



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS  
LEUCOCITARIAS COMO INDICADORES DEL  
ESTADO DE NUTRICION.

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta:

JOSE LUIS SILENCIO BARRITA

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1989.



## **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

	PAGINA
1. Introducción	1
2. Antecedentes. Adaptación	4
Homeostasis y regulación enzimática	6
Mecanismos de regulación enzimática	7
Enzimas como indicadores de adaptación	10
Efectos de la dieta sobre la actividad enzimática	10
3. Leucocitos Polimorfonucleares (PMN)	13
Origen y funciones	13
Metabolismo de los leucocitos polimorfonucleares	18
Consumo de oxígeno	19
Metabolismo oxidativo en el PMN humano	21
4. Nutrición , aspectos generales.	25
Desnutrición en niños. Kwashiorkor. Marasmo.	25
Cambios bioquímicos asociados con Kwashiorkor	29
Actividades enzimáticas de leucocitos PMN en desnutrición	30
Antropometría.	34
OBJETIVOS	36
METODOLOGIA	37
Diseño del estudio	37
Selección de la población	37
Población de niños testigo. Criterios de selección	
Grupo en recuperación nutricia. Criterios de selección.	
Obtención de leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN)	39
Obtención de la fracción citoplásmica de leucocitos PMN	40

Determinación de proteínas con el reactivo de fenol	41
Determinación de la actividad de la Hexocinasa (HC) de leucocitos PMN	43
Determinación de la actividad de la fosfofructocinasa en leucocitos PMN	45
Determinación de la actividad de la piruvato cinasa en leucocitos PMN	47
<b>RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS</b>	50
1.- Separación de leucocitos PMN	50
2.- Obtención de la fracción citoplásmica	50
3.- Proteínas citoplásmicas de leucocitos PMN	52
4.- Ensayos cinéticos	53
4.1 Hexocinasa	53
4.2 Fosfofructocinasa	56
4.3 Piruvatocinasa	59
4.4 Velocidad de reacción contra concentración de sustrato	63
5.- Antropometría en los niños del grupo testigo	70
5.1 Proteínas citoplásmicas totales del grupo testigo	70
5.2 Antropometría en niños desnutridos	73
5.2.1 Proteínas citoplásmicas totales del grupo en recuperación	79
6.- Actividad enzimática en leucocitos PMN	79
7.- Discusión de resultados y recomendaciones	90
<b>CONCLUSIONES</b>	93
<b>ANEXOS</b>	95
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	98

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

(Pagina )

### CUADROS

1	Ensayo cinético para HC, baja concentración de sustrato	(55)
2	Ensayo cinético para HC, alta concentración de sustrato	(55)
3	Ensayo cinético para FFC, baja concentración.	(58)
4	Ensayo cinético para FFC, alta concentración	(58)
5	Ensayo cinético para PC, baja concentración	(61)
6	Ensayo cinético para PC, alta concentración	(61)
7	Medidas antropométricas en los niños normales	(71)
8	Datos hematológicos de los niños normales	(71)
9	Antropometría de los niños desnutridos en diferentes etapas de la recuperación nutricia	(74)
10	Indices hematológicos de los niños en diferentes etapas de la recuperación nutricia	(82)
11	Indices hematológicos de los niños en recuperación nutricia	(82)
12	Actividades de la HC, FFC y PC en el grupo de niños bien nutridos (grupo testigo)	(93)
13	Actividad enzimática de la hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvatocinasa en los niños desnutridos en diferentes etapas de la recuperación nutricia según el peso para la talla.	(88)
14	Actividad enzimática de la hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvatocinasa en los niños desnutridos en diferentes etapas de la recuperación nutricia según el peso para la edad.	(88)

### FIGURAS

-Pagina-

1	Número de leucocitos PMN obtenidos por volumen de sangre	-51-
2	Reacción de PC utilizando dos métodos de rompimiento celular	-51-

3	Efecto de la concentración de glucosa en la reacción de HC	-54-
3a	Transformación de Lineweaver-Burk para HC de leucocitos	-54-
4	Efecto de la concentración de fructosa-6-fosfato en la reacción de FFC	-57-
4a	Transformación de Lineweaver-Burk para FFC de leucocitos .	-57-
5a	Efecto de la concentración de fosfoenolpiruvato en la reacción de piruvato cinasa .	-60-
5b	Transformación de Lineweaver-Burk para PC de leucocitos PMN	-60-
5c	Efecto de los iones Mg++ y K+ sobre la actividad enzimática de piruvatocinasa de leucocitos PMN.	-62-
6a	Velocidad contra [glucosa] para la reacción catalizada por HC	-64-
6b	" " ff[glucosa] en la reacción de HC	-64-
6c	" " [fructosa-6-fosfato] en la reacción de FFC	-66-
6d	" " ff[fructosa-6-fosfato] en la reacción de FFC	-66-
6e	" " [fosfoenolpiruvato] en la reacción de PC	-68-
6f	" " ff[fosfoenolpiruvato] en la reacción de PC	-68-
7a	Proteína citoplásmica de leucocitos PMN con relación al P/T (niños normales)	-72-
7b	Proteína citoplásmica de leucocitos PMN con relación al P/E (niños normales)	-72-
8	Perímetros corporales con respecto al peso para la talla en diferentes etapas de la recuperación nutricia	-76-
9	Pliegues cutáneos con respecto al peso para la talla en diferentes etapas de la recuperación nutricia .	-76-
10	Perímetros corporales en relación al tiempo de recuperación	-77-
11	Pliegues cutáneos en relación al tiempo de recuperación	-77-
12	Relación entre el índice perímetro torácico /perím. cefálico con respecto al peso para la talla(niños normales)	-78-

- 13 Relación entre el índice perímetro torácico/ perímetro cefálico con respecto al peso para la talla ( niños desnutridos ) -78-
- 14 Proteínas citoplásmicas totales de leucocitos PMN con relación al peso para la talla de los niños en recuperación nutricional -80-
- 15 Proteínas citoplásmicas totales de leucocitos PMN con relación al peso para la edad de los niños en recuperación nutricional. -80-
- 16 Leucocitos PMN en relación a los leucocitos totales en los niños desnutridos -81-
- 17 Índices hematológicos en relación al peso para la talla en diferentes etapas de la recuperación nutricional -81-
- 18 Actividad de la HC con relación al P/T de los niños en recuperación nutricional -85-
- 19 Actividad de la FFC con relación al P/T de los niños en recuperación nutricional -85-
- 20 Actividad de la PC con relación al P/T de los niños en recuperación nutricional -85-
- 21-23 Actividad de la HC, FFC y PC con relación al P/E de los niños en recuperación nutricional, respectivamente. -87-

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbencia
$\Delta A$	Cambio en la absorbencia (aumento o decremento)
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADP	Difosfato de adenosina
Ag-Ac	Complejo antígeno(Ag) - anticuerpo(Ac)
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico ( AMP cíclico )
ASB	Albumina sérica bovina
ATP	Trifosfato de adenosina
$^{\circ} C$	Grados centígrados
cm	Centímetro
D.E.	Desviación estandar
DNA	Acido desoxiribonucleico
24DNF	2,4-dinitrofenol
Fc	Porción cristalizable de la inmunoglobulina
FFC	Fosfofructocinasa
F-6-P	Fructosa-6- fosfato
G	Gravedad
GR	Grado reactivo
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HC	Hexocinasa
HMP	Hexosa monofosfato
IBV	Interescápulo vertebral
IgE	Inmunoglobulina tipo E
K+	Ion potasio



Kg	Kilogramo
KHz	Kilohertz o kilociclos
M	Molar
mM	Milimolar
mm	Milímetro
m	Metro
mg	Miligramo
ml	Mililitro
Mg <sup>++</sup>	Ion magnesio
n	Numero de datos , sujetos , valores.
N	Normal
NAD	Dinucleotido de nicotínamida y adenina óxidado
NADH	Dinucleotido de nicotínamida y adenina reducido
NADP	Dinucleotido fosfatado de nicotínamida y adenina
NADPH	Dinucleotido fosfatado de nicotínamida y adenina reducido
NaF	Fluoruro de sodio
nm	Nanómetros
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
p	Grado de significancia
PBS	Solución balanceada de fosfatos
PC	Piruvato cinasa
PBP	Fosfoenolpiruvato
pH	Concentración de iones hidrógeno
P/B	Peso con relación a la edad
P/T	Peso con relación a la talla

PMN	Polimorfonuclear
SSB	Solución salina balanceada
"t"	Prueba de "t" de student, para muestras independientes.
T/E	Talla con relación a la edad
U	Unidades
ul	Micro litros
uM	Micromoles
Vmax	Velocidad enzimática máxima
VS	<u>Versus</u> , contra , con relación a .....
[ ]	Corchetes : significa "concentración molar de...."
<	" menor que "
%	Por ciento

**I N T R O D U C C I O N**  
**Y**  
**A N T E C E D E N T E S**

### INTRODUCCION

La desnutrición se ha convertido en uno de los principales problemas de salud en nuestro país . De tal manera que no existen datos exactos de la prevalencia de desnutrición en México . Existen, eso sí, estimaciones o aproximaciones del porcentaje de habitantes que sufren algún grado de desnutrición, así por ejemplo, algunos autores (1,119) mencionan que entre el 15 y el 30 % de la población son desnutridos , lo que, en definitiva, no le resta importancia como un problema serio de salud en nuestro país. En algo sí se esta de acuerdo : la población mas afectada son los niños .

La mala alimentación puede traer graves consecuencias a cualquier edad, pero éstas se acentúan más en el niño pequeño, en la madre durante el embarazo y durante la lactancia. De estas, la causa más frecuente de desnutrición se inicia generalmente en el embarazo por lo que se condena al niño a nacer desnutrido y a formar parte del sin número de casos presentes en los hospitales. Por otro lado, la alimentación deficiente de la madre y del padre, conlleva a que el niño no tenga las oportunidades de una buena alimentación y, por lo tanto, tendrá un rendimiento pobre en la escuela y una actitud pasiva en todas sus actividades.

Las características más importantes de una mala alimentación comprenden aspectos que van desde una alta mortalidad en el seno materno, producción de leche materna de baja calidad, un elevado índice de niños prematuros con bajo peso al nacer, retardo en el crecimiento, subdesarrollo locomotor, intelectual y de lenguaje, insuficiente aprovechamiento escolar y retraso en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios.

Para tener una buena nutrición se requiere que la dieta este constituida por proteínas , lípidos , hidratos de carbono , vitaminas (22) y nutrimentos inorgánicos. Las proteínas actúan como elementos de construcción y reparación , de defensa contra diferentes agentes patógenos y sus productos y, junto con las coenzimas (por ejemplo, algunas vitaminas), forman moléculas cuya función catalítica es necesaria para todo el metabolismo celular : las enzimas. La desnutrición tiene efectos muy importantes sobre la mayoría de las funciones celulares y, en consecuencia, de todos los tejidos, por lo que las enzimas son las moléculas que se adaptan a estos cambios modificando alguna de sus características principales tales como sitios activos , Km , velocidad máxima , conformación, configuración etc. para mantener las funciones celulares .

El objetivo del presente trabajo, es determinar si la actividad de algunas enzimas glucolíticas como la hexocinasa , la fosfofructocinasa y la piruvatocinasa en los leucocitos polimorfonucleares de niños desnutridos en recuperación nutricia pueden ser utilizados como indicadores bioquímicos del estado de nutrición o bien como indicadores de desnutrición marginal, antes que aparezcan los síntomas.

Se ha escogido, a los leucocitos polimorfonucleares, como el modelo de este trabajo ya que, son fáciles de extraer, tienen un metabolismo completo, que puede reflejar el de otras células, y su obtención no le ocasiona mucho daño al paciente.

Las enzimas mencionadas, catalizan pasos irreversibles en la glucólisis , lo que sugiere , puntos estratégicos de control que responden a cambios drásticos en el medio ambiente , como lo es la

falta de sustratos, típicos en estados de desnutrición o de deficiencia alimentaria . De ser así , estos valores podrían ser utilizados como un arma de diagnóstico importantísima en la valoración de pacientes desnutridos o bien en el seguimiento de los pacientes cuando se estan recuperando de un estado de deficiencia extrema, como la desnutrición.

## ADAPTACION

La adaptabilidad es una característica básica de los seres vivos. La habilidad para ajustarse a cambios drásticos en el medio ambiente externo es tal que previene cambios drásticos en el medio interno, en la sangre y en los fluidos corporales esenciales, no solo para el funcionamiento eficiente de los organismos vivos sino también para su supervivencia (53, 111, 112).

La falla de estos mecanismos que permiten ajustarse a los cambios en el medio ambiente, llevan al deterioro del organismo; al aumentar el deterioro, disminuye la capacidad de responder a un cambio, lo que depende también de la severidad de dicho cambio para una respuesta en particular.

La fuente del alimento es un componente del medio externo que puede variar grandemente. Los cambios en esta fuente: cantidad del alimento, cantidad de nutrimentos individuales en el alimento o el patrón de ingestión del alimento disponible, todos, requieren de ajustes en la actividad metabólica de un organismo.

Estos ajustes pueden ser de dos tipos: el primero incluye un cambio en la velocidad de una reacción sin alterar la maquinaria metabólica existente. En el segundo, se incluyen aquellos ajustes en los que ocurren cambios en la concentración de las moléculas que constituyen la maquinaria metabólica de la célula. Ambos tipos de ajustes son facetas de la regulación metabólica (66).

La velocidad de catabolismo de un compuesto (aminoácidos, ácidos grasos o glucosa) puede aumentar o disminuir considerablemente en respuesta a cambios en el consumo de ellos, sin cambios en la cantidad de las enzimas que degradan tales compuestos.

El segundo tipo de ajuste es la alteración en la capacidad de

todo el sistema. Un ejemplo es la alteración en la cantidad de una enzima limitante de una vía metabólica en respuesta a cambios en la fuente de nutrimentos. La cantidad de enzimas que degradan aminoácidos por ejemplo, aumenta en el hígado cuando el consumo de proteínas es alto y disminuye cuando es bajo.

La adaptación implica cambios en el sistema en respuesta a una variación en el medio ambiente, no denota un mecanismo, ni representa un juicio como el valor de una respuesta, es decir, si es o no benéfico. Sin embargo, los cambios efectuados durante el curso de la evolución son mas prometedores si existe un valor de sobrevivencia. Este concepto va muy relacionado con el de competencia, es decir, la habilidad de un organismo para adaptarse a las alteraciones en el medio ambiente y para competir con otros organismos de la misma o de otras especies.

El mayor problema en las investigaciones sobre la adaptación en la desnutrición, es distinguir entre los cambios que representan una alteración no específica a la adaptación y aquellas que representan cambios para una adaptación benéfica. Sin embargo, existe poca información acerca de la importancia fisiológica de las adaptaciones enzimáticas. Aunque los sistemas vivos no son una simple mezcla de reacciones, in vitro, uno debería de esperar que cuando la concentración de enzima aumenta en un tejido, el tiempo requerido para eliminar una carga de sustrato, disminuya proporcionalmente. Es posible demostrar esta relación, in vivo, incluso cuando la relación no sigue las predicciones teóricas de la enzimología aunque se vea afectada por varios factores como son todas las condiciones óptimas pH, concentración de sustrato, fuerza iónica, cofactores, etc.



condiciones que, in vitro, son altamente manipuladas hasta alcanzar una velocidad de reacción máxima (54,64).

El progreso en bioquímica hace posible explicar la acción catalítica de las enzimas y el mecanismo de su regulación a un nivel molecular. Las técnicas disponibles actualmente para la determinación de la actividad enzimática tienen un alto grado de especificidad y sensibilidad que permiten detectar ligeras alteraciones en la concentración de las enzimas. Actualmente estas técnicas se aplican para evaluar la nutrición desde un punto de vista bioquímico, ya que existe un gran número de enzimas cuyas actividades dependen de la cantidad y calidad de la dieta, la frecuencia del consumo del alimento y del volumen del alimento.

Muchos factores afectan la actividad enzimática in vivo de manera que detectar una cantidad de enzima en un momento dado representa solo un destello en el panorama bioquímico. Todos estos factores en determinado momento son señales que modifican continuamente las instrucciones del genoma (66).

#### HOMEOSTASIS Y REGULACION ENZIMATICA

La homeostasis se refiere a la tendencia del organismo para mantener todas las condiciones vitales sin cambio, es decir, mantener los niveles de cada uno de los metabolitos en un valor constante (normal). Se debe suponer que este mantenimiento constante (equilibrio) es un mecanismo de control homeostático, descrito por Cannon en 1926 y que no es un principio rígido sino la adaptación flexible del organismo a situaciones externas, como la disponibilidad de oxígeno, alimento, agua, temperatura, etc, para mantener un estado dinámico estacionario (2).

Sin embargo , existen límites en estas condiciones favorables para el mantenimiento de la vida y dentro de estos límites la respuesta es óptima en relación al medio ambiente y sus cambios. La clasificación de estos efectos es difícil debido a que muchos de ellos tienen una interdependencia muy estrecha.

Los efectos que sobre la actividad de las enzimas ejercen diferentes factores nutricios son muy variados y pueden ser directos o indirectos, La mayoría son mediados por mecanismos de control homeostáticos y, dentro de ellos, la acción hormonal juega un papel importante .

#### MECANISMOS DE REGULACION ENZIMATICA .

Existe una gran variedad de sistemas regulatorios disponibles en la célula que pueden clasificarse de acuerdo a modificaciones físicas y químicas de las enzimas que se efectuan en un tiempo determinado . Tales mecanismos regulatorios funcionan notablemente sobre las enzimas para mantener el flujo óptimo de una vía metabólica y por lo tanto de una función biológica. Sin embargo debe considerarse que la modulación de una actividad enzimática involucra varios mecanismos por los que tal actividad puede modificarse in vitro con la reelevancia de estos mecanismos en las condiciones in vivo.

##### 1) Disponibilidad limitada de sustrato.

Esta es el camino mas simple en la alteración del flujo en una vía metabólica. Los patrones metabólicos típicos se mantienen solo bajo ciertas condiciones en el estado basal. Sin embargo, si las concentraciones intracelulares de un sustrato son insuficientes no es posible la interacción entre este y la enzima de una manera

específica, a menos que la enzima sea el factor limitante de todo el sistema.

## 2.-Interacciones alostéricas.

Pequeños cambios en la conformación de una enzima pueden causar un aumento o disminución drásticos en la afinidad por su sustrato específico, modificando así la actividad específica aparente. Ese tipo de interacción se observa principalmente en enzimas oligoméricas. Una sustancia precursora o un metabolito pueden afectar indirectamente las propiedades del sitio activo de la enzima, actuando sobre sitios diferentes a donde específicamente se une el sustrato modificando la velocidad enzimática. La interacción alostérica representa un mecanismo que controla la velocidad de una vía metabólica. Este control se alcanza por una inhibición por producto final, entre otros, y permite una respuesta inmediata y eficiente a un cambio en los patrones metabólicos (18,20,45,85,98).

## 3.-Modificación covalente reversible.

Las enzimas pueden estar en forma activa o inactiva e interconvertirse en una u otra forma, por modificaciones tales como la eliminación o adición de un sustituyente (por ejemplo un grupo fosfato), que modifica la conformación y las propiedades catalíticas del sitio activo. Los ejemplos clásicos de este tipo de regulación son las enzimas que regulan la síntesis y degradación de glucógeno: la glucógeno sintetasa y la fosforilasa (92,93). Ambas enzimas se encuentran en forma fosforilada y no fosforilada. Mientras que la forma activa de la fosforilasa esta fosforilada, la forma activa de la glucógenosintetasa se encuentra desfosforilada.

Este mecanismo es un medio eficiente para operar la vía en el

camino de la síntesis bloqueando simultáneamente la degradación, con la ayuda de enzimas auxiliares que fosforilan (cinasas) o desfosforilan (fosfatasa) (93,97,103,113).

#### 4.- Activación proteolítica irreversible.

La generación de una enzima activa a partir de una enzima inactiva incluye normalmente una modificación proteolítica del precursor por eliminación de un aminoácido o de algún péptido pequeño. Este tipo de mecanismo es muy importante en el tracto gastrointestinal donde se mejoran las enzimas proteolíticas almacenadas y liberadas en un estado inactivo, como los zimógenos, que se activan en el momento apropiado.

#### 5.-Variación en la concentración total de enzima por cambios en su velocidad de síntesis o degradación.

Ambos mecanismos, la síntesis y la degradación, modifican los niveles enzimáticos intracelulares. Es un proceso relativamente lento pero muy eficiente ya que se aplica a adaptaciones a largo término.

Como la síntesis de todas las proteínas está bajo control genético resulta evidente que los mecanismos de regulación genética, (inducción o represión), juegan un papel esencial adaptando continuamente las capacidades metabólicas a las necesidades actuales del organismo. La velocidad de síntesis puede variar por una alteración de la expresión genética, sin embargo, un aumento en la velocidad de síntesis de una enzima no necesariamente puede deberse a una inducción, sino que puede ser también una aceleración del proceso de transcripción, o bien, una manifestación de control postranscripcional (9,27,64).

En las células de los organismos superiores (excepto en los

eritrocitos) las enzimas están en continuo recambio, de manera que la velocidad para renovar un grupo de enzimas es un prerequisite para su regulación enzimática, sin que se altere su equilibrio.

La vida media de una enzima es una característica específica de cada una de ellas y difiere entre las especies en el mismo orgánulo. La velocidad de síntesis y degradación de una enzima explica la dinámica del recambio de dicha enzima. Algunos estudios en hígado de rata en donde se mide el recambio enzimático bajo diferentes condiciones dietarias, muestra evidencias de que la vida media de cada enzima varía considerablemente (33,45,85,115).

#### ENZIMAS COMO INDICADORES DE ADAPTACION.

Para la investigación de las respuestas adaptativas en organismos superiores se usan varios procedimientos tales como la inanición o la alimentación de animales de laboratorio con dietas deficientes en una sustancia específica (aminoácidos, vitaminas, etc.), o bien proporcionando una dieta que contenga un componente en una elevadísima proporción (una dieta alta en proteínas). Los resultados de estos estudios, se expresan como cambios relativos del nivel de actividad enzimática medida por ensayos estandar.

