



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO COMPARATIVO EN LA INCORPORACION DE LA ADENOSINA A ERITROCITOS DE INDIVIDUOS NORMALES Y PACIENTES ESQUIZOFRENICOS.



T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

María Cristina Regina Fernández Mejía



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

TESIS 1978
M.T. ~~158~~ 148
ECHA _____
RBO _____
S _____



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO COMPARATIVO EN LA INCORPORACION DE LA ADENOSINA A
ERITROCITOS DE INDIVIDUOS NORMALES Y PACIENTES ESQUIZOFRENICOS.

Sustentante:

MARIA CRISTINA REGINA FERNANDEZ MEJIA

Carrera:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1978.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE

PRESIDENTE	PROFA. VICTORIA VALLES SANCHEZ.
VOCAL	PROFA. PAULINA CASTRO ARDON.
SECRETARIO	PROF. ENRIQUE PIÑA GARZA.
1er. SUPLENTE	PROF. EZEQUIEL MURILLO GARCIA.
2º. SUPLENTE	PROFA. CLEMENTINA BELAUNZARAN.

Sitio donde se desarrollo el tema:
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA. FACULTAD DE MEDICINA. UNAM.

Sustentante:

MARIA CRISTINA REGINA FERNANDEZ MEJIA.

Asesor del tema:

DR. ENRIQUE PIÑA GARZA.



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Enrique Piña Garza', written over a horizontal line.

Supervisor técnico.

M. en C. LEONOR FERNANDEZ RIVERA RIO.



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Leonor Fernandez Rivera Rio', written over a horizontal line.

Con todo mi cariño A MIS PAPAS.

A MI HERMANO.

A MIS ABUELOS: ALFONSO

JOSE MANUEL.

MARIA

MARIANA.

A MI TIA LUPITA.

A TOMAS, CECILIA Y EVA.

Con gran afecto al Dr. ENRIQUE PIÑA
GARZA, a quien agradezco profundamen
te sus consejos y la confianza depo
sitada en mi al permitirme desarro
llar mis intereses profesionales.

Con gratitud y afecto a ---
LEONOR FERNANDEZ, quien con
singular paciencia alentó y
guió este trabajo.

A todas las personas que con
su presencia cordial y afec-
tuosa trajeron bienestar, en-
tusiasmo y fé a mi espiritu .

Al profesor VICENTE LAURIA F.
quien encausó decisivamente mi
interés por la ciencia, y me
brindó un ejemplo humano exep-
cional.

INDICE

	Página
Introducción	1
Generalidades: Algunos aspectos sobre la esquizofrenia	4
Generalidades del transporte en membrana	17
Generalidades del metabolismo de la adenosina ...	31
Antecedentes	39
Hipótesis de trabajo	44
Objetivo	44
Descripción general del trabajo experimental	45
Materiales	46
Descripción general de la técnica	48
Resultados	50
Conclusiones	60
Discusión	65
Bibliografía	68

I N T R O D U C C I O N . -

La esquizofrenia ha sido estudiada y descrita a - - través de la historia con diferentes puntos de vista que van desde el aspecto mágico, pasando por el religioso, el filosófico y aún el artístico, hasta el aspecto puramente científico.

En las últimas décadas ha habido un avance científico notable en el estudio de la esquizofrenia; por un lado - la escuela biológica señala una serie de factores genéticos y bioquímicos como causantes de la enfermedad, por el otro lado se encuentra la escuela psicológica que señala como factores desencadenantes las interacciones familiares y socioculturales.

El hombre en su deseo por descubrir la naturaleza - se ha visto forzado a seccionarla en diversos elementos y estos elementos a su vez orientarlos hacia diferentes caminos. Las definiciones, conceptos y teorías científicas creadas son solo una herramienta para guiar sus observaciones e interpretaciones de la naturaleza.

La psicopatología es tal vez la rama del conocimiento humano donde, a pesar de las diferentes orientaciones bio-

lógicas, psicológicas y socioculturales que han influido en - su desarrollo, se puede observar que de alguna manera existe conexión entre las denominadas ciencias sociales y las ciencias exactas. Es conocido el hecho de que ciertas sustancias modifican la conducta humana y que estas modificaciones son - dirigidas por el sujeto dependiendo de su estado anímico y -- experiencias previas, y que, como señala Baudelaire ninguna - droga psicotrópica es capaz de crear lo que el hombre no posee en su interior.

Todas las aportaciones efectuadas en el campo de la psicopatología, independientemente de la escuela de que provengan, resultan de gran utilidad para esta ciencia, puesto - que llegará algún día en que de alguna manera se logren ensamblar las piezas de este complejo rompecabezas, así como llegó el día en que la química y la biología encontraron sus puntos de unión.

Este trabajo es una aportación, desde el punto de - vista bioquímico y específicamente en el metabolismo de bases púricas a la interesante ciencia de la psicopatología, en una de las enfermedades que tiene mayor importancia, debido a su incidencia, en la salud mundial..

La originalidad de este trabajo radica en que nunca antes en el estudio de la esquizofrenia, se había considerado

al transporte de las bases púricas o sus derivados como un probable factor involucrado en el padecimiento.

Finalmente los datos obtenidos han sido útiles tanto para circunscribir el área de estudio de este padecimiento como para abrir nuevas rutas y aclarar la información contradictoria existente en la literatura con respecto a la incorporación de la adenosina en los eritrocitos humanos. Y a pesar del trabajo que ello representó, forma parte muy importante del fin que persigue una tesis profesional: adquirir un pensamiento crítico capaz de evaluar y seleccionar la información obtenida.

Ma. Cristina Fernández Mejía.

GENERALIDADES.

ALGUNOS ASPECTOS SOBRE LA ESQUIZOFRENIA.

I.- Esquizofrenia.

No está claro aún si la esquizofrenia es solo un desorden de tipo mental o un grupo de desórdenes clasificados bajo un mismo nombre; por un lado existe una tendencia en considerarla como un síndrome clínico con múltiples etiologías, por el otro es concebida como una predisposición genética que toma diferente cariz dependiendo de los estímulos que haya recibido el individuo; por ejemplo, la severidad, frecuencia o tipo de situaciones que haya experimentado el individuo, puede determinar la sintomatología del padecimiento.

I.1.- Descripción clínica.

Los síntomas clínicos de la esquizofrenia son principalmente:

Pérdida de la secuencia lógica de las ideas, conducta bizarra o confusa, en casos extremos el lenguaje se vuelve incomprensible con un acúmulo de palabras y oraciones sin sentido. Disturbios en sus relaciones afectivas, ambivalencia de sentimientos frente a la misma persona o situación, desvaríos, pérdida del contacto con el exterior, conducta --

estereotipada, por ejemplo repetición de la misma conversación o el mantenimiento de la misma postura, generalmente -- incómoda o antinatural. Alucinaciones y delirios que se refieren principalmente a voces ó comunicaciones extraterrestres.

I.2.- Debido a que la etiología de la esquizofrenia es desconocida, la clasificación de ella en la actualidad es simplemente descriptiva, dependiendo de los síntomas o conducta predominante.

- 1).- Tipo paranóica; se encuentra caracterizada por delirio de persecución o de grandeza, acompañada por alucinaciones terroríficas. Su conducta es generalmente hostil, suspicaz o agresiva.
- 2).- Tipo catatónico; la conducta del paciente tiene oscilaciones marcadas entre la hiperactividad y la total pasividad, llegando hasta la catalepsia.
- 3).- Tipo hebefrénico; predominan las respuestas emocionales inapropiadas, la conducta se torna infantil llegando a incluir balbuceos.
- 4).- Tipo simple; es el tipo de esquizofrenia menos severa.

Los pacientes a pesar de su idiosincrasia extraña y problemas de relación interpersonal, no presentan deterioraciones mentales graves; las alucinaciones y delirios solo llegan presentarse en los estados de stress.

I.3.- Historia Natural de la Enfermedad.

La enfermedad aparece generalmente en los adolescentes o en adultos jóvenes, por lo que se el asignó durante -- muchos años el nombre de demencia precoz. Generalmente se -- inicia con una manifestación aguda, posteriormente a la manifestación inicial algunos pacientes muestran una progresiva deterioración de su funcionamiento mental, mientras otros -- solo presentan ataques sicóticos eventuales, generalmente -- después de semanas o meses, en algunos casos la recuperación después de la manifestación aguda inicial parece ser permanente.

I.4.- Hallazgos Bioquímicos:

Se han encontrado una serie de sucesos de tipo bioquímico en la esquizofrenia, que apoyan a la escuela biológica, quien señala a los factores orgánicos como causantes de la enfermedad.

I.4.1.- Factores Genéticos:

Existe un buen número de estudios genéticos que indican la incidencia significativa de descendientes de padres esquizofrénicos con conducta esquizoide o esquizofrénica.

El estudio genético de la esquizofrenia, como de -- cualquiera de las enfermedades mentales presenta el problema de la existencia de factores familiares y psicosociales que influyen en los resultados; es difícil diferenciar entre la existencia de factores genéticos comunes y/o la influencia -- del medio familiar. Heston (1) efectúa una serie de estudios, en los cuales separa a los hijos de esquizofrénicos del ambiente familiar mórbido, dándolos en adopción a -- familias consideradas normales, dentro de los patrones sociales de conducta; los resultados obtenidos indican que los -- descendientes de estos pacientes se ven afectados por conductas de tipo esquizoide o esquizofrénica, con mucho mayor frecuencia que los niños adoptados sin antecedentes esquizofrénicos familiares.

I.4.2.- Factores Bioquímicos:

La investigación bioquímica de este padecimiento se basa fundamentalmente en diferencias cuantitativas o cualitativas de las sustancias presentes en la sangre ó orina de -- estos pacientes. No obstante este tipo de estudios se enfrenta a un conjunto de problemas que interfieren con los resul-

tados como son las drogas administradas para el tratamiento, la fase de la enfermedad, el tiempo de hospitalización del paciente y la dieta.

I.4.2.1.- Catecolaminas.-

Una serie de hechos bioquímicos que de alguna manera se encuentran relacionados con la esquizofrenia, han sido encontrados en el metabolismo de las catecolaminas, estas -- sustancias son producidas en el organismo y algunas de ellas como la nor-adrenalina y la dopamina juegan un papel muy importante en la transmisión de los impulsos nerviosos del sistema simpático.

Entre los eventos relacionados se encuentran los siguientes:

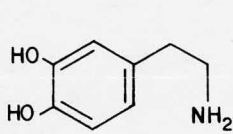
a).- La mezcalina, droga alucinógena, presente en el peyote (Lophophora williamsi), posee una estructura química muy parecida a las catecolaminas (Ver fig. # 1) y produce estados de conducta semejantes a los presentes en la esquizofrenia.

b).- La administración crónica de altas dosis de anfetamina, droga que actúa en el sistema simpático compitiendo por los receptores de la nor-adrenalina y estimulando su producción, genera un cuadro clínico muy semejante a los de la esquizofrenia-paranóica.

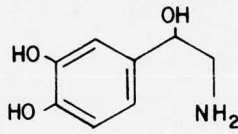
c).- Las drogas usadas en el tratamiento de la esquizofrenia son los principales antídotos de la psicosis --

FIGURA 1

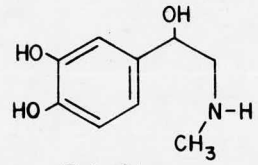
I.- Catecolaminas endógenas:



Dopamina

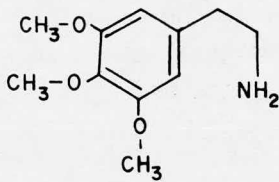


Nor - epinefrina.

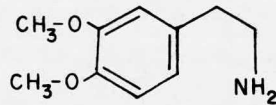


Epinefrina

II.- Catecolaminas alucinógenas:



Mescalina



3,4 Dimetoxifenilalanina

producida por anfetamina.

d).- Existe un daño del sistema nor-adrenérgico producido por la 6-hidroxidopamina (6HD) la cual destruye a las neuronas catecolaminérgicas en el cerebro, reduce la estimulación intracraneana e induce cambios conductuales emparentados con los procesos observados en la esquizofrenia. Stein y Wise (2) basados en el hecho anterior postulan una teoría para explicar la esquizofrenia, que consiste en una deficiencia metabólica que cause una acumulación de 6HD en neuronas nor-adrenérgicas y produzcan un daño cerebral expresado con los síntomas de una esquizofrenia. Su teoría se encuentra apoyada en que la cloropromazina, fármaco usado en el tratamiento de la enfermedad, protege a los animales de experimentación del efecto de la 6HD.

e).- Existe una gran cantidad de trabajos que reportan la presencia de una sustancia que aparece en la orina de los pacientes con esquizofrenia y ha sido identificada como 3,4-dimetoxifenil-alanina, un compuesto de estructura muy parecida a las catecolaminas. Estudios tendientes a demostrar cambios de conducta, tanto en animales como en humanos, al administrar esta sustancia, solo han podido dar informaciones contradictorias al respecto.

I.4.2.2.- Serotonina y sus derivados.

