



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

**EFFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE LA
ACTIVIDAD NAD GLICOHIDROLASA DEL
ERITROCITO HUMANO Y ESTUDIO MOR-
FOLOGICO DE ESTAS CELULAS EN
DIFERENTES CONDICIONES
EXPERIMENTALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

MARIA DE LOURDES ESCOBEDO SANCHEZ



MEXICO, D. F.

MAYO DE 1993



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

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

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Ignacio Chávez Rivera, Director del Instituto Nacional de Cardiología Ignacion Chávez, por su generoso apoyo y al Dr. Raúl Izaquirre Avila, jefe del Banco de Sangre y a su amable personal.

A Sirenia González Pozos de la Unidad de Microscopía Electrónica del CINVESTAV por su ayuda en el procesamiento de las muestras de microscopía electrónica de transmisión.

DEDICATORIA

A mis padres por permitirme decidir,
por su cariño y comprensión y sobre
todo por su incondicional apoyo

Al Dr. Edmundo Calva y a la Dra. Rosario Nuñez
por su dedicación, enseñanzas y por su amistad

GRACIAS

INDICE DE TEMAS

	Pag.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVOS.....	9
MATERIALES Y METODOS.....	10
Soluciones.....	10
Obtención de la sangre.....	12
Muestras de sangre recién extraída.....	13
Separación de eritrocitos y de plasma.....	13
Lavado de los eritrocitos.....	13
Preparación de eritrocitos para determinar su concentración de glucosa.....	14
Determinación de la glucosa por el método enzimático de la hexocinasa-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.....	14
Valoración del sistema enzimático usado para determinar la concentración de glucosa.....	17
Obtención del plasma libre de células sanguíneas.....	20
Preparación del extracto térmico del plasma.....	20
Diálisis del extracto térmico.....	20
Ensayo de la actividad NADasa.....	21
Preparación de soluciones utilizadas para resuspender los eritrocitos.....	21
Preparación de las suspensiones de glóbulos rojos para ser incubados.....	21
Medición del hematocrito.....	22
Incubación para el ensayo de la actividad NADasa.....	23
Obtención del sobrenadante libre de proteínas.....	24
Medición del NAD por el método de la deshidrogenasa alcohólica.....	24
Determinación de proteínas.....	27

Preparación de eritrocitos para su análisis con microscopía electrónica de transmisión.....	29
RESULTADOS.....	31
DISCUSION.....	60
CONCLUSIONES.....	69
REFERENCIAS.....	72

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Efecto del pH sobre la degradación del NAD que ocurrió durante 30 min a 37°C en presencia de sangre recién extraída, eritrocitos lavados, fantasmas o plasma	7
Fig. 2. Correlación entre los datos esperados y los datos obtenidos correspondientes a las concentraciones de las soluciones estándar de glucosa	19
Fig. 3. Efecto de la concentración de glucosa del extracto térmico y de una solución pura de glucosa sobre la actividad NADasa a pH alcalino	43
Fig. 4. Eritrocitos de sangre recién extraída sin lavar	56
Fig. 5. Eritrocitos de sangre recién extraída lavados	57
Fig. 6. Eritrocitos de sangre almacenada sin lavar	58
Fig. 7. Eritrocitos de sangre almacenada lavados	59

INDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Preparación de soluciones estándar de glucosa para el ensayo con el método enzimático	17
Tabla 2. Comparación de las concentraciones de glucosa calculadas con las determinadas enzimáticamente	18
Tabla 3. Actividad NAD glicohidrolasa de eritrocitos lavados de sangre recién extraída y de sangre almacenada	32
Tabla 4. Respuesta de la actividad NAD glicohidrolasa de eritrocitos lavados de sangre almacenada a preparaciones semipurificadas del plasma sanguíneo	33
Tabla 5. Efecto de los lavados sucesivos de los eritrocitos de sangre almacenada sobre su actividad NAD glicohidrolasa medida en presencia de extracto térmico	34
Tabla 6. Pérdida de glucosa al ser lavados los eritrocitos de sangre almacenada utilizando soluciones isosmóticas de fosfatos o de cloruro de sodio	36
Tabla 7. Efecto de la D-glucosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada	37
Tabla 8. Respuesta de la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada al extracto térmico dializado	38

Tabla 9.	Respuesta de la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada a la D-glucosa a bajas concentraciones y consumo de este monosacárido en el medio alcalino	40
Tabla 10.	Respuesta de la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada incubados con D-glucosa a altas concentraciones	41
Tabla 11.	Respuesta de la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada incubados con diferentes volúmenes de extracto térmico expresados como concentración de la glucosa que contienen	42
Tabla 12.	Efecto de la D-fructosa y de la D-2-desoxiglucosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada	47
Tabla 13.	Efecto de la D-glucosamina sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada	48
Tabla 14.	Efecto de la L-glucosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada	49
Tabla 15.	Efecto de la D-ribosa y de la D-fucosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada	50
Tabla 16.	Efecto de la D-glucosa 6-fosfato y de la lactosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada	51

Tabla 17. Efecto de la sacarosa y de la maltosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada	52
Tabla 18. Efecto de la D-manosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada	53
Tabla 19. Efecto de la D-galactosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada	54

INDICE DE CUADROS SINOPTICOS

	Pág.
Cuadro 1. Efecto de la concentración de glucosa en la mezcla de incubación sobre la actividad específica alcalina de la NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada y resuspendidos en diluciones de D-glucosa y de extracto térmico respectivamente	44
Cuadro 2. Contribución porcentual de la D-glucosa al incremento de la actividad específica alcalina NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada extraída de diversos donadores y resuspendidos en diferentes preparaciones de extracto térmico	45
Cuadro 3. Efecto de diversos azúcares y sus derivados sobre la actividad específica alcalina de la NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada	55

RESUMEN

1. Se estudió la actividad NAD glicohidrolasa de eritrocitos lavados de sangre humana de diferentes donadores obtenida de un banco.
2. El objetivo de este trabajo fue determinar si la D-glucosa, uno de los componentes del plasma sanguíneo, incrementa la actividad NADasa de los eritrocitos, cuando éstos se incuban en el medio alcalino y si este incremento es de la misma cuantía que el observado cuando los eritrocitos están resuspendidos en plasma.
3. Los eritrocitos separados del plasma se lavaron hasta reducir a cero su contenido de glucosa.
4. La actividad NADasa de los eritrocitos se ensayó tanto en un medio ácido como en uno alcalino.
5. Los eritrocitos fueron resuspendidos en diferentes medios: solución isotónica de fosfatos, extracto térmico preparado del plasma y soluciones puras de D-glucosa y de otros azúcares.
6. Las incubaciones para valorar la actividad NADasa se hicieron a 37°C durante 15 min. La mezcla contenía eritrocitos lavados resuspendidos en la solución por estudiar o en las soluciones testigo, amortiguador de fosfatos de sodio a pH ácido o alcalino y NAD como sustrato.
7. La concentración del NAD en las muestras de la mezcla de incubación tratadas con ácido perclórico, se midió con el sistema etanol-alcohol deshidrogenasa.
8. La concentración de glucosa se determinó mediante el sistema hexoquinasa-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en el extracto ácido de las mezclas que contenían eritrocitos y en los diferentes medios que se usaron para resuspenderlos.
9. Se demostró que la solución isotónica de fosfatos resultó más conveniente para lavar los eritrocitos que la solución isotónica de cloruro de sodio.
10. Se demostró que al someter a diálisis al extracto térmico disminuyó la capacidad de la porción retenida para incrementar la actividad específica alcalina NADasa de los eritrocitos y que otros compuestos igualmente activos atravesaron la membrana de diálisis junto con la glucosa.
11. Se demostró que la D-glucosa por sí sola incrementó la actividad específica alcalina de la NADasa de los

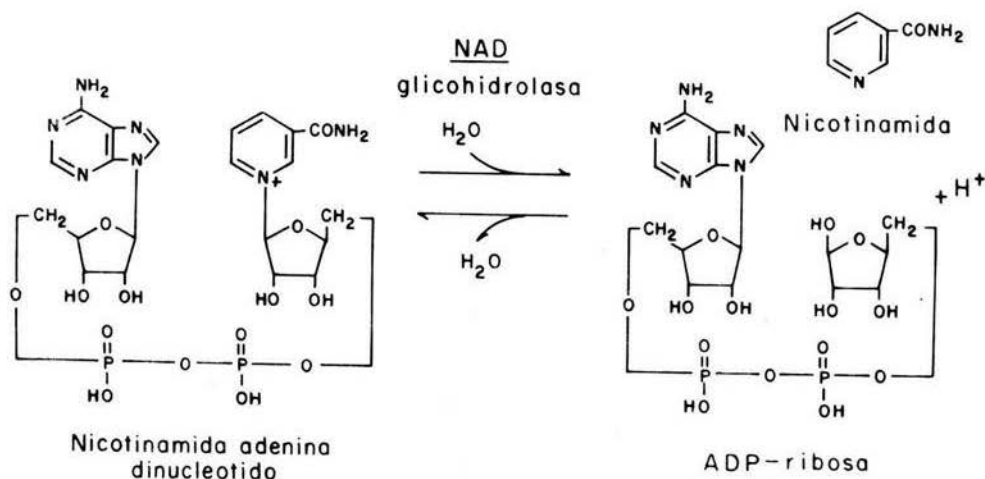
eritrocitos lavados aunque en menor cuantía que el extracto térmico.

12. Se demostró que la respuesta de la NADasa alcalina del eritrocito a concentraciones crecientes de D-glucosa fue del tipo todo o nada. En contraste, la respuesta a diferentes concentraciones de extracto térmico, que entre otros componentes contiene glucosa, fue de tipo aparentemente hiperbólico.
13. Se demostró que con excepción de la D-fructosa, cuyo efecto fue menor que el de la D-glucosa, ninguno de los otros azúcares ensayados incrementó la actividad específica alcalina NADasa de los eritrocitos.
14. Se demostró que los eritrocitos de la sangre almacenada modifican su forma y tamaño y que al lavarlos tienden a recuperarlos.
15. Se proponen tres posibles mecanismos de acción, a través de alguno de los cuales, la D-glucosa incrementa la actividad específica alcalina NADasa de los eritrocitos humanos.

INTRODUCCION

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

HIDROLISIS DEL NAD



Alivisatos y Denstedt (1951) observaron que el NAD agregado a una suspensión de glóbulos rojos lavados de conejo (o de humano) o a la preparación obtenida al hemolizar estos glóbulos rojos, era destruido catalíticamente. Demostraron que la actividad enzimática responsable de la degradación catalítica del NAD se encuentra en la

membrana del eritrocito (preparación que llamaron estroma) y que su sitio activo está orientado hacia la superficie externa de dicha membrana; esto último explica que catalice solamente la hidrólisis del NAD exógeno y no la del NAD contenido dentro del eritrocito. Comprobaron que la inhibición de esta enzima producida por la nicotinamida es de tipo competitivo y que resulta casi total a la concentración 10 mM del inhibidor.

