sangre total, la degradación del NAD fue mayor en todo momento de la incubación que en la que contenía los glóbulos rojos lavados, no obstante que ambas preparaciones provinieron de la misma sangre y que en uno y otro caso, la actividad está referida a un mililitro de suspensión con hematocrito de 45 por ciento. La diferencia se debe posiblemente a que la sangre contiene leucocitos, plaquetas y plasma, además de eritrocitos, y en todos ellos se ha demostrado la presencia de la enzima NAD glicohidrolasa, aun cuando estos componentes son responsables de menos del 20% de la actividad mostrada por la sangre total (Beltrán, 1981; Torres, 1984). Hay otra razón por la cual la sangre total presenta mayor actividad y es la presencia de un factor en el plasma que estimula la NADasa de los eritrocitos en incubación a pH mayor de 7 (trabajos no publicados de nuestro laboratorio), desde 10 hasta 180% si se le refiere a la actividad medida a pH alrededor de 6.5.

En el curso de la incubación de 60 min, la velocidad de degradación del NAD, catalizada por la sangre total, disminuyó con

tinuamente, no sólo considerada en sí misma sino en relación con la degradación catalizada por los glóbulos rojos lavados, de manera que a los 15 min la cifra era 39% mayor y a los 60 min sólo fue 16%. Quizá esto se debe a que la sensibilidad de la enzima al calentamiento de 37°C, es diferente según se trate de la del plasma, de los leucocitos o de las plaquetas y las enzimas más lábiles van dejando de actuar eficientemente.

La nicotinamida a la concentración 100 mM, que es aproximadamente 90 veces el valor de la  $K_i$  (Beltrán, 1981), inhibió casi completamente la degradación del NAD y mientras no se demuestre que la nicotinamida a la concentración usada también inhibe otras enzimas, se puede concluir que la actividad que contienen los glóbulos rojos humanos después de haber sido lavados, es la NAD glicohidrolasa. A esta misma conclusión se llega si se observa que la relación entre la cifra de NAD obtenida con la deshidrogenasa alcohólica y la medida con KCN fue alrededor de 1, pues esto significa que el NAD sólo se degrada por hidrólisis del enlace  $\beta$ -N-glicosídico, entre el anillo de la nicotinamida y la ribosa.

El sustrato NAD fue estable durante 30 min de incubación a 37°C, en medios con pH desde 6.3 hasta 8.9, usando diversos amortiguadores y también cuando se incubó a diversas temperaturas desde 15 hasta 45°C, durante 90 min en las bajas y hasta 15 min en las altas, en medios de incubación a pH alrededor

de 6.7 y en otros de 7.6. Consecuentemente, sólo cuando las incubaciones se hicieron a valores de pH mayores de 8.9, se tomó en cuenta la hidrólisis no enzimática del NAD y eso - siempre que el número de nanomoles degradadas por minuto y por mililitro de mezcla de incubación fuese mayor de 0.30, que representa la variabilidad del método.

En la incubación con sangre total, se observaron dos zonas de máxima actividad enzimática en función del pH: una alrededor de 6.8 y otra alrededor de 7.8; la actividad específica en esta última fue 12% mayor que en la primera. Beltrán (1981), en nuestro laboratorio, obtuvo una sola región de máxima actividad entre los valores de pH de 6.3 a 7.3. La diferencia se debe, según lo sabemos ahora, al tiempo que transcurre entre la extracción de la sangre y la realización del estudio. Sin embargo, la sangre de dos donadores, aparentemente sanos, no mostró esta zona de mayor actividad en el medio de incubación alcalino, a pesar de que había sido extraída recientemente; por lo que convendrá hacer un estudio especial de este diferente comportamiento.

Cuando la incubación se hizo con la suspensión de glóbulos rojos lavados o con la de los fantasmas, hubo solamente una zona de actividad óptima, alrededor del pH 6.5.

Ravazzolo, Bruzzone, Garré y Ajmar (1976), en su trabajo con la enzima extraída de los fantasmas de eritrocitos humanos,

encontraron también una sola región de actividad máxima entre los valores de pH de 6.4 a 6.7.

Esto nos permite concluir que la condición de la enzima, juzgada por su comportamiento frente a distintos valores de pH del medio de incubación, es la misma si se le estudia en los glóbulos rojos lavados, en los fantasmas y en solución, y que la diferencia de comportamiento de la sangre total se debe a la presencia del plasma.

Las cifras de la actividad específica máxima a pH 6.5, no fueron semejantes en los tres tipos de preparaciones, porque además de que la sangre para estos experimentos fue extraída de diferentes donadores, la sangre total contenía no solo glóbulos rojos sino leucocitos, plaquetas y plasma, y en el caso de los fantasmas de eritrocitos, la actividad está referida a miligramo de proteínas y no a un mililitro de suspensión de glóbulos rojos con hematocrito de 45 por ciento.