La serotonina es un derivado indólico, que efectúa funciones de neurotransmisor. Existen en la naturaleza una

serie de derivados indólicos que poseen actividades alucinógenas como lo son la dietilamina del ácido lisérgico (LSD), la psilocibina (principio activo de los hongos alucinógenos) la dimetiltreptamina, la bufotenina y otros (Ver figura #2).

Muchos autores (3), han encontrado bufotenina - o derivados de esta sustancia en la orina de pacientes esquizofrénicos, no así en individuos normales.

Algunos esquizofrénicos tienen aberraciones - - electrofisiológicas durante el sueño, las cuales pueden ser reproducidas en animales y en humanos, con la administración de p-clorofenilamina, un inhibidor de la síntesis de la serotonina, por otro lado hay evidencias que sugieren que las -- sustancias alucinógenas pueden ejercer su efecto al reducir la actividad de las neuronas serotoninérgicas del cerebro.(5)

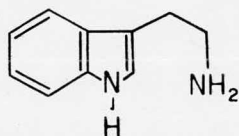
I.4.2.3.- Metilación.

Es interesante observar que la diferencia entre -- los neurotransmisores y los alucinógenos se encuentra principalmente en grupos metilos presentes en estos últimos compuestos. En base a este hecho se ha propuesto la denominada "Hipótesis de la transmetilación", para explicar la esquizofrenia, la esquematización de esta hipótesis se encuentra en la figura # 3.

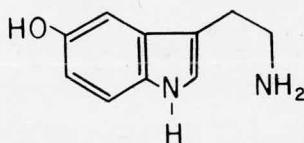
Los experimentos efectuados para probar esta hipó- -

FIGURA 2

I.- Indoles endógenos

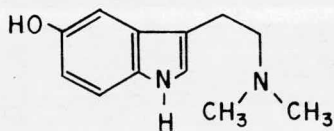


Triptamina

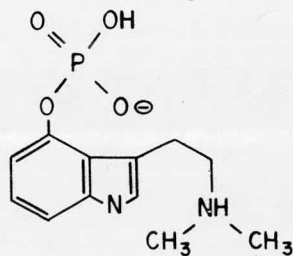


Serotina

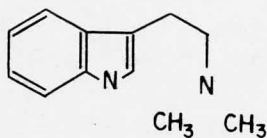
II.- Indoles alucinógenos:



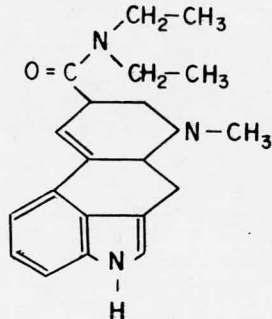
Bufotemina



Psilocibina



N,N Dimetilriptamina



LSD

tesis han brindado los siguientes resultados:

a).- Existen enzimas orto-metilantes de catecolaminas y de indoles, localizadas en el cerebro.

b).- La administración de las sustancias precursoras no incrementan la sintomatología de la esquizofrenia.

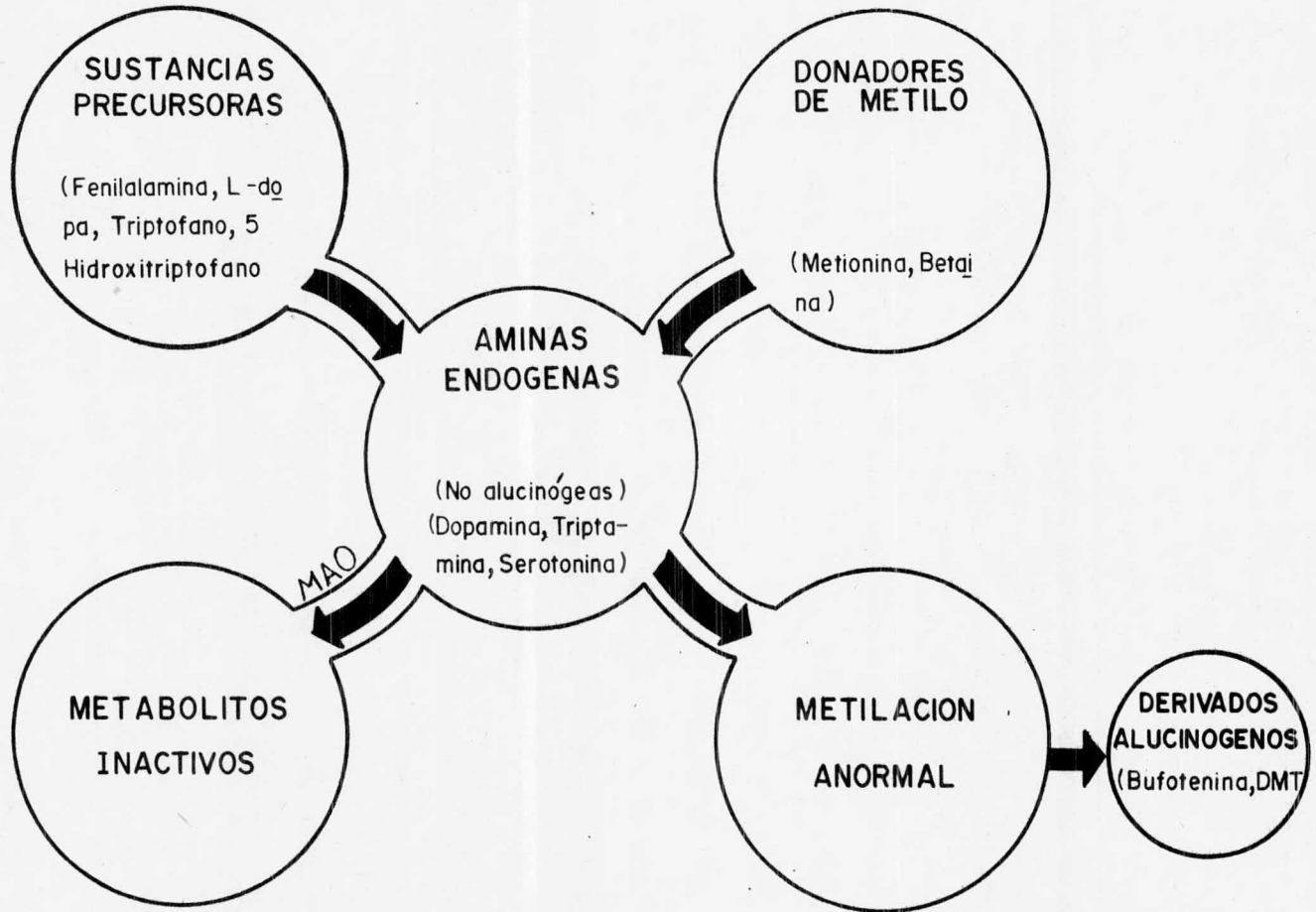
c).- La administración de agentes metiladores con inhibidores de la mono-amino-oxidasa (MAO), enzima que cataliza la oxidación de los neurotransmisores y por ende su transformación a metabolitos sin actividad en la transmisión de impulsos nerviosos, incrementan los síntomas de los pacientes esquizofrénicos. Este mismo tratamiento parece no provocar efectos en individuos normales.

d).- La administración de aceptores de grupos metilos como el ácido nicotínico y el nicotin-adenin-denucleótido (NAD) producen mejoría en los pacientes. Sin embargo no existe reversión o mejoría al administrar NAD, cuando los pacientes han sido previamente tratados con donadores de metilo e inhibidores de la MAO.

e).- Wyatt (3) identificó un defecto en la actividad de la MAO presente en plaquetas de gemelos monocigotos con esquizofrenia crónica.

f).- Existen reportados casos de pacientes con homocistenuria, enfermedad producida por un defecto enzimático en el metabolismo de metionina, que presentan padecimiento de tipo psiquiátrico (4).

FIGURA 3



I.4.2.4.- Proteínas sanguíneas.

Existen estudios bioquímicos de la esquizofrenia - basados en la presencia anormal de proteínas en la sangre.

Se ha encontrado que inyecciones de plasma de esquizofrénicos a animales de experimentación, provocan modificaciones a su conducta de apredizaje. Inyecciones de suero - de pacientes catatónicos a perros alteran el apredizaje de - estos (4); la cloropromazina, sustancia generalmente usada en el tratamiento de los esquizofrénicos, protege del efecto del suero.

Reportes que datan desde 1954 (3) indican la presencia de una proteína presente en el suero de algunos esquizofrénicos, denominada taraxeína, que cuando es inyectada a humanos sanos, les produce síntomas de tipo esquizofrénico.

Heath (3) encontró que la antiglobulina marcada con fluoresceína se una a rebanadas de cerebro de esquizofrénico, no observándose este efecto en rebanadas de cerebro de individuos sanos. Por lo que ha sido postulada una teoría -- proponiendo la producción de auto-anticuerpos en contra del tejido cerebral de los esquizofrénicos.

El suero de los pacientes con esquizofrenia pueden contener un factor, denominado factor de Frohman, que altera el metabolismo anaerobio de los eritrocitos de pollo, aumenta la relación lactato/piruvato y aumenta el recambio - - -

de ATP (3, 6) . Este factor parece ser idéntico al descrito por los investigadores rusos Krasnora y Lozovsky como una -- L-2-globulina, de carácter lipoprotéico que altera muchas - membranas celulares y que puede estar asociada a ciertas - - anomalías inmunológicas.

II.- GENERALIDADES DEL TRANSPORTE EN MEMBRANAS.-

II.- Transporte:

Para que la célula viva se requiere de un recambio selectivo de sustancias con el exterior, este recambio está limitado por la presencia de la membrana celular y depende de ciertas variables como son la concentración y la naturaleza fisicoquímica de las sustancias.

II.1.- Clasificación termodinámica de los sistemas de transporte.

Termodinámicamente los sistemas de transporte pueden dividirse en transporte activo y transporte pasivo.

Se le da el nombre de transporte pasivo al fenómeno por el cual una sustancia difunde a través de una membrana desde una zona de alta concentración hacia una zona de baja concentración hasta alcanzar un equilibrio en donde las concentraciones a ambos lados de la membrana son iguales.-- Este proceso es termodinámicamente espontáneo.

El transporte activo es aquel que se efectúa en --

contra de un gradiente de concentración, es decir, que las moléculas de la sustancia que se encuentra en una zona de baja concentración difunde a través de la membrana hacia la zona de alta concentración. El proceso es "no espontáneo" y requiere por lo tanto de energía.

Termodinámicamente los sistemas de transporte se comportan de acuerdo a la fórmula:

$$AG = RT \ln \frac{C_2}{C_1}$$

Cuando el cambio de energía libre (AG) tiene valores negativos el proceso se efectúa espontáneamente por lo que el transporte será de tipo pasivo. Cuando el AG tiene valores positivos para que el proceso se lleve a cabo se requiere de la administración de energía, y el transporte es de tipo activo.

II.2.- Tipos de transporte a través de las membranas biológicas.

II.2.1.- Difusión simple.

La difusión simple es un sistema de transporte que se comporta de acuerdo a las leyes de difusión de los solutos y se caracteriza porque:

a).- La velocidad del proceso depende de manera directamente proporcional de la concentración y de las características fisicoquímicas, como son peso y carga eléctrica -

de la sustancia transportada.

b).- La sustancia transportada permanece en la misma forma molecular durante todo el proceso.

c).- La velocidad del transporte aumenta 1.4 veces cuando se incrementa 10°C la temperatura.

II.2.2.- Transporte facilitado. Ó mediado

El transporte facilitado es un sistema de transporte que trabaja a la presencia en las membranas de proteínas acarreadoras, las cuales ha sido posible aislar, purificar y caracterizar, comprobándose así su existencia y su función.- (18). Se ha propuesto que estas proteínas acarreadoras -- son sintetizadas en los ribosomas unidos a membranas (17). El transporte facilitado se comporta de acuerdo a las leyes la cinética enzimática y cumple con las siguientes condiciones:

a).- El sistema de acarreo es específico para la - sustancia transportada.

b).- Existe una saturación del sistema de transporte, alcanzándose una velocidad máxima.

c).- Se presenta el fenómeno de inhibición.

El transporte mediado puede subdividirse en dos -- tipos: transporte mediado activo y transporte mediado pasivo;

El criterio, para distinguir entre los dos se basa en la dependencia del sistema por alguna forma de energía. Ejemplos del primero lo tenemos en la bomba de sodio-potasio y en el transporte de glucosa en bacterias; con respecto al transporte mediado pasivo tenemos como ejemplo el transporte de monosacáridos en los glóbulos rojos.

II.3.- Modelos de transporte facilitado.

En base a evidencias experimentales han sido postulados una serie de modelos para explicar el transporte facilitado de las sustancias a través de las membranas. Estos modelos pueden explicarse tanto para los procesos activos -- como los pasivos, siendo necesario en este último caso únicamente ajustar un sistema adicional que sea capaz de proporcionar energía.

II.3.1a.- Transporte facilitado simple.