Frischer *et al.* (1973) no encontraron diferencias en la actividad NADPasa de eritrocitos lavados de sangre reciente y de sangre almacenada a 4°C recibida en el anticoagulante ACD (ácido cítrico - citrato - dextrosa), durante los ensayos hechos a lo largo de 3 semanas. Estos investigadores sugieren que en los eritrocitos humanos las actividades NADasa y NADPasa radican en una sola enzima y no en dos como lo habían postulado Hofmann y Knoll (1961), dado que ambas actividades siempre variaron paralelamente en las distintas preparaciones de eritrocitos (con una relación NADPasa/NADasa promedio de 0.60) y que en ningún caso encontraron deficiencias de una sola de estas enzimas sino siempre de ambas.

Ravazzolo *et al.* (1976) extrajeron en forma soluble la NADasa de la membrana del eritrocito humano mediante una solución de Triton X-100 en fosfatos y mercaptoetanol y la purificaron precipitándola con sulfato de amonio. La actividad NADPasa fue solamente el 35 por ciento de la actividad NADasa y en el análisis electroforético, en acetato de celulosa, la actividad NADasa aparecía en una banda que tuvo la misma posición que la banda revelada por su actividad NADPasa; lo que confirma, según estos autores, que una y otra actividad son debidas a una sola enzima. La preparación mostró su actividad máxima a pH 6.5, con un descenso notable a pH mayor de 7.5 y también a pH menor de 5.5. El K_m para el NAD fue 43 μM , tanto a pH 6.5 como a 7.2.

Goodman y su grupo (1982) confirmaron que la NADasa de los eritrocitos de varias especies animales (humanos, ratones, ratas, bovinos, ovinos y monos) es una enzima extracelular (una ectoenzima) y demostraron que funciona en todos estos casos como glicohidrolasa y como ADP-ribosiltransferasa (utilizaron protamina como aceptor). La K_m para el NAD fue muy parecida entre los eritrocitos de las diversas especies (desde 20 hasta 80 μM , a 37°C y pH 7.4 con amortiguador de fosfatos de potasio); en cambio, la V_{max} fue notablemente diferente (77.8 en

eritrocitos humanos y sucesivamente mayor en la serie de animales mencionada, hasta $27,121 \text{ pmol}/10^8$ células en los eritrocitos del mono); esto último implica que el número de moléculas de esta enzima que se encuentran en la membrana de los eritrocitos de los diversos animales es muy desigual. La autoinactivación de la NADasa que se observó in vitro no se corrige con el lavado exhaustivo de los eritrocitos, ni con el enfriamiento a 4°C durante 48 h; por lo que Goodman et al. sugieren que este cambio irreversible posiblemente revela una modificación covalente de la molécula, quizá una auto-ADP ribosilación, como la que se ha demostrado que ocurre en la toxina del cólera, una de cuyas unidades actúa tanto como catalizadora como aceptora del grupo ADP-ribosa.

El interés de nuestro grupo de trabajo por la NADasa surge durante el estudio del infarto experimental agudo del miocardio, provocado en el corazón del perro, al ocluirle quirúrgicamente la rama descendente anterior de la arteria coronaria izquierda. Las mitocondrias aisladas de la zona dañada dejan de oxidar a los sustratos cuyas deshidrogenasas específicas utilizan el NAD como coenzima. El contenido de NAD de estas preparaciones mitocondriales disminuye considerablemente y al investigar la causa de esta disminución se demostró que la responsable era la actividad NADasa del propio tejido cardíaco, dado que en la primera hora de la oclusión de la arteria, la cantidad de NAD que desaparece en el tejido isquémico es equivalente a la cantidad de nicotinamida que aparece en dicho tejido (Calva et al., 1966 y Nuñez et al., 1976).

Los eritrocitos resultan ser un material relativamente sencillo en comparación con el tejido cardíaco; por lo cual, el estudio de la NADasa en estas células es menos complicado que en el corazón.

En los eritrocitos de mamíferos la NADasa se encuentra en la membrana plasmática, con su sitio activo orientado hacia la superficie externa; por lo que esta enzima actúa virtualmente sólo sobre el NAD del medio de suspensión y no sobre aquél contenido dentro del eritrocito.

Las investigaciones realizadas en nuestro laboratorio demostraron que al incubar, en medios con diferente pH, muestras de sangre recién extraída, hay dos zonas con actividad NADasa máxima: una a pH relativamente ácido

(alrededor de 6.5) y otra con actividad más alta a pH relativamente alcalino (cercano a 7.9) (Méndez 1985). En cambio, la sangre total almacenada durante 10 a 12 días a 4°C, deja de mostrar la mayor actividad al pH alcalino y sólo conserva la máxima a pH ácido (Urbán, 1989). Asimismo, se observó que la suspensión de eritrocitos lavados o la preparación de fantasmas sólo muestran una región de actividad NADasa máxima, la correspondiente a la zona ácida (Méndez, 1985) y que la adición de plasma aumenta la actividad en el medio alcalino, de tal manera que la cuantía de la activación acerca este valor al valor mostrado por la sangre recién extraída incubada en estas condiciones, sin que modifique significativamente la actividad NADasa en el medio ácido (Urbán, 1989).

En los eritrocitos que sin lavar se separaron de la sangre recién extraída y se incubaron en ausencia de plasma, la actividad NADasa a pH alcalino fue mayor que a pH ácido, como si se tratara de eritrocitos presentes en la sangre completa. La adición de plasma al medio en que se resuspendieron estos eritrocitos, aumentó muy poco la actividad alcalina, pero el valor llegó a ser igual al de los eritrocitos exhaustivamente lavados que se incubaron con plasma (Urbán, 1989).

Los eritrocitos que después de ser lavados se sometieron a hemólisis, aunque conservaron la actividad NADasa, no respondieron a la presencia de plasma; esto es, la actividad a pH alcalino no aumentó (Urbán, 1989).

En el plasma no se detectó actividad intrínseca NADasa cuando se incubó en medios de pH desde 5 hasta 7.5 y en el medio alcalino, pH 7.9, la degradación del NAD apenas representó el 6% de la hidrólisis observada, a ese pH, en presencia de eritrocitos lavados (Urbán, 1989). Consecuentemente, es indudable que el aumento notable de la actividad NADasa de los eritrocitos humanos, incubados a pH alcalino, provocado por el plasma, es debido, no a la manifestación de la enzima contenida en el plasma, que es insignificante, sino al efecto de otros componentes del plasma, hasta ahora no conocidos, que activan a la enzima en el medio alcalino de incubación.

Sangre total ■ 0.1M cit-0.1M fosf □ 0.2 M fosfatos
 Eritrocitos ● 0.1M cit-0.1M fosf ○ 0.1 M Tris-0.1M fosf
 Fantasmas ▲ 0.1M cit-0.1M fosf △ 0.2 M fosfatos

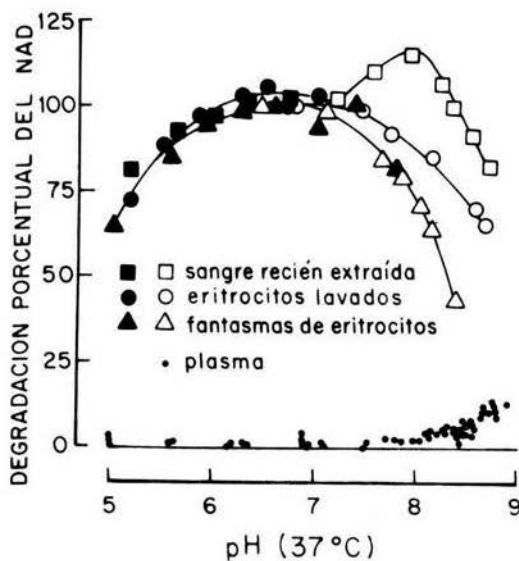


Fig. 1. Efecto del pH sobre la degradación del NAD que ocurrió durante 30 min a 37°C en presencia de sangre recién extraída, eritrocitos lavados, fantasmas, o plasma. Los valores de la actividad específica se calcularon como nanomoles de NAD degradado por minuto y por mililitro de sangre; excepto en el caso de los fantasmas en que se refirió a un miligramo de proteínas. En esta gráfica todos los valores se muestran en cada serie como porcentajes de la actividad máxima correspondiente.

Aparentemente, el factor o los factores del plasma responsables de la activación de la NADasa a pH alcalino, están adsorbidos en la superficie externa de los eritrocitos contenidos en la sangre recién extraída. Es probable que durante el almacenamiento de la sangre se modifiquen las características de la membrana del eritrocito y que esto provoque la separación de dichos factores de la superficie de esta célula. Posteriormente, al lavar los eritrocitos, es posible que con este tratamiento se reconstituya la estructura de la membrana y los factores plasmáticos vuelvan a ser adsorbidos cuando estos eritrocitos lavados son resuspendidos en el mismo plasma que tuvieron durante el almacenamiento.

Las investigaciones hechas en nuestro laboratorio, relativas a la identificación del factor o de los factores presentes en el plasma que estimulan a la NADasa de los eritrocitos humanos íntegros, incubados en un medio alcalino, han revelado que estos compuestos son estables durante el calentamiento a 92°C, hasta por 3 horas; son solubles en agua, pero no en solventes de lípidos; resisten el enfriamiento y la liofilización y se destruyen por digestión ácida prolongada llevada al cabo a alta temperatura. Al filtrar por una columna de Sephadex el extracto térmico obtenido del plasma, con sólo el 3% de las proteínas contenidas en el plasma original, observamos que la fracción que fue capaz de activar a la NADasa alcalina del eritrocito humano, redujo el reactivo cualitativo de Folin-Wu usado para revelar azúcares con grupo reductor y posteriormente demostramos, con el sistema hexocinasa-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, que este azúcar es la glucosa.

O B J E T I V O S

Con base en estas últimas observaciones juzgamos pertinente realizar el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- a) Estudiar el efecto que tiene el lavado de los eritrocitos sobre su actividad NADasa y sobre su contenido de glucosa.
- b) Estudiar el efecto del extracto térmico plasmático liberado de su glucosa por diálisis sobre la actividad NADasa de los eritrocitos.
- c) Estudiar el efecto de diferentes concentraciones de D-glucosa en soluciones puras de este azúcar y en diluciones del extracto térmico plasmático que también contiene glucosa, sobre la actividad NADasa de los eritrocitos.
- d) Investigar si el incremento de la actividad NADasa de los eritrocitos provocado por el extracto térmico plasmático se debe exclusivamente a la glucosa.
- e) Determinar si a concentraciones equivalentes a la usada en la solución de D-glucosa, otros mono- y disacáridos biológicos tienen efecto sobre la actividad NADasa de los eritrocitos y
- f) Investigar si los eritrocitos al ser almacenados como sangre total a 4°C durante varias semanas, sufren modificaciones morfológicas y si éstas son reversibles al lavarlos.