Estos resultados pueden expresarse como la cantidad de enzima o actividad enzimática con respecto a la proteína total, al nitrógeno proteico, al nitrógeno total o al DNA. Es muy importante elegir, por lo tanto, la unidad de referencia apropiada con la cual se representen las alteraciones reales en el organismo (99,101,112,118,120).

#### EFFECTOS DE LA DIETA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA .

La ingestión del alimento en el hombre es un proceso intermitente. Los hábitos alimenticios no solo dependen de la

cantidad y la calidad del alimento consumido sino también de los esquemas y patrones de esa alimentación como el tamaño y la presentación(66). La alteración más drástica del patrón alimenticio y la más fácilmente reproducible en animales de laboratorio ( y aun en el hombre) es la inanición. Todas las consecuencias metabólicas observadas bajo este estado nutricional extremo representan mecanismos de regulación homeostática y la selección de prioridades para asegurar el mantenimiento de la vida en las mejores condiciones posibles (2).

La ausencia de fuentes externas para renovar los constituyentes corporales y para aportar energía, ocasiona cambios en la composición de los fluidos corporales tales como una disminución de la glucosa sanguínea y de la insulina circulante (65,70,107).

Por una parte, las bajas concentraciones de glucosa, típicas del ayuno, estimulan la liberación de somatotropina, glucagón, hormona adrenocorticotrófica (ACTH), y glucocorticoides. Además se estimulan la glucógenolisis (109), la gluconeogénesis (113), y la lipólisis, las dos primeras en el hígado y la tercera en el tejido adiposo, por lo que en consecuencia aumentan los ácidos grasos libres y los cuerpos cetónicos en la sangre. Estos cambios se reflejan como eventos adaptativos primarios dentro de las células ocasionados por cambios en la actividad de las enzimas de un tejido en particular(70).

Un gran número de enzimas responden al ayuno prolongado aumentando o disminuyendo su actividad : en general, aumenta la actividad de enzimas de la gluconeogénesis y del catabolismo de aminoácidos y lípidos (25,54).

Para el estudio de la adaptación a diferentes condiciones

dietarias se utilizan los cambios drásticos en las actividades enzimáticas observadas en la realimentación de animales con ayuno prolongado .

En este aspecto se restablece la maquinaria enzimática necesaria para la utilización de glucosa y la acumulación de ácidos grasos (44). El análisis de los patrones enzimáticos en humanos que sufren de desnutrición está sujeto a varios factores. En primer lugar al tipo de tejido que se pretende estudiar, en segundo lugar las técnicas usadas para obtener la muestra (accesibilidad), y en tercer lugar, a consideraciones éticas.

Debido a que en muchos casos el material de biopsia no es posible obtenerlo por razones prácticas y éticas, los investigadores se han esforzado en analizar muestras que incluyen la mucosa oral, la piel, los folículos pilosos y la saliva para estudios de desnutrición. Sin embargo, el empleo de éstas muestras, debido a su naturaleza tienen una aplicación limitada y un patrón enzimático que no necesariamente refleja el de otros tejidos.

La mejor alternativa disponible hasta el momento para el estudio de enzimas en la desnutrición humana son los eritrocitos, los leucocitos, y el suero. El análisis de enzimas leucocíticas sirve como un sustituto valioso del material de biopsia ya que estas células se obtienen fácilmente y tienen un metabolismo completo comparable con las células de otros tejidos (74,91,95).

El Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) ha utilizado esta posibilidad para diferenciar bioquímicamente los dos grandes síndromes de desnutrición que son el Kwashiorkor y el marasmo.

## Origen

Los granulocitos se derivan de la médula ósea por un fenómeno denominado granulopoyesis. La célula primitiva o reticular da origen al mieloblasto, que es la célula precursora de esta serie, carece de gránulos, aunque en ocasiones aparece con algunos gránulos azurófilos de un color rojo brillante. El núcleo contiene uno o más nucleolos. La maduración del mieloblasto sigue dos líneas paralelas, una de ellas comprende la maduración del núcleo y la otra, la constituyen todas las reacciones químicas necesarias para la formación de gránulos neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

La primera fase consiste en la transformación en un promielocito y condensación de la cromatina nuclear, desaparición de nucleolos y la formación de gránulos en el citoplasma (azurófilos y específicos)

La segunda fase la forma el mielocito cuyo núcleo es redondo u ovalado y la cromatina nuclear esta más condensada. Los gránulos citoplásmicos se han desarrollado por completo, cubriendo en algunos casos al núcleo.

En la tercera fase, la del mielocito, el núcleo toma un aspecto dentado y en forma de riñon, con la cromatina aún más compacta. En la cuarta fase la transformación en un núcleo en forma de banda le da el nombre de célula en banda, también conocido como Rabdocito.

En la quinta fase el núcleo se segmenta y los segmentos se unen por filamentos de grosor variable. Al continuar la maduración aumenta el número de segmentos. Conviene mencionar aquí que se obtienen tres tipos de células, los neutrófilos, los basófilos, y los eosinófilos, que también se conocen como granulocitos y/o leucocitos PMN, en forma general.



La maduración de los neutrófilos con respecto a los basófilos y eosinófilos es similar pero con algunas ligeras variaciones. Los granulocitos eosinófilos segmentados rara vez tienen mas de 2 lóbulos, los gránulos son grandes y de color rojo brillante y están separados en la célula madura. En la célula inmadura pueden tener un color gris oscuro o purpura (128,129,130).

En la serie basófila, el mielocito tiene menos gránulos que la célula neutrófila o eosinófila, pero estos son gruesos e irregulares y por lo general cubren casi todo el núcleo y el citoplasma. Durante el proceso de maduración aparecen dos variedades distintas de gránulos, los gránulos primarios o azurófilos y los gránulos secundarios o específicos ( los gránulos azurófilos son positivos a la peroxidasa, mientras que los específicos no ). Los gránulos primarios son opacos cuando se observan en el microscopio electrónico con un diámetro de 0.4  $\mu$ m, contienen mieloperoxidasa, proteínas básicas ricas en arginina (cationicas), mucopolisacáridos ricos en azufre, fosfatasa ácida y otras hidrolasas ácidas. Los gránulos secundarios no son tan opacos a los electrones como los primarios, tienen un diámetro de 0.3  $\mu$ m, contienen gran cantidad de fosfatasa alcalina, lisozima y aminopeptidasa.

El organismo contiene unos  $18 \times 10^9$  neutrófilos / Kg de peso corporal y de estos alrededor de 0.7 billones se encuentran en la sangre, por lo que la médula ósea contiene unas 25 veces mas neutrófilos ( y sus precursores ) que la sangre.

El tiempo que necesita un mielocito para dividirse y terminar su maduración y entrar en la sangre es de unos 11 días, por lo menos  $9 \times 10^9$  células existen en la forma de células maduras y de este depósito se liberan para entrar a la sangre diariamente alrededor de

$1.6 \times 10^9$ . Esto constituye más o menos dos y media veces el número total de neutrófilos en la sangre, con una vida media de aproximadamente 6.8 horas (126-131).

Los neutrófilos abandonan la sangre de una manera desordenada en el individuo normal (probablemente la mayoría por secreciones de los bronquios, saliva, aparato gastrointestinal, orina y exudados).

De los  $0.7 \times 10^9$  neutrófilos en la sangre solo la mitad se recoge en el recuento de leucocitos y constituye el fondo circulante de granulocitos. El resto conocido como fondo marginal, se encuentra situado a lo largo de las paredes de los vasos sanguíneos o secuestrado en lechos capilares temporalmente cerrados.

La leucocitosis que sigue a un ejercicio o a la inyección de adrenalina, se debe al paso de las células del fondo marginal a la circulación, lo que explica muchos estados transitorios de neutrofilia (126,127).

El número de leucocitos PMN en el adulto normal es de 54 a 62 %, mientras que en el recién nacido tiene un promedio de 60 % con un margen de 16 a 70 %, pero al quinto día desciende al 38 % y se mantiene así durante algún tiempo. En los adolescentes el promedio aumenta al 48 % y el margen se mantiene entre 25-70% (134).

En el adulto se encuentran células en banda de 0 al 5% del total de glóbulos blancos, mientras que en el recién nacido pueden contarse hasta el 25 % durante el primer día para alcanzar lentamente los valores de la edad adulta. Los valores de PMN's en banda superiores al 10% son anormales en la fórmula leucocitaria en la edad adulta.

#### Neutrófilos

Los neutrófilos PMN comprenden el 60% de los leucocitos

circulantes en humanos. Miden 10-20  $\mu$ m de diámetro en los frotis y 7-9  $\mu$ m de diámetro en secciones. El núcleo tiene 3 a 5 lóbulos unidos por filamentos angostos de cromatina. El neutrófilo maduro es primeramente una célula fagocítica con dos tipos distintos de gránulos. Estos se conocen como gránulos primarios o azurófilos que contienen hidrolasas ácidas, mieloperóxidasa y lisozima y los gránulos secundarios o específicos que contienen lactoferrina y lisozima, entre otras. Los gránulos primarios también contienen un número de proteínas catiónicas que tienen actividad bactericida.

En el neutrófilo maduro del 80 al 90 % de los gránulos son específicos y de éstos, del 10 al 20 % son azurófilos. Los neutrófilos tienen una vida media de 6 a 20 horas en la sangre periférica y su sobrevivencia en otros tejidos bajo condiciones estables es de 4 a 5 días. Los granulocitos se producen a una velocidad de  $1.6 \times 10^9$  células/kg /día.

Estas células son capaces de migrar hacia un sitio determinado (quimiotaxis) bajo el estímulo de factores quimiotácticos que incluyen productos bactericidas, proteasas de tejido y componentes del complemento (132,133).

#### Eosinófilos

Comprenden del 2 al 5 % de los leucocitos en sangre periférica normal. Son células redondas con un diámetro de 12  $\mu$ m. Están caracterizados por un tipo de gránulo que se tiñe de naranja con la tinción de Romanovsky. Por microscopía electrónica se ha encontrado que estos gránulos contienen cristaloides característicos. Los eosinófilos de tejidos son exactamente iguales a los circulantes.

Se ha demostrado que el eosinófilo tiene un potencial fagocítico

para ingerir complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) y tiene un papel importante en fenómenos anafilácticos y alérgicos. Los eosinófilos pueden alcanzar hasta el 10 o 20 % del total de leucocitos circulantes.

#### Basófilos

Son células en forma ovalada con granulos densos cuando se observan en el microscopio electrónico que contienen compuestos biológicamente activos como la heparina y la histamina. Estas células se encuentran en la sangre, tejido conectivo, en la piel, alrededor de pequeñas vesículas sanguíneas, en folículos pilosos y tejido adiposo.

Tienen receptores que se unen a la fracción cristalizable (Fc) de la IgE. Hay aproximadamente  $10^5 - 10^6$  receptores por célula y están relacionados con la liberación de histamina, después de la interacción de la IgE con el antígeno específico.

**METABOLISMO DE LOS LEUCOCITOS PMN**

Las principales vías metabólicas del leucocito PMN son la glucolisis, la vía de hexosa monofosfato (HMP), la gluconeogénesis, y lo que se ha denominado como la "explosión" respiratoria del granulocito. Los PMN neutrófilos son constituyentes importantes del sistema fagocítico activo contra microorganismos invasores. Estas células gastan energía cuando se aproximan y engloban a su presa.

Diversos estudios demuestran que estas células sirven como un modelo para la realización de estudios metabólicos en tejidos, ya que, comparada con los eritrocitos, en los PMN's se encuentra un patrón metabólico más diversificado incluyendo el consumo de oxígeno y el metabolismo de lípidos, además de que son relativamente más fáciles de obtener que otros tejidos, y no se ocasiona daño al donador (24). En relación a sus aplicaciones teóricas, los estudios metabólicos en granulocitos conducen a aproximaciones bioquímicas más detalladas de varios problemas patofisiológicos, incluyendo la desnutrición (44, 118).

El metabolismo energético de los PMN ha sido objeto de muchas investigaciones y se acepta generalmente que la energía usada en fagocitosis se deriva principalmente de la glucolisis, acompañada por un marcado aumento en el consumo de oxígeno, la cual resulta en la producción de derivados de oxígeno tóxicos que participan en la destrucción de los organismos ingeridos (14).

En la fagocitosis, ocurre un déficit de energía, que se obtiene a partir de la degradación anaeróbica de las reservas de glucógeno del PMN con un consiguiente aumento en la producción de ácido láctico (92,93). En un medio libre de glucosa las células fagocíticas utilizan su glucógeno a por la activación de la enzima fosforilasa

del glucógeno con un aumento del 70 % en la producción de lactato (104). Por otro lado, en estudios hechos con <sup>3</sup>H-glucosa se ha observado que la velocidad de flujo a través de la vía glucolítica es constante en la fagocitosis, lo que indica que hay un equilibrio rápido a través de la membrana plasmática del leucocito (103,109).

Se observa, además, un aumento dramático en la producción de glicerol-3-fosfato. Esto indica que una parte importante de la glucosa consumida se dirige hacia la síntesis de glicerolípidos, a través del glicerol -3-fosfato que participa también en la formación de lactato (109).

#### CONSUMO DE OXÍGENO

El consumo de oxígeno por leucocitos de pacientes con leucemia es muy elevado, más del doble de lo normal; existe prevalencia de la glucolisis anaerobia, ya que el consumo de oxígeno es bajo y el glucógeno "consumido" se recupera como lactato (solo el 73 % de las unidades de glucosa se recuperan como lactato). La disminución de oxígeno produce una disminución en las concentraciones de ATP y un aumento en la producción de ADP (27,33,51).

#### EFFECTO DEL pH

La variación de pH entre 6.8 y 7.8 no altera la glucógenólisis o el consumo de oxígeno. En general, la glucolisis se activa muy poco cuando aumenta el pH, efecto que se observa mucho mejor con granulocitos de exsudados peritoneales. La FFC se activa a pH alcalino y se inhibe a pH ácido. Esta regulación de FFC por una variación del pH se ha encontrado en eritrocitos y en músculo y está relacionada con una inhibición de la enzima por ATP y por la variación en el pH.

La concentración de piruvato es normal en contraste con la fuerte disminución de 3-fosfoglicerato y el aumento de lactato, y es una consecuencia de la baja concentración de NADH que previene, que pequeñas cantidades de piruvato se formen a partir de lactato.

Selvaraj (95), utilizando un inhibidor metabólico, como lo es el fluoruro (20 mM), ha informado un aumento en el consumo de oxígeno hasta 600 % de su valor basal así como de la actividad de la vía HMP, el cociente respiratorio y las óxidasas extramitocondriales durante la fagocitosis; disminuye el consumo de glucosa y se consume lactato, debido a la inhibición de la enzima enolasa que induce un aumento en la concentración de todos los intermediarios de fructosa-1,6-difosfato, mientras que el piruvato disminuye.

En bajas concentraciones (0.2-0.5mM) el NaF disminuye el contenido del glucógeno en el PMN, aumenta el consumo de glucosa con una disminución en el consumo de oxígeno, lo que aparentemente produce un efecto Pasteur. Hay activación de la FFC y por lo tanto, una mejor glucolisis. La actividad de la enolasa y la HC son normales, al igual que la concentración de ATP.

Estos resultados indican que la actividad glucolítica en el PMN no se regula simplemente en el paso de FFC, sino que resulta de una regulación concertada que incluye enzimas como la HC, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato cinasa.

Una comparación entre las actividades glucolíticas y el entrecruzamiento indica que la glucolisis del granulocito se regula en el paso de hexocinasa por ATP, en FFC por una inhibición alostérica por ATP y en gliceraldehído fosfato deshidrogenasa por la acción de masas de la relación NAD/NADH.

## METABOLISMO OXIDATIVO EN EL PMN HUMANO

Cuando los leucocitos PMN humanos se encuentran a una partícula fagocitable se presentan alteraciones apreciables en su metabolismo oxidativo. Estos cambios conocidos como la "explosión respiratoria del leucocito PMN" (32), incluyen los siguientes fenómenos que son sensibles a la acción del cianuro o la azida:

- a) Consumo elevado de oxígeno.
- b) Aumento en la oxidación de glucosa vía hexosa monofosfato (HMP).
- c) Elevada producción de peróxido de hidrógeno.
- d) Producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ).
- e) Generación de bioluminiscencia.
- f) Aumento en la reducción de colorantes del tipo tetrazolio

La importancia de estos fenómenos oxidativos para la célula son las variadas condiciones clínicas que se presentan, entre ellas la mejor estudiada es la enfermedad granulomatosa crónica de la infancia. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de neutrófilos deficientes en su habilidad para destruir bacterias, esto provoca que los pacientes sufran episodios recurrentes de infecciones bacterianas que en muchos casos tienen un desenlace fatal (34).

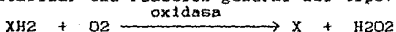
Las células defectuosas tienen una ingestión normal pero el aumento del metabolismo oxidativo, que normalmente acompaña a la fagocitosis, está alterado completamente. La degranulación de los lisosomas en la vacuola fagocítica generalmente es normal, aunque a veces está un poco disminuida. Otro síndrome importante, más raro que la enfermedad granulomatosa crónica, es la deficiencia total de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Las células de estos pacientes demuestran una ingestión y degranulación normal, pero un profundo defecto en la actividad bactericida cuando se



ensayan in vitro. La inestabilidad de esta enzima es un fenómeno secundario que resulta de un defecto metabólico primario.

Es simplista creer que solo el proceso oxidativo esta involucrado en la actividad bactericida. La habilidad de matar microorganismos es un proceso complejo que incluye multiples mecanismos.

En general, se acepta que las diferentes especies de bacterias son destruidas por mecanismos diferentes y que varios de éstos mecanismos tienen la capacidad de destruir a un solo tipo de bacteria, dentro de la misma célula. Los mecanismos bactericidas en los PMN's neutrófilos pueden, por lo tanto, dividirse en dos grandes categorías: dependientes y no dependientes de oxígeno. Desde los trabajos de Sbarra y Karnovsky se ha intentado definir a las enzimas responsables de la iniciación del metabolismo respiratorio. Tales enzimas deberían catalizar una reacción general del tipo:



Cualquier enzima que catalize una de estas reacciones (presumiblemente una oxidasa), debería de cumplir, al menos, cuatro criterios:

- a) La enzima debe activarse por un evento fagocítico.
- b) La activación de la enzima debe explicar los eventos incluidos en la explosión respiratoria.
- c) La actividad enzimática debe estar defectuosa en alguna vía metabólica y ,
- d) La enzima debe ser insensible al cianuro, ya que la explosión respiratoria es, de por sí, insensible a este agente.

Otro criterio que se debe de considerar es la localización celular de la enzima o enzimas iniciadoras, sugiriendose lo siguiente:

- 1) La enzima se localiza en el exterior de la membrana celular, como

una exoenzima. Una vez que la membrana celular se invagina para formar la vacuola fagocítica, la porción externa de la membrana celular, forma el interior de la vacuola fagocítica y la oxidasa se añadiría a la partícula ingerida.

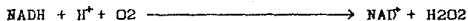
2) La enzima puede localizarse en uno de los gránulos citoplásmicos de la célula, ya sea a la mieloperóxidasa o a las enzimas hidrolíticas. La oxidasa, entonces, puede liberarse dentro de la vacuola fagocítica después de la ingestión en el proceso de degranulación. Se han propuesto varios candidatos para la oxidasa que inicia la explosión respiratoria con diferentes localizaciones celulares:

A) Ascorbato oxidasa.- El ácido ascórbico reacciona con oxígeno para producir peróxido de hidrógeno y ácido deshidroascórbico. La combinación de ácido ascórbico (1 a 3 mM en neutrófilos) con peróxido de hidrógeno y un metal iónico constituye un potente sistema bactericida.

B) Glutatión reductasa.- Esta enzima aumenta rápidamente en la fagocitosis, sin embargo, no es una oxidasa, por lo que se postulan algunas reacciones asociadas con esta enzima a la que se acopla otra enzima que es la NADPH oxidasa, esto no ha sido demostrado.

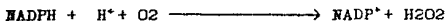
C) Glutatión peróxidasa.- Esta enzima esta involucrada en la desintoxicación de peróxido de hidrógeno.

D) NADH oxidasa.- Esta enzima cataliza la reacción :



Es fácil visualizar como esta reacción explica el consumo de oxígeno y la producción de peróxido de hidrógeno durante el trabajo respiratorio.

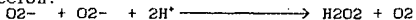
E) NADPH oxidasa.- Esta enzima cataliza la reacción :



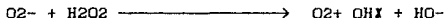
Esta reacción también demuestra un aumento en el consumo de oxígeno y la producción del peróxido de hidrógeno, además de que no es sensible al cianuro, estimulándose durante la fagocitosis en un pH ácido. Las siguientes reacciones explican el mecanismo de iniciación de la explosión respiratoria y la producción de metabolitos de oxígeno con actividad bactericida:



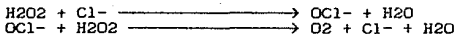
El elevado consumo de oxígeno ocurre porque este es un sustrato para la reacción y el aumento del anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) se debe a que es un producto inicial de la reacción. El peróxido de hidrógeno producido se debe a la dismutación de los aniones superóxidos de acuerdo a la reacción:



El anión superóxido puede entonces originar espontáneamente o dar lugar a una molécula de oxígeno denominada "oxígeno singlet", debido a la interacción con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de acuerdo a la reacción de Haber-Weiss:



El oxígeno singlet puede producirse también por la interacción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el anión hipoclorito de acuerdo a lo siguiente:



Una característica de el "oxígeno singlet" es que puede emitir su exceso de energía en forma de luz (quimiluminiscencia), más que en la forma usual de calor. La quimioluminiscencia sin embargo, es más complicada en la fagocitosis, ya que incluye la interacción de este oxígeno singlet y otras especies reactivas del oxígeno con factores séricos y/o material particulado, ya que este tipo de sustancias mejoran la respuesta quimioluminisciente.