Estos modelos proponen que la sustancia transportada se combina específicamente con el transportador en la parte externa de la membrana, formando un complejo el cual difunde hacia la superficie interna de la membrana donde el complejo se separa, de esta manera la sustancia transportada penetra a la célula y el transportador regresa a la superfi-

cie externa, para unirse de nuevo a otra molécula de sustrato. Widdas (16) modifica este modelo proponiendo que cuando el transportador se encuentra en la superficie interna de la membrana, es capaz de unirse a las moléculas de sustrato presentes en el interior de las células y transportarlas al exterior (ver figura # 4). Lo que determina el sentido del transporte es la concentración de sustrato en ambos lados -- de la membrana, ó bien, en el transporte activo la liberación de energía.

II.3.1b.- Contratransporte.

Este sistema es una modificación del sistema anterior basado en diferencias en el comportamiento cinético.- La modificación fué propuesta por Park en base a que el acarreador de monosacáridos en las membranas de los glóbulos rojos es capaz de acarrear más de una especie de azúcar. - Este modelo se puede considerar más apegado a la realidad ya que los transportadores reconocen generalmente a más de un sustrato (ver figura # 4).

Existen evidencias experimentales de que el acarreador puede tener diferentes propiedades estereoisómeras en -- cada lado de la membrana (17); el fenómeno fué demostrado en el sistema transportador de monosacáridos de los eritrocitos.

II.3.2.- Translocación.

Se caracteriza porque la sustancia transportada es modificada químicamente en el interior celular. Este sistema funciona en el transporte de la glucosa en bacterias, en donde el sistema transportador de glucosa se encuentra asociado a la fosforilación para formar glucosa-6-fosfato en el interior celular. El mismo sistema es usado en el denominado ciclo del γ -glutamil para el transporte de aminoácidos.

II.3.3.- Difusión de intercambio.

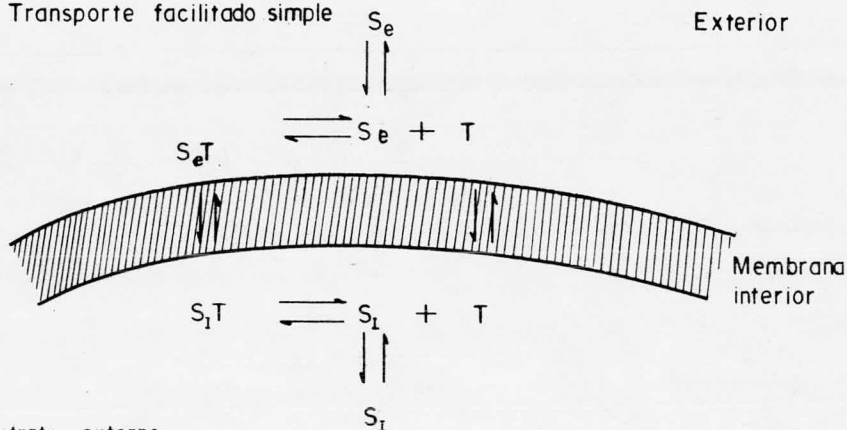
Consiste en el paso de una molécula de sustrato -- hacia el interior de la célula acoplada abligatoriamente al paso de otra molécula al exterior celular; la condición para que este sistema funcione es la equivalencia de cargas eléctricas de las sustancias transportadas. El ejemplo clásico, lo tenemos en el transporte de ADP^{3-} al interior de la mitocondria acoplado a la salida de ATP^{4-} ; para que exista equivalencia de cargas es necesaria la entrada de fosfato (HPO_4^{2-}) y algún catión monovalente.

II.4.- Acarreo acoplado al transporte de electrones.

Se refiere a un tipo de transporte activo descrito recientemente en bacterias, donde el sistema de transporte de electrones localizado en membranas se encuentra ligado al acarreo de metabolitos como azúcares y aminoácidos; aunque -

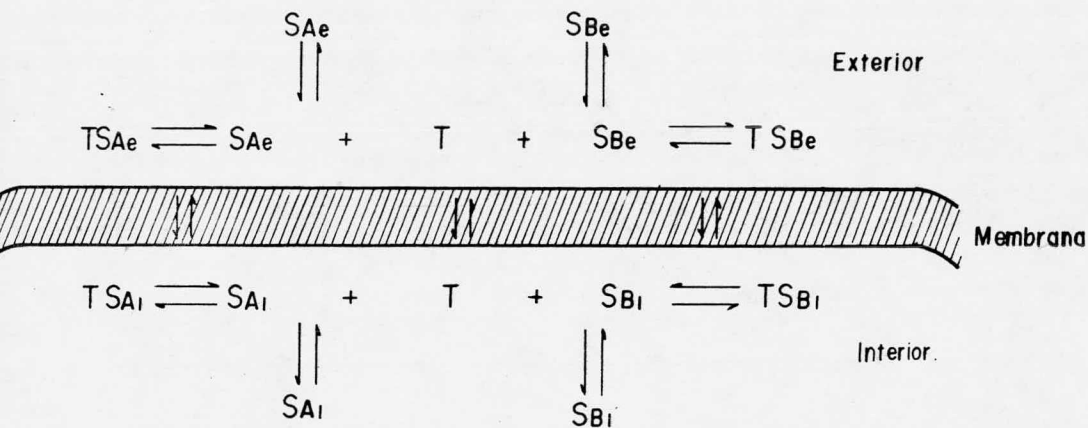
FIGURA 4

I.- Transporte facilitado simple



S_e = Sustrato externo
 S_i = Sustrato interno
 T = Transportador.

II.- Contratransporte



$S A_e$ = Sustrato A externo
 $S B_e$ = Sustrato B externo
 $S A_i$ = Sustrato A interno
 $S B_i$ = Sustrato B interno

existen diversas hipótesis para explicar el mecanismo, la -- más aceptada es la hipótesis quimiosmótica denominada gradiente motriz de protones, que propone que la cadena de transporte de electrones localizada en membrana bombea los protones, provenientes de un compuesto reducido, hacia el exterior de la membrana creando así un gradiente de pH que produce el movimiento de sustancias al interior.

II-5.- Cinética del transporte facilitado:

Como se señaló en la sección II-2.2, el transporte facilitado se comporta de acuerdo a la ecuación de la cinética enzimática de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

V=velocidad

[S]= concentración de sustrato.

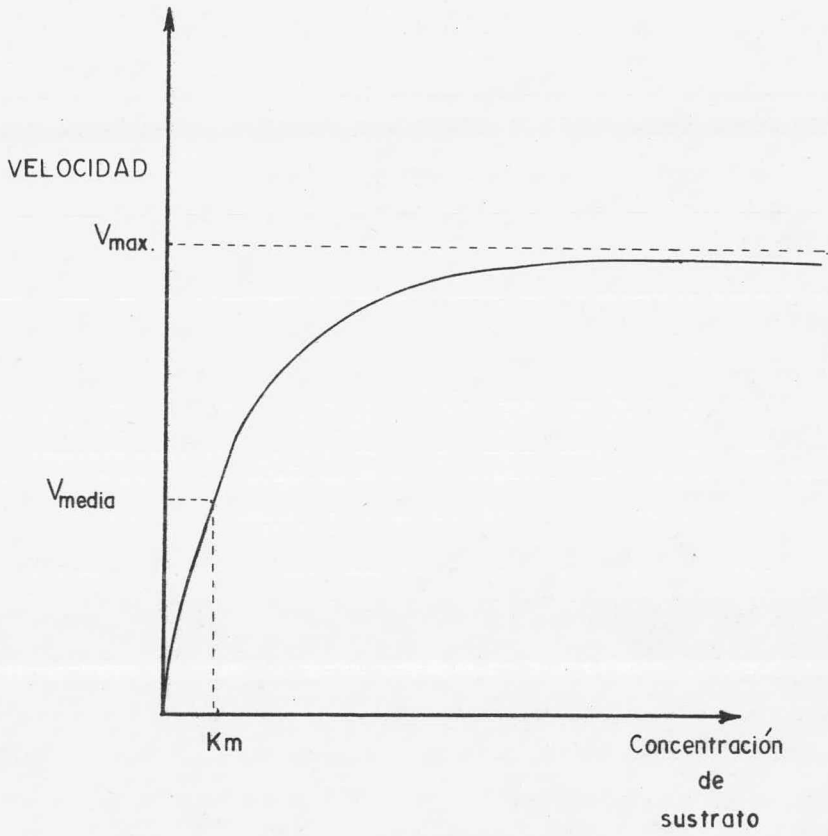
K_m= constante de Michaelis-Menten.

A continuación se amplían algunos conceptos señalados anteriormente.

II-5.1.- Fenómeno de saturación:

A bajas concentraciones de sustancia transportada, la velocidad de entrada de esta es proporcional a su concentración.-- Sin embargo, a medida que se aumenta la concentración de sustrato, la velocidad de reacción llega a un máximo y se vuelve independiente de la concentración de sustrato, cuando este fenómeno sucede se dice que se ha alcanzado la velocidad máxima del sistema transportador y que los sitios activos de este se han saturado.

FIGURA 5



Graficando el fenómeno se obtiene una curva hiperbólica (ver figura 5), en donde la parte asintótica nos representa la -- velocidad máxima del sistema.

II-5.2.- Afinidad del transportador por su sustrato

El sistema transportador reconoce específicamente a su ó sus sustratos, mostrando mayor o menor afinidad por ellos, esta - afinidad se encuentra representada por la constante de - - - Michaelis-Menten (Km.).

II-5.3.- Transformaciones de la ecuación de Michaelis-Menten.

Para facilitar la interpretación de los datos experimentales existen una serie de modificaciones algebraicas de la ecua- - ción de Michaelis-Menten. La más conocida de ellas es la pro- puesta por Lineweaver-Burk, donde se forman los recíprocos de ambos miembros de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$i) \quad v = \frac{V_{m\acute{a}x.} (S)}{K_m. + (S)} \quad (1)$$

ii) Sacando recíprocos:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m. + (S)}{V_{m\acute{a}x.} (S)} \quad (2)$$

iii) Rearreglando términos:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x.}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x.}} \quad (3)$$

De esta manera obtenemos la ecuación de una línea recta $y=mx + b$.

Graficando $\frac{1}{v}$ vs. $\frac{1}{S}$ obtenemos:

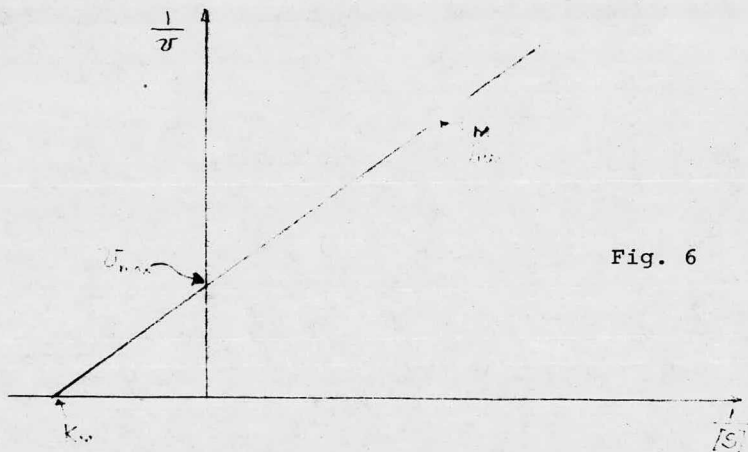


Fig. 6

Se obtiene también otra transformación útil de la ecuación de Michaelis-Menten multiplicando la ecuación (3) por $V_{m\acute{a}x.}$ en ambos lados de la ecuación:

$$i) \frac{V_{m\acute{a}x.}}{v} = K_M \cdot \frac{1}{S} + 1 \quad (4)$$

ii) reordenando términos obtenemos una recta -- con la ecuación:

$$v = - K_M \cdot \frac{v}{S} + V_{m\acute{a}x.} \quad (5)$$

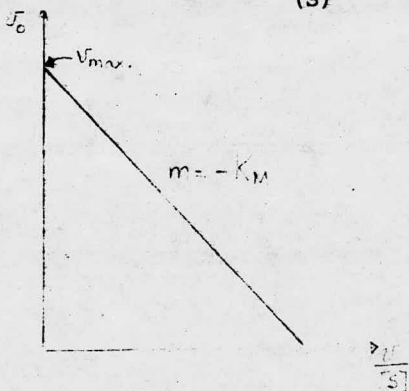


Fig. 7

Graficando v contra $\frac{v}{(S)}$, se obtiene la representación de - Eadie-Hofstee. (Fig. 7)

II-5.4.- Fenómeno de Inhibición.

Las inhibiciones del transporte facilitado pueden clasificarse en dos grandes grupos: reversibles e irreversibles:

II-5.4.1. Inhibiciones irreversibles.

Son aquellas en las cuales la sustancia inhibidora se une -- permanentemente al acarreador modificando los grupos funcionales requeridos para llevar a cabo el transporte, y por lo -- tanto transformando al acarreador en una molécula inactiva.

II-5.4.2. Inhibiciones reversibles.