MATERIALES Y METODOS

Solución anticoagulante.

1. Anticoagulante CPD (Citrato-fosfato-dextrosa).- Se pesaban 0.327 g de ácido cítrico, 2.63 g de citrato trisódico, 0.222 g de fosfato monosódico y 2.55 g de D-glucosa (dextrosa) y se disolvían en agua bidestilada para obtener 100 ml.

Solución isotónica de fosfatos para lavar los eritrocitos.

2. Solución isotónica de fosfatos (Dodge, Mitchell y Hanahan, 1963) (Solución de Dodge).- Se pesaban 14.63 g de Na_2HPO_4 y se disolvían en 1000 ml de agua bidestilada (0.155 M solución alcalina). Por otra parte se pesaban 5.348 g de NaH_2PO_4 y se disolvían en 250 ml de agua bidestilada (0.155 M solución ácida).

La solución isotónica de Dodge (310 miliosmolal) se preparaba agregando a los 1,000 ml de la solución alcalina un volumen suficiente de la solución ácida para obtener un pH de 7.40 a temperatura ambiente.

Soluciones para el ensayo de la actividad NADasa.

3. Amortiguador de fosfatos 0.30 M a pH 6.25-6.28.- A una solución 0.30 M de NaH_2PO_4 (solución ácida) se le añadió la cantidad necesaria de solución de Na_2HPO_4 0.30 M (solución alcalina) para obtener un pH de 6.25 a temperatura ambiente.

4. Amortiguador de fosfatos 0.30 M a pH 8.70-8.75.- A una solución de Na_2HPO_4 0.30 M (solución alcalina) se le agregaba la cantidad necesaria de solución de NaH_2PO_4 (solución ácida) para disminuir el pH a 8.70 a temperatura ambiente.

5. Solución isotónica de cloruro de sodio.- Se disolvían 8.5 g de NaCl en agua y se completaba el volumen a un litro.

6. Solución a pH entre 7.0 y 7.4 de NAD 6 mM en cloruro de sodio.- Se pesaban 48 mg de NAD (Sigma N-7004) y se disolvían en 7 ml de NaCl al 0.85%. El pH se ajustaba entre 7.0 -7.4 a temperatura ambiente con NaOH 0.1 N. Al final el volumen se completaba a 10 ml.

Soluciones para la medición enzimática del NAD.

7. Solución concentrada de deshidrogenasa alcohólica (1,000 unidades por mililitro).- La solución concentrada preparada con 10,000 unidades /ml (reactivo Sigma A-7011 disuelto en 3 ml de agua estéril) se diluía 1:10 con la solución isotónica de NaCl. Esta dilución se conservaba en el refrigerador hasta por una semana y se centrifugaba antes de usarse si estaba turbia (1 a 2 min a 1,120 xg, 2600 rpm en la centrifuga clínica).

8. Amortiguador para la mezcla de reacción de la deshidrogenasa alcohólica.- Se disolvían 18.16 g de Trizma base en unos 150 ml de agua y se vaciaban cuantitativamente a un matraz volumétrico de 250 ml. Luego se añaden 14.7 ml de etanol absoluto y se completaba el volumen con agua.

El pH final de esta solución era 10.8 aproximadamente a temperatura ambiente.

Soluciones para la cuantificación de proteínas (Oyama e Eagle, 1956).

9. Solución A.- Se disolvían 20 g de Na_2CO_3 , 4 g de NaOH, 0.2 g de tartrato de sodio y potasio en agua bidestilada y se llevaban a un volumen final de 1,000 ml. (El tartrato se disolvió en esta solución alcalina, en lugar de ponerlo en la de CuSO_4 , porque en esta última se produce a la larga un precipitado; Oyama e Eagle, 1956.)

10. Solución B .- Se pesaban 5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, se disolvían en agua bidestilada y se completaba el volumen a 1,000 ml.

11. Solución C .- Se preparaba inmediatamente antes de usarse, agregando 50 ml de la solución A a 1 ml de la solución B.

12. Dilución del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu .- Se preparaba con agua bidestilada una dilución 1:2 del reactivo concentrado de Folin-Ciocalteu (Sigma F-9252) inmediatamente antes de usarse.

13. Solución tipo concentrada de albúmina de suero de bovino (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$).- Se pesaban 10.00 mg de albúmina (Sigma A-4378) y se disolvían con solución salina 0.85% hasta un volumen de 25 ml. Esta dilución se guardaba en el refrigerador.

14. Solución tipo diluida de albúmina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).- Se ponían 1.25 ml de la solución tipo concentrada de albúmina, en un matraz volumétrico de 10 ml y se completaba el volumen con solución salina al 0.85%.

Obtención de la sangre.

Las bolsas de sangre, donadas por el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, contenían 70 ml de anticoagulante CPD, cantidad suficiente para recibir 500 ml de sangre del donador. El contenido de glucosa en la suspensión final de eritrocitos, suponiendo que la sangre del donador contiene 100 mg/dl, es de unos 400 mg/dl. En la mayoría de las ocasiones las bolsas recibidas no tenían los 500 ml sino menos, por lo que contenían un exceso de anticoagulante.

Muestras de sangre recién extraída.

Se extraían de una vena superficial del codo 60 ml de sangre de un donador sano en ayunas. La muestra de sangre se vaciaba en un tubo que contenía 8.4 ml de anticoagulante CPD y se hacía la mezcla por inversión suave para evitar la hemólisis.

Separación de eritrocitos y de plasma.

La sangre contenida en la bolsa se mezclaba muy bien y la muestra extraída o, en su caso, la sangre recién extraída, se centrifugaba a 1,000 xg (3,600 rpm) en el rotor JA-20 de 7 cm de radio medio, a 4°C, durante 20 min. Al final, con pipeta Pasteur se transfería el plasma a un matraz de Erlenmeyer. La interfase entre el plasma y los eritrocitos se desechaba con el fin de descartar la mayor parte de los leucocitos y las plaquetas.

Lavado de los eritrocitos (Dodge, Mitchell y Hanahan, 1963).

A los eritrocitos sedimentados, separados del plasma, se les agregaba un volumen igual de solución isotónica de fosfatos. Los tubos se tapaban con parafilm y se invertían suavemente hasta resuspender totalmente los eritrocitos. La suspensión de glóbulos rojos se centrifugaba a 1,000 xg, durante 20 min, a 4°C. El sobrenadante se eliminaba con una pipeta Pasteur, junto con la capa blanquecina de leucocitos y de plaquetas.

En el transcurso de los experimentos se detectó que al lavar los eritrocitos, además de quitar residuos de plasma y de otras células sanguíneas, se extraía la glucosa endógena de los glóbulos rojos (ver Resultados). Consecuentemente los eritrocitos se lavaban las veces que era necesario para quitar toda la glucosa endógena, lo cual se logró en la mayoría de las ocasiones al cuarto lavado.

Los eritrocitos una vez lavados se ponían en un frasco de Erlenmeyer.

Preparación del extracto ácido para determinar glucosa.

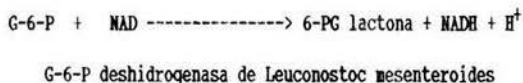
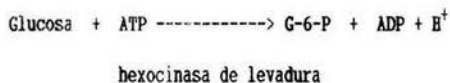
A 1 ml de eritrocitos se le agregaba 1 ml de solución isotónica de fosfatos y a esta resuspensión se añadían 2 ml de ácido perclórico al 10%, se agitaba y se dejaba la mezcla en hielo 10 min. Luego se centrifugaba a 1,120 xg (2,600 rpm) (radio máximo 15 cm) a temperatura ambiente, durante 10 min, en una centrifuga clínica Chriss. El sobrenadante libre de proteínas precipitadas se pasaba a otro tubo para centrifugarlo nuevamente y así obtener una solución libre de partículas visibles.

Determinación de la concentración de glucosa por el método enzimático de la hexocinasa-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

Las determinaciones de glucosa se llevaron a cabo en muestras de plasma, de diluciones de extracto térmico, de soluciones de glucosa químicamente pura o de extracto ácido de eritrocitos o de mezcla de incubación.

Fundamento

La glucosa es fosforilada por el ATP en presencia de la hexocinasa. La glucosa-6-fosfato formada es posteriormente oxidada por el NAD a 6-fosfogluconolactona en presencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Durante esta oxidación una cantidad equimolar de NAD es reducido a NADH. El NADH presenta su máxima absorbancia con la luz de longitud de onda de 340 nm. El incremento en la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.



La actividad de esta G-6-P deshidrogenasa con NAD es aproximadamente 1.8 veces la observada con NADP (Cat. Sigma 1990, pág. 515).

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

NAD 1.5 mmol/l

ATP 1.0 mmol/l

Hexocinasa de levadura 1,000 unidades/l

G-6-P deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* 1,000 unidades/l

Iones magnesio 2.1 mmol/l

Amortiguador pH 7.5 +/- 0.1

Azida de sodio 0.05% (preservativo)

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

La reacción se llevaba a cabo a temperatura ambiente. Se ponían 1.00 ó 1.50 ml (dependiendo de la concentración de glucosa en la muestra por medir) de la solución de los reactivos Sigma en una cubeta rectangular de 3 ml de volumen y de 10 mm de anchura interior y se medía su absorbancia a 340 nm, comparándola contra la del agua puesta en otra cubeta semejante. Una vez obtenida la lectura inicial, se agregaba a la cubeta, con una pipeta Hamilton, 10 ó 25 µl (dependiendo de la concentración de glucosa en la muestra por medir); se mezclaba bien y luego de 10 min, cuando la absorbancia ya era estable, se tomaba la lectura final.

Para obtener el cambio de absorbancia (ΔA) se le restaba a la lectura final (A_2) la lectura inicial (A_1).

La concentración de glucosa se expresa en los miligramos contenidos en un decilitro (100 ml) de la muestra analizada y se obtenía con la siguiente ecuación.

$$\text{Glucosa (mg/dl)} = \frac{\Delta A \times VT \times PM \times 100}{6.22 \times 10^3 \times PL \times VM} = \Delta A \times 119, 292 \text{ ó } 437$$

$$= \frac{\text{ml mg mmol}^{-1} \cdot \text{ml dl}^{-1}}{\text{cm}^{-1} \text{ mmol}^{-1} \text{ ml cm ml}} = \text{mg/dl}$$

Donde:

ΔA = cambio de absorbancia = $A_2 - A_1$

VT = volumen total de la mezcla de reacción en la cubeta (1.010, 1.025 ó 1.510 ml)

PM = peso molecular de la glucosa (180.16 mg/mmol)

100= conversión de mililitros a decilitros (ml/dl)

6.22×10^3 = coeficiente de absorbancia del NADH ($\text{cm}^{-1} \text{mmol}^{-1} \text{ml}$)

PL = paso de luz en la cubeta (1 cm)

VM = volumen de la muestra analizada (0.010 ó 0.025 ml)

Valoración del sistema enzimático usado para determinar la concentración de glucosa.