La nutrición incluye el consumo del alimento, la liberación de la energía, la eliminación de los desechos y todas la síntesis esenciales para el mantenimiento, crecimiento y la reproducción (1,3). En general, este concepto es válido para todos los organismos vivos desde el mas simple, hasta el más complejo. Los nutrimentos se han agrupado en grandes familias tales como los hidratos de carbono, los lípidos, las proteínas (y, en menor proporción, pero indispensables) los nutrimentos inorgánicos y las vitaminas. A partir de estas moléculas presentes en los alimentos, se obtienen unidades mas sencillas, como glucosa, aminoácidos y glicerol que son bloques constructores de nuevos polímeros sintetizados por la célula, para el mantenimiento de la homeostasis. La buena nutrición (adecuada) contiene todos estos elementos que permiten el mantenimiento de la salud.

El lado opuesto de la moneda, es decir el desequilibrio total lo conforman todas aquellas deficiencias de nutrimentos en la dieta. Estas deficiencias se caracterizan por la falta de una vitamina en particular o bien por deficiencias de proteínas o energía.

En países en desarrollo, la desnutrición tiene su principal impacto en los niños cuyo crecimiento es rápido, los requerimientos de nutrimentos altos y las dietas son inadecuadas debido a muchos factores, entre ellos la ignorancia, la pobreza, la disponibilidad de ciertos alimentos y la tensión continúa debida a infecciones por bacterias, virus, hongos y parásitos.

#### DESNUTRICION EN NIÑOS

Aunque no existe una división precisa para considerar los distintos tipos de desnutrición en los niños, algunos autores (38,

40), los han descrito para dos grupos de edad: los niños lactantes menores de 1 año y los preescolares de 1 a 4 años.

El estado nutricional de los infantes depende del tipo de alimentación que se acostumbre en la zona donde vive, depende normalmente -y en principio- de las reservas fetales, del estado nutricional de la madre durante el embarazo, pero principalmente de la alimentación al seno materno, ya que sostiene adecuadamente el crecimiento en los primeros 6 meses de vida aportando proteínas, energía y algunas vitaminas en cantidades suficientes (1,74).

El período de 1 a 4 años de edad es un período realmente crítico especialmente en el segundo año de vida, puesto que existe una gran demanda de nutrimentos, ya que se trata de un período de crecimiento rápido. Existen algunas enfermedades debidas a deficiencias específicas, pero la forma prevalente de desnutrición en estos períodos es la denominada desnutrición proteico-energética. Dentro de estos conceptos se incluyen los dos grandes síndromes, Kwashiorkor y Marasmo .

#### KWASHIORKOR

Es la palabra usada para denominar un síndrome pluricausal, deriva de su descripción de la enfermedad en el oeste de Africa, pero se conoce con otros términos como culebrilla, niños rojos, o enfermedad del hígado graso (17).

Es un padecimiento que puede ocurrir en la infancia o en la niñez y raramente en adultos. Su frecuencia es más importante en el segundo año de vida y es el resultado de infecciones, sin embargo, la causa principal son dietas bajas en proteínas pero que contienen hidratos de carbono. Hay 4 signos que son constantes en kwashiorkor. Estos

son el edema, retardo en el crecimiento, disminución del músculo con retención de grasa subcutánea y cambios psicomotores.

- a) Edema.- Es el principal signo del padecimiento y característico. Puede detectarse en la región pretibial por la producción de un "hoyo" bien definido debido a la presión ejercida por 3 segundos con un dedo sobre el extremo inferior de la tibia.
- b) Retardo del crecimiento.- Se detecta por el análisis de ciertas mediciones antropométricas tales como el peso corporal, circunferencia del brazo y talla, sin embargo la valoración del peso puede ser equívoca por la presencia del edema.
- c) Disminución en la masa muscular con retención de grasa subcutánea. Esta característica es constante y se presenta con una disminución en la circunferencia del brazo.
- d) Cambios psicomotores. Hay un desarrollo motor retardado, anorexia y el paciente se muestra apático y huraño.

Otros signos que acompañan la enfermedad se resumen como sigue: cambios en el pelo, en color y aspecto, despigmentación de la piel, "cara de luna", anemia, salpullido, hepatomegalia, queratomalacia y otras infecciones asociadas.

#### MARASMO

El marasmo se debe principalmente a una dieta baja tanto en proteínas como en hidratos de carbono. Se presenta principalmente en el primer año de vida, como resultado de alimentación artificial con leche muy diluida, asociada con diarrea infecciosa y en ocasiones con tuberculosis.

Los signos clínicos del marasmo pueden dividirse en dos grupos: constantes y ocasionales. Los signos constantes se refieren a retardo en el crecimiento que es extremo y más marcado que en la

talla; el niño usualmente baja 60 % respecto de su peso teórico, y pierde músculo y grasa subcutánea.

En los signos ocasionales hay despigmentación del pelo, avitaminosis A y B2 (estomatitis angular y queratomalacia) y algunas enfermedades asociadas como diarrea infecciosa, tuberculosis, moniliasis oral y cambios psicomotores como apatía y anorexia(22).

### Cambios bioquímicos asociados con Kwashiorkor.

Inevitablemente mucho de nuestro conocimiento sobre los mecanismos bioquímicos en el hombre, estan basados en experimentos en animales, debiendo reconocer que estos resultados se aplican relativamente al hombre, ya que las dos especies difieren en tamaño, vida media, velocidad metabólica, naturaleza de su dieta y sobre todo requerimientos nutricios (38,39,40).

En la rata existen enzimas que cambian o se inducen de acuerdo con la dieta, sin embargo en el hombre, la información sobre variación enzimática es limitada y en muchos casos estos resultados pueden tener un doble significado (101). Estos cambios pueden ser adaptativos y en parte, mecanismos compensatorios ya que su mayor efecto es economizar sustratos cuando la disponibilidad es pobre (2,53,54).

Esto es importante para la sobrevivencia humana ya que el problema que permanece ahora es como se presentan estos cambios y como se controlan. Estudios realizados por Hoffenberg, demuestran que en el Kwashiorkor la albúmina del suero disminuye y esto se explica porque cuando la proteína de la dieta disminuye a un nivel crítico, baja también la cantidad de aminoácidos que van hacia el hígado donde se sintetiza la albúmina (54,126,127).

En la desnutrición, la síntesis de todas las proteínas de exportación esta disminuida, las capacidades de unión de hierro, cobre, calcio y síntesis de transferina son bajas, mientras que las proteínas que no se exportan como la ferritina se sintetizan a una velocidad normal. Los niveles séricos de inmunoglobulinas no producidas en el hígado son normales o elevadas (134).



Una deficiencia de albúmina, y en general de las proteínas de transporte tendrá efectos adversos puesto que no solo habrá deficiencia de aminoácidos sino también de vitaminas y de lípidos.

En el Kwashiorkor el contenido de citrato esta disminuido (99) y esto es de especial interés ya que una elevada concentración de citrato inhibe la actividad de la fosfofructocinasa (FFC). Un descenso en la concentración de citrato explica la baja velocidad de síntesis de ácidos grasos ya que es un activador de la enzima acetil CoA carboxilasa, reguladora de esta síntesis, además de que el citrato es una fuente inmediata de acetil CoA extramitocondrial, en la reacción catalizada por la enzima ATP citrato liasa (9,64).

Schopfer y Douglas, midieron la actividad de enzimas citoplasmáticas en leucocitos PMN de niños normales y con Kwashiorkor y no observaron ningún cambio o diferencia entre las células con y sin fagocitosis, las enzimas medidas fueron hexocinasa, fosfofructocinasa, piruvato cinasa, gliceraldehído fosfatocinasa, mieloperóxidasa, NADPH y NADH oxidasa y producción de lactato.

Hay pocos datos acerca de la actividad metabólica de PMN en desnutrición. Aunque se ha establecido la relevancia de aumentos en la actividad de vías glucolíticas y oxidativas durante la fagocitosis para el consumo y la destrucción de partículas (133).

Actividades enzimáticas de leucocitos PMN en desnutrición.

La fagocitosis y la digestión intracelular de organismos patógenos son mecanismos de protección fundamentales para la sobrevivencia del hombre. Defectos cuantitativos y cualitativos de los PMN se asocian a una gran incidencia y severidad de infecciones piógenas causadas por bacterias y virus (30,50,120,132).

El englobamiento de la partícula y la formación de la vesícula fagocítica requieren de cambios metabólicos y morfológicos que incluyen degranulación, activación de vías energéticas (glucólisis y respiración), fusión del lisosoma con la vacuola para formar los fagolisosomas, y por último la digestión (127-131).

Las enzimas asociadas con los granulos primarios y secundarios en PMN catalizan la producción de energía, alteran el pH de la vacuola fagocítica a un pH ácido y degradan macromoléculas microbianas por medio de los metabolitos de oxígeno, el peróxido de hidrógeno los aniones superóxido, los radicales hidroxilo y el oxígeno molecular "singlet" los que tienen propiedades bactericidas (78,14,32,104).

Ohno y col. han indicado que la producción de éstos metabolitos tienen una localización subcelular en la membrana plasmática y en la membrana fagosomal (78). Por otro lado Susuki y col. demostraron que el ácido siálico presente en la membrana plasmática del PMN se necesita para la generación de estos metabolitos (104).

En estados de deficiencia nutricional, la división celular está dañada, el metabolismo energético está restringido y la actividad de varias enzimas está frecuentemente alterada. La asociación de desnutrición e infección y la reducción de la capacidad bactericida del PMN en niños desnutridos desatan eventos metabólicos importantes en los leucocitos (28,95).

Las actividades de enzimas citoplasmáticas de pacientes con Kwashiorkor; hexocinasa, fosfofructocinasa, piruvatoquinasa, Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, mieloperoxidasa, NADPH, y glutatión reductasa no mostrarán cambios con respecto a sujetos normales. Sin embargo, Selbaraj y Bhat (95), en la India encontraron disminución de

la actividad de NADPH oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (95). Además, los leucocitos de niños desnutridos no liberan fosfatasa ácida de los lisosomas durante la fagocitosis. El tratamiento de estos niños con dietas altas en proteína y energía aumenta la actividad de dichas enzimas.

Por otro lado Metcoff y Yoshida, observaron una disminución de la actividad de la piruvato cinasa y de la concentración de ATP en niños con desnutrición proteico energética (74,118).

La actividad de la vía hexosa monofosfato es muy alta en leucocitos PMN en reposo (sin fagocitar), de sujetos deficientes en proteínas, comparados con los controles, pero los niveles máximos de estimulación de la vía, durante la fagocitosis fueron iguales en los dos grupos. La captación de yodo en proteínas precipitadas con ácido tricloroacético de neutrófilos en fagocitosis, fue baja y además existe una disminución en la habilidad de estas células para matar cultivos de Candida albicans ya que existe una reducción en la respuesta quimiotáctica de las células (30,50).

Estas observaciones concuerdan con los datos publicados en Guatemala India y México (95,74,118), en donde se encontraron actividades disminuidas de fumarasa, isocitrato deshidrogenasa (IDH), malato deshidrogenasa (MDH), aspartato aminotransferasa (AsAT), y alanina aminotransferasa (AlAT). La fosfatasa alcalina aumento y la actividad de la NADPH oxidasa y de la vías hexosa monofosfato, disminuyeron en PMN fagocíticos .

Yoshida, Metcoff y Frenk, observaron en niños mexicanos con deficiencias nutricias, bajas concentraciones de ATP en leucocitos pero niveles normales de ADP, AMP, fosfoenolpiruvato (PEP), malato, y alfa-cetoglutarato (118).

La reducción oxidativa del colorante nitrosazul de tetrazolium a formazán se emplea para evaluar la actividad de la vía hexosa monofosfato y la producción de metabolitos de oxígeno, que están involucrados en la destrucción de bacterias(9,79,91). En niños desnutridos los PMN en reposo presentan un valor alto en la reducción de este colorante, lo que nos indica una estimulación leucocítica in vivo por un microbio y sus productos.

La terapia dietaria y la rehabilitación nutricia se asocian con la recuperación de las funciones fagocíticas y de la capacidad bactericida (66,133).

Según Chandra (134), la migración quimiotáctica esta reducida en niños desnutridos que por lo general tienen infecciones recurrentes o una historia clínica de enfermedades infecciosas repetitivas, la quimiotaxis también se encuentra disminuída en individuos bien nutridos pero con infección, de manera que esta anomalía en la migración de los leucocitos viene a ser un resultado de la infección más que de una deficiencia nutricia per se .

Existe un número de factores inmunológicos y no inmunológicos que juegan un papel crítico en la susceptibilidad de individuos desnutridos a la infección. La función dañada de los neutrófilos asociada con alteraciones en las enzimas intracelulares y procesos metabólicos es una de las influencias más fundamentales . Más aún es importante definir los nutrimentos específicos que modulan las vías metabólicas bactericidas en el fagocito (50,66).

La antropometría es la medición de la dimensión y composición del cuerpo humano (58).

El crecimiento se ve afectado por determinantes biológicas, incluyendo el sexo, el medio ambiente intrauterino, el peso al nacer, el número del embarazo, el tamaño del producto al nacer, la constitución genética y por factores ambientales como son el clima, la estación y el nivel socioeconómico. Las influencias ambientales, principalmente la nutrición es de mayor importancia que el esquema genético y otros factores biológicos (38).

Las dimensiones físicas del cuerpo se afectan por la nutrición particularmente en el período de crecimiento rápido de los niños, por lo que las mediciones selectas del cuerpo, dan una valiosa información con respecto a una desnutrición en la que se afecta la talla y la composición corporal.

Los métodos y las mediciones empleadas en antropometría varían en número y complejidad, pero los elegidos dependerán del propósito y objetivos del estudio en particular. Las condiciones que deberán cubrir para ser seleccionadas, son la sencillez, facilidad, rapidez y reproducibilidad, para que brinden un máximo de información. Las mediciones más usuales son: la masa corporal, representada por el peso; dimensiones lineales, como la talla y la composición corporal y reservas de energía, representadas por el tejido blando superficial, la grasa subcutánea y el músculo.

El peso es la medición antropométrica de más uso. En regiones en desarrollo la prevalencia de la desnutrición energético proteíca se observa por una deficiencia en el peso.

Se emplean comunmente dos tipos de mediciones lineales: la talla y la circunferencia de cabeza y torax (denominadas también perímetro cefálico y torácico). La circunferencia de cabeza se mide para detectar estados patológicos como tamaño anormal (hidrocefalia o microcefalia) útiles en pediatría. La circunferencia de cabeza y de tórax son las mismas en el sexto mes de edad pero después de esto el cráneo crece más lentamente que el tórax.

#### Tejidos blandos

El cerebro, el hígado, el corazón, los riñones y otros órganos internos forman una parte apreciable del peso corporal pero no varía mucho en la desnutrición. El músculo y el tejido adiposo constituyen el tejido blando que presenta mayor variación debido a una deficiencia en proteínas y energía por lo que la antropometría de estos tejidos es representativa de las reservas del organismo.

Se han reportado estudios acerca de la cantidad y distribución de la grasa subcutánea y reservas calóricas y de su medición. Se utilizan distintos métodos como el ultrasonido, la densitometría, los análisis físico-químicos y la antropometría física usando plicómetros o antropómetros (58).

## OBJETIVOS

## OBJETIVOS

- 1) DESARROLLAR UN SISTEMA PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS HEXOCINASA, FOSFOFRUCTOCINASA Y PIRUVATOCINASA EN LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS (PMN)
- 2) OBTENER LOS VALORES DE ACTIVIDAD DE ESTAS ENZIMAS EN LEUCOCITOS PMN DE NIÑOS BIEN NUTRIDOS PARA SER USADOS COMO TESTIGOS .
- 3) COMPARAR LAS ACTIVIDADES DE ESTAS ENZIMAS EN LEUCOCITOS PMN DE NIÑOS DESNUTRIDOS EN DIFERENTES ETAPAS DE LA RECUPERACION NUTRICIA Y RELACIONAR ESTAS ACTIVIDADES CON LOS VALORES DE PESO PARA LA TALLA



El estudio se dividió en varias etapas para un mejor desarrollo de la metodología, consistentes en :

- 1) ADAPTACION Y ESTANDARIZACION DE LAS TECNICAS DE MEDICION DE LAS ENZIMAS HEXOCINASA , POSFOFRUCTOCINASA Y PIRUVATOCINASA EN LEUCOCITOS PMN HUMANOS DE SUJETOS CLINICAMENTE SANOS.
- 2) SELECCION DE LA POBLACION
- 3) OBTENCION DE UNA MUESTRA DE SANGRE VENOSA EN EL GRUPO TESTIGO Y MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LAS ERZIMAS ANTES MENCIONADAS, BIOMETRIA Y CITOLOGIA HEMATICAS.
- 4) OBTENCION DE UNA MUESTRA DE SANGRE PERIFERICA EN NIÑOS DESNUTRIDOS DESDE SU INGRESO HASTA SU EGRESO, CON TOMA DE MUESTRAS CADA 15 DIAS, PARA LA VALORACION DE LOS NISMOS PARAMETROS QUE EN EL GRUPO TESTIGO.
- 5) EVALUACION ANTROPOMETRICA DE LAS DOS POBLACIONES DURANTE EL ESTUDIO, CADA 15 DIAS, HASTA LA RECUPERACION TOTAL O HASTA QUE SEAN DADOS DE ALTA.
- 6) ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS .

#### SELECCION DE LA POBLACION

##### POBLACION DE NIÑOS TESTIGO

Se conformó con quince niños bien nutridos, no parasitados, asistentes a la guardería del Instituto Nacional de Pediatría (con la aceptación voluntaria de los padres), con edades de 10 meses a 5 años.

##### Criterios de selección

- Tener un peso para la talla entre las percentilas 95-105 del patrón
- Tener un peso en relación con la edad entre las percentilas 90-110

del patrón.

38

-Con una citología y biometría hemática, dentro de los valores de referencia establecidos por el Instituto Nacional de Pediatría.

#### GRUPO EN RECUPERACION NUTRICIA

Se integró con 12 niños que presentaban desnutrición proteínica energética de tipo marasmo, de 4 meses a 4 años de edad, internados en la sala de recuperación nutricia del Instituto Nacional de Pediatría (participación voluntaria).

Criterios de selección

- Presentar algún tipo de desnutrición
- Tener un porcentaje de peso en relación a la talla menor al 90 %
- No presentar ningún tipo de parasitosis

A continuación se presentan los principales métodos que se utilizaron para el cumplimiento de los objetivos, en el siguiente orden:

- a) Obtención de los leucocitos PMN humanos
- b) Obtención de la fracción citoplásmica de los leucocitos PMN
- c) Determinación de proteínas con el reactivo de fenol (Lowry)
- d) Determinación de la actividad de Hexocinasa
- e) Determinación de la actividad de Fosfofructocinasa
- f) Determinación de la actividad de Piruvatoquinasa

La concentración de hemoglobina se valoró por el método de la cianometahemoglobina y el hematocrito se realizó con tubos capilares en una microcentrifuga, según se describe en la literatura (126).

Las mediciones antropométricas se realizaron según las técnicas descritas por Jelliffe (58).

**OBTENCION DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS (PMN).**

(24,49)

**Reactivos**

- a) Heparina, 5000 U / ml
- b) Solución salina balanceada (SSB).
- c) Solución balanceada de fosfatos (PBS).
- d) Ficoll Hypaque , densidad = 1.077 g/ml
- e) Cloruro de amonio , 0.87 % .

**Metodo**

- 1) Extraer 3 ml de sangre periférica , agregar heparina (10 U/ml) y mezclar bien .
- 2) Centrifugar a 1000 x g durante 10 minutos
- 3) Separar la capa superior de leucocitos ( Buffy coat ) y resuspenderla en 3 ml de solución balanceada de fosfatos (PBS).
- 4) Colocar la suspensión anterior en un gradiente de Ficoll Hypaque (densidad = 1.077 +/- 0.002 g/ml ) .
- 5) Eliminar la interfase rica en células mononucleares (capa superior) y el Ficoll-Hypaque residual (capa media).
- 6) Lavar la capa inferior con NH<sub>4</sub>Cl al 0.87 % , para la lisis de los eritrocitos contaminantes. Incubar esta solución a 37° C durante 15 minutos.
- 7) Centrifugar a 1000 x g durante 10 minutos. Con esta operación se obtiene una fase rica en leucocitos ( sedimento blanco ) y una fase líquida que se desecha (lisado de eritrocitos).
- 8) Lavar el sedimento blanco dos veces con solución salina balanceada (SSB), o hasta obtener un sedimento blanco libre de eritrocitos.
- 9) Resuspender el sedimento blanco en 2 ml de SSB

- 10) Contar en un hemocitómetro (Cámara de Neubauer) el número de PMN, y determinar pureza y viabilidad.
- 11) Ajustar la concentración a  $1 \times 10^6$  leucocitos PMN/ml con SSB
- 11) Congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis .

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

#### Determinación de la pureza de los leucocitos PMN.

Se cuentan todos los leucocitos presentes en la cámara de Neubauer tanto células mononucleares (linfocitos y monocitos) como las células polimorfonucleares ( basófilos, eosinófilos y neutrófilos) y se expresa el porcentaje de células PMN presentes en relación al número total de células.

#### Determinación de la viabilidad de los leucocitos PMN.

Para esta operación se utiliza el colorante azul de tripán , que es un colorante "vital" , es decir , tñe a las células de azul solo cuando están muertas, pero si están viables, las células tienen un ligero color amarillo . Se cuenta el total de células en un hemocitómetro ( lo que representa el 100% ) y se cuentan los PMN viables (color amarillo ).

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

#### OBTENCION DE LA FRACCION CITOPLASMICA DE LEUCOCITOS PMN.

##### Reactivos

- a) Hielo seco
- b) Acetona GR
- C) Suspensión de leucocitos PMN.

##### METODO

- 1) Preparar una mezcla frigorífica consistente en hielo seco/ acetona para disminuir la temperatura a  $-30^{\circ}\text{C}$  .
- 2) Preparar un baño de incubación a  $60^{\circ}\text{C}$

- 3) Sumergir la suspensión de PMN en la mezcla frigorífica hasta congelamiento e inmediatamente pasarla a el baño de incubación a 60°C .
- 4) Repetir el paso 3), cinco veces en forma continua.
- 5) Posteriormente , homogeneizar la muestra en un disruptor de celulas Potter - Elvehjem ( marca Lourdes Co.) , durante 30 segundos a 500 rpm .
- 6) Centrifugar a 5200 x g , durante 30 minutos.
- 7) Desechar el sedimento y separar el sobrenadante que servirá para la medición de la actividad enzimática y la determinación de proteínas según el método de Lowry (67), usando albúmina de suero bovina como referencia (ASB) , mantenerlo en refrigeración a 4°C.