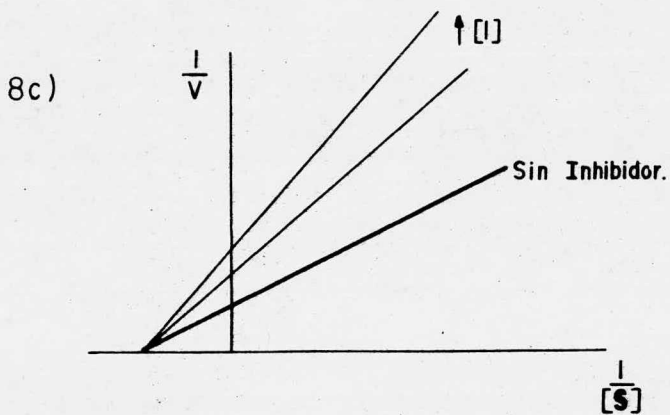
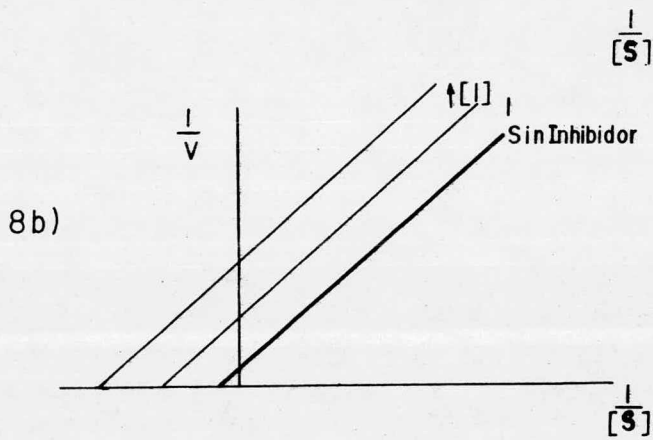
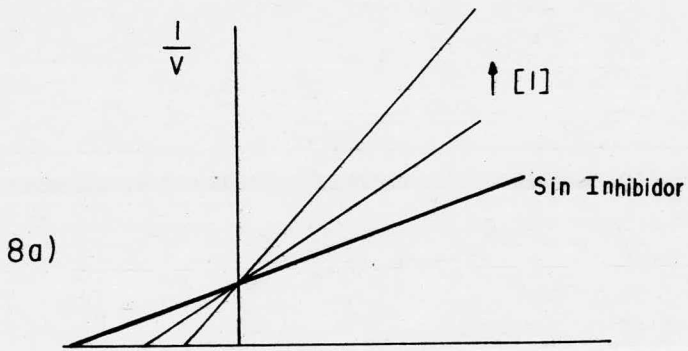
Se caracterizan porque el inhibidor se combina reversible y lábilmemente con el transportador, o con el complejo transportador-sustrato.

Existen tres grandes grupos de inhibiciones reversibles; - - competitivas, un-competitivo (descompetitivo) y no-competitivo, las cuales pueden ser distinguidas experimentalmente al analizar la cinética de la reacción (ver figura 8).

II-5.4.2.1.- Inhibición competitiva.

La reacción se caracteriza porque el inhibidor se combina -- reversiblemente con el transportador libre compitiendo con -- el sustrato. Dos características importantes de la inhibición

FIGURA 8



competitiva pueden observarse en la figura 8a :

- a).- El aparente aumento de la K_m del transportador.
- b).- El inhibidor no afecta la velocidad máxima.
- c).- La inhibición disminuye cuando se aumenta la concentración de sustrato.

II-5.4.2.2. Inhibición uncompetitiva (descompetitiva):

El inhibidor se combina con el complejo transportador-sustrato. Como se puede observar en la figura 8b, se modifica tanto la K_m como la $V_{m\acute{a}x}$. Un hecho característico de esta inhibición es que el grado de inhibición puede incrementarse -- cuando se aumenta la concentración de sustrato.

II-5.4.2.3. Inhibición no competitiva:

El inhibidor no competitivo se une al transportador en el sitio activo deformándolo, o bien al complejo transportador-sustrato, impidiendo la transportación de la sustancia. Cinéticamente se caracteriza por una disminución de la velocidad máxima, sin modificación de la K_m . (fig. 8c).

III.- GENERALIDADES DEL METABOLISMO DE LA ADENOSINA.

III.- Adenosina.

La adenosina es un nucleósido púrico constituido por la adenina y la ribosa. La unión entre ambos compuestos es de tipo β 1'-9 glucosídica. En la figura 9 se observa la fórmula de esta sustancia.

III-1.- Metabolismo:

El metabolismo de la adenosina en el hepatocito humano se encuentra esquematizado en la figura 10.

III-1.1.- Vías de formación.

La adenosina puede formarse a partir de la desfosforilación de los nucleótidos, de la adenosil-metionina, de la adenina y de la síntesis de novo de los derivados púricos.

III-1.1.1.- Formación a partir de la desfosforilación de los nucleótidos.

Estas reacciones se encuentran catalizadas por las fosfatasas, que existen en las células en diversas formas: a) la fosfomonoesterasa, localizada en la superficie

FIGURA 9

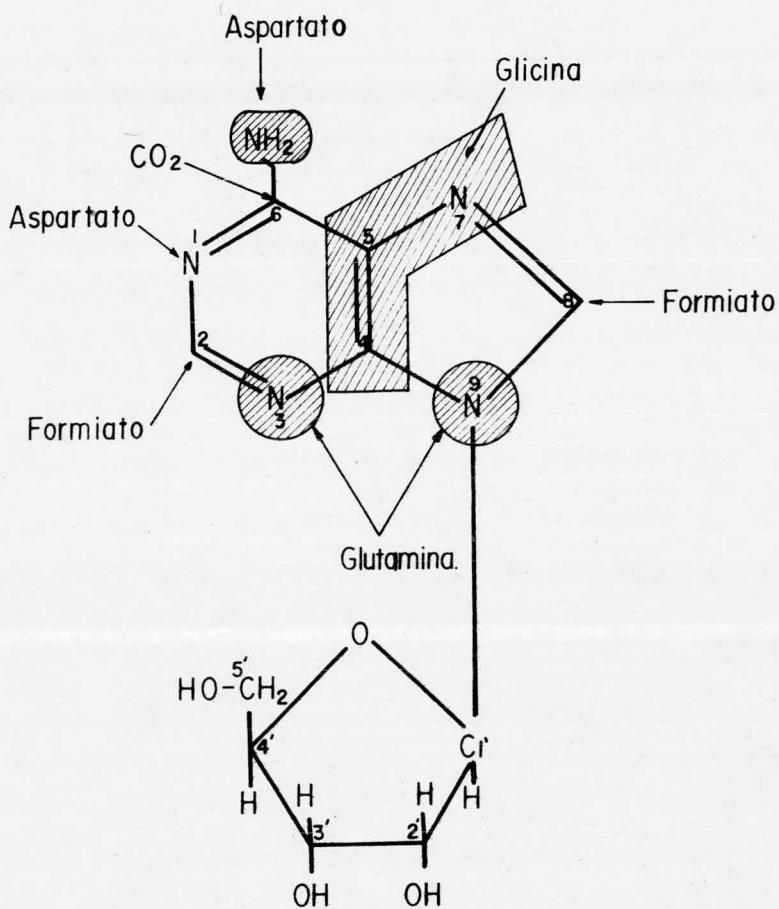
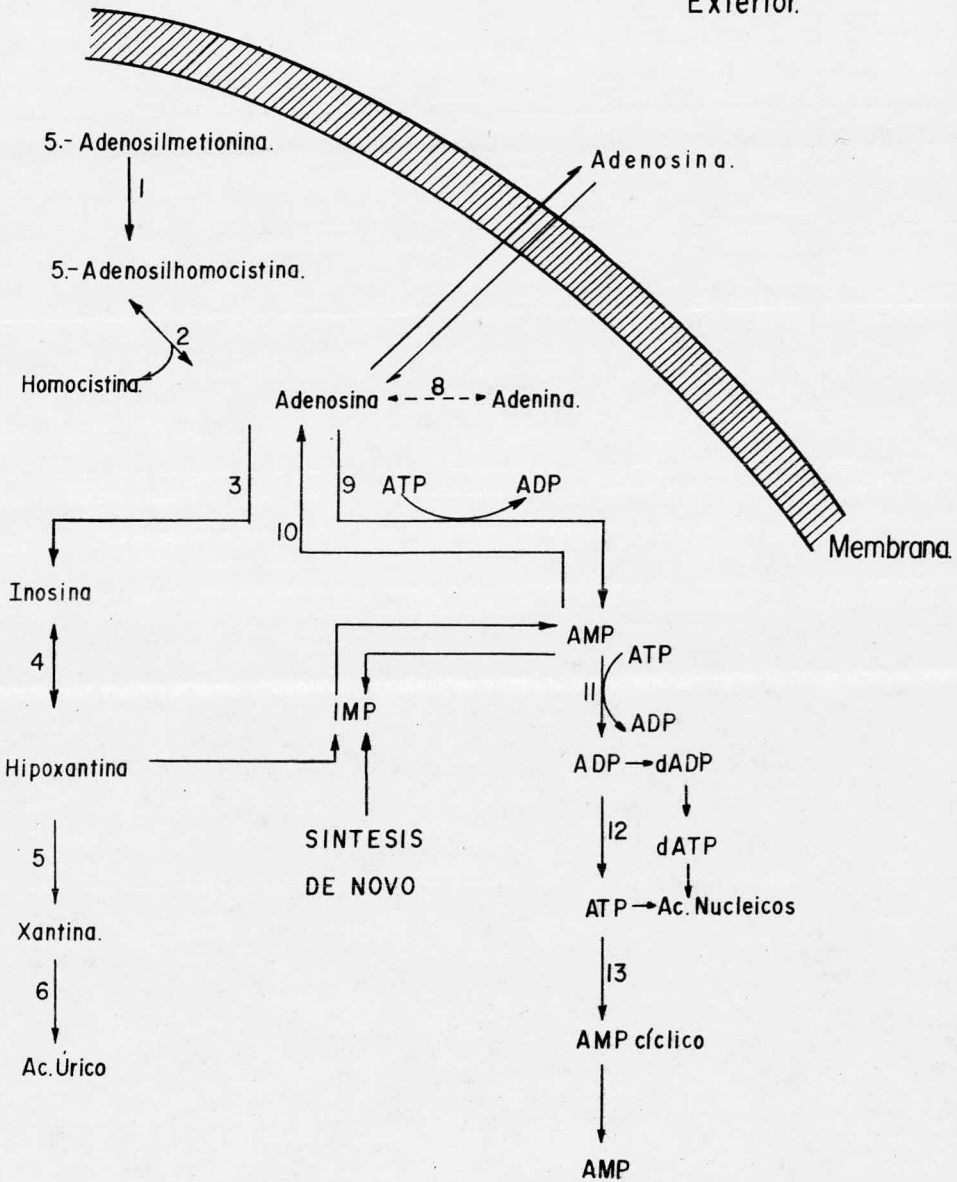


FIGURA 10

CELULA.

Exterior.



externa de la membrana y que permite la entrada de AMP en forma de nucleósido. b) Intracelularmente el AMP es degradado por la 5' nucleotidasa o por fosfatasa no específicas.

III-1.1.2.- Formación a partir de la S-adenosil-metionina.

La S-adenosil metionina pierde su grupo metilo en las reacciones de metilación originando la S-adenosil-homocisteína, la cual es hidrolizada por medio de la adenosil-homocisteína-hidrolasa para dejar homocisteína y adenosina -- libres. La S-adenosil-homocisteína es un compuesto fuertemente inhibidor de las reacciones de metilación por lo que su degradación tiene importancia metabólica.

III.1.1.3.- Formación a partir de la adenina.

La 6-amino-purina reacciona con el 5-fosfo-ribosil-pirofosfato (5PRPP) para formar AMP, esta reacción es catalizada por la adenosín-fosforibosil-transferasa en presencia de Mg^{++} y constituye una de las reacciones de la denominada vía de recuperación de las bases nitrogenadas.

El AMP así formado debe perder su fosfato para dar origen a la adenosina, en estas reacciones intervienen las fosfatasa celulares descritas en la sección III.1.1.1.

III.1.1.4.- Síntesis de Novo.

Recibe este nombre la vía metabólica por medio de la cual se sintetiza el anillo púrico a partir de otro tipo de compuestos, como son la glutamina, la glicina, el CO_2 y el aspartato . Esta ruta metabólica no se efectúa - en todos los tejidos de los mamíferos, entre ellos cerebro y médula ósea (21,46.). En la figura número 9 se -- señalan los compuestos de los cuales proviene cada uno de los elementos constituyentes del heterociclo púrico. La - sustancia iniciadora de la síntesis es el 5-fosfo-ribosil-pirofosfato (5PRPP), y el producto final de la misma vía es el ácido inosínico (IMP); la conversión del IMP en ácido adenílico (AMP) requiere solamente la inserción en la posición 6 del anillo púrico de un grupo amino que proviene del aminoácido denominado ácido aspártico , la reacción -- necesita guanósín-trifosfato (GTP) como compuesto donador de energía, el producto de la reacción final es el ácido - adenilsuccínico, del cuál posteriormente se elimina ácido fúmarico para dejar finalmente adenosín-monofosfato (AMP), que como hemos visto anteriormente pierde su fosfato para dar adenosina.

III-1.2.- Vías de transformación a otros productos.