Se determinaron varias concentraciones de soluciones estándar de glucosa (3, 6, 9, 12, 18 y 24 mg/dl) con el fin de conocer la sensibilidad y exactitud del método.

Las diluciones se prepararon a partir de una solución tipo que contenía 24 mg de mezcla de anómeros de D-glucosa (Sigma G-8270) en 100 ml (Tabla 1).

Tabla 1. Preparación de soluciones estándar de glucosa para el ensayo con el método enzimático

Solución número	Preparación de 25 ml	Concentración final al completar a 25 ml con agua (mg/dl)
1	Solución original	24.0
2	18.80 ml de solución 1	18.05
3	16.70 ml de solución 2	12.06
4	18.75 ml de solución 3	9.04
5	16.70 ml de solución 4	6.04
6	12.50 ml de solución 5	3.02

Tabla 2. Comparación de las concentraciones de glucosa calculadas con las determinadas enzimáticamente

G l u c o s a		
Concentración esperada (mg/dl)	Concentración obtenida (mg/dl)	Diferencias (mg/dl)
3.02	2.87	-0.15
6.04	6.46	+0.42
12.10	12.2	+0.10
18.00	19.0	+1.00
24.00	25.1	+1.10

Los resultados obtenidos (Tabla 2) (Fig.1) nos sirvieron de base para confiar en las determinaciones de glucosa a partir de 3 mg/dl y tomar como significativas solamente las diferencias de 2 mg/dl cuando menos.

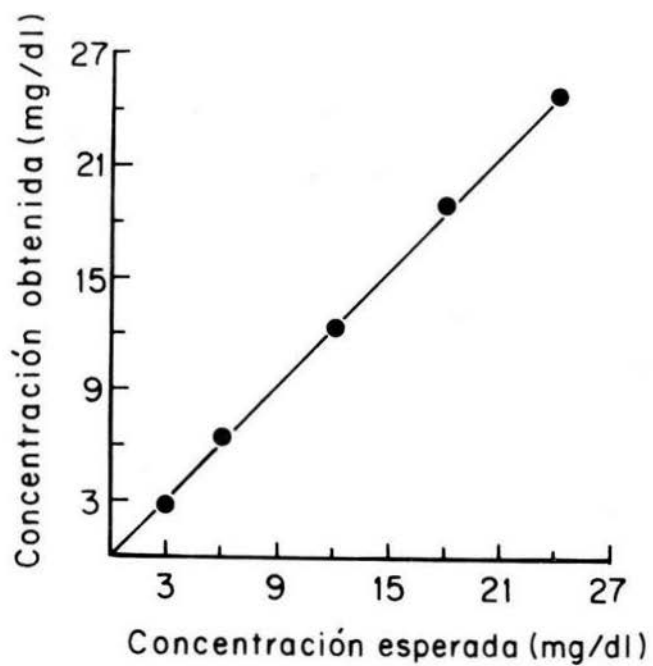


Fig. 1. Correlación entre de los datos esperados y los datos obtenidos correspondientes a las concentraciones de soluciones estándar de glucosa (ver Tabla 2). La ecuación correspondiente a la gráfica es $y = 1.056 x$ y el índice de correlación 0.999 .

Obtención del plasma libre de células sanguíneas.

El plasma obtenido de la centrifugación de la sangre total, con anticoagulante, se ultracentrifugaba y se microfiltraba para eliminar restos de eritrocitos, de leucocitos y de plaquetas, ya que todos ellos contienen actividad NAD glicohidrolasa.

La ultracentrifugación se realizaba a 7,800xg (10,000 rpm) en el rotor JA20 de radio medio 7cm, a 4°C, durante 10 min y el sobrenadante se pasaba luego a través de un microfiltro de 0.20 µm de poro.

Preparación del extracto térmico de plasma.

Los tubos conteniendo porciones de 30 ml del plasma libre de células sanguíneas, se ponían en un baño de agua que estaba a la temperatura de ebullición y a partir del momento en que se alcanzaba esta temperatura se incubaba 30 min. Al término de este tiempo, los tubos se enfriaban poniéndolos en una hielera. El contenido pastoso se disgregaba y se pasaba a otros tubos para centrifugarse a 25,350 xg (18,000 rpm) en el rotor JA20 de radio medio de 7 cm, durante 2 h a 4°C.

El sobrenadante obtenido se pasaba por un filtro de 0.20 µm y se guardaba en un frasco que había sido esterilizado (extracto térmico).

Diálisis del extracto térmico.

Un volumen de 12 ml de extracto térmico se dializó utilizando un tubo de celulosa con poros suficientemente pequeños para retener compuestos de peso molecular mayores de 3500 daltones (Dialyzer Tubing of regenerated cellulose, Spectra Por, 3, MWC0 3500, Thomas Scientific 3787-H45).

El extracto se dializó contra más de 100 volúmenes de amortiguador de fosfatos de sodio 0.005 M a 4°C, cambiándose éste cada 2 horas.

Se determinó la concentración de glucosa del extracto térmico cada vez que se cambiaba el amortiguador. Se

consideró terminada la diálisis cuando el extracto térmico casi no contenía glucosa, como lo mostró el ensayo enzimático.

Ensayo de la actividad NADasa

Resuspensiones de eritrocitos que se incubaron.

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

1. Solución de Dodge
2. Plasma con anticoagulante
3. Extracto térmico
4. Soluciones de glucosa
5. Soluciones de diferentes carbohidratos

Preparación de las soluciones utilizadas para resuspender los glóbulos rojos lavados.

Diluciones de extracto térmico.

Con el fin de ver el efecto de la concentración de la glucosa que forma parte de los diversos compuestos contenidos en el extracto térmico, se realizaron varias diluciones de éste en solución de Dodge.

La concentración de glucosa en el extracto original se determinó por el método enzimático.

Soluciones con diferente concentración de glucosa químicamente pura.

Se pesó D-glucosa químicamente pura (Sigma G-8270, mezcla de anómeros) para obtener una solución con la concentración de glucosa igual a la del extracto térmico original y a partir de esta solución se obtuvieron diferentes diluciones correspondientes a las concentraciones de glucosa presentes en las diluciones utilizadas del extracto térmico.

Soluciones de diferentes carbohidratos a la misma concentración molar que la glucosa tenía en el extracto térmico original

Se determinó la concentración de glucosa en miligramos por decilitro de extracto térmico y se calculó la correspondiente concentración en milimoles por decilitro.

Las soluciones de los diferentes carbohidratos se prepararon a la misma molaridad que tenía la glucosa en el extracto térmico.

Ejemplo para la maltosa:

$$\frac{307 \text{ mg de glucosa/dl de extracto térmico}}{180 \text{ mg de glucosa/mmol de glucosa}} = 1.71 \text{ mmol/dl de extracto térmico}$$

Por lo tanto, $342.3 \text{ mg de maltosa /mmol} \times 1.71 \text{ mmol/dl} = 584 \text{ mg de maltosa /dl}$

Preparación de las suspensiones de glóbulos rojos para ser incubados.

Eritrocitos 4.5 ml + 4.5 ml de la solución escojida

La suspensión se hacía por inversión suave del tubo y se determinaba la concentración de eritrocitos mediante el hematocrito.

Medición del hematocrito.

El hematocrito se determinó en todas las suspensiones de eritrocitos. Se usaron capilares de 75 mm de longitud, 1.1-1.2 mm de diámetro y 0.2 mm de grosor de la pared. La suspensión de eritrocitos se dejaba subir por el

capilar manteniendo inclinado tubo hasta llenar 3/4 partes del mismo. El capilar se sellaba en el extremo libre de sangre, fundiendo el vidrio con una flama de gas, evitando que la sangre se dañara.

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

La actividad NADasa se refirió a un mililitro de eritrocitos.

Incubación para el ensayo de la actividad NADasa

En los ensayos se incluían siempre dos controles, uno consistente en una suspensión de eritrocitos en la solución isotónica de fosfatos (solución de Dodge) y otro de eritrocitos suspendidos en el extracto térmico. Cada ensayo se realizó por duplicado tanto a pH ácido como a pH alcalino.

La mezcla de incubación contenía lo siguiente:

- 1.50 ml de eritrocitos suspendidos en la solución correspondiente
- 1.00 ml de amortiguador de fosfatos 0.3 M al pH inicial de 6.25-6.28 para la actividad ácida y de 8.70-8.75 para la actividad alcalina respectivamente, y
- 0.25 ml de agua

- 2.75 ml volumen inicial

La mezcla se preincubaba 10 min en el baño a 37 °C y la reacción se iniciaba al añadir 0.25 ml. de una solución de NAD 6 mM (concentración final 0.5mM) (volumen final 3 ml). Inmediatamente se tapaba el tubo y se invertía 10 veces (aproximadamente 20 seg). En seguida se tomaba 1 ml de la mezcla y se vaciaba a un tubo que contenía 1 ml de ácido perclórico al 10% (p/v) puesto en la hielera. El tubo con la mezcla ácida se agitaba vigorosamente y se volvía a poner en frío al menos por 10 min. Esta muestra correspondía al tiempo 0.

El tubo con la mezcla de incubación restante se regresaba de inmediato al baño a 37°C y se incubaba 14 min más.

Al minuto 14 se sacaba el tubo, se mezclaba su contenido y nuevamente se tomaba 1 ml de muestra que se vaciaba al minuto 15 en otro tubo que contenía 1 ml de ácido perclórico frío. Esta muestra correspondía al tiempo 15. A la porción restante de la mezcla de incubación se le medía el pH a 37°C con el potenciómetro Radiometer PHM22r, con una escala de sensibilidad de 0.01.

Obtención del sobrenadante ácido libre de proteínas.

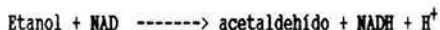
Los tubos que contenían las proteínas precipitadas de la muestra incubada, se centrifugaban a 1,120 xg (2,600 rpm) (radio máx. 15 cm) a temperatura ambiente durante 10 min, en la centrífuga clínica Chriss.

El sobrenadante se transfería a otro tubo y se centrifugaba nuevamente para obtener un líquido libre de partículas visibles.

Medición del NAD por el método de la deshidrogenasa alcohólica (Racker, 1950).

Fundamento

La deshidrogenasa alcohólica cataliza la siguiente reacción:



La reducción de bajas concentraciones de NAD es casi del 100% cuando la reacción ocurre a pH alcalino y en presencia de un exceso de etanol y sin necesidad de agregar semicarbazida para atrapar el acetaldehído (Racker, 1950).