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

DETERMINACION DE PROTEINAS CON EL REACTIVO DE FENOL (LOWRY, ROSEBROUGH, FARR Y RANDALL) (67).

1) PRINCIPIO

Varios tipos de fenoles se comportan como agentes reductores débiles y pueden oxidarse a compuestos de tipo quinona por muchos agentes oxidantes. El reactivo de Folín óxida compuestos fenólicos en condiciones alcalinas , de tal manera que se reduce pasando de un color amarillo a un color azul intenso. A la solución de proteína se le agrega ión cuprico en tartrato débilmente alcalino que reacciona con las uniones peptídicas. El complejo de Biuret y las cadenas aromaticas de la proteína reducen el reactivo y las dos reacciones juntas son cien veces mas sensibles que el método de Biuret por sí solo. Se pueden determinar fácilmente cantidades de proteína del orden de 1-100 microgramos con un coeficiente de variación menor al 5 % (67).

## 2) MATERIAL

## 2.1) Reactivos

- a) Solución A : Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N
- b) Solución B :  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5 % en tartrato de sodio y potasio al 1 % .
- c) Solución C : Solución de cobre alcalino , mezclar 50 ml del solución A con 1 ml de la solución B ( descartar después de 1 día )
- d) Solución D : Reactivo de Folin diluido a 1N con  $\text{H}_2\text{O}$
- e) Solución Patrón : Se prepara con albúmina de suero bovina (ASB) a una concentración de 4 mg/ml en NaOH 0.1N .

2.2) Preparación de la curva patrón . Hacer diluciones seriadas 1:2 de la solución patrón de BSA ( 4 mg/ml ) y tomar alíquotas de 20 microlitros para obtener muestras de 20, 40, y 80 microgramos/ml .

- a) 80 ug/ml.- Colocar en un tubo de ensayo 20 ul de la solución estandar y agregar 180 ul de agua destilada desionizada.
- b) 40 ug/ml.- Realizar una dilución 1:2 de la solución patrón . Colocar en un tubo de ensayo 20 ul de ésta dilución y adicionar 180 ul de agua.
- c) 20 ug/ml .- Realizar una dilución 1:2 de la solución anterior (b). Colocar en un tubo de ensayo 20 ul de ésta solución y agregar 180 ul de agua .

## MÉTODO

- 1) Colocar 20 ul de muestra en un tubo de ensayo de 12 x 75 mm.
- 2) Agregar 180 ul de agua destilada desionizada.

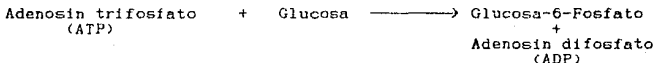
- 3) Adicionar 1 ml de la solución C , agitar y dejar en reposo la solución 10 minutos (A partir de este punto se trabajan los problemas y la curva patrón de la misma manera).
- 4) Agregar 0.1 ml de la solución D .
- 5) Dejar reposar 1 hora a temperatura ambiente.
- 6) Medir la absorbencia de las muestras y la curva patrón a 660 nm
- 7) Graficar absorbencia contra concentración de Proteínas (ASB).

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
XXXXXX

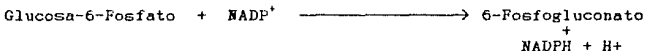
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA HEXOCINASA (HC) DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS (PMN). (29,33,60)

PRINCIPIO

La hexocinasa cataliza la reacción :



La formación de glucosa-6-fosfato se mide por la adición de NADP y la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-P DH ), según la reacción :



El 6-fosfogluconato formado se óxida por acción de la enzima fosfogluconico deshidrogenasa , presente en el sistema para reducir más NADP<sup>a</sup> a NADPH :



La reducción de NADP se mide como un incremento de absorbencia ( $\Delta A$ ) a 340 nm.

## MATERIAL

### Reactivos

Amortiguador de fosfatos 0.05 M , pH= 7.4 .

Solución de KCl, 0.1 M.

Solución de MgCl<sub>2</sub> 0.1 M.

Solución de ATP<sup>2</sup> , 0.02 M.

Solución de glucosa , ( 0.06 M )

Solución de NADP, ( 0.002 M )

Solución de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, G6PDH,  
(10 U/ml)

Preparación del lisado de leucocitos PMN .

( ver sección ; Obtención de la fracción citoplásmica de leucocitos PMN)

### METODO.

Los tubos se preparan como sigue :

Reactivo	Tubo I (ml)	Tubo II (ml)
Amortiguador de fosfatos	1.0	1.1
KCl	0.1	0.1
MgCl <sub>2</sub>	0.1	0.1
Glucosa	0.1	---
ATP	0.1	0.1
G6PDH	0.1	0.1
Fracción citoplásmica	0.1	0.1

Los tubos se incuban a 37°C durante 10 minutos, posteriormente se añade 0.1 ml de la solución de NADP a cada tubo . Los tubos se agitan y el contenido se vierte en las celdas de cuarzo .La reacción se lee a 340 nm durante 10 minutos . El tubo II se utiliza como



blanco . Se registra todo el período de los 10 minutos y se determina el  $\Delta A$  desde el tiempo 0 hasta el minuto 10 ( la pendiente es lineal en este período ). Todos los problemas se realizan por triplicado .

### 3) CALCULOS

Una unidad de actividad enzimática se expresa como las micromolas de NADP reducidas por minuto por miligramo de proteína , a 37°C y pH= 7.4 .

$\Delta A$  = incremento en absorbencia en un minuto a 340 nm.

Coefficiente de extinción molar de NADP =  $6.22 \times 10^3 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$

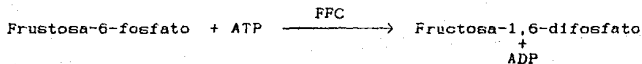
Actividad de la hexocinasa =  $\frac{\Delta A \times 1.7 \times 1000}{6.23 \times 10 \times 0.1 \times \text{mg Prot.}}$

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

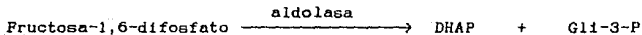
### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOFRUCTOCINASA EN LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS (PMN) (11,12,13)

#### PRINCIPIO

La enzima fosfofructocinasa (FFC) cataliza la fosforilación de fructosa-6-fosfato por medio del ATP a fructosa-1,6-difosfato :



La fructosa-1,6-difosfato producida se mide por la conversión a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (Gli-3-P) por acción de la enzima aldolasa:

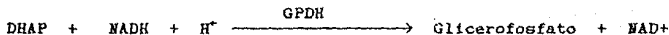


El gliceraldehído-3-fosfato formado se transforma a dihidroxiacetona fosfato por acción de la enzima triosa fosfato isomerasa (TPI) :

TPI

Gliceraldehído -3-fosfato  $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$  Dihidroxiacetona fosfato

La reducción de la dihidroxiacetona fosfato a glicerofosfato por medio de la enzima glicerofosfato deshidrogenasa ( GPDH )promueve la oxidación de NADH que se mide a 340 nm.



#### MATERIAL

##### Reactivos

Amortiguador de fosfatos 0.05 M , pH = 7.4

Solución de KCl , 0.1M.

Solución de MgCl<sub>2</sub> , 0.1M.

Solución de ATP<sup>2</sup> , 0.02 M.

Solución de fructosa-6-fosfato , F6P , 0.02 M.

Solución de NADH , 2.65 mM

Solución de enzimas auxiliares, SEA, consistente de:

Aldolasa, 50 U/ml

Triosa fosfato isomerasa (TPI), 36 U/ml.

Glicerofosfato deshidrogenasa , GPDH , 37 U/ml.

Preparación del lisado de leucocitos polimorfonucleares (ver sección : Obtención de la fracción citoplásmica de leucocitos PMN)

#### METODO

Los tubos se preparan como sigue :

Reactivo	Tubo I (ml)	Tubo II (ml)
Amortiguador de fosfatos	1.0	1.1
KCl	0.1	0.1
MgCl <sub>2</sub>	0.1	0.1
ATP <sup>2</sup>	0.1	0.1

F6P	0.1	---
SEA	0.1	0.1
Fraccion citoplásmica	0.1	0.1

---

Los tubos se incuban a 37°C durante 10 min., posteriormente se añade 0.1 ml de la solución de NADH a cada tubo. Los tubos se agitan y el contenido se vierte en las celdas de cuarzo. La reacción se lee a 340 nm, durante 10 min. El tubo II se utiliza como blanco. Se registra todo el período de los 10 min y se determina el  $\Delta A$  desde el tiempo 0 hasta el minuto 10. (La pendiente es lineal en este tiempo). El tubo I se prepara por triplicado.

#### CALCULOS

Definición de actividad específica: Una unidad de actividad enzimática se expresa como las micromolas de NADH oxidadas por minuto por miligramo de proteína a 37°C y pH 7.4 .

$\Delta A$  = incremento en absorbencia en un minuto a 340 nm  
 Coeficiente de extinción molar del NADH =  $6.22 \times 10^3 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$

Actividad de la fosfofructocinasa =  $\frac{\Delta A \times 1.7 \times 1000}{6.22 \times 10 \times 0.1 \times \text{mg Prot.}}$

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

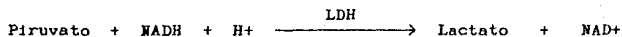
#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PIRUVATOCINASA DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS (PMN). (8,23,44,74)

#### PRINCIPIO

La piruvato cinasa (PC), cataliza la fosforilación de adenosin difosfato (ADP), a adenosin trifosfato (ATP) a partir de fosfoenolpiruvato (PEP):



La velocidad de formación de piruvato se mide por la oxidación del dinucleotido de adenina y nicotinamida reducido (NADH) en la reacción acoplada con la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) :



La disminución de la densidad óptica que ocurre cuando el NADH es oxidado a NAD<sup>+</sup> se detecta a 340 nm

#### MATERIAL

##### Reactivos

Amortiguador de fosfatos 0.05 M , pH 7.4 .

Solución de KCl , 0.1M.

Solución de MgCl<sub>2</sub> , 0.1M.

Solución de ADP , 6.1 mM.

Solución de fosfoenolpiruvato , PEP , 7.3 mM.

Solución de lactato deshidrogenasa, LDH , 100 U/ml.

Solución de NADH , 2.65 mM.

Preparación del lisado de leucocitos polimorfonucleares, PMN

( ver sección : Obtención de la fracción citoplásmica de leucocitos PMN ) .

#### METODO

Los tubos se preparan como sigue :

Reactivo	Tubo I (ml)	Tubo II (ml)
Amortiguador de fosfatos	1.0	1.1
KCl	0.1	0.1
MgCl <sub>2</sub>	0.1	0.1
ADP	0.1	0.1
PEP	0.1	---
Fracción citoplásmica	0.1	0.1

Los tubos se incuban a 37°C durante 10 min., posteriormente se añade 0.1 ml de la solución de NADH a cada tubo. Los tubos se agitan y el contenido se vierte en las celdas de cuarzo. La reacción se lee a 340 nm por 10 minutos. El tubo I se prepara por triplicado y el tubo II se utiliza como blanco.

#### CALCULOS

Una unidad de actividad enzimática se expresa como las micromolas de NADH oxidadas por minuto por miligramo de proteína a 37 C y pH 7.4

$\Delta A$  = decremento de absorbencia en un minuto a 340 nm

Coefficiente de extinción molar del NADH =  $6.22 \times 10^3 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$

$$\Delta \text{Actividad de la piruvato cinasa} = \frac{\Delta A \times 1.6 \times 1000}{6.22 \times 10^3 \times 0.1 \times \text{mg Prot.}}$$

DONDE :

1.6 o 1.7 = se refieren al volumen total del ensayo en ml.

10 = tiempo de lectura de absorbencia en minutos

0.1 = volumen en ml de la fracción citoplásmica ensayada.

1000 = corrección para la concentración en micromolas

6.22 = coeficiente de extinción molar del NADH .

RESULTADOS  
Y  
DISCUSION

## RESULTADOS Y DISCUSION

### SEPARACION DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMN)

En la figura 1 se muestra la relación que existe entre el rendimiento de leucocitos PMN humanos de sujetos clínicamente sanos de acuerdo con el volumen de sangre procesada. Cabe mencionar que al trabajar con volúmenes mayores de 50 ml de sangre, los leucocitos PMN separados, se aglutinan formando grumos difíciles de disgregar; esto se resolvió empleando 100 U de heparina por cada 20 ml de la suspensión final de leucocitos PMN. Volúmenes mayores a 120 ml de sangre producen cifras bajas de leucocitos PMN en la cámara de Neubauer, quizás debido a esta aglutinación. Para evitar esto es necesario procesar la sangre rápidamente, ya que 2 o 3 horas después de extraída, la aglutinación es muy evidente.

Las células se resuspendieron en solución salina balanceada (SSB) pH = 7.4 y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la medición de la actividad enzimática.

La viabilidad de las células que se evaluó por el método de exclusión del colorante azul Tripán, fue de  $95.70 \pm 1.19\%$ . La pureza valorada por criterio morfológico, resultó ser de  $96.14 \pm 3.72\%$ .

La variación del método para la obtención de leucocitos PMN empleando un volumen fijo de sangre (3 ml), fue de  $12.66\%$  ( $n=16$  realizando cada muestra por duplicado) con un rendimiento de  $3.66 \pm 0.46 \times 10^6$  PMN. La variación obtenida es buena teniendo en cuenta los problemas metodológicos del aislamiento.

### 2.- OBTENCION DE LA FRACCION CITOPLASMICA

La figura 2 muestra dos métodos de lisis celular en la reacción catalizada por piruvatoquinasa (PK). Con sonicador a una frecuencia

NUMERO DE LEUCOCITOS PMN OBTENIDOS POR VOLUMEN DE SANGRE

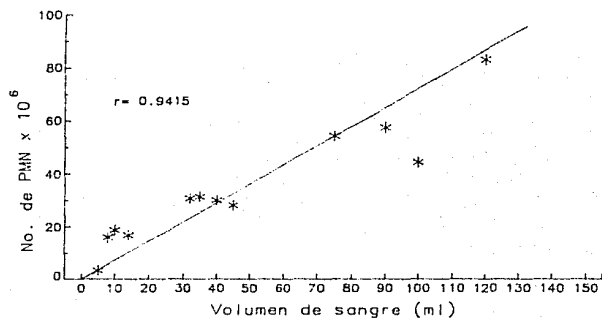
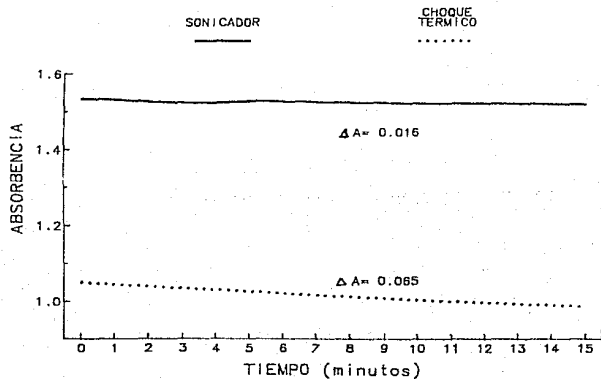


FIGURA # 1

REACCION DE PC UTILIZANDO DOS METODOS DE ROMPIMIENTO CELULAR



PC = Piruvato Cinasa

FIGURA # 2



de 20 KHz, amplitud 12  $\mu$ m y tiempo de exposición de 20 segundos, se obtuvo una disminución de 0.016 unidades de absorbencia durante 15 minutos, mientras que utilizando el choque térmico, se obtuvo una disminución de 0.065 unidades de absorbencia en el mismo lapso de tiempo, es decir, cuatro veces la obtenida por el sonicador. En ambos casos se utilizó una suspensión de  $5 \times 10^6$  PMN/ml de SSB, obtenidas del mismo sujeto (cada muestra se analizó por cuatuplicado). Con éstos resultados se decidió utilizar el choque térmico para la liberación de las enzimas en las muestras problema.

### 3.- MEDICION DE LAS PROTEINAS CITOPLASMICAS DE LEUCOCITOS PMN

En un ensayo preliminar se midió la concentración promedio de proteínas citoplásmicas en leucocitos PMN de 28 adultos clínicamente sanos obteniendose  $3.036 \text{ mg} / 5 \times 10^6$  PMN, mientras que para 14 niños clínicamente sanos fué de  $1.061 \text{ mg} / 3.66 \times 10^6$  PMN.

Los coeficientes de variación obtenidos en estas valoraciones fueron menores al 5 %, lo que permite la confiabilidad en el método de medición.

#### 4.- ENSAYO CINETICO PARA HEXOCINASA

La figura 3a muestra la actividad de la enzima hexocinasa(HC) de leucocitos PMN, cuando se varía la concentración de sustrato. Al graficar la absorbencia contra el tiempo, la actividad de la enzima es lineal cuando se tiene una concentración de 6.0 umolas de glucosa en el sistema de reacción. La figura 3b muestra la transformación de Lineweaver-Burk para la reacción catalizada por la hexocinasa.

Mediante el análisis de regresión lineal se obtiene que  $-1/K_m = -1.39 \times 10^{-5} M$ , de donde  $K_m = 7.2 \mu M$  y el inverso de la velocidad máxima ( $1/V_{m\acute{a}x}$ ) es de  $3.0 \times 10^{-5}$  ( molas NADP reducidas/minuto/mg Protefna), por lo que  $V_{m\acute{a}x} = 3.2 \times 10^{-6}$  molas de NADP reducidas / minuto/mg de protefna.

El cuadro I muestra los datos para el cálculo de la  $K_m$  con respecto a glucosa. El valor obtenido de la  $K_m$  (7.2  $\mu M$ ) es muy similar a la concentración de glucosa (6.0  $\mu M$ ) en la que la respuesta es lineal. La  $K_m$  para la hexocinasa de leucocitos PMN humanos encontrada en este trabajo es muy similar a la de la isoenzima tipo III de hígado humano calculada por Colowick y col.(29), que también se ha reportado en riñón y en intestino y que es de 1.0  $\mu M$ .

En un ensayo cinético con una concentración mayor de sustrato, cuadro II, se obtiene un valor de  $K_m = 14.5 \mu M$  y una  $V_{m\acute{a}x} = 4.8 \times 10^{-6}$  molas de NADP reducidas/minuto/mg de protefna, valores muy cercanos a los calculados anteriormente. La  $K_m$  es prácticamente el doble en la concentración mas alta de sustrato, mientras que la velocidad máxima tiene poca variación, lo que significa que la enzima no modifica su actividad en estas concentraciones pero sí su afinidad por el sustrato .

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN LA REACCION DE HEXOCINASA

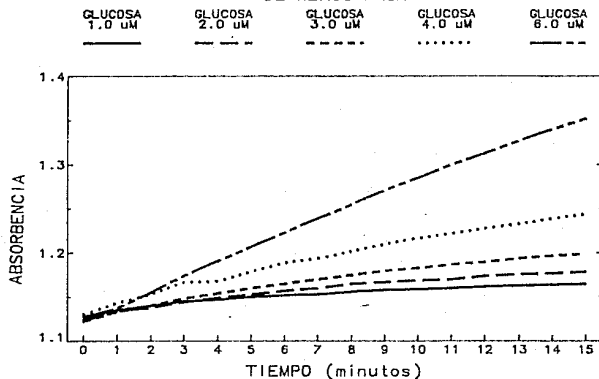


FIGURA # 3a

TRANSFORMACION DE LINEWEAVER-BURK PARA HEXOCINASA DE LEUCOCITOS PMN

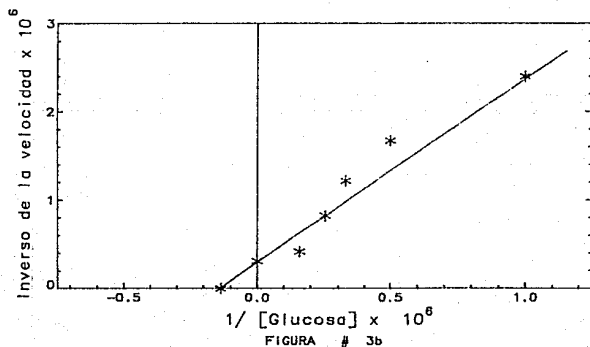


FIGURA # 3b

## CUADRO I

ENSAYO CINETICO PARA HEXOCINASA  
(baja concentración de glucosa)

[glucosa] uM	Velocidad Máxima uM NADPx10/min
1.0	4.173
2.0	5.993
3.0	8.239
4.0	12.199
6.0	24.080

## CUADRO II

ENSAYO CINETICO PARA HEXOCINASA  
(alta concentración de sustrato)

[glucosa] uM	Velocidad Máxima uM NADPx10/min
10	17.65
20	20.86
30	28.89
40	33.70
50	35.31
60	35.31

### 5) ENSAYO CINETICO PARA LA FOSFOFRUCTOCINASA

La figura 4a muestra el comportamiento de la reacción de la fosfofructocinasa (FFC) con distintas concentraciones de la fructosa-6-fosfato (F6P). El comportamiento de esta enzima es distinto del de la hexocinasa, pues a diferentes concentraciones de sustrato, la disminución en la absorbencia es muy pequeña. El cuadro III muestra los resultados de los ensayos cinéticos para FFC. Se obtiene una  $K_m$  de  $0.8 \mu M$  y una  $V_{m\acute{a}x}$  de  $6.6 \times 10^{-1}$   $\mu$ molas de NADH oxidadas/minuto/mg de proteína.

Para observar el efecto de una concentración mayor de sustrato sobre la actividad de la FFC, se ensayaron hasta 36  $\mu$ molas de fructosa-6-fosfato por ensayo, con los resultados que se muestran en el cuadro IV. Se obtiene una  $K_m$  de  $2.07 \mu M$  y una  $V_{m\acute{a}x}$  de  $4.8 \times 10^{-7}$   $\mu$ molas de NADH oxidadas /minuto / mg de proteína (fig. 4b).