Consta de dos grandes caminos: la formación de nucleótidos y la degradación a productos de desecho.

III-1.2.1.-Degradación a productos de desecho.

El primer paso consiste en la desaminación de la adenosina para formar inosina, la reacción es catalizada por la adenosín-desaminasa, enzima presente en los tejidos tanto asociada a membrana (36), como en tres formas solubles diferentes, denominadas "pequeña", "intermedia" y "grande". La forma pequeña, presente en tejidos con mayor actividad desaminadora, puede convertirse a la forma grande con la adición de una proteína que por sí misma no tiene actividad enzimática, esta forma prevalece en tejidos con baja actividad desaminadora; estas variaciones en la actividad de la enzima hace suponer que el polipéptido es un regulador de la misma (30). La enzima se encuentra regulada por las concentraciones de adenosina (35 ,30); cuando esta sobrepasa la concentración para llegar a la velocidad máxima produce un efecto inhibitor. Una vez formada la inosina esta se transforma en hipoxantina por medio de la inosín-fosforilasa quien rompe la unión glucosídica -- (1'-9 incorporando un grupo fosfato en la posición 1' -- del azúcar; la hipoxantina sufre subsecuentes oxidaciones hasta llegar al producto final del catabolismo de las --

purinas en humanos, el ácido úrico.

III-1.2.2.-Formación de nucleótidos.

Como se puede observar en la figura 10, la adenosina es fosforilada a expensas del ATP para dar AMP, la reacción es catalizada por la adenosina cinasa, quien juega un papel muy importante en la regulación de la síntesis de nucleótidos, su actividad depende de las concentraciones de ATP, ADP y Mg^{++} (35).

III-2.- Importancia de la adenosina.

La adenosina juega un papel muy importante en el organismo, tanto por los compuestos a los que dará origen, como por la actividad que tiene por sí misma. Es precursora de los ácidos nucleicos; del ATP, el compuesto de alta energía disponible celular más importante; del AMP cíclico denominado el mensajero intracelular; de la S-adenosil-metionina, sustancia donadora de metilos. Por otro lado existen un gran número de estudios sobre los efectos de la adenosina, entre algunos de ellos se pueden citar:

- a).- El incremento del glucógeno hepático debido a la actividad aumentada de la glucógeno-sintetasa (45).
- b).- El aumento de la carga energética hepática (13).

- c).- El bloqueo en la acumulación de grasa en el hígado inducida por el etanol(47).
- d).- El incremento en el AMP cíclico (30).
- e).- La propuesta de Burnstock (14) sobre la existencia de nervios purinérgicos que utilizan la adenosina - como neurotransmisor.
- f).- Los efectos vasodilatadores en coronarias (19-21,30)

ANTECEDENTES.-

La esquizofrenia es un padecimiento caracterizado por una conducta diferente a la considerada normal, su estudio se ha abordado desde diversos puntos de vista en cada una de las ramas -- del conocimiento humano.

Desde el punto de vista bioquímico este problema ha sido estudiado, encontrándose hallazgos que hablan de diferencias metabólicas, algunas de ellas han sido señaladas en el capítulo I; se han dejado para este capítulo los eventos que se encuentran más relacionados con la hipótesis de este trabajo.

- 1).- Suhayl (9) reporta que en algunos casos la deficiencia de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima que cataliza una de las reacciones de la vía de las pentosas, donde se produce la ribosa parte de la estructura química de la adenosina, provoca síntomas y signos, que pueden ser clasificados como esquizofrenia.

- 2).- Frohman reporta la presencia de un factor protéico, presente en el suero de pacientes esquizofrénicos que afecta al metabolismo del fosfato y a las oxidasas celulares, además de aumentar la relación lactato/piruvato y causar alteraciones en las membranas celulares (3, 4, 10).

- 3).- En individuos normales una carga de glucosa produce un - - aumento del ATP en sangre; el aumento no se observa en pacientes esquizofrénicos cuando se encuentran en estado de ansiedad.(48).
- 4).- Nieto (7) reporta la mejoría clínica de pacientes esquizofrénicos al ser tratados con AMP.
- 5).- Kishimoto (11) señala que existen alteraciones metabólicas en el metabolismo de las bases púricas en la esquizofrenia.
- 6).- Otto Hansen (8) reporta la presencia de altas concentraciones de adenosina y valores ligeramente altos de ATP en los eritrocitos de pacientes esquizofrénicos.
- 7).- Resulta interesante que una serie de alteraciones metabólicas muestren en determinadas etapas de sus evolución un -- cuadro psiquiátrico que recuerda al de la esquizofrenia. - Entre tales alteraciones tenemos las porfirias hepáticas y la pelagra.

Además que el cuadro psiquiátrico es muy semejante en las dos condiciones anotadas resulta atractivo el que exista - en ambos casos defectos en los sistemas celulares hepáticos responsables de la síntesis de ATP.

La pelagra es provocada por una carencia crónica de niacinamida (o su derivado nicotinamida) en la dieta. La forma activa de esta sustancia en las células es la nicotinamida adenin-dinucleótido (NAD^+), que interviene en las reacciones de deshidrogenación y forma parte de los aceptores en la cadena respiratoria; al disminuir el paso de electrones por la cadena respiratoria se reduce la síntesis de ATP.

En las porfirias hepáticas agudas, el defecto genético primario se encuentra en la síntesis del hemo debido a una --disminución de la actividad de la uroporfirinógeno I sintetasa, demostrada en hígado. Se sugiere que el bloqueo enzimático de la síntesis del hemo determina una baja en la --disponibilidad de citocromos de la cadena respiratoria, en la oxidación de sustratos en el hígado y en la síntesis de ATP.

8).- Otra explicación que se le puede dar a la exacerbación del cuadro psicótico que ocurre en los pacientes esquizofrénicos tratados con metionina, además de la expuesta en el --capítulo I, sería la disminución del ATP al reaccionar con la metionina para formar S-adenosil-metionina. Varias evidencias indirectas apoyan este punto de vista:

a).- La administración de metionina en pacientes cirróticos en los que se sabe que su metabolismo energético está comprometido, se acompaña de alteraciones neurológicas.

b).- El cuadro tóxico desencadenado por la metionina se --normaliza en animales de laboratorio, con la administración de adenina (12); por otro lado se sabe que la adenosina aumenta el ATP en hígado (13).

La formación de ATP depende tanto de los sistemas de fosforilación como de la presencia de su precursor la adenosina.

Se sabe que el anillo púrico contenido en la molécula no - puede sintetizarse de novo en muchos tejidos (21,46), por lo que Pritchard, Chavez-Peón y Berlin (33) proponen al -- hígado como un órgano de abastecimiento del anillo púrico para estos tejidos. El vehículo en el cual la adenosina es transportada, debe ser como consecuencia lógica la sangre.

Henderson y La Page (32), 24 horas después de una inyec-- ción intraperitoneal de adenina marcada, perfunden el híga do con eritrocitos y detectan una gran radiactividad en -- ellos, la cual se pierde gradualmente (50% en 8 horas) - - cuando se encuentran en circulación corpórea, lo que hace suponer que el vehículo en el cual llega el anillo púrico son los glóbulos rojos. La incorporación de bases y deriva dos púricos en eritrocitos ha sido estudiada por diversos autores (19-29); los resultados obtenidos en algunos de -- estos estudios indican que el sistema transportador de las bases es diferente al sistema transportador de los nucleó-- sidos. En ambos casos se reporta la existencia de dos mecan ismos de transporte:

- a).- Un sistema de transporte facilitado específico, que - es inhibido competitivamente por análogos azufrados, purinas sustituidas en posición 6 y 2,6 y dipiridamole. Los reportes referentes a la dependencia energétic a del transporte son contradictorias.
- b).- Un sistema de difusión simple.

No es posible decir cual es la forma o formas en que el ---
hígado dona las purinas a los eritrocitos, así como tampoco
es posible decir en que forma estos abandonan las purinas.-
A continuación se señalan una serie de datos que orientan a
pensar que es en forma de base como salen los derivados - -
púricos del eritrocito. Lassen (24) encuentra que la dismi-
nución de hipoxantina en el medio donde se incuban eritrocí-
tos es insignificante por lo que efectúa sus experimentos a
partir de eritrocitos "cargados" con hipoxantina. Schrader
et.col. (20) y Leonor Fernández (Datos no publicados) encuen-
tran que la adenosina es captada por el eritrocito, trans--
formada a nucleótidos de adenina, inosina e hipoxantina y -
lanzada al exterior en forma de inosina e hipoxantina. - -
Finalmente el síndrome de Lesh-Nyhan sugiere que la vía de -
recuperación de las bases, específicamente de la hipoxanti-
na, es muy importante para el sistema nervioso. Por otro --
lado la diferencia entre la Km del transportador de nucleósi-
dos y la Km del transportador de bases púricas, del orden de
 10^3 veces mayor en este último y la rápida incorporación a -
los eritrocitos de la adenosina a partir de los tejidos que
tienen capacidad de liberarla (19,30) sugieren que es en --
forma de nucleósido como los derivados púricos son donados -
al glóbulo rojo. Sin embargo no existe en la literatura in-
formación capaz de aclarar este punto.

HIPOTESIS DE TRABAJO.-

El sistema nervioso es incapáz de sintetizar de novo el anillo púrico contenido en la adenosina (21,46), por lo que requiere de la llegada de este compuesto ya sintetizado. Existen evidencias de que el hígado es el órgano proveedor del anillo púrico y que el vehículo por medio del cual llega a los órganos es el eritrocito (32).

Una disfunción en la síntesis o en el transporte de adenosina, produce como consecuencia una deficiencia en la disponibilidad de ATP en ciertos tejidos involucrando entre ellos al sistema nervioso central, esta deficiencia es el evento primario que desencadena alteraciones metabólicas en las células nerviosas y que a su vez provocan los cambios bioquímicos, fisiológicos y conductuales que se presentan en la esquizofrenia.

OBJETIVO.-

Este trabajo de investigación va encaminado a dilucidar las diferencias en la incorporación de adenosina en los eritrocitos de los pacientes esquizofrénicos con respecto a los individuos sanos.

DESCRIPCION GENERAL DEL TRABAJO EXPERIMENTAL.

Se aislan eritrocitos a partir de la sangre de pacientes esquizofrénicos o individuos normales, los cuales se colocan en un medio conteniendo adenosina marcada, se investiga la incorporación de la marca radioactiva a los eritrocitos con respecto al tiempo, y se analiza la cinética de la reacción.

MATERIALES Y METODOS.-

I.- Soluciones.-

1.- Solución de Krebs-Ringer-Glucosa.

100 partes NaCl	(Merck)	0.154 M.
4 partes KCl	(Merck)	0.154 M.
3 partes CaCl ₂	(Merck)	0.110 M.
1 parte HK ₂ PO ₄	(Merck)	0.154 M.
1 parte MgSO ₄ .7H ₂ O	(Merck)	0.154 M.
21 partes HNaCO ₃	(Carlo-Erba)	0.154 M.

Agregar 100 mg. de Glucosa por 100 ml. de solución.

Tapar y guardar en refrigeración.

2.- Solución Sacarosa-adenosina.

Sacarosa	(Sigma)	0.22 M.
Adenosina	(Merck)	1.00 M.

Tapar y guardar en refrigeración.

3.- Acido Perclórico 6%, tapar y guardar en refrigeración.

4.- Líquido de Centelleo para mezclas acuosas.

Etilen glicol	(J.T.Baker)	111 ml.
Etanol absoluto	(Merck)	318 ml.
Xilol	(J.T.Baker)	1800 ml.
P. P. O.	(Merck)	3 grs.
Tritón x 100	(Rahm and Hass)	771 ml.

5.- Adenosina (8^{-14}C) en solución etanol-agua 50% (New England - Nuclear)

Aparatos:

- 1).- Incubadora metabólica "Dubnoff" GCA/Precision Scientific
- 2).- Microfuga "Spinco" Beckman.
- 3).- Espectómetro de centelleo líquido. Packard. -- Tri-Carb.
- 4).- Centrífuga Clínica.

Material:

- 1).- Tubos de ensaye 13 X 100 mm.
- 2).- Tubos de microfuga. Capacidad 400 ml.
- 3).- Viales para el contador del centelleo.
- 4).- Pipetas Pasteur.
- 5).- Pipetas de 1 ml.

Pacientes:

N° PACIENTE	Tipo Esquizofrenia	Edad	Sexo
1	Hebefrénica catatónica	29 años	Masc.
2	Hebefrénica	19 años	Fem.
3	Paranóica	32 años	Masc.
4	Paranóica	24 años	Masc.
5	Hebefrénica	19 años	Masc.
6	No clasificada	24 años	Fem.
7	Paranóica Tardía	45 años	Fem.
8	No clasificada	23 años	Masc.

Los pacientes se encontraban sin tratamiento cuando menos quince días antes de la prueba.

DESCRIPCION GENERAL DE LA TECNICA.-

I.- Obtención de eritrocitos a partir de sangre total.