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

Medición del NAD

En cubetas rectangulares de 3 ml, se ponían 2.00 ml de amortiguador de la deshidrogenasa alcohólica y 1.00 ml del extracto ácido. Luego de tapar la cubeta con parafilm, se mezclaba bien su contenido invirtiéndola varias veces.

La absorbancia a 340 nm se leía contra otra cubeta con agua (lectura inicial).

Después se agregaban, con una pipeta automática Gilson, 0.05 ml de la dilución de la deshidrogenasa alcohólica (50 unidades) y, luego de tapar la cubeta, se mezclaba bien su contenido y se leía la absorbancia 2 ó 3 min después, también contra agua (lectura final).

La absorbancia neta se obtenía restando a la lectura final la lectura inicial.

La diferencia de absorbancia ΔA se obtenía restando a la absorbancia neta del tiempo 0 la absorbancia neta del tiempo 15.

Cálculos para obtener el valor de la actividad específica.

$$1. \Delta A \times \frac{1}{6.22 \times 10^{-3}} \times \frac{3.05}{1.0} \times \frac{2.0}{1.0} \times \frac{3.0}{1.5} \times \frac{1}{15} = \Delta A \times 130.76 \frac{\text{nmol de NAD consumido}}{\text{min, ml de sangre o de suspensión de eritrocitos en cualquiera de las soluciones usadas}}$$

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

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

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

Significado de los términos de la ecuación anterior.

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

3.05 = mililitros en la cubeta del espectrofotómetro

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

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

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

3.0 = mililitros totales de la mezcla de incubación.

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

15 = minutos de incubación

hematocrito $\frac{1}{2}$ = hematocrito de la sangre total o de las suspensiones de eritrocitos en las diferentes soluciones.

Determinación de proteínas (Oyama e Eagle, 1956).

Las preparaciones de extracto térmico se diluían 1:10 con solución isotónica de NaCl para ajustar la concentración de proteínas a la sensibilidad del método de Lowry.

En tubos de ensayo se ponían los siguientes volúmenes de solución estándar (50 µg/dl) de albúmina de suero de bovino: 0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 y 1.00; y 0.10 y 0.20 de la dilución del extracto. En cada tubo el volumen se completaba a 1.00 ml con solución isotónica de NaCl. Luego se agregaban 5 ml de la solución C recién preparada y se mezclaba bien. Se dejaban 10 min a la temperatura ambiente y enseguida se agregaban rápidamente 0.5 ml de la dilución del reactivo fenólico, con pipeta volumétrica de soplar y manteniendo el tubo en agitación constante con el vórtex. Una hora después se leía la absorbancia a 660 nm contra el testigo de reactivos.

Como se conoce la pendiente (n) de la recta obtenida al relacionar en la gráfica las absorbancias de la solución tipo de albúmina (y) con las concentraciones de albúmina de bovino (x), expresadas en microgramos por mililitro de muestra contenida en la cubeta del espectrofotómetro, se puede calcular (x) correspondiente a los microgramos de proteína (o compuestos que reaccionan con el reactivo de Folin) - en términos de microgramos de albúmina de bovino - presentes en un mililitro de la muestra analizada contenida en la cubeta del espectrofotómetro.

$$y = n x ; \text{ por lo tanto, } x = \frac{y}{n}$$

En donde:

y = absorbancia de la solución problema

n = $\frac{\text{absorbancia de la sol. de alb. de bov.}}{\mu\text{g de alb/ml de muestra en la celda}}$; por lo que,

x = $\frac{\mu\text{g de proteína en términos de alb. de bov.}}{\text{ml de muestra en la celda}}$

Finalmente, la concentración de proteínas (o compuestos que reaccionan con el Folin) - en términos de microgramos de albúmina de bovino - presentes en un mililitro de la solución problema original analizada, se obtenia como sigue:

$$X \cdot \frac{1}{0.1 \text{ (ó } 0.2)} \cdot \frac{10}{1} \cdot \frac{1}{10^3} = \frac{\text{ug de proteína}}{\text{ml de sol. problema original}} = \text{concentración de proteínas}$$

0.1 ó 0.2 = mililitros de la dilucion de la sol. problema puesta en la celda del espectrofotómetro

10/1 = dilución hecha de la solución problema original

1/10³ = conversión de microgramos a miligramos

Preparación de eritrocitos para su análisis con microscopía electrónica de transmisión.

Se estudiaron eritrocitos sin lavar que se aislaron de sangre recién extraída, eritrocitos lavados de sangre recién extraída, eritrocitos sin lavar tomados de sangre almacenada y eritrocitos lavados de sangre almacenada, respectivamente.

Los eritrocitos de sangre reciente se procesaban inmediatamente después de que la sangre era extraída de un donador en ayunas. Esta misma sangre se almacenaba dos semanas y al cumplirse este periodo se tomaba la muestra para tener eritrocitos sin lavar de sangre almacenada.

Los eritrocitos de sangre reciente y de sangre almacenada, respectivamente, se lavaban por la técnica de Dodge et al. (1963).

A todas las muestras de eritrocitos se les determinaba actividad NADasa.

En cada caso, las preparaciones para el análisis con microscopía electrónica de transmisión se hacían con 5 μ l de eritrocitos que se fijaban primero con glutaraldehído al 2%, en la siguiente forma: la muestra se resuspendía en el glutaraldehído durante 5 min y luego se dejaba en reposo 1 h a la temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaban en una microcentrífuga Eppendorf durante 10 segundos. El sobrenadante se desechaba y el sedimento se lavaba dos veces con solución isosmótica de fosfatos, centrifugándose la suspensión en cada ocasión.

La segunda fijación se hacía durante 1 h a 4°C con tetróxido de osmio diluido al 1%. Posteriormente la muestra se lavaba de manera similar a la primera fijación.

La deshidratación de las células se llevaba a cabo con etanol a porcentajes crecientes desde 50 hasta 100%, en pasos de 10 en 10%. Cada paso de deshidratación era de 10 min y al llegar al 100% el procedimiento se repetía tres veces.

La infiltración se hacía con resina epóxica spurr, agregando al volumen de etanol, que tenía la muestra, un

volumen semejante de resina y manteniendo la mezcla en constante agitación durante 3 h a temperatura ambiente. En seguida, a esta mezcla se le agregaba el volumen necesario de resina para tener una proporción 3:1 resina-etanol y se agitaba durante 3 h más también a temperatura ambiente; por último se hacían dos cambios sólo con resina y en el último cambio la resina se dejaba que polimerizara 35 h a 60°C.

Las muestras se cortaban con ultramicrotomo y se teñían con soluciones saturadas de acetato de uranilo y de citrato de plomo sucesivamente.

RESULTADOS

La sangre total recién extraída mostró mayor actividad NADasa a pH alcalino que a pH ácido; mientras que en la sangre almacenada, dos semanas a 4°C, la actividad en el medio alcalino fue igual a la observada en el medio ácido (Tabla 3).

Los eritrocitos lavados de sangre recién extraída o de sangre almacenada resuspendidos en solución isotónica de fosfatos presentaron mucho menor actividad NADasa alcalina que la sangre total recién extraída incubada en el medio alcalino y menor o igual actividad que la observada en el medio ácido. La actividad alcalina aumentó notablemente cuando los eritrocitos lavados fueron nuevamente suspendidos en plasma, independientemente de si procedían de sangre recién extraída o de sangre almacenada (Tabla 3).

Los eritrocitos lavados de sangre almacenada mostraron un incremento en su actividad NADasa alcalina al ser incubados en presencia del plasma sanguíneo y también cuando fueron resuspendidos en dos preparaciones semipurificadas de plasma que convencionalmente llamamos extracto térmico y extracto ultrafiltrado, respectivamente. Sin embargo, el aumento de la actividad NADasa provocado por el extracto térmico fue sólo el 85% del causado por el plasma y con el extracto ultrafiltrado solo se obtuvo el 81%. No obstante que el porcentaje de activación fue menor, la ventaja de estas dos preparaciones es que en la primera la concentración de proteínas sólo es el 3% de la medida en el plasma y en el extracto ultrafiltrado todavía disminuye más y apenas es del 0.4%. Por otra parte, las dos preparaciones semipurificadas contienen la misma concentración de glucosa que el plasma. En contraste con estos resultados obtenidos en el medio alcalino, la actividad específica NADasa medida con los eritrocitos incubados en el medio ácido resultó aproximadamente igual en las tres diferentes resuspensiones de eritrocitos (Tabla 4).

Con los lavados sucesivos, los eritrocitos de sangre almacenada mostraron un aumento significativo en la actividad alcalina NADasa medida en presencia de extracto térmico plasmático; mientras que no se modificó la actividad ensayada en el medio ácido. Ahora bien, cuando se usó la solución isotónica de fosfatos para los lavados, los eritrocitos mostraron un aumento progresivo de la actividad alcalina con el número de lavados. En

Tabla 3. Actividad NAD glicohidrolasa de eritrocitos lavados de sangre recién extraída y de sangre almacenada

Muestras incubadas	NADasa			
	Medio ácido		Medio alcalino	
	pH	Actividad específica [†]	pH	Actividad específica [†]
Sangre recién extraída				
Sangre total	6.49	20.4	7.84	28.4
Eritrocitos lavados				
+ fosfatos	6.60	22.0	7.62	15.4
+ plasma	6.54	20.6	7.84	31.6
Sangre almacenada				
Sangre total	6.41	19.7	7.67	19.2
Eritrocitos lavados				
+ fosfatos	6.60	19.3	7.85	19.2
+ plasma	6.53	19.9	7.90	32.4

[†]La actividad específica son los nanomoles de NAD hidrolizado por minuto por mililitro de eritrocitos.

Tabla 4 Respuesta de la actividad NAD glicohidrolasa de eritrocitos lavados de sangre almacenada a preparaciones semipurificadas del plasma sanguíneo

Medios de suspensión de los eritrocitos lavados	<u>Mezcla de incubación</u>		<u>NADasa</u>			
	Glucosa (mg/dl)	Proteínas del plasma (mg/dl)	<u>Medio ácido</u>		<u>Medio alcalino</u>	
			pH	Actividad específica	pH	Actividad específica
Plasma sanguíneo	80	1860	6.54	19.4	7.83	34.9
Extracto térmico	86	61	6.53	17.7	7.85	29.8
Extracto ultrafiltrado	87	8	6.53	18.8	7.82	28.4

Tabla 5. Efecto de los lavados sucesivos de los eritrocitos de sangre almacenada sobre su actividad NAD glicohidrolasa medida en presencia de extracto térmico

Número de lavados	NADasa				Incremento de la actividad específica alcalina *
	Medio ácido		Medio alcalino		
	pH	Actividad específica	pH	Actividad específica	
Lavados con fosfatos					
0	6.73	19.1	7.82	20.7	0
1	6.60	19.5	7.68	28.3	7.6
2	6.60	18.7	7.75	34.2	13.5
3	6.61	20.5	7.78	44.7	24.0
Lavados con NaCl					
0	6.73	18.4	7.82	20.7	0
1	6.53	18.8	7.93	30.7	10.0
2	6.53	21.5	7.85	31.1	10.4
3	6.52	19.0	7.93	30.2	9.5

La mezcla de incubación de los eritrocitos contenía 120 mg de glucosa por decilitro proveniente del extracto térmico utilizado para resuspenderlos.