Como se observa la  $V_{m\acute{a}x}$  prácticamente no cambia, mientras que la  $K_m$  sí lo hace. Esto puede deberse a que se tiene una concentración de fructosa-6-fosfato mucho mayor que la  $K_m$  y, cuando esto ocurre, la velocidad de la reacción es poco sensible a cambios grandes en la concentración del sustrato.

Frieden, Gilbert y Bock (12,13,45,46) observaron el comportamiento cinético y regulatorio de la FFC obtenida de músculo de conejo y encontraron dos formas de la enzima, las cuales difieren en el grado de protonación de la enzima en residuos específicos y en su habilidad para unirse al sustrato. El pH óptimo de la enzima es alcalino, por lo que se inactiva en valores bajos de pH.

Whitaker (115), ha mencionado que la actividad máxima de la FFC de eritrocitos se alcanza en un pH de 7.8, sin embargo, también ha descrito que la FFC del eritrocito es distinta de la de músculo y

### EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE FRUCTOSA 6 FOSFATO EN LA REACCION DE FOSFOFRUCTOCINASA

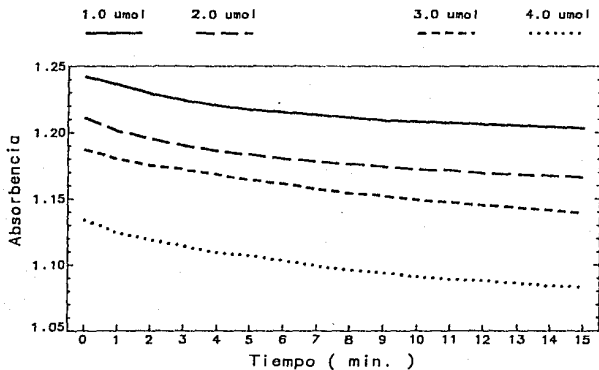


FIGURA # 4a

### TRANSFORMACION DE LINEWEAVER-BURK PARA FOSFOFRUCTOCINASA DE LEUCOCITOS PMN

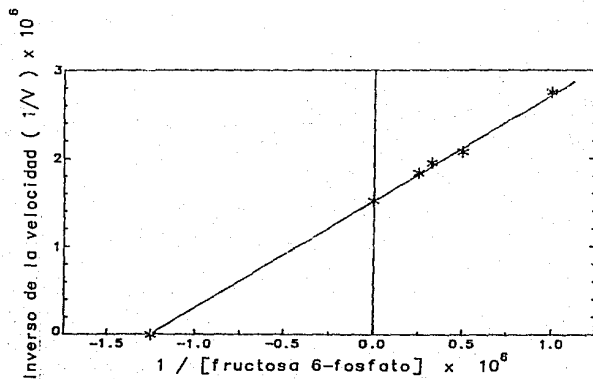


FIGURA # 4b

## CUADRO III

ENSAYO CINETICO PARA FOSFOFRUCTOCINASA  
(baja concentracion de sustrato)

[fructosa-6- fosfato] $\mu\text{M}$	Velocidad máxima $\mu\text{M NADHox/min}$
1.0	3.64
2.0	4.82
3.0	5.14
4.0	5.45

## CUADRO IV

ENSAYO CINETICO PARA FOSFOFRUCTOCINASA  
(alta concentracion de fructosa-6-fosfato)

[fructosa-6- fosfato] $\mu\text{M}$	Velocidad máxima $\mu\text{M NADH ox/min}$
4.0	3.21
16.0	4.07
24.0	4.38
30.0	4.60
36.0	4.81

la de leucocitos, ya que en la distrofia muscular solo la FFC de leucocitos retiene toda su actividad, la FFC de músculo disminuye casi totalmente su actividad y la del eritrocito disminuye a la mitad. Esta inactivación en valores bajos de pH indica una protonación, principalmente de los grupos tiol en el sitio activo de la enzima, lo que provoca además, una disociación reversible de la FFC (12).

Para la FFC, los sustratos se unen preferentemente a formas isoméricas de la enzima (isoenzimas), definidas por el proceso de protonación. De aquí que la fructosa-6-fosfato se une principalmente a las formas enzimáticas no protonadas, mientras que el ATP y el complejo  $Mg^{++}$  ATP se unen a las formas protonadas (13).

De ser así, es posible que el ATP libre, que se une preferentemente a la forma protonada, se una a un segundo sitio y éste sea el responsable de la inhibición por ATP, lo que provocaría que la actividad de la enzima no cambie, aunque la concentración de sustrato aumente (cuadro IV).

#### 6) ENSAYO CINETICO PARA PIRUVATO CINASA

En la figura 5a se muestra la actividad de la enzima piruvato cinasa (PC) frente a distintas concentraciones de fosfoenolpiruvato (PEP). La figura 5b muestra la transformación de Lineweaver-Burk, para el cálculo de  $K_m$  y de  $V_{máx}$ .

La curva que ofrece un comportamiento más lineal es la correspondiente a 3.0  $\mu$ moles en el sistema de reacción según el cuadro V; después de esta concentración disminuye la actividad de la enzima. En el cuadro VI se tiene el mismo efecto, pero después de una concentración de 6.0  $\mu$ moles. En la figura 5a se observan



### EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE FOSFOENOLPIRUVATO EN LA REACCION DE PIRUVATO CINASA

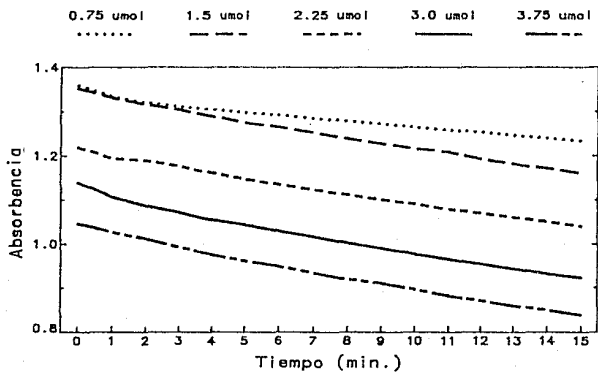


FIGURA # 5a

### TRANSFORMACION DE LINEWEAVER-BURK PARA PIRUVATO CINASA LEUCOCITOS PMN

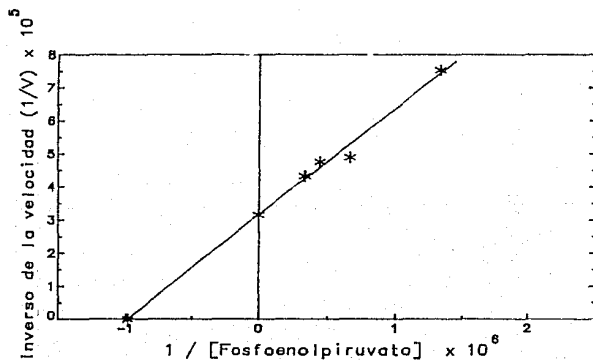


FIGURA # 5b

## CUADRO V

ENSAYO CINETICO PARA PIRUVATO CINASA  
(Baja concentración de sustrato)

[Fosfoenol- piruvato] ( $\mu\text{M}$ )	VELOCIDAD MAXIMA umoles NADH oxidados/min
0.75	1.327
1.50	2.044
2.25	2.097
3.00	2.310
3.75	2.215
6.75	1.640

## CUADRO VI

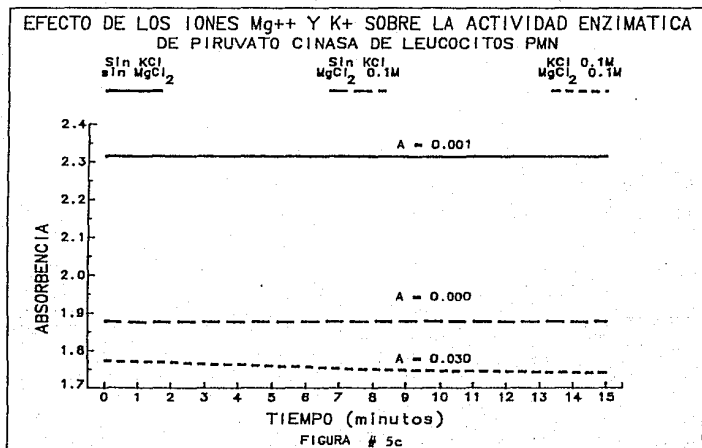
ENSAYO CINETICO PARA PIRUVATO CINASA  
(alta concentración de sustrato)

[fosfoenol- piruvato] ( $\mu\text{M}$ )	VELOCIDAD MAXIMA umoles de NADH oxidados/min
0.75	0.652
3.00	2.097
6.00	2.664
12.0	2.536
24.0	1.862

las diferentes pendientes en el primer minuto, que corresponden a la velocidad inicial de la enzima.

De los datos expuestos en el cuadro V se obtiene una  $K_m$  de  $1.01 \times 10^{-6}$  uM y una  $V_{m\acute{a}x}$  de  $5.7 \times 10$  molas de NADH oxidadas /minuto/mg de prote\u00edna (figura 5b).

La enzima es activada por iones mono y divalentes ( $K^+$  y  $Mg^{++}$ ) que deben encontrarse en el sistema in vitro (figura 5c) ya que sin ellos no es posible medir la actividad de la enzima (41,63).



## VELOCIDAD DE REACCION CONTRA CONCENTRACION DE SUSTRATO

63

Al medir la velocidad de reacción de las tres enzimas a diferentes concentraciones de sustrato, manteniendo la concentración de la enzima constante, se obtienen las gráficas 6a-6f (que corresponden a los datos presentados en los cuadros I al VI).

### a) HEXOCINASA

Con bajas concentraciones de sustrato (1 a 5  $\mu$ moles de glucosa) la hexocinasa (HC) muestra un comportamiento de tipo sigmoide (figura 6a), al incrementar la concentración de glucosa, 10 a 60  $\mu$ moles, también aumenta rápidamente la velocidad, hasta 40  $\mu$ moles de glucosa, después de los cuales la curva se vuelve asintótica lo que indica la saturación de la enzima (figura 6b).

Este comportamiento sigmoide, es característico de enzimas alostéricas, especialmente homotrópicas, donde la unión de la primera molécula de sustrato con la enzima, aumenta la afinidad por las otras moléculas de sustrato (cooperatividad positiva).

Hubsley y Suelter (56), demostraron que la enzima de mamíferos y la de levadura, forman complejos binarios con glucosa más rápidamente que con ATP, por lo que la glucosa es el primer sustrato que interactúa con la hexocinasa, después de la adición de ATP en el sistema de reacción.

### b) FOSFOFRUCTOCINASA

Los estudios cinéticos sobre el mecanismo enzimático de la FFC son complicados, por el hecho de que la actividad catalítica en la reacción normal es función de, por lo menos, cuatro sustratos: fructosa-6-fosfato, iones  $Mg^{++}$  y  $K^+$  y del complejo  $Mg^{++}ATP$ .

GRAFICA DE VELOCIDAD CONTRA [GLUCOSA] PARA LA REACCION CATALIZADA POR HEXOCINASA (HC)

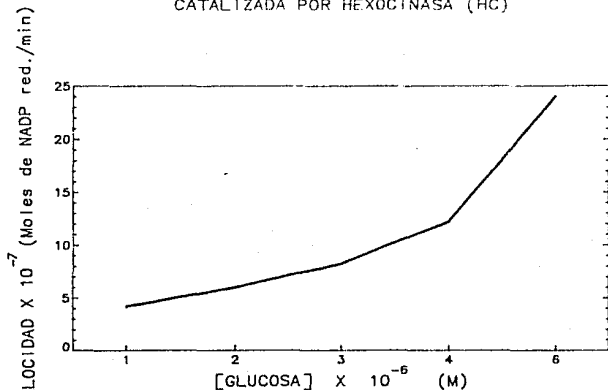


FIGURA # 6a

GRAFICA DE VELOCIDAD CONTRA [GLUCOSA] EN LA REACCION DE HEXOCINASA

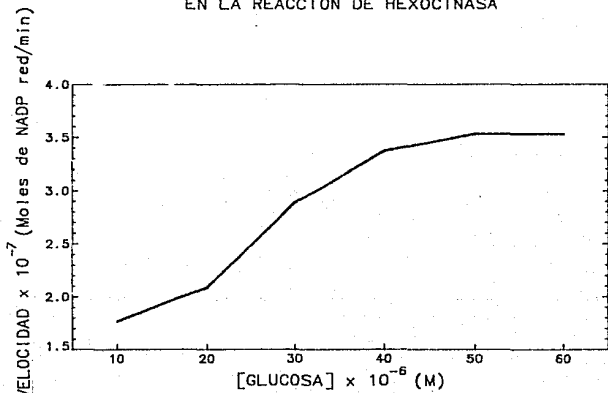


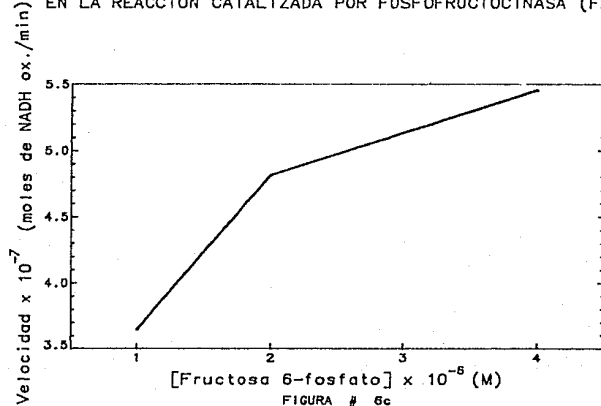
FIGURA # 6b

Las figuras 6c y 6d, muestran los resultados de las gráficas de velocidad contra concentración de sustrato. Se observa un aumento de la velocidad, proporcional a la concentración de fructosa-6-fosfato, característico de las enzimas que muestran la clásica relación cinética de Michaelis-Menten. La figura 6c muestra la relación para una concentración baja de sustrato y la figura 6d para una concentración mayor. En las dos gráficas se observa que la curva no se vuelve asintótica, es decir, no se alcanza la saturación de la enzima y por lo tanto la  $V_{m\acute{a}x}$ . Las enzimas cuya respuesta es de tipo sigmoidal, son de profunda significancia para el control metabólico, ya que una enzima que muestra cinética hiperbólica requiere un gran cambio en la concentración de sustrato (80 a 90 veces) para aumentar la velocidad de un 10% a un 90% de la actividad total, mientras que para una enzima que muestra una cinética sigmoidal, se requieren solo pequeños cambios (3 a 6 veces) para alcanzar este efecto. La PFC sin embargo, puede mostrar curvas de velocidad hiperbólica cuando se trabaja en un pH donde la inhibición por ATP es mínima, es decir, en su pH óptimo (pH=8.0), pero también con concentraciones inhibitorias de ATP, la concentración de P6F aumenta obteniéndose entonces un efecto cooperativo sobre la actividad de la enzima. De esta manera, la gráfica de velocidad inicial contra la concentración de P6F es de tipo sigmoidal (11).

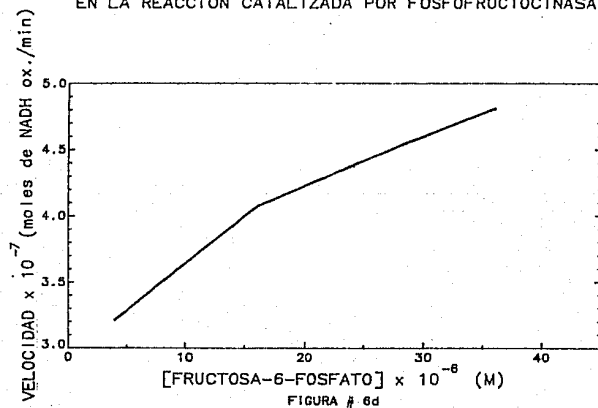
#### c) PIRUVATO CINASA

El sustrato de la enzima, el fosfoenolpiruvato (FEP) es un activador alostérico homotrópico de la enzima, que actúa como modulador positivo de la reacción. Hunsley y Suelter (56),

GRAFICA DE VELOCIDAD CONTRA [FRUCTOSA 6-FOSFATO]  
EN LA REACCION CATALIZADA POR FOSFOFRUCTOCINASA (FFC)



GRAFICA DE VELOCIDAD CONTRA [FRUCTOSA-6-FOSFATO]  
EN LA REACCION CATALIZADA POR FOSFOFRUCTOCINASA



encontraron que la PC purificada de músculo de conejo, exhibe una cinética alostérica clásica del tipo K, es decir cambia el valor de la  $K_m$  aparente pero no el valor de la  $V_{máx}$ .

La gráficas 6e y 6f muestran la velocidad de reacción contra concentraciones bajas y altas de FEP respectivamente. Se observa un comportamiento de tipo hiperbólico, para concentraciones menores a 3.0  $\mu$ moles de glucosa, el aumento de la actividad es gradual pero después de este valor disminuye rápidamente (figura 6e).

Se ha observado la activación heterotrópica debida a fructosa-1,6-difosfato (F-1,6-diP), en la PC de hígado de rata y, aunque es difícil generalizar, muchas de las formas de PC de fuentes no musculares muestran cooperatividad en la union con FEP por lo que F-1,6-diP sirve como activador alostérico para muchas de ellas (18,25,27).

Esta activación ocurre como una elevación aparente de la curva de saturación de FEP. Cabe destacar que para concentraciones altas y bajas del sustrato, la pendiente es muy pronunciada aún con cambios pequeños en la concentración de FEP, lo que puede interpretarse como una cooperatividad positiva. Suponemos que en este caso, la F1,6diP presente en el extracto citoplásmico, pudo haber actuado como un activador de la enzima.

Este tipo de cooperatividad es clásico en la regulación enzimática de tipo catabólica cuando se presenta el cambio de glucolisis a gluconeogénesis.

El descenso brusco de la velocidad que se observa en ambas figuras, sugiere algún mecanismo de inhibición; esto es cierto, si se considera que el grupo fosfato del FEP ocupa el mismo sitio que



GRAFICA DE VELOCIDAD CONTRA [FOSFOENOLPIRUVATO]  
EN LA REACCION CATALIZADA POR PIRUVATO CINASA (PC)

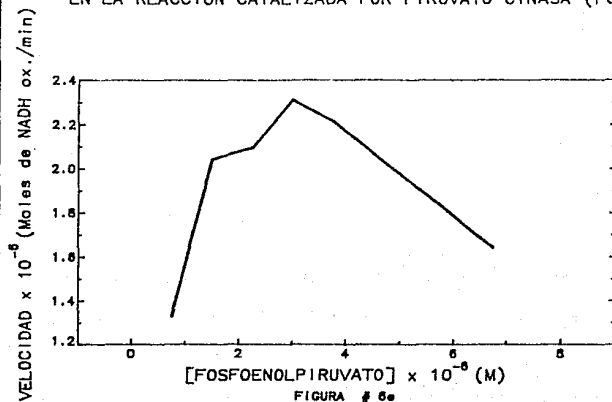


FIGURA # 6e

GRAFICA DE VELOCIDAD CONTRA [FOSFOENOLPIRUVATO]  
EN LA REACCION CATALIZADA POR PIRUVATO CINASA

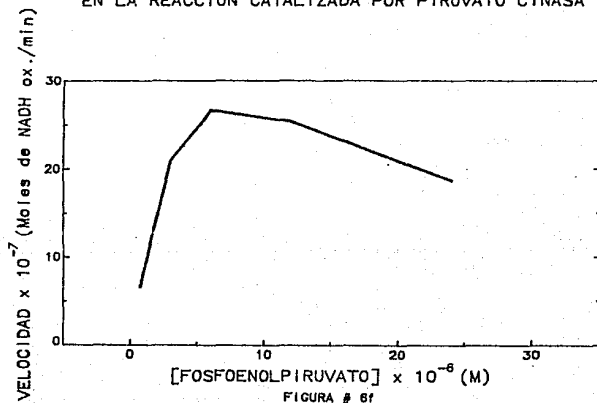


FIGURA # 6f

el fosfato terminal del ATP (20).

Macfarlane y Ainsworth (59), reportaron un análisis cinético completo de la PC de levadura, concluyendo que el mecanismo de reacción es de tipo ordenado, es decir, FEP se une primero a la enzima, después el complejo  $Mg^{++}ADP$  y por último se elimina el piruvato después de la producción de ATP. Posiblemente es en éste paso donde se efectúa la inhibición de la enzima en las condiciones de nuestro ensayo, debido a que el ATP ocupa todos los sitios activos de PC.

## 7) ANTROPOMETRIA EN LOS NIÑOS DEL GRUPO TESTIGO

El cuadro VII muestra las medidas antropométricas realizadas en 19 niños clínicamente sanos, asistentes a una guardería del Instituto Nacional de Pediatría, el cual sirvió como grupo testigo.

Se anotan los datos de edad y los porcentajes de peso para la talla (P/T), peso en relación a la edad (P/E) y talla en relación a la edad (T/E), así como los perímetros corporales y el espesor del pánículo adiposo representado por los diferentes pliegues cutáneos. Los porcentajes de P/T, P/E y T/E para todos los casos se mantuvieron dentro de los límites normales, es decir, alrededor del 100 %. En el cuadro VIII se observan los datos hematológicos del grupo testigo. Como puede observarse no existe ninguna diferencia en los datos presentados en dicho cuadro con respecto a los valores de referencia (anexo 3).

### 7.1 PROTEINAS CITOPLASMICAS TOTALES

Las figuras 7a y 7b muestran la concentración de proteínas citoplásmicas de PMN con respecto a dos mediciones antropométricas, el peso según la talla (P/T) y el peso según la edad (P/E). En la figura 7a se observa que la concentración de proteínas intracelulares en los leucocitos PMN es de 61.28 mg/100 ml de sangre cuando la relación P/T está entre el 90 y el 100 %, mientras que comparada contra la relación P/E (figura 7b) obtenemos 61.51 mg de proteína/100 ml de sangre, cuando esta relación es de 100-110% del peso para la talla. Estos resultados indican que la concentración de proteínas en relación con el índice P/T y el índice P/E es prácticamente la misma.