- 1.- Tomar aproximadamente 5 ml. de sangre por punción venosa.
- 2.- Se vierte la sangre extraída en un matr az conteniendo - - perlas de vidrio y se procede a desfibrinar la sangre, - agitando con movimiento circular por 10 minutos.
- 3.- Transferir la sangre a un tubo de centrifuga graduado.
- 4.- Centrifugar durante 10 minutos a 3,000 rpm., en centrifuga clínica.
- 5.- Extraer el suero con una pipeta Pasteur.
- 6.- Lavar el paquete celular a nadiendo dos volúmenes de solución de Krebs-Ringer-Glucosa.
- 7.- Centrifugar 10 minutos a 3,000 rpm.
- 8.- Extraer el líquido sobrenadante con una pipeta Pasteur.
- 9.- Suspender el paquete celular hasta un hematocrito del 50%

II.- Método para los experimentos de captación de adenosina.

- 1.- Incubar a 37 C una serie de tubos conteniendo 100 μ l de - mezcla de reacción por solución de Krebs-Ringer-Glucosa - adicionada con adenosina 8 C¹⁴ y adenosina no marcada - - hasta completar concentraciones de 2.5, 5, 9.3, 20, 50 μ g 100 μ M.
- 2.- Añadir con una micropipeta 100 μ l de la superficie de - - eritrocitos; mezclar perfectamente.

3.- Transferir una parte alícuota de 100 μ l a un tubo de -- microfuga que contiene un gradiente de sacarosa 0.22 M más adenosina no marcada 1 μ M; centrifugar en microfuga por 15 segundos.

El tiempo que debe transcurrir entre el momento de adición de la suspensión de eritrocitos y el inicio de la centrifugación es de 10 segundos.

4.- Para efectuar el experimento de incorporación en el -- tiempo "cero" se procede de la siguiente manera:

Al tubo de microfuga conteniendo el gradiente de sacarosa-adenosina se añaden 50 μ l de suspensión de eritrocitos y 50 μ l de mezcla de reacción, procurando no exista contacto entre ambos; se centrifuga por 15 segundos.

5.- Transferir cuidadosamente el sobrenadante a tubos de ensaye colocados en hielo. A esta fracción se le denomina medio extracelular o sobrenadante.

6.- Suspender el paquete celular en 250 μ l de ácido perclórico al 6%.

7.- Centrifugar en microfuga por 15 segundos.

8.- Extraer el sobrenadante. A esta fracción se le denomina como fracción intracelular.

R E S U L T A D O S .

En la gráfica I se presenta la desaparición de la marca radioactiva en el sobrenadante y la aparición de la marca --- en la fracción intracelular. Cada dato corresponde al promedio de cuatro experimentos siendo la concentración de adenosina de $9.3 \mu\text{M}$. Como se puede observar, la adenosina es incorporada rápidamente antes del primer minuto de incubación, después de este tiempo hay un aparente equilibrio entre la radioactividad de la fracción extracelular e intracelular, esto no implica una saturación del sistema transportador de la adenosina, datos obtenidos en el laboratorio demuestran la entrada de esta al eritrocito, su transformación en otros derivados púricos y la salida en forma de hipoxantina e inosina, las cuales son detectadas en el medio de incubación después de los primeros diez segundos de incubación. En base a estos resultados, los estudios de cinética de transporte de la adenosina se hicieron en los primeros diez segundos de incubación.

En la gráfica II se analiza la cinética de transporte de la adenosina. Los resultados experimentales se manejaron por el método de dobles recíprocos. Para esta gráfica se tomaron -- los datos obtenidos en los controles normales y en los pacientes esquizofrénicos, cuyos valores aparecen en la tabla # 1. La gráfica resultante puede ser interpretada de diferentes formas, por

una parte los puntos pueden ser unidos por medio de una sola línea con un coeficiente de correlación de 0.9937 ó bien unirse -- por medio de dos líneas, con diferentes puntos de intersección -- en los ejes, lo cual representaría la existencia de dos diferentes sistemas de transporte. El factor de correlación para la línea que une los puntos obtenidos en los ensayos de bajas concentraciones es de 0.9965, el factor de correlación para las altas concentraciones ensayadas es de 0.9983.

Como puede observarse no existen diferencias significativas entre la incorporación de adenosina en los eritrocitos de -- pacientes esquizofrénicos y los controles normales.

Debido a que la escala utilizada en la gráfica II, es -- difícil determinar con precisión si la línea que une los resultados de las concentraciones altas cruza por el origen, lo cual -- representaría a un sistema de difusión simple, ó si cruza por -- algún punto del eje y, lo que representaría a un sistema de transporte facilitado. En la gráfica III se simplifica el sistema de altas concentraciones, con el fin de aclarar en que punto se lleva a cabo la intersección; como se puede observar se trata de un sistema de transporte facilitado.

En la gráfica IV se hace un análisis de los resultados -- de la tabla # 2 por el método de Eadie-Hofstee. Gracias a este --

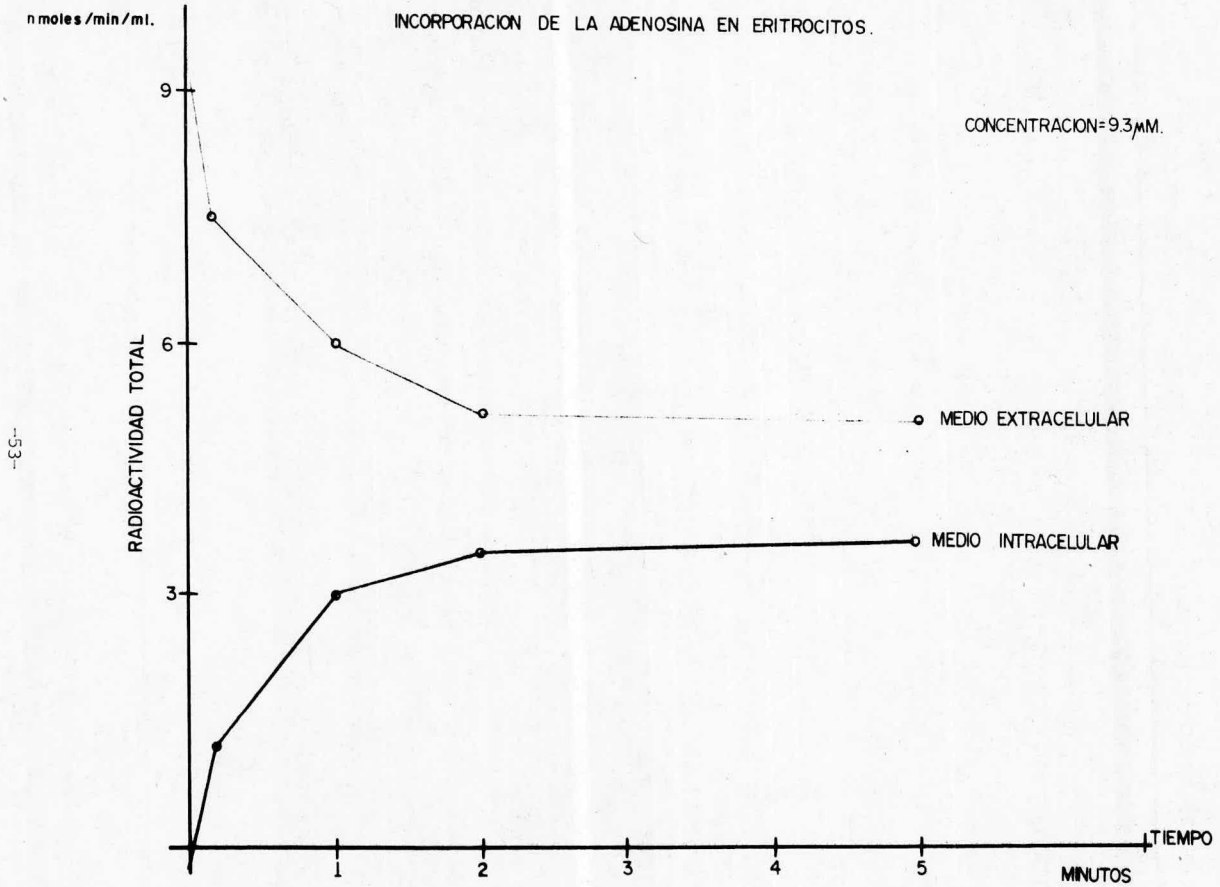
método es posible separar los datos en dos sistemas de transporte. La curva con menor pendiente señala la existencia de un - - transporte de alta afinidad por la adenosina que maneja concentraciones menores a 10 M. Por otro lado existe un transporte - facilitado con menor afinidad por el nucleósido, que es detectado desde concentraciones de 20 μ M. Gracias a este método se concluye claramente que: a) Existen cuando menos dos sistemas de transporte diferentes para la adenosina; b) El sistema de baja afinidad corresponde a un sistema de transporte facilitado y no a una difusión simple, debido a que la pendiente de la recta -- tiene una pendiente diferente de uno.

En la tabla # 3 se reportan los valores de la velocidad máxima, la constante de Michaelis-Menten y el factor de correlación de los dos sistemas de transporte, obtenidos por los dos diferen--tes métodos de análisis. Las constantes obtenidas son práctica--mente iguales.

GRAFICA I.

INCORPORACION DE LA ADENOSINA EN ERITROCITOS.

CONCENTRACION=9.3 μ M.



T A B L A # 1.-

CONCENTRACION (M)	TIPO	N° DE DATOS	VELOCIDAD* PROMEDIO	¹ VELOCIDAD* PROMEDIO	ERROR STANDARD
2.5	N	10	2.392	0.4185	0.182
2.5	E	7	2.356	0.4245	0.237
5.0	N	10	3.972	0.2518	0.316
5.0	E	9	4.238	0.2359	0.360
9.3	N	9	7.604	0.1315	0.520
9.3	E	9	7.063	0.1416	0.565
20.0	N	7	17.310	0.0577	1.363
20.0	E	8	17.600	0.0608	1.371
50.0	N	8	36.768	0.0272	2.828
50.0	E	9	35.405	0.0282	2.432
100.0	N	7	62.552	0.0159	3.736
100.0	E	8	57.415	0.0174	4.558

N = CONTROLES NORMALES.

E = ESQUIZOFRENICOS

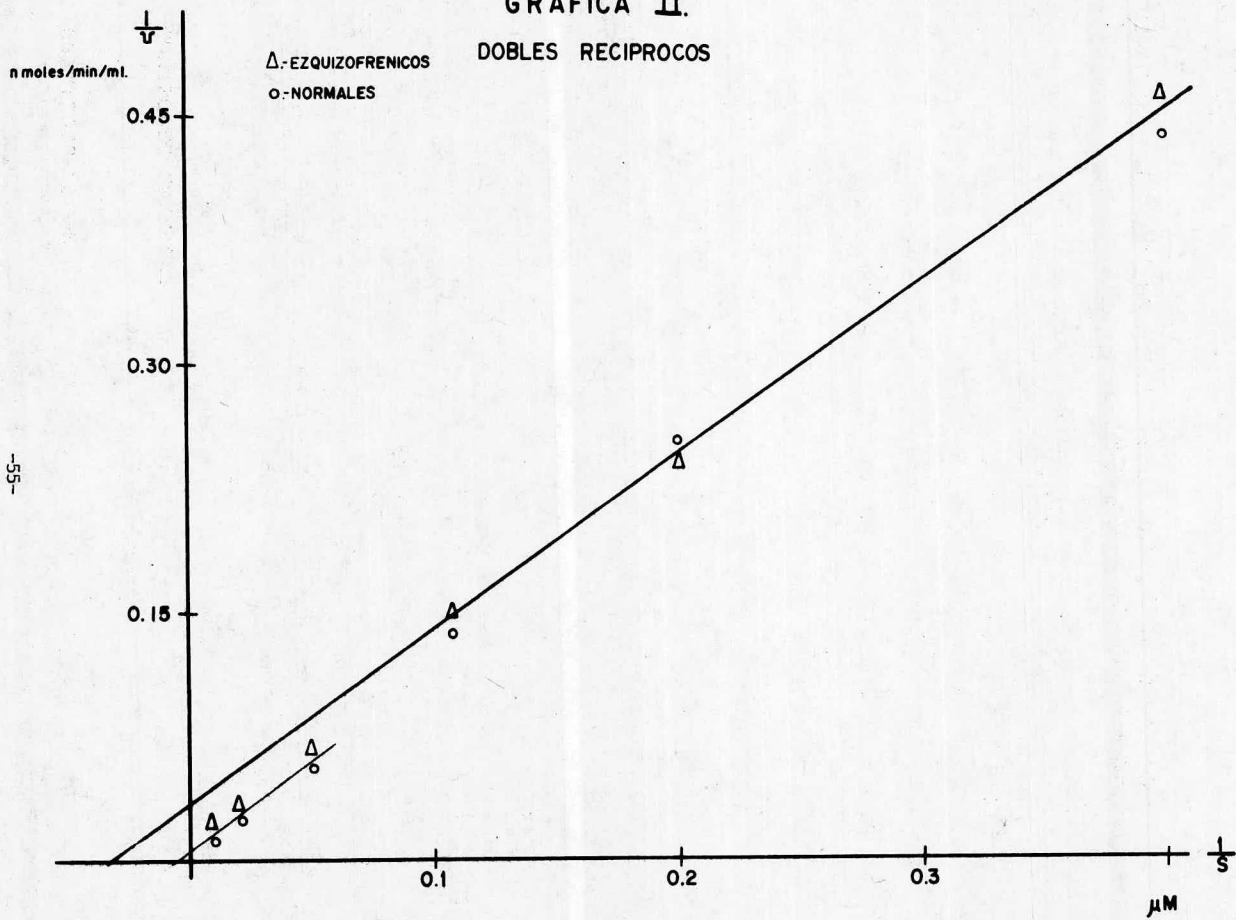
* = n moles/ml/minuto

GRAFICA II.