Datos de uno de dos experimentos similares.

*El incremento de la actividad específica alcalina es la diferencia de actividad entre la manifestada por los eritrocitos resuspendidos en el medio en estudio y la de los eritrocitos resuspendidos en el medio en estudio y la de los eritrocitos resuspendidos en la solución isotónica de fosfatos.

cambio, en los lavados con solución isotónica de cloruro de sodio, la actividad alcalina no aumentó después del primer lavado y el valor de este aumento fue sólo el 40% del alcanzado por los eritrocitos lavados tres veces con solución de fosfatos; a pesar de que después del primer lavado con cloruro de sodio, la cifra de la actividad alcalina NADasa fue 32% más alta que en los eritrocitos lavados con fosfatos (Tabla 5).

Los eritrocitos de sangre almacenada al ser lavados, tanto con la solución de fosfatos como de cloruro de sodio, fueron perdiendo sucesivamente la glucosa que contenían y esto ocurrió en forma similar usando una u otra de estas soluciones. Así, al final del tercer lavado los eritrocitos sólo contenían el 4% de la glucosa original (Tabla 6). En los experimentos posteriores, los eritrocitos se lavaron una cuarta vez para reducir a cero su contenido de glucosa.

La D-glucosa disuelta en solución isotónica de fosfatos estimuló notablemente a la actividad alcalina NADasa de los eritrocitos lavados de sangre humana almacenada; sin embargo, en este experimento en particular, el incremento sólo alcanzó el 71% del provocado por el extracto térmico y el 50% del causado por el plasma. Por otra parte, la glucosa no modificó la actividad ácida de esta enzima (Tabla 7).

Al someter el extracto térmico plasmático a diálisis utilizando un tubo de celulosa con poro que retiene compuestos de pesos moleculares mayores de 3500 (Thomas Scientific, p.440/1991-1992), se observó que la concentración de glucosa disminuyó de 336 mg a 15 mg por decilitro de extracto térmico, aproximadamente un 96%. El incremento de la actividad específica alcalina NADasa provocado por el extracto térmico dializado sólo fue 43% del obtenido con el extracto sin dializar. Por otra parte, con el mismo extracto térmico dializado, pero con la concentración de glucosa restaurada a 424 mg/dl, el incremento aunque fue mayor que con el extracto dializado, sólo alcanzó el 53% del obtenido con el extracto antes de la diálisis (Tabla 8).

El estudio del efecto de concentraciones progresivamente crecientes de D-glucosa sobre la actividad específica alcalina NADasa y su comparación con el efecto de volúmenes progresivos de extracto térmico que también contiene

Tabla 6. Pérdida de glucosa al ser lavados los eritrocitos de sangre almacenada utilizando soluciones isosmóticas de fosfatos o de cloruro de sodio

Solución usada	Número de lavados	Glucosa (mg/dl)		Solución usada	Número de lavados	Glucosa (mg/dl)	
		Eritrocitos	Sb *			Eritrocitos	Sb *
F o s f a t o s	0	437	480	N a C l	0	440	470
	1	170	165		1	160	158
	2	47	50		2	48	52
	3	19	12		3	18	14

* Sb, significa sobrenadante y se refiere a plasma en el renglón 1 y al líquido obtenido después de lavar los eritrocitos.

Datos de uno de dos experimentos similares.

Tabla 7. Efecto de la D-glucosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada

Medio de suspensión de los eritrocitos lavados	Glucosa en la mezcla de incubación (mg/dl)	N A D a s a				Incremento de la actividad específica alcalina
		Medio ácido		Medio alcalino		
		pH	Actividad específica	pH	Actividad específica	
Fosfatos	-	6.65	12.4	7.78	12.9	0
D-glucosa*	125	6.54	14.0	7.75	26.2	13.3
Extracto térmico	125	6.54	13.1	7.82	31.6	18.7
Plasma	121	6.55	12.2	7.80	38.9	26

*La solución de los azúcares o sus derivados se hizo en mezcla isotónica de fosfatos para todos los experimentos.

La raya (-) significa que no se hicieron determinaciones analíticas.

Tabla 8. Respuesta de la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada al extracto térmico diálizado*

Medios de suspensión de los eritrocitos lavados	Glucosa en la mezcla de incubación (mg/dl) (mM)		N A D a s a				Incremento de la actividad específica alcalina
			Medio ácido		Medio alcalino		
			pH	Actividad específica	pH	Actividad específica	
Fosfatos	4.8**	0.27	6.70	18.5	7.83	22.5	-
D-glucosa	96	5.3	6.70	20.0	7.82	29.1	6.6
Extracto térmico completo	84	4.7	6.64	21.1	7.98	38.8	16.3
diálizado	3.8	0.21	6.57	22.2	7.93	29.5	7.0
diálizado + glucosa	106	5.9	6.60	19.1	7.95	31.2	8.7

* Se utilizó una membrana que retiene compuestos de pesos moleculares mayores de 3500.

** Los eritrocitos lavados contribuyeron en este experimento con 4.8 mg de glucosa por decilitro de mezcla de incubación.

Datos de uno de dos experimentos similares.

glucosa, se hizo en tres experimentos. En el primero, se estudió el efecto de las bajas concentraciones de soluciones puras de D-glucosa, de 1.5 a 12 mg/dl de mezcla de reacción (Tabla 9); en el segundo, el efecto de concentraciones altas de D-glucosa en solución pura, de 20 a 135 mg/dl (Tabla 10) y en el tercero, las concentraciones de 17.2 a 129 mg/dl de glucosa pero presente en el extracto térmico (Tabla 11). Como tanto los eritrocitos como el extracto térmico provinieron de diferentes donadores, en cada uno de los tres experimentos, los valores obtenidos en los dos últimos experimentos se refieren al valor encontrado con los eritrocitos resuspendidos en solución de fosfatos en el primer experimento (Cuadro sinóptico 1).

Los eritrocitos consumieron glucosa durante los 15 min de incubación a 37°C. En las concentraciones menores de glucosa el consumo de este azúcar fue menor que en las concentraciones mayores (Tabla 9); en estas últimas, la cifra fue constante, alrededor de 3 mg/dl, 15 min. La solución pura de D-glucosa no incrementa la actividad ácida NADasa (Tabla 10).

La respuesta de la NADasa alcalina de los eritrocitos a la D-glucosa pura se observó desde la concentración más baja que se usó y casi se alcanzó el máximo incremento con la segunda concentración (3 mg/dl de mezcla de reacción). En cambio, el extracto térmico, valorado para esta comparación por su contenido de glucosa, activó progresivamente a la NADasa en el medio de incubación alcalino; de manera que la gráfica de los valores obtenidos semeja una hipérbola. A muy bajas concentraciones de glucosa, menores de 5 mg/dl de mezcla de reacción, la solución de D-glucosa pura incrementó más la actividad que el extracto térmico conteniendo este mismo nivel de glucosa. A partir de 8 mg de glucosa por decilitro de mezcla de reacción, la respuesta de la NADasa alcalina de los eritrocitos humanos al extracto térmico plasmático fue mayor que a la solución de D-glucosa pura y a la concentración de 130 mg/dl, la respuesta a la solución pura de D-glucosa fue apenas el 53% de la obtenida con el extracto térmico (Fig. 3).

Al examinar los datos obtenidos con eritrocitos y extracto térmico de diferentes donadores (Cuadro sinóptico 2), se observa que una concentración prácticamente igual de glucosa, p. ej. de 100 a 113 mg/dl, no produjo el mismo incremento en la actividad alcalina NADasa de los diferentes eritrocitos, varió de 7.6 a 14 nmol de NAD

Tabla 9. Respuesta de la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada a la D-glucosa a bajas concentraciones y consumo de este monosacárido en el medio alcalino

Medios de suspensión de los eritrocitos	Glucosa en la mezcla de incubación			Consumo (mg/dl, 15 min)	NADasa	
	Concentración (mg/dl)				Medio alcalino pH	Actividad específica
	Valor nominal	Valores del análisis Inicial Final				
Fosfatos	-	-	-	-	7.82	22.3
D-glucosa	1.5	1.4	1.1	0.3	7.83	27.5
	3.0	3.2	0.7	2.5	7.84	30.8
	6.0	6.8	3.8	3.0	7.83	30.5
	9.0	9.7	6.6	3.1	7.82	29.5
	12.0	12.8	9.7	3.1	7.83	30.5

La D-glucosa se disolvió en la solución del NAD y por lo mismo se añadió al tiempo cero de incubación y la incubación se hizo durante 15 min.

Tabla 10. Respuesta de la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada incubados con D-glucosa a altas concentraciones

Medios de suspensión de los eritrocitos lavados	Glucosa en la mezcla de incubación (mg/dl) Valor inicial nominal	N A D a s a			
		Medio ácido		Medio alcalino	
		Actividad específica		Actividad específica	
		pH		pH	
Fosfatos	-	6.62	22.2	7.80	20.3
D - glucosa	20	6.62	19.8	7.79	29.1
	41	6.63	19.3	7.78	29.6
	135	6.63	20.1	7.76	30.4
Plasma	108*	6.53	20.0	7.90	34.9

La D-glucosa se añadió donde la preincubación que fue de 10 min y la incubación se hizo durante 30 min más.

* Este valor se determinó experimentalmente.

Datos de uno de dos experimentos similares.

Tabla 11. Respuesta de la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada incubados con diferentes volúmenes de extracto térmico expresados como concentración de la glucosa que contienen

Medios de suspensión de los eritrocitos lavados	Glucosa en la mezcla de incubación (mg/dl)		N A D a s a			
	Valor inicial medido	Valor final calculado*	Medio ácido		Medio alcalino	
			pH	Actividad específica	pH	Actividad específica
Posfatos	-	-	6.69	21.2	7.83	17.4
Extracto térmico	17.2	14.2	6.69	19.7	7.86	30.2
	43.0	40.0	6.68	19.2	7.87	33.1
	64.5	61.5	6.65	18.9	7.88	36.0
	129.0	126.0	6.58	20.2	7.92	34.6

*Se tomó en cuenta que los eritrocitos en las condiciones de incubación usadas consumen 0.2 mg de glucosa por decilitro de mezcla de incubación, por minuto (Tabla 7).

Datos de uno de varios experimentos similares.