## CUADRO VII

MEDIDAS ANTROPOMETRICAS EN LOS NIÑOS NORMALES  
(n=19)

MEDICION	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
Edad (meses)	39.84	12.03
Peso para la talla (%)	103.89	8.65
Peso para la edad (%)	105.50	10.71
Talla para la edad (%)	100.20	8.65
PERIMETROS (cm)		
Cefálico	50.25	1.77
Torácico	53.01	2.19
Brazo	16.33	1.17
Muslo	29.37	1.95
Pierna	19.53	2.70
PLIEGUES (mm)		
Interescapulo vertebral	6.87	1.70
Tricipital	8.11	1.43
Abdominal	4.95	1.13

## CUADRO VIII

DATOS HEMATOLOGICOS DE LOS NIÑOS NORMALES  
(n=19)

MEDICION	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
Hemoglobina (g/dl)	13.67	1.73
Hematócrito (%)	39.64	4.73
# Glóbulos blancos/mm <sup>3</sup>	7900	1750
# Glóbulos rojos/mm <sup>3</sup>	5400000	780000
Albumina (g/dl)	4.31	0.77
Transferrina (mg/dl)	404.13	78.30
CUENTA DIFERENCIAL (%)		
Linfocitos	54.47	9.67
Monocitos	0.47	0.51
Neutrófilos	41.48	9.84
Basófilos	0.53	0.51
Eosinófilos	1.89	1.29

PROTEINA CITOPASMICA DE LEUCOCITOS PMN CON RELACION  
AL PESO PARA LA TALLA EN NIÑOS NORMALES  
(mg/ 100 ml de sangre)\*

Relación peso/talla	n	Promedio	D.E.
80-90	1	25.35	—
90-100	3	61.28	30.68
100-110	4	49.02	43.00
110-120	4	36.78	25.10

(figura 7a)

PROTEINA CITOPASMICA DE LEUCOCITOS PMN CON RELACION AL  
PESO PARA LA EDAD EN NIÑOS NORMALES  
(mg/100 ml de sangre)\*

Relación peso/edad	n	Promedio	D.E.
90-100	4	50.93	33.81
100-110	4	62.51	65.78
110-120	4	57.41	34.51
120-130	1	21.10	---

(figura 7b)

\* - 100 ml de sangre equivale a 10 leucocitos PMN aprox.

PROTEINAS CITOPASMICAS DE PMN EN RELACION CON EL PESO PARA  
LA TALLA EN NIÑOS NORMALES

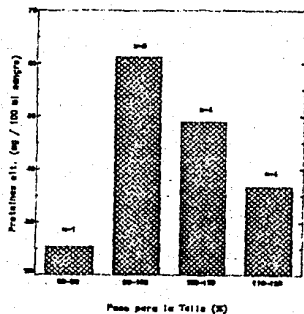


FIGURA 7a

RELACION DE PROTEINAS DE PMN Y EL PESO PARA LA EDAD  
NIÑOS NORMALES

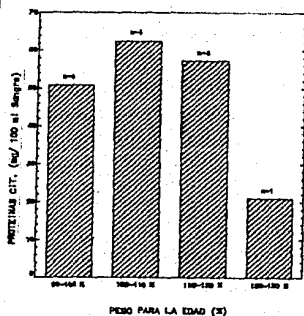


FIGURA 7b

## 8.- ANTROPOMETRIA EN NIÑOS DESNUTRIDOS

Al ingresar los niños desnutridos al Instituto Nacional de Pediatría se encontró en el 90 % de ellos, cuadros infecciosos y parasitarios, que fueron eliminados por tratamiento con fármacos.

Al mismo tiempo fueron tratados con electrolitos por vía oral o intravenosa dependiendo de el grado de deshidratación ocasionada por los cuadros diarreicos que presentaban. La recuperación nutricia de los niños se inició con una dieta de 40 Kcal/Kg de peso, que se aumentó a 80 Kcal y a 200 kcal/Kg de peso dependiendo de su aceptación. La dieta estuvo conformada por leche entera al 5% y al 10% ; si no se presentaban cuadros diarreicos se les complementaba con 100 Kcal más por Kg de peso.

Después de ello el estudio se dividió en tres períodos según la recuperación de el peso para la talla (cuadro IX). Estos son, el período INICIAL para los niños con una relación P/T menor al 70 %, el período MEDIO para los niños con un peso para la talla entre el 70 y el 84 % y el período FINAL para aquellos con una relación P/T mayor al 84 %.

El cuadro IX muestra los resultados de peso y talla para los 19 niños estudiados, aunque solo 10 de ellos se siguieron en forma longitudinal; a los nueve restantes, solo se les tomó una o dos muestras de sangre, ya que eran dados de alta o transferidos a otra unidad hospitalaria cerca del lugar donde viven.

El mismo cuadro, muestra los resultados de los perímetros corporales y los pliegues cutáneos en las distintas etapas de la recuperación nutricia. Al aplicar la prueba de "t" para muestras independientes resultan significativos los perímetros torácico, de brazo, de músculo y de pierna entre los tres períodos ( $p < 0.005$ ) y para

## CUADRO IX

ANTROPOMETRIA DE LOS NIÑOS DESNUTRIDOS EN DIFERENTES ETAPAS DE LA RECUPERACION NUTRICIA

MEDICION	PERIODOS		
	INICIAL ( < 70% P/T)	MEDIO ( 70-84% P/T)	FINAL ( > 84% P/T)
PESO (kg)	4.24 ± 0.31	5.45 ± 0.75**	6.65 ± 1.26*
TALLA (cm)	63.26 ± 0.84	65.17 ± 3.03	66.85 ± 4.60.
PERIMETRO (cm)			
CEFALICO	41.43 ± 0.78	41.80 ± 1.69	46.85 ± 6.59
TORACICO	38.33 ± 0.57	41.32 ± 3.25	53.02 ± 8.82 <sup>a</sup>
BRAZO	8.21 ± 0.48	10.03 ± 1.05	12.77 ± 2.60 <sup>a</sup>
MUSLO	11.82 ± 1.27	14.91 ± 1.38	20.10 ± 6.72 <sup>a</sup>
PIERNA	9.96 ± 0.85	11.78 ± 1.03	14.22 ± 2.65 <sup>a</sup>
PLIEGUE (mm)			
Interescápulo vertebral (IEV)	2.34 ± 0.76	3.74 ± 1.15 <sup>b</sup>	5.00 ± 2.01 <sup>c</sup>
Tricipital	3.08 ± 0.97	4.65 ± 1.33 <sup>b</sup>	5.13 ± 1.75 <sup>c</sup>
Abdominal	1.50 ± 0.35	2.60 ± 0.87	3.00 ± 1.32 <sup>c</sup>
* p < 0.002 con respecto al inicial ** p < 0.001 con respecto al inicial y al final <sup>a</sup> p < 0.005 <sup>b</sup> p < 0.002 <sup>c</sup> p < 0.05			

los pliegues interescapulo vertebral (IEV), tricípital y abdominal entre el período inicial y medio ( $p < 0.002$ ) y entre el período inicial y el final ( $p < 0.05$ ).

La figura 8 muestra los perímetros corporales por períodos de recuperación. Cuando la relación P/T es menor al 70 %, los valores promedio para los perímetros cefálico y torácico fueron de 42 y 38 cm respectivamente; conforme se van recuperando los niños, aumenta el torácico a 42 cm por lo que en 70-84 % del peso para la talla son prácticamente iguales y aumenta con mayor velocidad el torácico hasta tener 53 cm, mientras que el cefálico permanece en 48 cm para un P/T mayor al 84 %. La figura 9, muestra los pliegues cutáneos para los distintos períodos de la recuperación, se observa que aumenta mas ampliamente el pliegue IEV y el tricípital.

La variación de los perímetros corporales (figura 10) en relación con el tiempo de recuperación muestra que después de 78 días de tratamiento se inicia un aumento de los perímetros de tórax y muslo principalmente ( $p < 0.05$ ). Otra gráfica similar (figura 11) pero ahora relacionando los pliegues cutáneos con respecto al tiempo de recuperación muestra la sensibilidad como indicadores antropométricos de los pliegues IEV, abdominal y tricípital.

La relación entre los perímetros torácico y cefálico (tor/cef) con respecto al peso para la talla, mostró que en los niños normales con un P/T entre el 90-120 % se obtiene un índice de 1.00-1.15, mientras que en los niños desnutridos el intervalo es de 0.75-1.0 para los niños que tienen un P/T entre 60-80 %. Para valores mayores de peso para la talla el índice sube hasta 1.2. Estas observaciones indican la franca recuperación de los niños, lo que se confirma por la medición de la antropometría (figuras 12 y 13).



PERIMETROS CORPORALES CON RESPECTO AL PESO PARA LA TALLA  
EN DIFERENTES ETAPAS DE LA RECUPERACION NUTRICIA

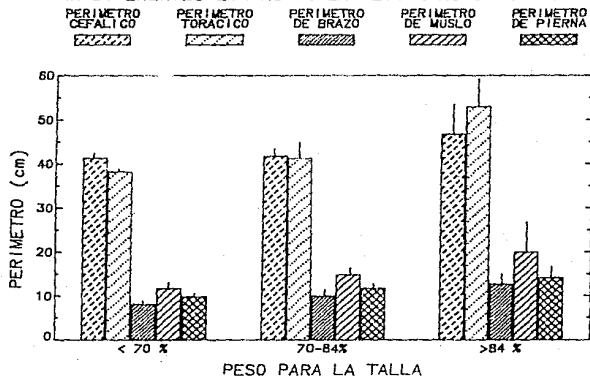


FIGURA # 8

PLIEGUES CUTANEOS CON RESPECTO AL PESO PARA LA TALLA  
EN DIFERENTES ETAPAS DE LA RECUPERACION NUTRICIA

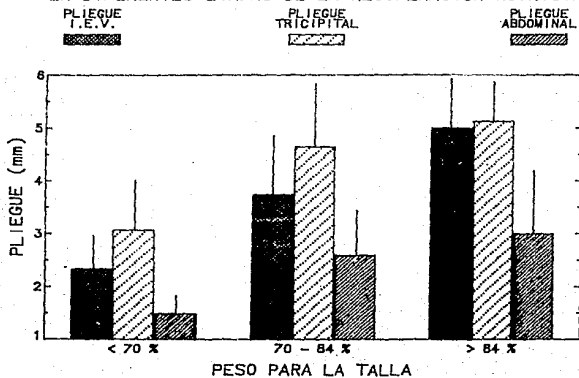


FIGURA # 9

PERIMETROS CORPORALES EN RELACION AL TIEMPO DE RECUPERACION  
Niños desnutridos

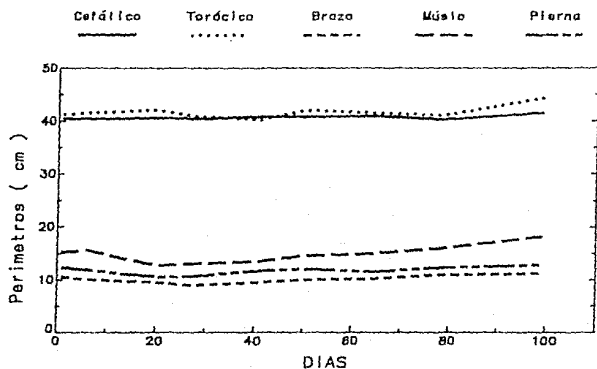


FIGURA # 10

PLIEGUES CUTANEOS EN RELACION AL TIEMPO DE RECUPERACION  
NIÑOS DESNUTRIDOS

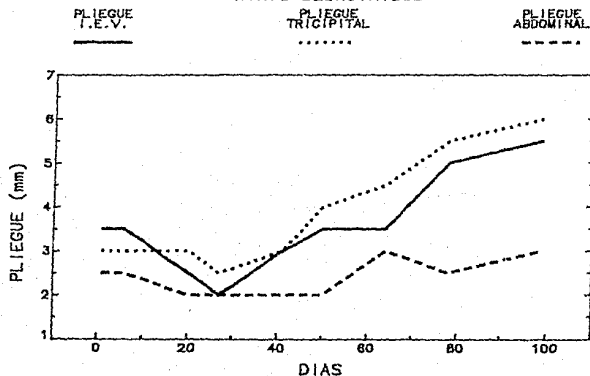


FIGURA 11

RELACION ENTRE EL INDICE PERIMETRO TORACICO/PER. CEFALICO  
CON RESPECTO AL PESO PARA LA TALLA (NIÑOS NORMALES)

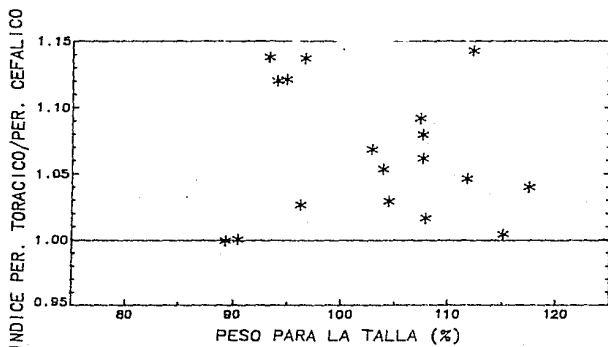


FIGURA # 12

RELACION ENTRE EL INDICE PERIM. TORACICO/PERIM. CEFALICO  
Y EL PESO PARA LA TALLA (NIÑOS DESNUTRIDOS)

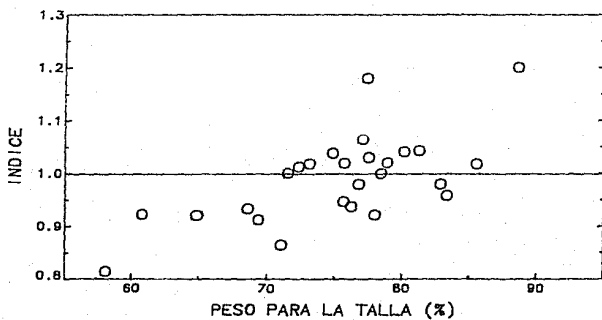


FIGURA 13

### 8.1.- PROTEINAS CITOPLASMICAS TOTALES

La concentración de proteínas intracelulares totales de leucocitos PMN, fué de 69.08 mg proteínas/100 ml de sangre ( $6 \times 10^7$  PMN), para los niños con una relación P/T de 58 a 70%; de 57.21 mg de proteína/ 100 ml de sangre cuando la relación P/T es de 80 a 90 % del P/T. Para una relación P/T > 90% se obtiene una concentración de proteína de 61.81 mg / 100 ml de sangre (figura 14).

El mismo patrón se observa cuando se relaciona según el peso para la edad ( figura 15); para un P/E menor al 50 %, la concentración de proteínas es de 74 mg / 100 ml de sangre, entre el 50 y el 66% es de 47.64 mg de proteína/ 100 ml de sangre y cuando P/E es mayor del 66 % ésta es de 64.82 mg de proteína/100 ml de sangre.

Al relacionar la concentración de proteínas citoplásmicas de PMN contra el número de leucocitos PMN, se obtiene un contenido proteico de 1.2 mg/3000-4000 leucocitos PMN. Al mismo tiempo, la relación de leucocitos PMN obtenidos contra leucocitos totales de la cuenta diferencial muestra una correlación = 0.80 (figura 16).

### 8.2.-INDICES HEMATOLOGICOS .

En la figura 17 se muestran los índices hematológicos de los niños en recuperación nutricia, en relación al peso para la talla comparados con los datos obtenidos de los niños que conformaron el grupo testigo (vea el cuadro VIII). Al aplicar la prueba de "t" para muestras independientes entre ambos grupos, se obtienen diferencias significativas para la hemoglobina ( $p < 0.0002$ ) y para la albúmina ( $p < 0.05$ ), cuadros X y XI.

### 9.- ACTIVIDAD ENZIMATICA EN LEUCOCITOS PMN

En el cuadro XII se muestran los resultados obtenidos en el grupo

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

PROTEINAS CITOPLASMICAS TOTALES DE LEUCOCITOS PMN CON RELACION AL PESO PARA LA TALLA DE LOS NIÑOS EN RECUPERACION NUTRICIA (mg / 100 ml de sangre\*)

Relación peso/talla (%)	n	Promedio	D.E.
58-70	8	69.08	48.72
70-80	13	57.21	61.10
80-90	5	51.98	17.30
90-100	3	61.81	16.62

FIGURA 14

\* 100 ml de sangre equivale a 10 leucocitos PMN aprox.  
D.E. = Desviación estandar.

PROTEINAS CITOPLASMICAS TOTALES DE LEUCOCITOS PMN CON RELACION AL PESO PARA LA EDAD DE LOS NIÑOS EN RECUPERACION NUTRICIA (mg / 100 ml de sangre)

Relación peso / edad (%)	n	Promedio	D.E.
40-50	6	74.00	47.40
50-60	9	59.58	48.35
60-70	7	35.72	30.06
70-80	2	64.82	7.60
80-90	2	38.45	11.48
90-100	3	101.68	92.90

FIGURA 15

PROTEINAS CITOPLASMICAS TOTALES PMN EN RELACION CON EL PESO PARA LA TALLA (niños desnutridos)

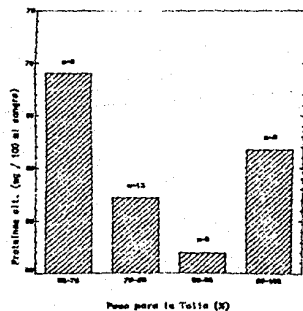


FIGURA 14

PROTEINAS CITOPLASMICAS DE PMN EN RELACION AL PESO PARA LA EDAD (niños desnutridos)

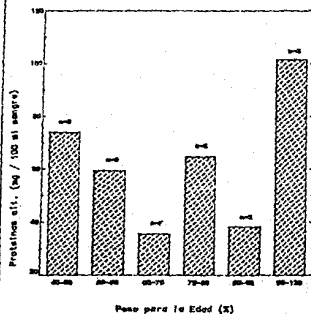
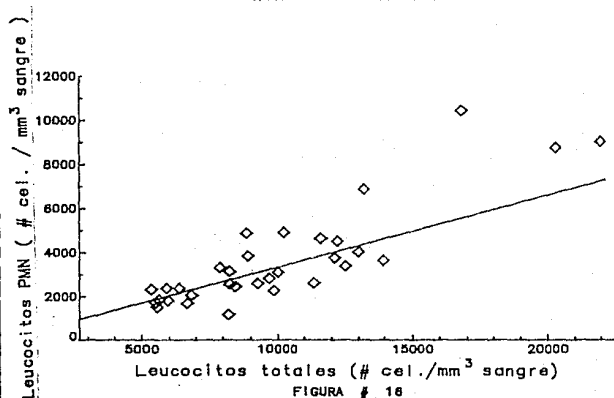
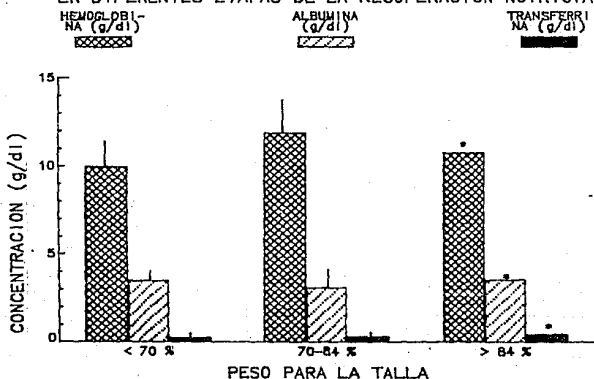


FIGURA 15

LEUCOCITOS PMN EN RELACION A LOS LEUCOCITOS TOTALES  
niños desnutridos



INDICES HEMATOLOGICOS EN RELACION AL PESO PARA LA TALLA  
EN DIFERENTES ETAPAS DE LA RECUPERACION NUTRICIA



\* (Solo un niño obtuvo este valor) FIGURA 17

**CUADRO X**  
**INDICES HEMATOLOGICOS EN NIÑOS EN DIFERENTES ETAPAS**  
**DE LA RECUPERACION NUTRICIA**

MEDICION	PERIODOS		
	INICIAL ( $<84\%$ P/T)	MEDIO ( $70-84\%$ P/T)	FINAL ( $>84\%$ P/T)
Hemoglobina (g/dl)	$9.97 \pm 1.46$	$11.86 \pm 1.91$	10.75
Hematócrito (%)	$30.85 \pm 5.27$	$33.83 \pm 3.88$	35.00
Albumina (g/dl)	$3.50 \pm 0.58$	$3.09 \pm 1.07$	3.54
Transferrina (mg/ml)	$261.9 \pm 61.62$	$333.0 \pm 136.3$	462.50

\* Solo un paciente se recupero hasta obtener un P/T  $> 84\%$  por lo que no se muestra su desviacion estandar (D.E.)

**CUADRO XI**  
**INDICES HEMATOLOGICOS DE NIÑOS EN RECUPERACION NUTRICIA**

MEDICION	n	PROMEDIO	D.E.	p <
HEMOGLOBINA (g/dl)	16	11.08	1.88	0.0002
HEMATOCRITO (%)	16	33.56	5.59	0.002
ALBUMINA (g/dl)	9	3.28	0.84	0.05
TRANSFERRINA (mg/dl)	10	317.50	115.82	0.05
# LEUCOCITOS/mm	17	9560	5030	NS
CUENTA DIFERENCIAL (%)				
LINFOCITOS	16	56.88	11.16	NS
MONOCITOS	16	1.06	1.06	0.05
NEUTROFILOS	16	37.63	11.06	NS
BASOFILOS	16	0.38	0.50	NS
EOSINOFILOS	16	3.13	2.19	0.05

n = numero de sujetos  
p = significancia  
NS = no significativo

## CUADRO XII

ACTIVIDADES DE LA HEXOCINASA, FOSFOFRUCTOCINASA Y PIRUVATOCINASA  
 EN EL GRUPO DE NIÑOS BIEN NUTRIDOS  
 (grupo testigo)  
 (n=19)

(uM de NADP reducido o NADH oxidado/ minuto/ mg de Proteína)

ENZIMA	ACTIVIDAD PROMEDIO
HEXOCINASA	6.57 ± 4.67
FOSFOFRUCTOCINASA	21.39 ± 14.46
PIRUVATOCINASA	16.42 ± 13.25



testigo de niños bien nutridos, para la actividad de las tres enzimas. Se observa una actividad enzimática para hexocinasa de  $6.57 \pm 4.67$  micromolas de NADP reducidas/min/mg de proteína, para fosfofructocinasa es de  $21.39 \pm 14.46$  micromolas de NADH oxidadas/min/mg de proteína y para piruvato cinasa de  $16.42 \pm 13.25$  micromolas de NADH oxidadas/min/mg de proteína.