DOBLES RECIPROCOS

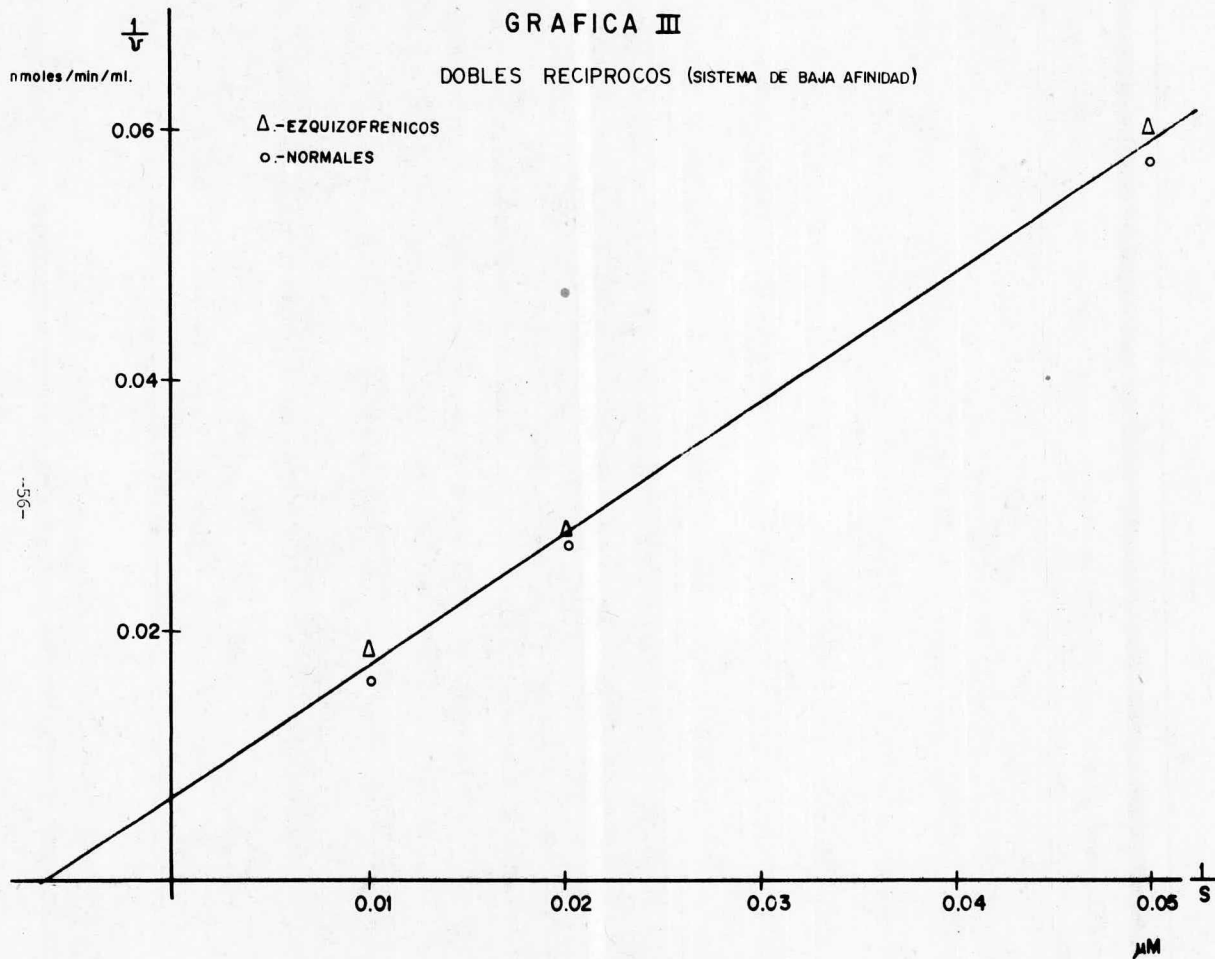
Δ -EZQUIZOFRENICOS

\circ -NORMALES



GRAFICA III

DOBLES RECIPROCOS (SISTEMA DE BAJA AFINIDAD)



T A B L A # 2.-

CONCENTRACION (M)	TIPO	N° DE DATOS	VELOCIDAD*	<u>VELOCIDAD*</u> (S)
2.5	N	10	2.392	0.9567
2.5	E	7	2.356	0.9422
5.0	N	10	3.972	0.7944
5.0	E	9	4.238	0.8176
9.3	N	9	7.604	0.8176
9.3	E	9	7.063	0.7595
20.0	N	7	17.310	0.8655
20.0	E	8	17.600	0.8214
50.0	N	8	36.768	0.6672
50.0	E	9	35.405	0.7080
100.0	N	7	65.552	0.6255
100.0	E	8	57.415	0.5741

N = CONTROLES NORMALES.

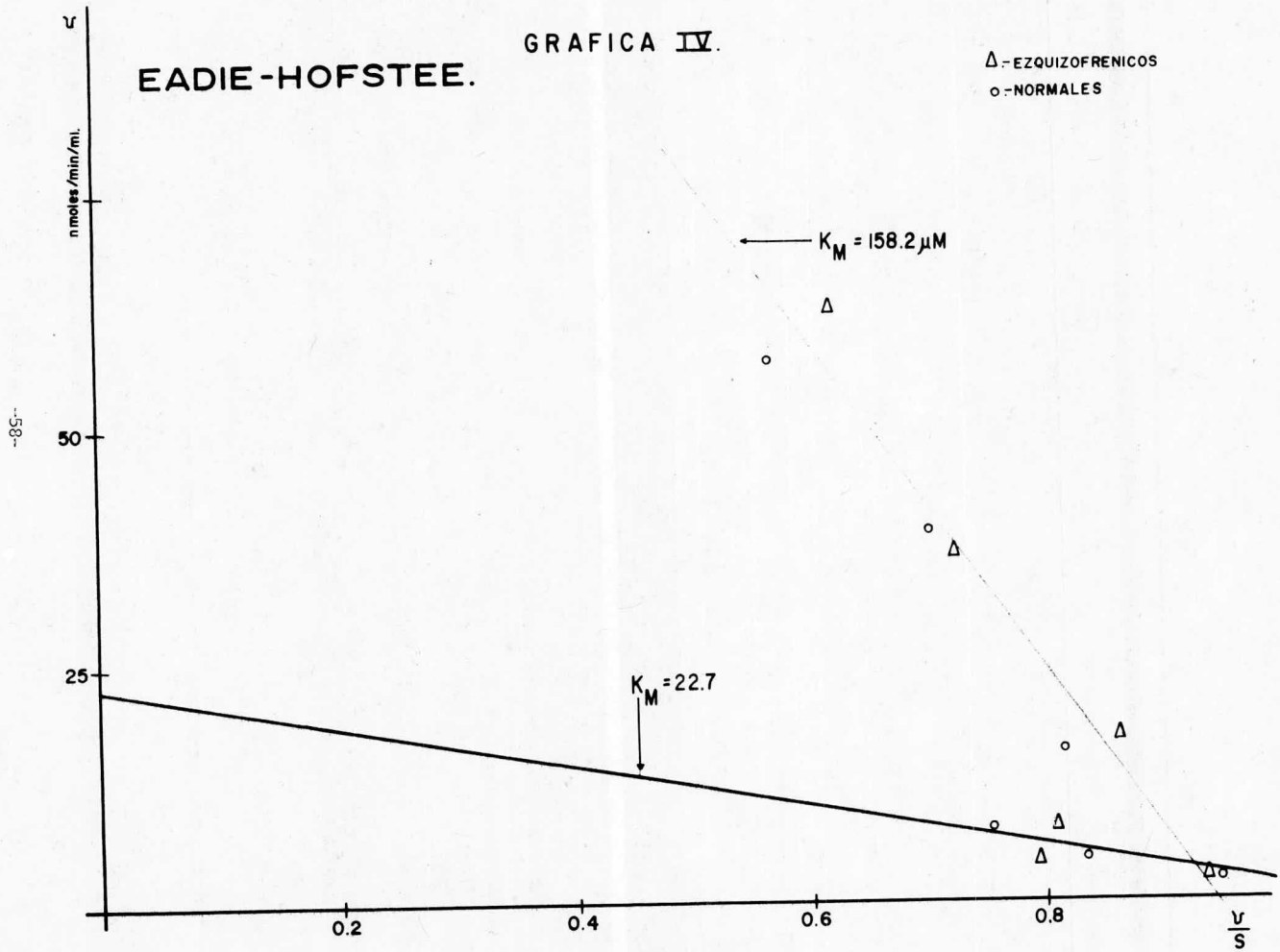
E = ESQUIZOFRENICOS.

* = n moles/ml/minuto

EADIE-HOFSTEE.

GRAFICA IV.

Δ - EZQUIZOFRENICOS
o - NORMALES



T A B L A # 3.-

S I S T E M A	DOBLES- RECIPROCOS			EADIE - HOFSTEE		
	V máx ⁽¹⁾	Km ⁽²⁾	Correlación	V máx ⁽¹⁾	Km ⁽²⁾	Correlación
Alta Afinidad	96.518	23.123	0.9965	95.547	22.66	0.8025
Baja Afinidad	643.564	170.854	0.9983	597.696	158.171	0.9191

Unidades: (1) - μ moles/minuto/litro de células.

(2) - μ Molar.

C O N C L U S I O N E S . -

- 1.- No existen diferencias significativas en la incorporación de la adenosina entre los eritrocitos de los pacientes esquizofrénicos y controles normales; por lo que queda descartado, que de existir un problema metabólico de las bases púricas - en la esquizofrenia, este sea a nivel del transporte intra-eritrocítico de la adenosina.
- 2.- La incorporación de la adenosina es lineal, en los primeros 10 segundos de incubación; dato que no concuerda con lo reportado por otros autores, que efectúan sus experimentos de incorporación en los primeros 5 minutos (19,20,35).
- 3.- Se establece un equilibrio entre la radioactividad de la -- fracción extracelular e intracelular a partir de los dos minutos de incubación. Esto no implica una saturación del sistema transportador de la adenosina; datos obtenidos en el -- laboratorio demuestran la entrada de esta en el eritrocito, su transformación en otros derivados púricos, y la salida en forma de hipoxantina e inosina.
- 4.- Se observan dos sistemas de transporte facilitado:
 - a).- Un sistema que incorpora adenosina en un rango de 2.5 a 9.3 μ M.
 - b).- Un segundo sistema de transporte facilitado, que incor-

para concentraciones mayores de $10 \mu\text{M}$, en el cuál no se observa saturación a concentraciones de $100 \mu\text{M}$.

- 5.- Los valores obtenidos de las constantes por el método de --
dobles recíprocas y el método de Eadie-Hofstie son práctica-
mente iguales. Este hecho adquiere importancia si se tiene --
en cuenta que existen reportadas diferencias notables de --
error en estas constantes cuando son calculadas por los dos
métodos (37).

- 6.- El factor de correlación en las curvas obtenidas tanto por --
el tratamiento de datos por dobles recíprocas y por el Eadie-
Hofstie es cercano a uno. El acontecimiento es relevante, --
sobre todo en el tratamiento de datos por el sistema de --
Eadie-Hofstie, donde pequeñas desviaciones en el valor de --
la velocidad producen exageradas desviaciones en la curva.

- 7 .- Los datos obtenidos en estos experimentos difieren notable-
mente con los datos reportados en la literatura; en el si--
guiente cuadro se muestra un resumen de las diferencias en-
contradas.

T A B L A N° 4

CONDICIONES	SCHARADER, BERNE, RUBIO	ROOS, PFLEGER	OBTENIDOS
a).- Tipo de eritrocitos	fantasmas humanos	íntegros cuyo	íntegros humano
b).- Sustancia incorporada	adenosina	adenosina	adenosina
c).- Tiempo de incubación	5 min	3 min	10 seg
d).- Método de separación de las células	centrifugación 18,000 g/3 min	centrifugación 16,000 g/45 seg	centrifugación 13,000 g/15 seg
e).- Concentraciones usadas	5-50 μ M	37-3745 μ M	2.5-100 μ M
f).- Tipo de transporte en- contrado.	Transporte facilitado y difusión simple.	transporte facilitado y difusión simple.	Dos diferentes sis- temas de transporte facilitado.
g).- Concentración en la -- cuál se satura el -- transporte facilitado.	15 μ M	203.6 μ M	1).- 60.86 μ M* 2).- 235.34 μ M*

	CONDICIONES	SCHARADER, BERNE, RUBIO	ROOS PFLEGER	OBTENIDOS
h).	Inhibidores de <u>trans</u> porte usados	Dipiridamole	Dipiridamole	Ninguno
i).	Concentraciones del inhibidor.	$8.5 \times 10^{-6} M$	$2 \times 10^{-6} M$	- - - -
j).	Sistema Inhibido.	Transporte facilitado y difusión simple.	Transporte facilitado.	- - - -
k).	Método de análisis - de datos	Dobles Recíprocos.	Dobles Recíprocos.	Dobles Recíprocos y Eadie-Hofstie.
l).	Km.	7.5 M	101.8 M	22.89** M 164.52** M
m).	Vm.	2.29 moles/min/1	20.1 moles/min/1	94.53 moles/min/1 624.25 moles/min/1

* Valor obtenido por cálculos teóricos.