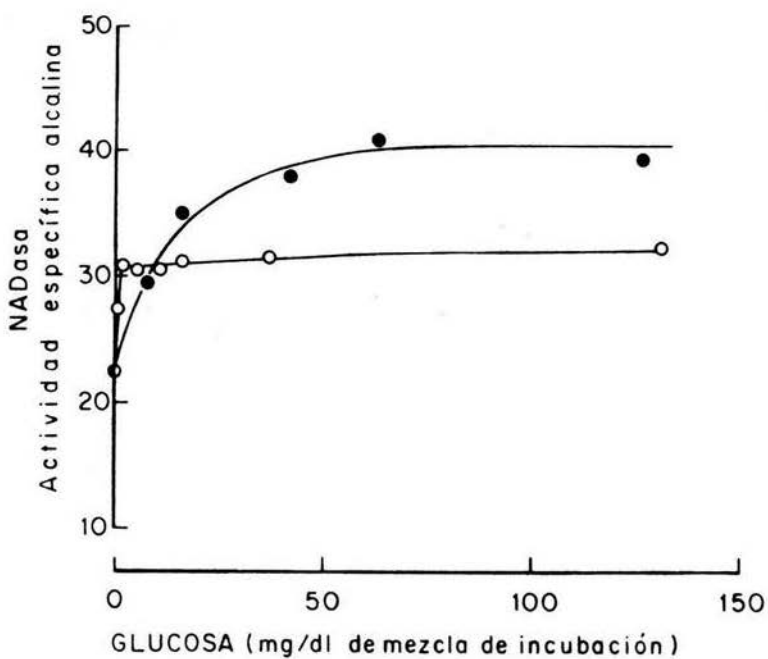


Fig. 3. Efecto de la concentración de glucosa en el extracto térmico (●) y en una solución pura de glucosa (○) sobre la actividad NADasa a pH alcalino. Los valores de la actividad específica se expresan como los nanomoles de NAD consumido por minuto en un mililitro de eritrocitos

Cuadro sinóptico 1. Efecto de la concentración de glucosa en la mezcla de incubación sobre la actividad específica alcalina de la NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada y resuspendidos en diluciones de D-glucosa y de extracto térmico respectivamente

Glucosa Concentración promedio en la mezcla de incubación (mg/dl) [*]	NADasa Actividad específica alcalina ^{**}		
	Medio con fosfatos	Medios con glucosa	Medios con extracto térmico
0	22.3		
1.25		27.5	
1.95		30.8	
5.3		30.5	
8.15		29.5	
10.9		30.5	
16.0		31.1	
37.0		31.6	
131		32.4	
15.7			35.1
41.5			38.0
63.0			40.9
127.5			39.5

Los datos de esta tabla fueron calculados de los valores que aparecen en las tablas 7, 8 y 9.

^{*}Las concentraciones de glucosa son las que se calculó que existían a la mitad del tiempo de incubación.

^{**}Los valores de la actividad NADasa de las Tablas 10 y 11 se refirieron, como los de la Tabla 9, al valor mencionado en esta última Tabla cuando los eritrocitos estuvieron resuspendidos en solución de fosfatos (22.3 nmol de NAD degradado por minuto y por mililitro de eritrocitos).

Datos de uno de dos experimentos similares.

Cuadro sinóptico 2. Contribución porcentual de la D-glucosa al incremento de la actividad específica alcalina NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada extraída de diversos donadores y resuspendidos en diferentes preparaciones de extracto térmico

Preparación de eritrocitos [†]	Glucosa en la mezcla de incubación (mg/dl)	N A D a s a		Activación porcentual	
		Incremento de la actividad específica alcalina ^{**}		debida a la glucosa ^{**}	debida a otros componentes del extracto
		Medio con glucosa	Medio con extracto térmico		
17	77	5.9	10.6	56	44
6	96	6.6	16.3	40	60
16	100	7.6	18.7	41	59
14	110	11.3	15.5	73	27
13	110	14.0	19.2	73	27
11	112	13.8	23.2	59	41
15	113	8.4	18.6	45	55
5	125	13.3	18.7	70	29
Fig.1	130	9.7	18.3	53	47

[†]Datos tomados de las tablas mencionados en esta columna.

^{**}Se refiere al aumento de la actividad alcalina con respecto al valor encontrado en la preparación correspondiente de eritrocitos resuspendidos en la solución isotónica de fosfatos.

^{***}Valores referidos al extracto térmico tomado como 100 % en cada incubación.

degradado/min,ml de eritrocitos. Además, si este incremento, causado por la glucosa, se relaciona con el provocado por el extracto térmico, el porcentaje también resultó muy variable, de 41 a 73%. En otras palabras, por el momento no es factible predecir la cuantía del incremento de la NADasa alcalina que causará una concentración conocida de glucosa en eritrocitos lavados de sangre de diferentes donadores y tampoco el porcentaje en que este azúcar contribuirá en la respuesta causada por el extracto térmico.

Los siguientes azúcares y algunos de sus derivados no modificaron la actividad específica de la NADasa de los eritrocitos lavados de sangre humana almacenada, tanto en el medio ácido como en el alcalino: L-glucosa, D-glucosamina, D-2-desoxiglucosa, D-ribosa, D-fucosa, D-glucosa 6-fosfato, lactosa, sacarosa, maltosa, D-manosa y D-galactosa (Tablas 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19); en cambio la D-fructosa incrementó la actividad NADasa alcalina en un 53% en relación con el aumento causado por la D-glucosa (Tabla 12) (Cuadro sinóptico 3).

Los eritrocitos de sangre recién extraída que sin lavar fueron vistos con el microscopio electrónico de transmisión presentaron perfil bicóncavo y el conjunto de ellos apareció homogéneo en cuanto a la forma, tamaño y densidad electrónica de las células (Fig. 4). En la preparación de eritrocitos lavados de sangre recién extraída, la población fue heterogénea por la diversidad de formas, tamaño y densidad electrónica, aunque conservaron la tendencia al perfil discoide (Fig 5).

Los eritrocitos de sangre almacenada que sin lavar se estudiaron con en el microscopio electrónico aparecieron de perfil circular y con digitaciones, heterogéneos en forma y tamaño y de notable densidad electrónica; inclusive se ven fragmentos de células (Fig. 6).

Muchos de los eritrocitos de sangre almacenada después de que se lavaron disminuyeron de tamaño, se alargaron y tendieron a mostrar nuevamente perfil bicóncavo; mientras en otros persistió el perfil circular; la densidad a los electrones continuó siendo notablemente alta a pesar de los cambios mencionados (Fig. 7).

Tabla 12. Efecto de la D-fructosa y de la D-2-desoxiglucosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada

Medios de suspensión de los eritrocitos lavados	Concentración del azúcar en la mezcla de incubación (mg/dl) (mM)		N A D a s a				Incremento de la actividad específica alcalina
			Medio ácido		Medios alcalino		
			pH	Actividad específica	pH	Actividad específica	
Fosfatos	-	-	6.66	20.5	7.82	17.6	
D-glucosa	112	6.2	6.69	17.6	7.80	31.4	13.8
D-fructosa	112	6.2	6.66	18.0	7.78	24.9	7.3
D-2-desoxi-glucosa	112	6.8	6.66	18.7	7.81	18.7	1.1
Extracto térmico (glucosa)	112	6.2	6.56	20.4	7.89	40.8	23.2

Datos de uno de dos experimentos similares.

Tabla 13. Efecto de la D-glucosamina sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada

Medios suspensión de los eritrocitos lavados	Concentración del azúcar en la mezcla incubacion (mg/dl) (mM)		N A D a s a			
			Medio ácido		Medio alcalino	
			pH	Actividad específica	pH	Actividad específica
D-glucosamina monoclorhidrato	167	7.8	6.55	16.5	7.87	13.1
Plasma (glucosa)	-	-	6.57	17.7	7.84	31.1

Datos de uno de dos experimentos similares.

Tabla 14. Efecto de la L-glucosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada

Medios de suspensión de los eritrocitos lavados	Concentración del azúcar la mezcla de incubación (mg/dl) (mM)		N A D a s a				Incremento de la actividad específica alcalina
			Medio ácido		Medio alcalino		
			pH	Actividad específica	pH	Actividad específica	
Fosfatos	-	-	6.70	17.3	7.85	19.2	
D-glucosa	110	6.1	6.69	18.8	7.83	33.2	14
L-glucosa	112	6.2	6.70	17.3	7.86	16.1	-3
Extracto térmico (glucosa)	112	6.2	6.58	15.3	7.98	38.4	19.2

Datos de uno de dos experimentos similares.

Tabla 15. Efecto de la D-ribosa y de la D-fucosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada

Medios de suspensión de los eritrocitos lavados	Concentración del azúcar en la mezcla de incubación (mg/dl) (mM)		N A D a s a				Incremento de la actividad específica alcalina
			Medio ácido		Medio alcalino		
			pH	Actividad específica	pH	Actividad específica	
Fosfatos	-	-	6.68	19.5	7.80	22.7	
D-glucosa	110	6.1	6.68	24.3	7.80	34.0	11.3
D-ribosa	93	6.2	6.68	22.2	7.81	23.3	0.6
D-fucosa	102	6.2	6.68	21.2	7.82	14.3	-8.4
Extracto térmico (glucosa)	112	6.2	6.57	21.6	7.91	38.2	15.5

Tabla 16. Efecto de la D-glucosa 6-fosfato y de la lactosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada

Medios de suspensión de los eritrocitos lavados	Concentración del azúcar en la mezcla de incubación (mg/dl) (mM)		N A D a s a				Incremento de la actividad específica alcalina
			Medio ácido		Medio alcalino		
			pH	Actividad específica	pH	Actividad específica	
Fosfatos [*]	3.6	0.2	6.65	26.2	7.78	26.2	
D-glucosa	113	6.3	6.64	28.2	7.76	34.4	8.2
D-glucosa 6-P	86.5	6.5	6.66	28.0	7.76	26.7	0.5
Lactosa	233	6.5	6.66	26.7	7.78	21.5	-4.7
Extracto térmico (glucosa)	117	6.5	6.55	27.3	7.89	44.9	18.7

^{*} Los eritrocitos lavados contribuyeron en este experimento con 3.6 mg de glucosa por decilitro de mezcla incubación.

Tabla 17. Efecto de la sacarosa y la maltosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada

Medios de suspensión de los eritrocitos lavados	Concentración del azúcar en la mezcla de incubación (mg/dl) (mM)		N A D a s a				Incremento de la actividad específica alcalina
			Medio ácido		Medio alcalino		
			pH	Actividad específica	pH	Actividad específica	
Fosfatos	-	-	6.68	15.7	7.83	16.6	
D-glucosa	100	5.5	6.68	17.1	7.83	24.2	7.6
Sacarosa	190	5.6	6.68	16.8	7.82	17.3	0.7
Maltosa [*]	200	5.8	6.67	16.4	7.84	19.4	2.8
Extracto térmico (glucosa)	100	5.5	6.59	16.0	8.00	35.3	18.7

^{*}La maltosa utilizada no estaba libre de glucosa y la concentración de ésta fue de 0.33 mg por decilitro de mezcla de incubación (0.018 mM).