La degradación del NAD catalizada por la sangre total o las suspensiones de glóbulos rojos o fantasmas, aumentó a medida que se elevaba la temperatura de incubación: a los 40°C la actividad fue 6 a 7 veces mayor que a 20°C, independientemente del tipo de preparación. El mayor incremento ocurrió en la región de 35 a 40°C; excepto en la suspensión de glóbulos rojos incubada en medio alcalino, en donde el incremento se inició a 30°C, y en la suspensión de fantasmas,

también en medio alcalino, en donde principió a 33°C; en ambos casos, a los 40°C la actividad ya estaba disminuyendo, mientras en las otras preparaciones continuaba en ascenso. Es posible que este comportamiento corresponda a una diferencia en la labilidad de la enzima, que dependa de la ausencia del plasma y que se manifieste sólo cuando el medio es alcalino.

La temperatura de 37°C que se ha escogido para la incubación es la adecuada, ya que está antes de que la actividad - empiece a disminuir y en la región en donde el incremento es mayor; esto último obliga a que el control de la temperatura del baño de incubación debe ser muy riguroso.

Los puntos experimentales obtenidos con la sangre total y con los glóbulos rojos lavados, quedaron sobre la curva regular que se trazó en la gráfica correspondiente que relaciona la actividad específica con la temperatura de incubación; en el caso de las suspensiones de fantasmas, los valores de la actividad entre 25 y 31°C quedaron por arriba de la curva que une los demás puntos.

Los valores de  $Q_{10}$  en la zona de mayor incremento de la actividad específica fueron 1.95 y 1.87 para la sangre total, en medio ácido y en medio alcalino, respectivamente; 1.96 y 1.91 para las suspensiones de glóbulos rojos lavados y 2.13 y 2.57 en el caso de las suspensiones de fantasmas o sea que el aumento térmico produjo una mayor activación enzimática en - los eritrocitos que carecían de su contenido globular (fantag

mas) y no hubo diferencia debida a la presencia del plasma - (sangre total y glóbulos rojos lavados).

En la gráfica de Arrhenius los puntos experimentales, en todos los casos, no se agruparon en una sola recta sino que hubo una discontinuidad en la pendiente, de manera que se trazaron dos líneas convergentes en un ángulo mayor de  $180^\circ$ . Esto indica que ocurrió un cambio del valor de la energía aparente de activación, en la temperatura en que se cortan las dos rectas (temperatura de transición).

En las temperaturas menores de la de transición, las energías aparentes de activación resultaron entre 82 y 96 kJ/mol y no hubo diferencias significativas entre los resultados con la sangre total, los glóbulos rojos lavados y los fantasmas; ni tampoco entre los valores obtenidos con las incubaciones en medio ácido y en medio alcalino. La actividad medida en la sangre total incubada en medio ácido, no pudo compararse a través de la prueba  $t$  de Student con las otras actividades, porque se tuvo una sola serie de experimentos y no varias como con las otras preparaciones.

En la zona de temperaturas mayores que la de transición, las energías aparentes de activación fueron desde 41 hasta 57 kJ/mol. Bělehrádek (1957) opina que para ser reales las diferencias entre las energías de activación, a bajas y a altas temperaturas, deben sobrepasar el valor de 67 kJ/mol. En nuestras series, la diferencia menor fue 29 y la mayor



42 kJ/mol. Sin embargo, la prueba  $t$  de Student, entre los promedios de las  $E_a$  a bajas y a altas temperaturas, mostró valores de  $p$  altamente significativos y por otra parte, las relaciones entre las pendientes en las gráficas de Arrhenius, fueron 1.55 para la sangre total y 1.90 en el caso de las suspensiones de glóbulos o de fantasmas. Consecuentemente, las diferencias entre las energías aparentes de activación, para bajas y altas temperaturas, parecen ser reales, a pesar de que no satisfacen el criterio de Bělehrádek.

En la zona de temperaturas más altas que la de transición, el promedio de la  $E_a$  con los glóbulos rojos fue significativamente mayor en el medio ácido que en alcalino; pero, en los fantasmas esto ocurrió al contrario. Por su parte, el promedio de la  $E_a$  en el medio ácido fue significativamente menor en los fantasmas que en los glóbulos rojos; en cambio, en el medio alcalino no fueron diferentes entre sí, aunque ambos resultaron menores que el promedio obtenido con la sangre total.