La variabilidad en la actividad de las tres enzimas fué considerable, particularmente para la piruvato cinasa: de hecho se encontraron algunos valores altos en los tres casos que modifican la normalidad de la curva.

El criterio utilizado para la división de los tres grupos se debió a la tendencia de puntos bajos y altos en cada uno de los períodos con respecto a las actividades enzimáticas. Se encuentran valores bajos en el período inicial, valores altos en el período medio y nuevamente valores bajos en el final.

En las figuras 18, 19 y 20 se muestra la actividad de cada una de las enzimas y los cambios durante la recuperación de los niños desnutridos. Es conveniente aclarar que no todos los niños ingresaron con el mismo déficit de peso, ni todos fueron dados de alta en completa recuperación, además de que hay algunos puntos que corresponden a muestras únicas, cuando no fué posible el seguimiento longitudinal. En la figura 18 se observa la actividad de la hexocinasa en función del peso para la talla.

Como puede observarse, la actividad de la hexocinasa muestra un agrupamiento claro de valores altos en la parte central, entre el 70 y el 80 % del P/T, teniendo en los extremos valores inferiores.

Podemos, por lo tanto, dividir dicha escala en tres partes; una por debajo del 70 % que podríamos llamar período INICIAL, otra entre

ACTIVIDAD DE HEXOCINASA CON RELACION AL PESO PARA LA TALLA  
NIÑOS EN RECUPERACION NUTRICIA

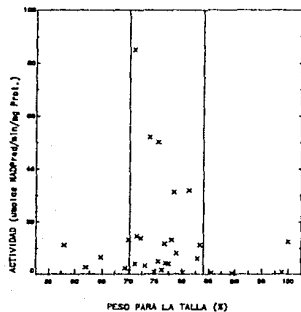


FIGURA # 28

ACTIVIDAD DE FOSFOFRUCTOCINASA VS PESO PARA LA TALLA  
NIÑOS EN RECUPERACION NUTRICIA

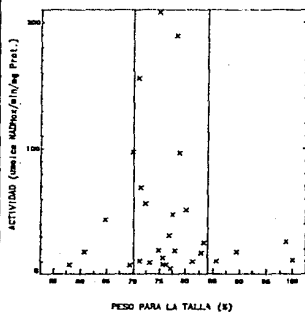


FIGURA # 29

ACTIVIDAD DE PIRUVATO CINASA VS PESO PARA LA TALLA  
NIÑOS EN RECUPERACION NUTRICIA

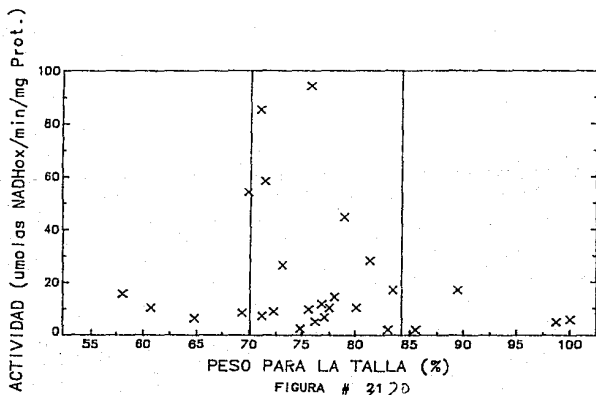


FIGURA # 31 D

70-84 % que podríamos calificar como período MEDIO y por arriba de 84 % como período FINAL.

En la misma situación se encuentra la actividad de la fosfofructocinasa (figura 19), y la actividad de la piruvato cinasa (figura 20) en donde podemos delimitar estos mismos períodos.

Si en vez de utilizar peso para la talla usáramos peso para la edad, la imagen es esencialmente la misma. En la figura 21 los períodos quedan delimitados, en el caso de la hexocinasa contra peso para la edad, el período inicial por debajo del 51%, el período medio entre el 51 y 66% y el período final por arriba del 66%. El mismo criterio se utilizó para las otras dos enzimas (figuras 22 y 23).

El cuadro XIII muestra resultados de las tres enzimas comparandolo con los valores del grupo testigo, analizandolos según el P/T, en el período medio las actividades son mucho mas altas y las desviaciones estandar demasiado amplias en la mayoría de los casos.

Al comparar los diferentes grupos entre sí, las diferencias no son significativas para los distintos períodos de recuperación debido a una gran variabilidad y al tipo de distribución de la curva. Solo el valor de la actividad de fosfofructocinasa durante el período medio fué estadísticamente diferente al valor del grupo de niños normales.

En el cuadro XIV se presenta el análisis de los grupos, según la relación P/E. En este caso se observan los mismos fenómenos descritos anteriormente, con diferencias estadísticamente significativas entre el período medio y el grupo testigo, tanto para la fosfofructocinasa como para la hexocinasa ( $p < 0.05$ ).

ACTIVIDAD DE HEXOCINASA CON RELACION AL PESO PARA LA EDAD

NIÑOS EN RECUPERACION NUTRICIA

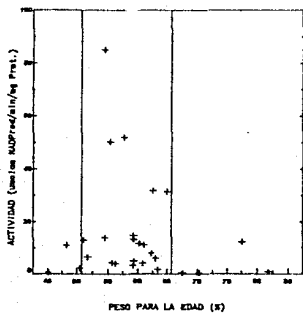


FIGURA # 23

ACTIVIDAD DE LA FOSFOFRUCTOCINASA VS PESO PARA LA EDAD

NIÑOS EN RECUPERACION NUTRICIA

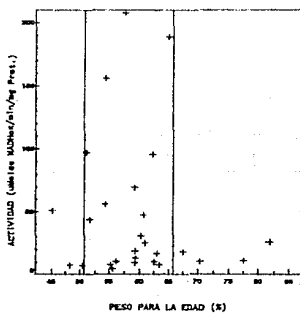


FIGURA # 22

ACTIVIDAD DE LA PIRUVATO CINASA VS PESO PARA LA EDAD  
NIÑOS EN RECUPERACION NUTRICIA

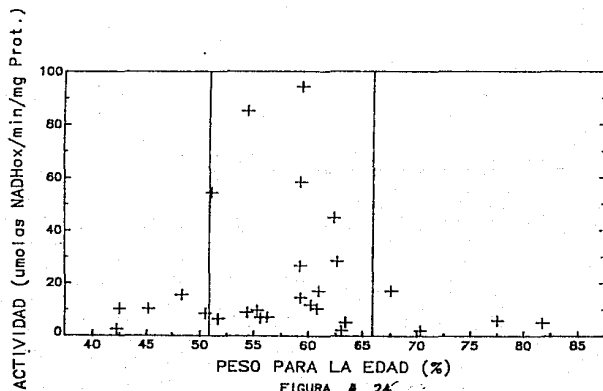


FIGURA # 24

## CUADRO XIII

ACTIVIDADES DE HEXOCINASA FOSFOFRUCTOCINASA Y PIRUVATOCINASA EN LOS NIÑOS DESNUTRIDOS EN DIFERENTES ETAPAS DE LA RECUPERACION NUTRICIA SEGUN EL PESO PARA LA TALLA (uM de NADP reducido o NADH oxidado/minuto/ mg de Proteína)

PERIODO DE RECUPERACION				
ENZIMA	INICIAL (<70%)	MEDIO (70-84%)	FINAL (>84%)	TESTIGO
n	7	21	6	19
HEXOCINASA	7.9 ± 6.15	15.8 ± 21.5	4.3 ± 5.4	6.6 ± 4.7
FOSFOFRUCTOCINASA	18.1 ± 17.9	57.1 ± 60.7*	15.8 ± 6.8	21.4 ± 14.5
PIRUVATOCINASA	14.6 ± 8.4	40.8 ± 54.6	7.9 ± 6.4	16.4 ± 13.3

\* p < 0.05 comparado con el valor testigo  
n = número de sujetos por período

## CUADRO XIV

ACTIVIDADES DE HEXOCINASA, FOSFOFRUCTOCINASA Y PIRUVATOCINASA EN LOS NIÑOS DESNUTRIDOS EN DIFERENTES ETAPAS DE LA RECUPERACION NUTRICIA SEGUN EL PESO PARA LA EDAD (uM de NADP reducido o NADH oxidado/ minuto/ mg de Proteína)

PERIODO DE RECUPERACION				
ENZIMA	INICIAL (<51%)	MEDIO (51-66%)	FINAL (>66%)	TESTIGO
n	7	18	9	19
HEXOCINASA	5.4 ± 6.5	18.9 ± 22.1*	7.1 ± 9.9	6.6 ± 4.7
FOSFOFRUCTOCINASA	27.4 ± 30.3	54.1 ± 63.4*	23.2 ± 24.6	21.4 ± 14.5
PIRUVATOCINASA	13.4 ± 8.5	40.2 ± 55.6	20.2 ± 35.1	16.4 ± 13.3

\* = p < 0.05 comparado con el valor testigo  
n = número de sujetos por período

Los presentes resultados no permiten decir que estas enzimas de leucocitos pueden servir como indicadores del estado de nutrición, ya que el experimento examina los cambios durante la recuperación de los niños, proceso que no equivale al de desnutrición activa.

La fosfofructocinasa y en menor grado la hexocinasa, presentan actividades diferentes en niños normales y en niños que se encuentran en el período medio de la recuperación y alientan a continuar la búsqueda, examinando como siguiente paso, las actividades enzimáticas en niños con desnutrición activa, antes de que comiencen a recuperarse. Antes de ello conviene tal vez, aumentar la muestra para conocer mejor el tipo de distribución de los valores y de ser posible llegar a una menor variabilidad.

Posiblemente sea necesario recurrir a análisis estadísticos más específicos para distribuciones no gaussianas.

Uno de los problemas mas importantes en el desarrollo de la presente metodologia fué el aislamiento de la fracción leucocitaria a partir de volúmenes pequeños de sangre, utilizando alícuotas de 2 a 3 ml de sangre (de sujetos adultos clínicamente sanos).

Sin embargo, al procesar la sangre de los niños desnutridos se encontraron cantidades muy bajas de leucocitos PMN, utilizando iguales volúmenes de sangre, problema que no se contemplo al estandarizar la metodología pero que se resolvió durante la realización del proyecto. Ya estandarizado el aislamiento, se procedió con la medición de la actividad de las enzimas hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa.

Al revisar la metodología descrita por diversas fuentes, para la medición de la actividad de cada una de estas enzimas, se encontraron enormes diferencias en la cantidad de sustrato y en las condiciones utilizadas para medir dicha actividad. Fue difícil, por lo tanto, establecer la metodología para medir la actividad en las tres enzimas, pero principalmente lo fue para piruvato cinasa de la cual se consultaron hasta 18 fuentes distintas, donde se valoró la actividad de piruvato cinasa en condiciones muy variadas (ver anexo 2).

Worthington, Edwards, Hubbard y Dyson, utilizaron por ejemplo amortiguador de imidazol cuyo pH fluctuaba entre 7 y 7.6, mientras que Lakomek, Beutler, Elder, Smith, Carmelli, McQuate y Giles, utilizaron un amortiguador de Tris-HCl a pH = 7.4- 8.0 ; Waygood y Badwey utilizaron Hepes a pH = 7.4, y solo uno, Flory, utilizó amortiguador de fosfatos a pH = 7.4 .

Se probó la actividad de la piruvato cinasa en amortiguador Tris-

HCl, imidazol y fosfatos y no se encontró diferencia en la actividad a  $\text{pH} = 7.4$ , por lo que se decidió utilizar el amortiguador de fosfatos, además de que es mas barato.

Con respecto a la concentración de sustratos, iones y coenzimas se siguieron las recomendaciones de Beutler, que midió la actividad de estas enzimas, pero en eritrocitos y con algunas modificaciones que ya fueron discutidas en el capítulo de resultados. Parte del análisis bibliográfico efectuado al respecto aparece en el anexo 1.

Al realizar los ensayos cinéticos para cada una de las enzimas, se observó que la hexocinasa tiene una  $K_m = 1.45 \times 10^{-5} \text{ M}$ , muy cercana a la  $K_m$  de la hexocinasa tipo I y III, descritas por Colowick y col. y cuyo valor es de  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , sin embargo la actividad específica, para sujetos sanos, con respecto a esta enzima, fué mucho menor,  $6.57 \pm 4.67 \text{ uM NADP reducidos/minuto/mg de Proteína}$ , comparada con la actividad medida por los mismos autores que fué de  $200\text{-}300 \text{ uM NADP red/minuto/mg Prot. en músculo de conejo}$ . La actividad de las otras dos enzimas también fué baja al comparar los otros resultados (ver cuadro XII y anexo 2), sin embargo debemos recalcar aquí que son diferentes tejidos e inclusive diferentes condiciones de ensayo.

El anexo 2, muestra en forma resumida, algunas propiedades encontradas para las tres enzimas en diversos tejidos. Después de la estandarización en la medición de la actividad enzimática se procedió a su aplicación en un grupo de niños desnutridos. La actividad enzimática fué muy variable tanto en los niños desnutridos como en el grupo testigo, por lo que el análisis estadístico efectuado no muestra resultados comparables entre ellos.

Es necesario, además tomar en cuenta que la cantidad de



leucocitos (y por lo tanto de enzimas) PHE obtenidos de la sangre de los niños desnutridos es tan baja que la concentración de sustratos en el sistema de reacción puede rebasar en mucho la concentración de sustrato ( $K_m$ ), y no obtener una buena respuesta para estas concentraciones. Sera necesario entonces ajustar el sistema de ensayo para tal efecto.

## CONCLUSIONES

Se logró la medición de la actividad de las enzimas hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa en leucocitos PMN, utilizando muestras pequeñas de sangre.

La Km para hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa de leucocitos PMN humanos fué de 7.19, 0.80 y 1.015  $\mu\text{M}$  respectivamente.

Se encontraron algunas diferencias significativas entre la actividad enzimática del grupo testigo y la actividad enzimática de los pacientes en recuperación, correspondientes al período medio, para la fosfofructocinasa y hexocinasa. La piruvato cinasa, por su elevada variación, no muestra ninguna diferencia significativa.

La valoración antropométrica de los niños desnutridos durante su recuperación, muestra que los pliegues cutáneos interescapulo vertebral y tricípital responden con mayor rapidez y aumentan de tamaño, con respecto al tiempo de recuperación, que el pliegue cutáneo abdominal.

Al evaluar los perímetros corporales entre los distintos períodos de recuperación se presentan diferencias significativas en los perímetros que resultaron ser mas sensibles a la recuperación de los niños; brazo, pierna, músclo y tórax, en ese orden. Esto significa que el perímetro de brazo es un buen indicador y el primero en responder a la recuperación.

**Recomendación:**

Por último podemos concluir que aunque las enzimas mencionadas no parecen ser indicadores del estado de nutrición, son sensibles dos de ellas al tiempo de recuperación, proceso que de ninguna manera equivale al de una desnutrición activa, por lo que se sugiere un estudio complementario que mida la actividad enzimática en sujetos que presenten tal padecimiento en forma activa y de ser posible ensayar antes esta posible correlación en animales de experimentación. Inclusive se sugiere medir no solo la actividad de estas enzimas sino también su concentración.

## ANEXO 1

## PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LAS ENZIMAS GLUCOLITICAS: HEXOCINASA FOSFOFRUCTOCINASA Y PIRUVATO CINASA (29,11,59)

	HEXOCINASA	FOSFOFRUCTOCINASA	PIRUVATOCINASA
Sustrato	glucosa	fructosa-6-fosfato	fosfoenolpiruvato
Especificidad de sustrato	glucosa fructosa	fructosa-1-fosfato tagatosa-6-fosfato glucosa-1-fosfato	-----
Localización	citoplasma	citoplasma	citoplasma
Peso molecular	100 000	380 000	195 000
Estructura	dimérica	tetramérica	tetramérica
No. Sitios activos	1-2	3-4	3.8 +/- 0.3
Actividad específica (músculo de conejo)	200-300 U/mg	99.5 U/mg	150-300 U/mg
Km	$5 \times 10^{-5} M$	$2.1 \times 10^{-5} M$	$1.7 \times 10^{-2} M$
Ki	-----	$5.0 \times 10^{-6} M$	$1.8 \times 10^{-2} M$
pH óptimo	8.0-8.4	7.4-7.8	7.4-7.6
Punto isoelectrico	6.0-6.3	-----	5.2-5.6
Cofactores	Mg, Mn, Ca, K, Na	Mg, Mn, Co, K.	Mg, K, NH <sub>4</sub> Na, Mn, Rb.
Activadores	citrato fosfatos 3-fosfoglicerato (ATP) baja	AMPc, ADP, Pi fructosa difosfato, iones	iones mono y divalentes fructosa difosfato, 5'-AMP
Inhibidores	[fosfatos] [glucosa-6-fosfato] pH ácido	[iones divalentes] pH ácido dilución [citrato], ATP	ATP, acidos grasos, acetyl CoA,
Sensibilidad	-----	almacenamiento	frio

Se presentan solo algunas variables importantes para esta investigación.

## ANEXO 2

SISTEMAS DE REACCION EN LA MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE  
PIRUVATOCINASA

REFERENCIA	MUESTRA	AMORTIGUADOR	pH	ADP (mM)	NADH (mM)	PEP (mM)	LDH (U)
WORTHINGTON	MC	IMIDAZOL	7.6	45.0	6.6	45.0	14
CHING-CHEM	E	TEA	7.4	0.4	0.17	1.5	2
LAKOMEK	E	TRIS-HCl	8.0	0.6	0.20	5.0	0.6
BEUTLER	E	TRIS-HCl	8.0	4.0	2.00	0.15	6
ELDER	Ep	TRIS-HCl	8.0	1.5	0.20	5.0	0.6
EDWARDS	P/M/H	IMIDAZOL	7.4	5.0	0.17	0.25	100
SMITHS	H	TRIS-HCl	7.4	0.5	0.50	---	---
MAX AUDIT	E	TEA	7.5	3.0	0.18	3.00	0.05
HUNSLEY	L	CACODILATO	6.2	10	0.15	5.00	3.3
CARMELI	MC	TRIS-HCl	7.5	0.27	0.43	0.80	2.0
McQUATE	MC	TRIS-HCl	7.4	3.1	---	0.3	0.1
BADWEY	E	HEPES	7.4	4.1	0.38	8.0	5.0
DYSON	MC	IMIDAZOL	7.0	2.0	0.16	1.0	1.0
GILES	MC	TRIS-HCl	7.4	0.23	0.15	0.8	1.6
WAYGOOD	E. coli	HEPES	7.0	1.33	0.15	0.2	50
HUBBARD	H/M/B	IMIDAZOL	7.0	2.0	0.16	1.0	2
FLORY	Ep	POSFATOS	7.4	1.5	0.14	0.6	1.0

E = eritrocitos  
Ep = enzima purificada  
MC = músculo de conejo  
H = hígado

M = músculo  
B = bovino  
ADP = adenosin difosfato  
NADH = dinucleotido de nicotinamida y adenina reducido

LDH = lactato deshidrogenasa

mM = milimolar

U = unidades

L = levaduras

P = plasma

E. coli = Escherichia coli

TEA = trietanolamina

PEP = fosfoenol piruvato

## ANEXO 3

Valores de referencia utilizados por el laboratorio de análisis clínicos de el Instituto Nacional de Pediatría.

---

HEMOGLOBINA	11.0-15.0 g/dl (6-12 meses)
	11.5-12.5 g/dl (24-120 meses)
HEMATOCRITO	35.0-40.0 % (6-12 meses)
	35.0-39.0 % (24-120 meses)
LEUCOCITOS	6-17 X 1000 (6-12 meses)
	6-14 X 1000 (24-120 meses)
NEUTROFILOS (en banda)	0 - 1 %
SEGMENTADOS	30 %
EOSINOFILOS	2.6-2.8%
BASOFILOS	0.5 %
LINFOCITOS	56-59 %
MONOCITOS	5-6 %

---

## REFERENCIA

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA (LABORATORJO)

Tietz N.W., Finley P.R. Guía clínica de pruebas de laboratorio  
Ed. Panamericana , 1a. edición , México , 1985 , pag. 530-531.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acacio E. El niño, la desnutrición y México. Instituto Nacional de la Nutrición, México. Mayo de 1979.
- 2.- Aebi H.E. and Berger E.G. Nutrition and enzyme regulation. Hanz Huber Pub., Switzerland, 1980.
- 3.- Akimoto K. y Bergami G. Necesidades calóricas: estudios sobre nutrición No. 15, FAO-ONU, Gran Bretaña, 1968.
- 4.- Andrews P.C. and Babior B.M. Endogenous protein phosphorylation by resting and activated human neutrophils. Blood 61: 333-340, 1983.
- 5.- Badwey J.A. and Westhead E.W. Hysteretic response of human erythrocyte pyruvate kinase to phosphoenolpyruvate J.Biol.Chem. 251: 5600-5606, 1976.
- 6.- Ballard F.J. Regulation of gluconeogenesis during exposure of young rats to hypoxic conditions. Biochem. J. 121:164-178,1971.
- 7.- Bass D.A., Grover W.H., Lewis J.C., Szejda P., DeChatelet L.R. McCall J.C. Comparison of human eosinophils from normals and patients with eosinophilia. J. Clin. Invest. 66:1265-1273,1980
- 8.- Beutler E. Coments on an optimized assay for red cell pyruvate kinase deficiency. Clin. Chim. Acta 116:397-399, 1981.
- 9.- Bhagavan N.V. Bioquímica. 2a. edición, Interamericana, pag. 59-125, México, 1983.
- 10.- Blair J.B., Cimbala M.A., James M.E. Hepatic pyruvate kinase. J.Biol. Chem. 257: 7595-7602, 1982.
- 11.- Bloxham D.P. and Lardy H.A. Phosphofructokinase, in "The enzymes" edited by Boyer P.D., Academic Press, 7:239-278, 1977
- 12.- Bock P.H., Frieden C. Phosphofructokinase I: Mechanism of the pH-dependent inactivation and reactivation of the rabbit muscle



- enzyme. J.Biol.Chem. 251: 5630-5636 ,1976.
- 13.- Bock P.E., Frieden C. Phosphofructokinase II: Role of ligands in pH-dependent structural changes of the rabbit muscle enzyme J.Biol.Chem.251: 5637-5643 , 1976.
- 14.- Borregaard N. and Herlin T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis . J.Clin.Invest. 70:550-557, 1982.
- 15.- Brubaker L.H. and Evans W.H. Separation of granulocytes , monocytes, lymphocytes, erythrocytes and platelets from human blood and relative tagging with diisopropylfluorophosphate (DFP). J. Lab.Clin. Med. 71(6): 1036-1041 , 1969 .
- 16.- Bruning J.L., Kintz B.L. Computational handbook of statistics 2nd. edition , Scott Foresman Co. , 1977.
- 17.- Burch H.B., Arroyave G. Scrimshaw N.S. Biochemical changes in liver associated with Kwashiorkor. J.Biol.Chem.257:1579-1587 1981.
- 18.- Cadenas E. Enzimas alostéricos. Investigación y Ciencia 42: 106-118 , 1980 .
- 19.- Carmelli C. , Lifshitz Y. Determination of pyruvate kinase activity by recording of pH changes . Anal. Biochem. 38: 309-312 ,1970 .
- 20.- Carminatti H., Jimenez de Azua L., Leiderman B., Rozengurt E., Allosteric properties of skeletal muscle pyruvate kinase . J.Biol.Chem.246: 7284-7288, 1971.
- 21.- Cawthon L.M., Bitte L.F., Krystosek A., Kabat D. Efect of ciclic adenosine 3':5'monophosphate on ribosomal protein phosphorylation in reticulocytes. J.Biol.Chem. 249: 275-278,1974.