** Promedio de los valores encontrados en el sistema de cobles recíprocos y Eadie-Hofstie.

8.- Es de particular interés el observar que mientras Roos y Pflieger (19) reportan un sistema de transporte facilitado hasta concentraciones de $203.6 \mu\text{M}$, Berne y colaboradores encuentran el mismo sistema solo hasta concentraciones de $15 \mu\text{M}$, y resulta más extraño aún el fenómeno reportado en esta última referencia con respecto a que el dipiridamole inhibe tanto el transporte facilitado como la difusión simple.

En base a los datos de la tabla N° 4 se llega a la conclusión de que el sistema de transporte que es inhibido por el dipiridamole en la referencia de Berne (20), no es el sistema de transporte difusión simple sino un sistema de transporte facilitado que transporte a la adenosina a concentraciones mayores de $10 \mu\text{M}$.

9.- Nuestros resultados no van en contra de los descubrimientos de Roos y Pflieger que demuestran la existencia de un sistema de difusión simple, sencillamente en las concentraciones que ensayamos se encuentra trabajando el sistema de transporte facilitado, el cual no permite identificar la difusión simple de la adenosina a través de la membrana.

D I S C U S I O N .-

Los resultados obtenidos modifican, amplían y aclaran -- ciertos puntos sobre los sistemas transportadores de membrana -- para la adenosina. Las modificaciones más importantes son: El -- corto tiempo en que se efectúa la captación de la adenosina en -- el eritrocito y la rápida salida de la marca en forma de deriva-- dos púricos. Por otro lado se encuentra el descubrimiento de dos sistemas de transporte facilitado para la adenosina en eritrocitos, el cual no ha sido reportado en la literatura. Recientemente fué publicado un trabajo en el cual se señala la existencia -- de dos sistemas de transporte de nucleósidos en células de bazo (28).

Gracias a los datos obtenidos en este trabajo es posible aclarar ciertos puntos contradictorios encontrados en la literatura sobre el transporte de la adenosina, los cuales han sido -- analizados en el capítulo de conclusiones.

La ausencia de diferencias significativas entre la incorporación de adenosina en eritrocitos de pacientes esquizofrénicos y controles normales elimina aparentemente la posibilidad de que de existir alteraciones en el metabolismo de las bases púricas en los esquizofrénicos estas sean al nivel de la entrada de la adenosina en el eritrocito. No obstante es necesario tomar en

consideración que existen otra serie de elementos, incluidos en la hipótesis de trabajo, que pueden ser los causantes de deficiencias en la fisiología química de las purinas:

a).- Problemas en la síntesis hepática del anillo púrico.

b).- Deficiencias en la transferencia hepático-eritrocítica del derivado púrico.

c).- Alteraciones en la salida del compuesto púrico del eritrocito.

d).- Presencia de factores sanguíneos, como el reportado por Frohman, que modifiquen las membranas celulares y por lo tanto alteren la actividad de los transportadores. Con el fin de detectar la presencia de factores en el suero de pacientes esquizofrénicos que modifican el transporte de la adenosina se efectuaron estudios preliminares, investigando la incorporación del nucleósido en eritrocitos de controles normales suspendidas en suero de pacientes esquizofrénicos y eritrocitos de pacientes esquizofrénicos suspendidos en suero de controles normales. No se encontraron alteraciones.

e).- Inhabilidad del sistema nervioso para captar derivados púricos.

f).- Alteraciones en el metabolismo celular de purinas.

Es necesario también recordar que los experimentos de -- este trabajo fueron hechos in vitro, procurando mantener al eritrocito en las condiciones más cercanas a las fisiológicas, sin embargo existen una serie de factores in vivo que modifican las actividades celulares, que no pueden ser detectadas en el modelo experimental utilizado.

BIBLIOGRAFIA.-

- 1.- Heston L.- The genetics of schizophrenic and achizoid - disease. Science 167: 249-256. 1970.
- 2.- Stein L. and Wise D.- Possible etiology of schizofrenia: Progressive damage of noradrenergic rewards system by - 6-Hidroxydopomine. Science 171: 1032-1036. 1971.
- 3.- Wyatt R. J., Termini B and Davis J.- Biochemical and -- sleep studies of schizophrenia: A review of the litera- ture- 1960-9170. Schizophrenia Bull 4: 10-66. 1971.
- 4.- Smythies J. R., Coppen A. and Kreitman.- N. Biological psychiatry. A review of recent advances. Springer-Verlag New York inc. 1968. pp 25-49.
- 5.- A. Coppen.- Indolamines and affective disorders. J. - - Psychiat. Res. 9: 163-197. 1972.
- 6.- Heath L. and Krupp.- Schizophrenia as an inmunologie -- disorder: I. Demonstration of antibraun globulins by -- fluorescent antibody techniques. Archives of General -- Psychiatry, 16 (1): 1-9. 1967 a
- 7.- Nieto D.- Tratamiento de la esquizofrenia y otros trans tornos mentales con ácido adenílico. Neurología-Neuro-- cirugía psiquiátrica 7 (1): 25-30. 1966.
- 8.- Hansen O. Blood nucleoside and nuclotide studies in men tal disease. British Journal of psichiatriy 121: 341-350. 1972.

- 9.- Suhayl J. Nasr.- Glucose-6-phosphatase deshydrogenase - - deficiency with psychosis. Archives of general psichiatry 33: 1202-1203. 1976.
- 10.- Frohman C.E., Goodman M. Beckett P.G.S. and Gottlieb J.S. New York Acad. Sci. Ann 96, 438, 1962.
- 11.- Kishimoto K.- Disturbance of purine metabolism in schizophrenia. Separatum confinia neologica 18: 242-254, 1958.
- 12.- Hadwick D. F., Cockroft D. W. and Appllegarth D.A. Ann R.- Coll. Phys. (can) 2: 25, 1969.
- 13.- Chagoya de Sánchez V., Brunner A., Piña E.- In vivo modification of energy charge in the liver cell. Biochem. and Biophys. Res. Comm. 46: 1441, 1972.
- 14.- Burnstock R. Purine nucleotides. Advances in biochemical psychopharmacology 15: 225-235, 1976.
- 15.- Nelson and Cserr.- Transport and metabolism of purines by isolated choroid plexus liver and brain in the spiny dogfish, Squalus acanthias. Comp. Biochem, Physiol. 53 B: - 53 B: 371-377, 1976.
- 16.- Miller D. M.- Monosaccharide transport in human erythrocytes. Red cell membrane. Structura and Function. Jamieson and Greenwalt J.B. Lippiencott Company.
- 17.- Wilson D.B.- Cellular tranport mechanism. Ann. Review of Biochemistry 47: 933-965, 1978. Anual Reviews Inc.
- 18.- Marchesi V.T., Furth Mayr. H., Tomitam.- The red membrane Ann. Review Biochem. 45: 667-669, 1976. Annual Reviews Inc.

- 19.- Roos H. and Pflieger K.- Kinetics of adenosine uptake by erythrocytes, and the influence of dipyridamole. *Molecular pharmacology* 8: 417-425, 1972.
- 20.- Schrader J., Berne R. M. and Rubio R.- Uptake and metabolism of adenosine by human erythrocytes ghost. *American Journal of Physiology* 223: 159-166, 1972.
- 21.- Brown R.R. and Paterson A.R.P.- Turnover of purine nucleotides in rabbit erythrocytes: Lack of in vivo effect of the nucleoside transport inhibitor, p-Nitrobenzyl-6-thioguanosine. *Can. J. Biochim* 49: 1251-1256, 1971.
- 22.- Oliver J.M. and Paterson A.R.P.- Nucleoside transport. I. A mediated process in human erythrocytes. *Can. J. Biochim* 49: 262-270, 1971.
- 23.- Whittam R.- The high permeability of human red cells to adenine and hypoxanthine and their ribosides. *J. Physiology* 154: 614-623, 1960.
- 24.- Lassen U.V.- Hypoxanthine transport in human erythrocytes. *Biochim, Biophys. Acta* 135: 146-154, 1967.
- 25.- Lassen U. V. and Avergaard-Hansen K.- Purine derivatives as inhibitors or uric acid transport into human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 57: 118-122, 1962.
- 26.- Smith R., Reineke J.M. and Burck.- Studies on the uptake of tubercidin by blood cells and its distribution in whole animals. *Cancer Research* 30: 69-75, 1970.
- 27.- Strauss P.R., Sheehan J.M. and Kashket E.R.- Membrane transport by murine lymphocytes. II the appearance of thymidine transport in cells from concanavalin A-stimulated mice. *Journal of Immunology* 118(4): 1328-1333. 1977.

- 28.- Strauss P.R., Sheehan J.M. and Kashket E.R. - Membrane - - transport by murine lymphocytes. I. A rapid sampling technique as applied to the adenosine and thymidine systems. - Journal experimental medicine, 144: 1009-1021, 1976.
- 29.- Lien T.S., Hudson R.A., Brown R.K. and White B.C.- Trans-- port of pyrimidine nucleosides across human erythrocyte - - membranes. Biochemica et Biophysica acta, 241; 884-893, -- 1971.
- 30.- Fox I.H. and Kelley W.N.- The role of adenosine and 2'-de- oxyadenosine in mammalian cells. Ann. Rev. Biochim. 47: -- 655-686, 1978. Annual Reviews Inc.
- 31.- Dean B.M. and Perret D.- Studies on adenine and adenosine metabolism by intact human erythrocytes using high perfor-- mance liquid chromatography. Biochemica et Biophysica acta 437: 1-15, 1976.
- 32.- Henderson J.F. and Le Page G.A.- Transport of adenosine -- 8-C¹⁴ among mouse tissues by blood cell. Journal of Biolo- gical Chemistry 234 (12): 3219-3223, 1959.
- 33.- Pritchard J.B., Chávez-Peón F. and Berlin R.D.- Purines: supply by liver to tissues. American Journal of Physiology 219 (5) : 1263-1267, 1970.
- 34.- Berne R.M.- Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role - in regulation of coronary blood flow. American Journal of Physiology 204 (2) : 317-322, 1963.
- 35.- Meyskens F.L. and Williams H.E.- Adenosine metabolism in - human erythrocytes. Biochemica et Biophysica acta. 240 - - (2):170-179, 1971.
- 36.- Agarwal T. and Parks.- A possible association between the nucleoside transport system of human erythrocytes and adeno

- sine diaminase. *Biochemical Pharmacology* 24:547-550, 1975.
- 37.- Dowd J.E. and Riggs D.S.- A comparison of estimates of --
Michaelis-Menten.- Kinetic constants from various linear --
transformations. *The Journal of Biological Chemistry* 240 -
2 : 863-869, 1965.
- 38.- Styer Lubert. *Biochemistry*. W.H. Freeman and company. 1975.
- 39.- Million. *Theories of psychopathology and personality*. Second
Edition. Saunders company. 1973.
- 40.- Lehninger Albert. *Biochemistry*. Second Edition. Worth Publi-
shers. 1976.
- 41.- Lehninger Albert. *Bioquímica*. Primera edición. Ediciones -
Omega, S.A. 1972.
- 42.- Bachelard Joe L. *Bioquímica del encéfalo*. 1a. edición. --
Interamericana.
- 43.- Kreysvig Erwin. *Introducción a la estadística matemática, -*
principios y métodos. Limusa-Wiley. 1973.
- 44.- Ham A.W.- *Tratado de Histología*. Séptima Edición. Inter-
americana.
- 45.- Chagoya de Sánchez V., Brunner A., Sánchez M.E., López C.,
Piña E., *Arch. Biochem. Biophys* 160: 145-150, 1974.
- 46.- Lowy B.A., Williams M.K., and London I.M.- Enzymatic defi-
ciencies of purine nucleotide synthesis in human erythrocyte.
The Journal Biological Chemistry. 237 5 :1622-1625, 1962.

47.- Hernández Muñoz Rolando, Santamaría D. Aída, Piña Garza Enrique, Chagoya de Sánchez Victoria y García Saíñz Adolfo. Mecanismos de prevención de la adenosina sobre la inducción de hígado graso por etanol. XII Reunión Nacional 1978. Sociedad Mexicana de -- Bioquímica. Pagina 41.

48.- Hawjkings D. y Pauling L. Orthomolecular psychiatry. W.H. Freeman and Company. San Francisco, 1973.