El valor de la  $E_a$ , que Beltrán (1981) determinó en nuestro laboratorio, para la sangre total humana a pH alcalino y en la zona de temperaturas bajas, fue más alto que el encontrado ahora: 141 y 88 kJ/mol, respectivamente; mientras que el valor en las temperaturas mayores de la transición, resultó muy parecido al de la presente serie: 37 y 41 kJ/mol, respectivamente. Es probable que la discrepancia se deba, a que en el

trabajo anterior, sólo se estudiaron los efectos a dos temperaturas bajas y muy separadas entre sí.

En las gráficas de  $\Delta G^{\ddagger}$  contra T los puntos experimentales, en general, se agruparon en dos rectas que convergen en forma de V y marcan con el vértice un valor mínimo de la energía libre estándar aparente. En el caso de la sangre total, incubada tanto en medio ácido como alcalino, la intersección ocurrió a 26°C. Con la suspensión de glóbulos rojos lavados, la gráfica resultó semejante a las anteriores con el medio ácido y la intersección correspondió a 27.5°C; en cambio, en medio alcalino, los puntos correspondientes a las temperaturas altas, se localizaron a lo largo de la rama derecha de la V, pero los obtenidos a temperaturas bajas, quedaron sobre una recta casi horizontal que corta a la anterior a los 29°C. Inicialmente, la gráfica de Arrhenius correspondiente a este experimento, es la que mostró el mayor cambio de pendiente entre las dos rectas. En el caso de las suspensiones de fantasmas, en las gráficas de los experimentos que se presentan, se aprecia una notable dispersión de los valores a las bajas temperaturas; por lo que no todos los puntos se tomaron en cuenta para calcular la recta correspondiente. La intersección tanto en los valores obtenidos con el medio ácido como los del alcalino, ocurrió a 27.5°C.

En vista de que en algunas gráficas, los valores de  $\Delta G^{\ddagger}$

resultaron dispersos en la zona de temperaturas bajas, se decidió hacer las comparaciones de la sangre total, los glóbulos rojos lavados y los fantasmas, tomando el valor de  $\Delta G^\ddagger$  a 37°C únicamente. A esta temperatura la energía libre estándar aparente de activación, fue mayor cuando la actividad enzimática se midió en las preparaciones de fantasmas que en las de los glóbulos rojos lavados y mayor en éstas que en las de sangre total, tanto en las incubaciones en medio ácido - como en el alcalino. En la mayor parte de las comparaciones las diferencias resultaron estadísticamente significativas.

Los valores de la entalpía estándar aparente de activación,  $\Delta H^\ddagger$ , resultaron entre 82 y 107 kJ/mol en la zona de temperaturas bajas y no parecen ser diferentes para la sangre total, los glóbulos rojos lavados y los fantasmas. En cambio, en las temperaturas altas, los valores quizá son menores para la enzima cuando se le estudia en los fantasmas o en los glóbulos rojos que cuando se utiliza la sangre total y esto se observó tanto en los medios alcalinos como en los ácidos; sin embargo, si en estas comparaciones se utiliza la prueba t de Student, la mayor parte de las diferencias resultaron no ser significativas estadísticamente.

Los valores de la entropía aparente de activación en condiciones estándar,  $\Delta S^\ddagger$ , fueron negativos en la zona de temperaturas menores de 27°C y positivos en la zona de temperaturas

más altas. Sólo se analizaron los datos de la entropía, obtenidos de la recta trazada en la zona de temperaturas altas, dada la dispersión de algunos de los valores en las temperaturas bajas. Las cifras variaron desde 0.067 hasta 0.140 J/mol, grado, y aparentemente, fueron menores en la sangre total y mayores en las suspensiones de fantasmas, quedando las cifras correspondientes a los glóbulos rojos lavados, parecidas a las de la sangre total cuando la incubación se hizo en medio ácido y semejantes a las de los fantasmas en el medio alcalino. La prueba t de Student no en todos los casos mostró significación estadística, entre los valores promedio que se compararon.

### CONCLUSION

La degradación del NAD, catalizada por los glóbulos rojos lavados de la sangre humana, se debió únicamente a la enzima NAD glicohidrolasa. La enzima fue sensible al calentamiento a 37°C en las condiciones de incubación. La mayor actividad enzimática se encontró al pH alrededor de 6.5, tanto con la sangre total como con los glóbulos rojos y los fantasmas; y fue notable el efecto del plasma sobre la actividad enzimática, al pH cercano a 7.8. La temperatura afectó distintamente a la actividad enzimática según se incubara la sangre total, los glóbulos rojos o los fantasmas, a juzgar por los valores de  $Q_{10}$ ,  $E^{\ddagger}$ ,  $\Delta G^{\ddagger}$ ,  $\Delta H^{\ddagger}$  y  $\Delta S^{\ddagger}$ .