- 22.- Chase H.P., Hambidge M.K., Barnett S.E. Low vitamin A and zinc concentration in mexican-american migrant children with growth retardation. *Am.J.Clin.Nutr.* 33: 2346-2349 , 1980.
- 23.- Chern C.J. , Rittenberg M.B., Black J.A. Purification of human erythrocyte pyruvate kinase. *J.Biol.Chem.* 247: 7173-7180 , 1972.
- 24.- Christlieb A.R., Sbarra A.J., Bardawill W.A. Isolation of highly purified viable leukocytes from blood. *Am.J.Clin.Pat.* 37: 257-262 , 1962.
- 25.- Clark M.G., Bloxham D.P., Holland P.C., Lardy H.A. Estimation of the fructose 1,6-diphosphatase-phosphofructokinase substrate cycle and its relationships to gluconeogenesis in rat liver *in vivo*. *J.Biol.Chem.* 249: 279-290, 1974 .
- 26.- Clarke F.M. and Morton D.J. Glycolytic enzyme binding in fetal brain :the role of actin . *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 109: 388-393 , 1982.
- 27.- Clemens M.J. *Biochemistry of cellular regulation . vol. 1* , CRC Press, 85-119 , 1980 .
- 28.- Cohen M.S., Elliott D.M., Chaplinski T., Pike M.M., Nidel E. A defect in the oxidative metabolism of human polymorphonuclear leukocytes that remain in circulation early in hemodialysis. *Blood* 60: 1283-1289 , 1982 .
- 29.- Colowick S.P. The hexokinases, in "The Enzymes". Boyer,N. editor, Academic Press, 9:1-48 , 1977.
- 30.- Conkling P., Klassen D.K., Sagone A.L. Comparison of antibody dependent cytotoxicity mediated by human polymorphonuclear cells, monocytes and alveolar macrophages. *Blood* 60: 1290-1297 , 1982.

- 31.- Cumme G.A., Bublitz R., Horn A. Dynamic properties of a phosphofructokinase/pyruvate system. *Eur. J. Biochem.* 115:59-65, 1981.
- 32.- DeChatelet L.R. Initiation of the respiratory burst in human Polymorphonuclear neutrophils : a critical review. *J.Ret. Soc.* 24: 73-91 , 1978 .
- 33.- Dixon M. and Webb E.C. *Enzymes* . Third edition , Academic Press, pp.7-23 , 1979.
- 34.- Dyson R.D., Cardenas J.M., Barsotti R.J. The reversibility of skeletal muscle pyruvate kinase and an assesment of its capacity to support glyconeogenesis. *J.Biol.Chem.* 250:3316-3321 1975.
- 35.- Elder G.E., Lappin R.J., Lanson B.E. Three pyruvate kinase variants with increased affinity for PEP. *Brit.J. Haemat.* 47: 371-381,1981.
- 36.- Edwards R.J. and Watts D.C. Specific spectrophotometric assay for M isoenzyme of pyruvate kinase in plasma samples containing mixtures of the muscle (M)and liver (L) isoenzymes . *Clin. Chem.* 27: 906-909 , 1981.
- 37.- Exton J.H. and Park C.R. Control of gluconeogenesis in liver. *J.Biol. Chem.* 244: 1424-1433 , 1969.
- 38.- FAO-OMS. Comité especial de expertos en nutrición. Alimentación y nutrición, 49 , 1972
- 39.- FAO-OMS. Comité especial de expertos en nutrición. Estrategias alimentarias y nutricionales en el desarrollo nacional. 56, 1976.
- 40.- FAO-OMS. Comité especial de expertos en nutrición .Necesidades de energía y proteínas # 7 , 1978.

- 41.- Flory W., Peczon B.D., Koeppel R.E., Spivey H.O. Kinetics properties of rat liver pyruvate kinase of cellular concentrations of enzyme ,substrates and modifiers. *Biochem. J.* 141: 127-131,1974.
- 42.- Flory W. and Koeppel R.E. Lack of temperature sensitivity of rat liver pyruvate kinase. *Biochem.J.* 133: 391-394 , 1973 .
- 43.- Freedland R.A. Effect of progressive starvation on rat liver enzyme activities. *J.Nutr.* 91: 489-495 , 1967.
- 44.- Frenk S., Metcalf J., Yoshida T. Actividad enzimática tisular en el niño con desnutrición avanzada . *Gaceta médica de México* 98: 536-545 , 1968 .
- 45.- Frieden C. Kinetic aspect of regulation of metabolic processes: the hysteretic enzyme concept. *J.Biol.Chem.* 245: 5788-5799 , 1970 .
- 46.- Frieden C., Gilbert H.R., Bock P.E. Phosphofructokinase III. Correlation of the regulatory kinetic and molecular properties of the rabbit muscle enzyme . *J.Biol. Chem.* 251: 5644-5647 ,1976.
- 47.- Garber A.J. and Hanson R.V. The interrelationships of the various pathways forming gluconeogenic precursors in guinea pig liver mitochondria. *J.Biol. Chem.* 245: 589-598 , 1971 .
- 48.- Giles I.G., Post P.C., Munday K.A. The kinetics of rabbit muscle pyruvate kinase . *Biochem. J.* 157: 577-589 , 1976.
- 49.- Giudicelli J., Phillip P.J.M., Sudaka P. and Delgie P. A single-step centrifugation method for separation of granulocytes and mononuclear cells from blood using discontinuous density gradients of percoll. *J. Immunol. Meth.* 54: 43-46 , 1982 .
- 50.- Gudewicz P.W., Beeshold D.H., Lehner T. A functional

- comparison of blood and gingival inflammatory polymorpho-nuclear leukocytes in man . Clin. Exp. Immunol. 27: 152-158, 1977 .
- 51.- Hance A.J. , Robin E.D., Simon L.M. , Alexander S.  
Regulation of glycolytic enzyme activity during chronic hypoxia by changes in rate-limiting enzyme content. J.Clin. Invest.66: 1258-1264 , 1980.
- 52.- Harkins R.W., Nocton J.C. A comparison of the structure and activities of cat and trout muscle pyruvate kinase .  
Eur. J. Biochem. 136: 341-346 , 1983 .
- 53.- Harper A.E., Metabolic adaptations to adequate and inadequate aminoacid supply . Proceeding of the IX International Congress of Nutrition, Mexico, pages. 1-9 , 1972.
- 54.- Hoffenberg R. Adaptation of plasma protein synthesis and breakdown to undernutrition. Proceeding of the IX International Congress of nutrition, Mexico, pages. 22-31 ,1972 .
- 55.- Hopkirk T.J. and Bloxham D.P. Biosynthesis of rat liver pyruvate kinase . Biochem. J. 192: 507-516 , 1980 .
- 56.- Hunsley J.R., Suelter C.H. Yeast pyruvate kinase II : kinetic properties. J. Biol. Chem. 244: 4819-4822 ,1969 .
- 57.- James T.L. and Cohn M. Structural aspects of manganese-pyruvate kinase substrate and inhibitor complexes deduced from proton magnetic relaxation rates of pyruvate and phosphoenolpyruvate analog. J.Biol.Chem. 249:3519-3526,1974 .
- 58.- Jelliffe D.B. The assessment of the nutritional status of the community. WHO. , Geneva ,pp.10-214 , 1966.
- 59.- Kayne F.J. Pyruvate kinase in " The Enzymes " , edited by Boyer N., Academic Press, 8: 353-387 , 1977 .

- 60.- King R.F., MacFire J., Hill G. Activities of hexokinase, phosphofructokinase, fructose bis-phosphatase and 2-oxoglutarate dehydrogenase in muscle of normal subjects and very ill surgical patients. Clin. Sci. 60: 451-456, 1980.
- 61.- Knull H.R. Compartmentation of glycolytic enzymes in nerve endings as determined by glutaraldehyde fixation. J. Biol. Chem. 255: 6439-6444, 1980.
- 62.- Kopp L.E., Mielch R.P. Nonlinear enzymatic cycling systems: the exponential cycling system I; mathematical models. J. Biol. Chem. 247: 3558-3563, 1972.
- 63.- Lakonek M., Schofer W., Winkler H. Red cell pyruvate kinase deficiency: an optimized assay. Clin. Chim. Acta 108: 31-40, 1980.
- 64.- Lehninger A.L. Bioquímica. Segunda edición, Omega, pp. 59-125, Mexico, 1979.
- 65.- Leroux P. and Marchand J.C. The influence of insulin in glucose permeability and metabolism of human granulocytes. J. Biochem. 58: 367-373, 1975.
- 66.- Leveille G.A. Effect of periodicity of eating and diet composition on enzymatic adaptations. Proceeding of the IX Congress of Nutrition, Mexico, pages. 13-22, 1972.
- 67.- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
- 68.- Ludwig W., Hoidal J.R., Alterations in leukocyte oxidative metabolism in cigarette smokers. Am. Rev. Respir. Dis. 126: 977-980, 1982.
- 69.- Marchand J.C., Leroux J.P., Cartier P. The energy metabolism of human blood polymorphonuclear cells. Eur. J. Biochem. 31: 483-495, 1972.

- 70.- Martin R.J. and Herbein J.H. Effect of a high fat diet on body composition cellularity and enzyme levels during early development of the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 164: 341-346, 1980.
- 71.- Max-audit I., Man J., Rosa R. Pyruvate kinase hyperactivity genetically determine metabolic consequences and molecular characterization. Blood 56: 902-909, 1980.
- 72.- McQuate J.T. and Viter M.F. Equilibrium and kinetic studies of the pyruvic kinase reaction. J. Biol. Chem. 236: 2151-2157, 1959.
- 73.- Meldolesi M.F., Maccha V., Laccetti P. Differences in phosphofructokinase regulation in normal and tumor rat thyroid cells. J. Biol. Chem. 251: 6244-6251, 1976 .
- 74.- Metcoff J., Yoshida Y., Frenk S. Enzyme changes in leukocytes during pregnancy. Proceeding of the IX International Congress of Nutrition, Mexico , vol. II , pp.70-74 , 1972 .
- 75.- Miwa S., Fujii H., Takegawa S. Seven pyruvate kinase variants characterized by the ICSH recommended methods. Brit. J. Haemat. 45: 575-583 , 1980.
- 76.- Morse G.A. and Behrisch H.W. Regulation of enzyme activity in the hibernator ; a kinetic and spectroscopic study of muscle pyruvate kinase from the arctic ground squirrel. Can. J. Biochem. 59: 762-769 , 1981.
- 77.- Nagao Y., Miyasaki K., Matuo Y. Difference in physical and chemical properties between muscle-type and spleen-type of pyruvate kinases. Eur. J. Biochem. 136: 341-346 , 1983.
- 78.- Ohno Y.I., Hirai K., Kanoh T., Uchino H., Ogawa K., Subcellular localization of H<sub>2</sub>O production in human  
2 2

- neutrophils stimulated with particles and an effect of cytochalasin B on the cells. *Blood* 60: 253-260, 1982 .
- 79.- Phillips V.A., Shelton M.J., Hosking C.S. Separation and detection of nitroblue tetrazolium reducing enzymes from human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol. Meth.* 54:175-181 1982.
- 80.- Flaxton W.C. and Storey K.B. Purification and properties of aerobic and anoxic forms of pyruvate kinase from red muscle tissue of the channelled whelk *Busycotypus canaliculatum* . *Eur. J. Biochem.* 143: 257-265 , 1984.
- 81.- Pogell B.M., Tanaka A., Siddons R.C. Natural activators for liver fructose 1,6-diphosphatase and the reversal of adenosine 5'-monophosphate . Inhibition by muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 243: 1356-1367 , 1968 .
- 82.- Porath J., Flodin P. Gel filtration: a method for desalting and group separation . *Nature* 183: 1657-1659 , 1959.
- 83.- Porter D.H. and Cardenas J.M. Single subunits of sepharose-bound pyruvate kinase are inactive. *Biochem.* 20:2532-2537, 1981.
- 84.- Potter V.R., Gebert R.A. Systematic oscillations in metabolic activity in rat liver and in hepatomas. *Cancer. Res.* 26: 1547-1560, 1966 .
- 85.- Purich D.L. Contemporary enzyme kinetics and mechanism , Academic Press, 1983.
- 86.- Ramos-Galván R. Somatometría pediátrica; estudio semilongitudinal en niños de la ciudad de México. *Arch. Invest. Med.* 8:83-185, 1975 .
- 87.- Reynard A.M., Hass L.F., Jacobsen D.P., Boyer P.D. The correlation of reaction kinetics and substrate binding with



- the mechanism of pyruvate kinase. J. Biol. Chem. 236:2277-2283  
1959.
- 88.- Riding G.A., Willadsen P. Simultaneous isolation of bovine eosinophils and neutrophils on gradients of percoll. J. Immunol. Meth. 46: 113-119, 1981.
- 89.- Rongstad R., Katz J. Gluconeogenesis in the kidney cortex J. Biol. Chem. 247: 6047-6054, 1972.
- 90.- Rose B.D., Hems R., Krebs H.A. The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver. Biochem. J. 102: 942-951, 1967.
- 91.- Sass M.D., Caruso C.J., Axelrod R. Evaluation of stored blood viability by methylene blue reduction. Pub. Health Ser. 73: 744-752, 1969.
- 92.- Scott R.B., Still J.S., Cooper L.W. Glycogen in human peripheral blood leukocytes I: Turnover of glycogen. J. Clin. Invest. 47: 344-352, 1968.
- 93.- Scott R.B., Still J.S., Cooper L.W. Glycogen in human peripheral blood leukocytes II: the macromolecular state of leukocyte glycogen. J. Clin. Invest. 47: 353-359, 1968.
- 94.- Segal A.W., Dorling J., Coade S. Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. J. Cell. Biol. 85: 42-59, 1980.
- 95.- Selvaraj R.J., Bhat K.S. Phagocytosis and leukocyte enzymes in protein-calorie malnutrition. Biochem. J. 127: 255-259 1972.
- 96.- Smith S.B., Freedland R.A. Regulation of pyruvate kinase by 6-phosphogluconate in isolated hepatocytes. Am. Physiol. Soc. 81: E279-285, 1981.

- 97.- Snyderman R., Goetzi E.J. Molecular and cellular mechanism of leukocyte chemotaxis. *Science* 213: 830-837, 1981.
- 98.- Spivey H.O., Flory W., Peczon B.D., Chandler J.P., Koeppe R.E. Kinetics of the activation of rat liver pyruvate kinase by fructose 1,6-diphosphate and methods for characterizing hysteretic transitions. *Biochem. J.* 141: 119-125, 1974.
- 99.- Start C., Newsholme E.A. The effects of starvation and aloxan-diabetes on the contents of citrate and other metabolic intermediates in rat liver. *Biochem. J.* 107: 411-415, 1968.
- 100.- Stellwagen E. and Cass R. Predicted distribution of NAD domain among glycolytic enzymes. *Nature* 257: 716-720, 1975.
- 101.- Stephen J.M.L. and Waterlow J.C. Effect of malnutrition on activity of two enzymes concerned with amino acid metabolism in human liver. *Lancet* 19: 118-119, 1968.
- 102.- Stifer F.B., Taunton O.D., Greene H.L., Herman R.H. Rapid reciprocal changes in rat tissue enzyme activities following epinephrine injection. *J. Biol. Chem.* 249: 7240-7244, 1974.
- 103.- Stossel T.P., Murad F., Mason R.J., Vaughan M. Regulation of glycogen metabolism in polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 245: 6228-6234, 1970.
- 104.- Susuki H., Kurita T., Kakinuma K. Effects of neuraminidase on O and H O from phagocytosing human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 60: 446-453, 1982.
- 105.- Tanaka T., Harano Y., Morimura H. Evidence for the presence of two types of pyruvate kinase in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 21: 55-60, 1965.

- 106.- Tauber A.I. , Brettler D.B., Kennington E.A. , Blumbreg P.M. Relation of human neutrophil phorbol ester receptor occupancy and NADPH-oxidase activity . Blood 60: 333-339 1982 .
- 107.- Taunton O.D. , Stifel F.B., Greene H.L. , Herman R.H. Rapid reciprocal changes in rat hepatic glycolytic enzyme and fructose diphosphatase activities following insulin and glucagon injection. J.Biol. Chem. 249: 7228-7239,1974 .
- 108.- Warkus M., Plessner T., Bortaux A. Analysis of progress curves . Rate law of pyruvate kinase type I from Escherichia coli . Biochem . J. 189: 421-433, 1980.
- 109.- Weisdorff D.J. , Craddock P.R. , Jacob H.S. Glycogenolysis versus glucose transport in human granulocytes ; differential activation in phagocytosis and chemotaxis. Blood,60:888-893 1982.
- 110.- Weisdorff D.J. , Jacob H.S. Granulocyte energy supply . Glycogenolysis versus exogenous glucose intake . Mid. Hyper. 43:731, 1982.
- 111.- Vergedal J.E. , Harper A.E. Metabolic adaptations in higher animals. J. Biol. Chem. 239: 1156-1163, 1964.
- 112.- Williams J.N. and Elvehjem C.A. The relation of aminoacid availability in dietary protein to liver enzyme activity . J. Biol. Chem . 176: 559-564, 1950.
- 113.- Williamson, J.R. Mechanism for the stimulation in vivo of hepatic gluconeogenesis by glucagon. Biochem.J.101:11c-14c 1966.
- 114.- Whitaker J.R. , Bernhard R.A. An introduction to enzymology,Whiber Press, 1972.

- 115.- Wu S.W.N., Wong S.S.C., Yeung D.C.Y. Biosynthesis of pyruvate kinase isozymes in rat liver. *Eur.J.Biochem.* 121: 59-63, 1981.
- 116.- Veneziaie C.M., Donotrio J.C. Specific radioimmunoassays for rabbit liver fructose biphosphatase, pyruvate kinase and glicerol-3-phosphate dehydrogenase. *Meth.Enzymology* 74:210-244, 1977 .
- 117.- Yoshida T. , Metcoff J., Frenk S. Reduced pyruvic kinase activity altered growth patterns of ATP in leukocytes in protein calorie malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 21:162-166 1968.
- 118.- Zorrilla E. Nutricion y metabolismo : Nutricion y aterosclerosis. *Esfera Medica Merck* , 18:1-8, 198 .
- 120.- Leitzman C. Metabolic and enzyme activities of neutrophils in malnutrition . *Nutr. Rev.* 39: 230-232 , 1977 .
- 121.- Hunsley J.R., Suelter C.H. Yeast pyruvate kinase I: purification and some chemical properties. *J.Biol.Chem.* 244: 4815-4827, 1969.
- 122.- Waygood E. B., Sanwal B.D.. The control of pyruvate kinases of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 249: 265-269, 1974 .
- 123.- Flynn I.W., Bowman I.B.R. Purification and characterization of pyruvate kinase from Trypanosoma brucei. *Arch. Biochem. B* 200 : 401-405, 1980 .
- 124.- Dimitriades M.G.K., Beis I.D. Purification , catalytic and regulatory properties of Rana Ridibunda erythrocyte pyruvate kinase. *Comp. Biochem. Physiol.* 79: 245-249, 1984 .
- 125.- Bernal A., Perez O.H., Rosado A., Velazquez A., Reyes R. Cambios en el contenido de aminoacidos libres de eritrocitos y leucocitos durante el embarazo . *Arch. Invest. Med.* 11 : 107-111 . 1980 , México .

- 126.- Tood-Sanford . Diagnostico clínico por el laboratorio.1977  
5a. ed. , Salvat .
- 127.- Guyton , A.C. Tratado de fisiología médica .1971  
4a. ed. , Interamericana .
- 128.- Bellanti, J.A. Inmunología, 1981  
2a. ed. , Interamericana .
- 129.- Stewart , S. . Immunology , Immunopatology and Immunity. 1980,  
3a. ed. , Harper Row Pub.
- 130.- Hood , Weisman and Wood. Immunology . 1979,  
The Benjamin Cummins Pub.
- 131.- Fudenberg and Stites. Basic and Clinical Immunology, 1980,  
2a. ed.
- 132.- Gómez E.A., Ramos D.M.E. , Vazquez E.C. Actividad fagocítica  
de los leucocitos PMN humanos a diferentes temperaturas.  
Arch. Invest. Med. 11: 65-72,1980.
- 133.- Martínez C.S., Coello P., Alvarez M.T., Diaz B.J., Alarid S.  
Función fagocítica en pacientes desnutridos con aporte de  
cinc . Arch. Invest. Med. 11 : 227-234 , 1980 .
- 134.- Chandra , R.K. Inmunología de los trastornos nutricionales.  
El manual Moderno , 1980 .