En resumen, el comportamiento de la enzima aparentemente no se modificó en los fantasmas, ni en los glóbulos rojos lavados con respecto a la sangre total, cuando se estudió el efecto del pH del medio de incubación; pero sí aparecieron diferencias interesantes en los valores termodinámicos, calculados a partir de las actividades enzimáticas obtenidas en función de la temperatura y especialmente en las temperaturas mayores que la de transición.

REFERENCIAS

- Alberty, R.A. (1983) Physical Chemistry. 6a. edición. pág. 617. John Wiley & Sons. New York.
- Alivisatos S.G.A. y Denstedt O.F. (1951) Lactic dehydrogenase and DPN-ase activity of blood. Science 114:281-283.
- Bělehrádek, J. (1957) Physiological aspects of heat and cold. Ann. Rev. Physiol. 19:59-82.
- Beltrán-Langarica, A. (1981) Cinética de la actividad enzimática NAD glicohidrolasa en la sangre humana. Tesis (depto. Bioq. CINVESTAV) UNAM Facultad de Ciencias. México.
- Daniels, F. y Alberty, R.A. (1966) Physical Chemistry. 3a. edición. pág. 612-625. John Wiley & Sons. New York.
- Dawcs, E.A. (1969) Quantitative problems in biochemistry. 4a. edición. pág. 149. E. & S. Livingstone Ltd. Edinburgh & London.
- Dickerman H.W. y Stolzenbach F.E. (1957) Solubilization of pyridine-nucleotide enzymes of the glycosidase type from mammalian tissues. Federation Proceedings 16:172.
- Dodge, J.T., Mitchell, C. y Hanahan, D.J. (1963) The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 100:119-130.
- Farmacopea Nacional de los E.U.M. (1974) 4a. edición. pág. 637-638.
- Goodman, S.I., Wyatt R.J., Trepel J.B., y Neckers L.M. (1982) NAD glycohydrolase: enzyme characterization using intact mammalian erythrocytes. Comp. Biochem. Physiol. 71:333-336.
- Grossman L. y Kaplan N.O. (1957) Niocinamide riboside phosphorylase from human erythrocytes. J. Biol. Chem. 231:717-725.
- Harris, J.W. (1963) The red cell. pág. 199. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Hofmann, E. y Noll F. (1961) Verteilung von DPN-und TPN-spezifischen Nukleosidasen in Erythrozyten verschiedener tierarten Acta. biol. med. germ. Band 6, Seite 1-6.

Kaplan, N.O. (1960) The pyridine coenzymes, en el libro The - Enzymes, editado por P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbäck. vol. 3 cap. 12. pág. 130-134. Academic Press. New York.

Mann P.J.G. y Quastel, J.H. (1941) Nicotinamide, cozymase and tissue metabolism. Biochem. J. 35:502-17.

Oyama, V.I. y Eagle, H. (1956) Measurement of cell growth in tissue cultures with a phenol reagent (Folin-Ciocalteu). Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 91:305-307.

Ravazzolo R., Bruzzone G., Garré C. y Ajmar F. (1976) Electro-phoretic demonstration and initial characterization of human red cell NAD(P)ase. Biochemical Genetics 14:877-882.

Solti, M. y Friedrich P. (1979) The "enzyme-probe" method for characterizing metabolite pools. The use of NAD-glycohydrolase in human erythrocyte sonicate as a model system. Eur. J. Biochem. 95:551-559.

Torres, A.M. (1984) Actividad NAD glicohidrolasa en las plaquetas de sangre humana. Tesis (Dept. Bioq. CINVESTAV) UNAM Facultad de Ciencias, México.

*Agradecemos al Director del Area de Asistencia  
Dr. Felipe Mendoza y al personal del Banco de  
Sangre, del Instituto Nacional de Cardiologia  
Ignacio Chávez, los donativos de sangre con  
los que contribuyeron a la realización del -  
presente trabajo.*



*Damos las gracias a las siguientes personas que donaron sangre:*

*Vicente Aguilar*

*Salvador Arellano*

*Alicia Seltrán Langarica*

*Luis Domínguez Herrera*

*Daniel López Contreras*

*María de los Angeles Mancilla*

*Agustín Martínez Segovia*

*Rafael Méndez Ramírez*

*Rosario Núñez Rosano*

*José Antonio Pérez Gorostieta*

*Ofelia Pérez Olvera*

*Ceferino Carlos Sánchez Díaz*

*Jaime Sampedro*

*Gloria Elena Torres Díaz*

*Irma Vargas*

*Eunice Zavala Martínez*

La estancia del estudiante en el laboratorio fue de 2 años 8 meses; en los períodos siguientes: 26 de mayo de 1981 al 21 de octubre de 1981; 23 de marzo de 1982 al 2 de febrero de 1983; 2 de septiembre de 1983 al 30 de septiembre de 1984 y 1° de febrero de 1985 - al 31 de mayo de 1985.