Tabla 18. Efecto de la D-manosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada

Medios de suspensión de los eritrocitos lavados	Concentración del azúcar en la mezcla incubación (mg/dl) (mM)		N A D a s a				Incremento de la actividad específica alcalina
			Medio ácido		Medio alcalino		
			pH	Actividad específica	pH	Actividad específica	
Fosfatos	-	-	6.71	21.6	7.83	21.4	
D-glucosa	77	4.3	6.71	19.4	7.81	27.3	5.9
D-manosa	77	4.3	6.71	22.4	7.85	22.2	0.8
Extracto térmico (glucosa)	77	4.3	6.64	20.5	7.98	32.0	10.6

Tabla 19. Efecto de la D-galactosa sobre la actividad NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada.

Medios de suspensión de los eritrocitos lavados	Concentración del azúcar en la mezcla de incubación (mg/dl) (mM)		N A D a s a				Incremento de la actividad específica alcalina
			Medio ácido		Medio alcalino		
			pH	Actividad específica	pH	Actividad específica	
Fosfatos	-	-	6.68	8.67	7.77	8.74	
D-galactosa	77	4.3	6.68	9.24	7.78	8.85	0.11
Extracto térmico (glucosa)	77	4.3	6.57	8.26	7.91	14.25	5.51

Cuadro sinóptico 3. Efecto de diversos azúcares y sus derivados sobre la actividad específica alcalina de la NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados de sangre almacenada

Azúcar	Activación relativa
D-glucosa	100
D-fructosa	50
L-glucosa; D-manosa; D-galactosa; 2-D-desoxiglucosa; 2-D-glucosamina; D-glucosa 6-fosfato; D-ribosa; D-fucosa; maltosa; lactosa; sacarosa	0

Datos tomados de las tablas 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

Figura 4. Eritrocitos de sangre recién extraída sin lavar

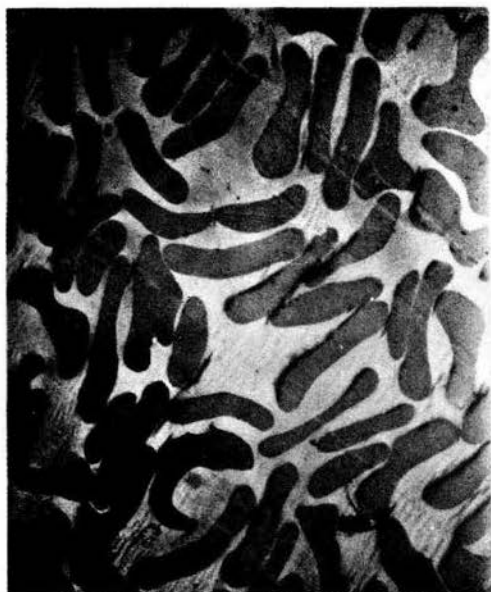


Foto 1.(x2500) Bar = 2 μ m

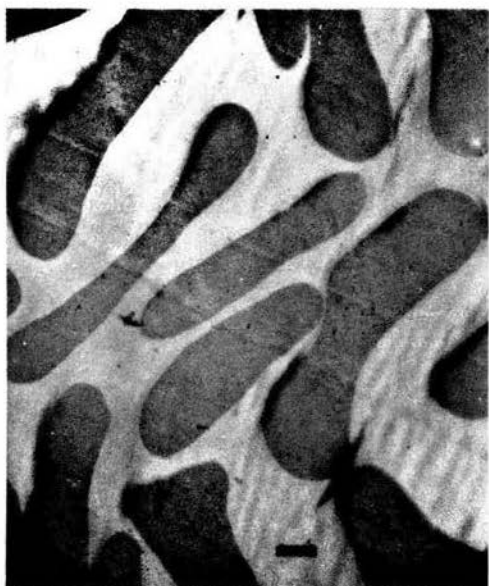


Foto 2.(x 600) Bar 1 μ m

Figura 5. Eritrocitos de sangre recién extraída lavados

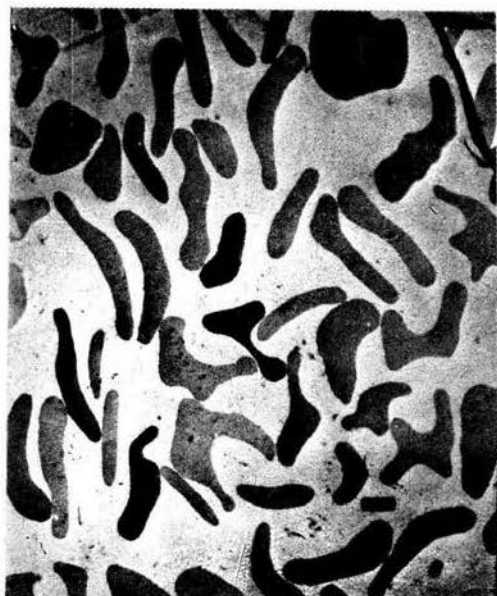


Foto 3. (x 2500) Bar = 2 μ m

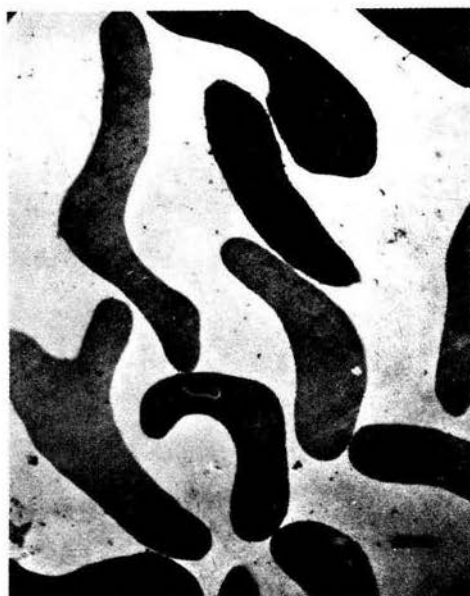


Foto 4. (x 6000) Bar = 1 μ m

Figura 6. Eritrocitos de sangre almacenada sin lavar



Foto 5. (x 2500) Bar = 2 μ m

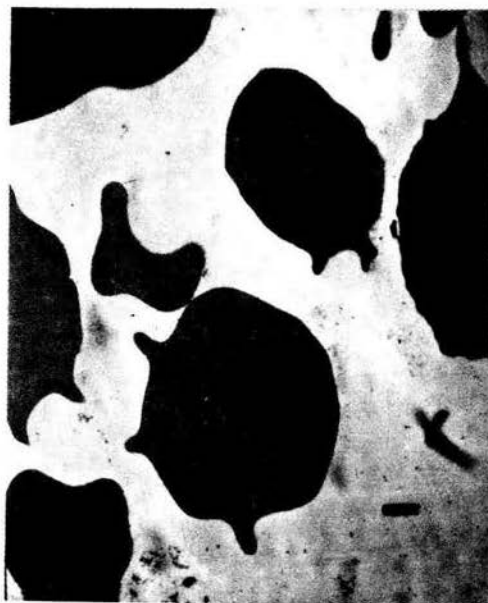


Foto 6. (x 6000) Bar 1 μ m

Figura 7. Eritrocitos de sangre almacenada lavados



Foto 7. (x 2500) Bar = 2 μ m



Foto 8. (x 6000) Bar = 1 μ m

DISCUSION

La enzima NAD glicohidrolasa que se encuentra en la membrana del eritrocito humano tiene su sitio activo orientado hacia el exterior (Alivisatos y Denstedt, 1951). Esto explica que la enzima catalice solamente la hidrólisis del NAD del medio en que se encuentren los eritrocitos y no la del NAD contenido dentro de ellos. Consecuentemente, el sustrato exógeno llega al sitio activo de la enzima sin mediar el paso a través de membranas y quizá ocurre lo mismo con los compuestos que la activan o la inhiben.

Trabajos anteriores de nuestro laboratorio demostraron que la sangre humana recién extraída al ser incubada en un medio alcalino (pH 7.9) tuvo mayor actividad NADasa que cuando fue incubada en un medio ácido (pH 6.5) (Mendez, 1985). Por su parte, los eritrocitos lavados de sangre recién extraída mostraron, cuando fueron incubados en ausencia de plasma, esto es, resuspendidos en solución isotónica de fosfatos, una sola región de actividad máxima, la correspondiente al pH ácido. Al pH alcalino de 7.9 la actividad NADasa fue menor, o cuando mucho igual, que al pH ácido. Y sólo resultó mayor cuando los eritrocitos fueron incubados en el medio alcalino, pero en presencia de plasma (Méndez, 1985; Urbán, 1989).

También se demostró en el laboratorio que la actividad alcalina NADasa en la sangre después de estar almacenada alrededor de dos semanas, a 4 grados C, fue notablemente menor que en la sangre recién extraída; mientras que la actividad medida en el medio ácido no se modificó significativamente (Urbán 1989). Cuando los ensayos se hicieron en los eritrocitos lavados de la sangre almacenada, no se encontraron diferencias con los eritrocitos lavados de sangre recién extraída, resuspendidos en ambos casos en solución isotónica de fosfatos, (Urbán, 1989).

Prischer et al. (1973) no hicieron estudios comparativos con la sangre completa recién extraída y con la almacenada; por lo cual no observaron la diferencia mencionada en el párrafo anterior que nosotros sí detectamos. Sus estudios los realizaron con eritrocitos lavados de sangre humana recién extraída y con

eritrocitos lavados de sangre almacenada, en ambos casos incubados en amortiguador de fosfatos. Nuestros resultados son semejantes a los obtenidos por estos investigadores, ya que ellos no encontraron diferencias significativas en la actividad NADPasa que midieron a pH 7.4, en estas preparaciones de eritrocitos. Previamente habían demostrado que en los eritrocitos humanos la actividad NADasa y la actividad NADPasa radican en una sola enzima.

En el presente trabajo lo que nos interesó fue la mayor actividad de la enzima NADasa de los eritrocitos humanos a pH alcalino en presencia de plasma y como este comportamiento fue semejante en eritrocitos lavados de sangre recién extraída y en eritrocitos lavados de sangre almacenada (Urbán, 1989), nosotros utilizamos estos últimos, ya que el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez nos estuvo donando la sangre que su banco descartaba por no ser útil para usos clínicos.

Por otra parte, en lugar del plasma sanguíneo empleamos la preparación que llamamos extracto térmico porque, aunque produjo solamente el 85% del incremento de la actividad NADasa alcalina causado por plasma original, tiene la ventaja de que el material proteico es sólo el 3% del contenido en el plasma y la concentración de glucosa es la misma en uno y en otro.

Algunos investigadores utilizan solución de NaCl 0.15 M (Jain, 1989) o 0.162 M (Frischer et al., 1973) para lavar los eritrocitos de sangre humana y otros usan amortiguador idealmente isotónico de fosfatos de sodio (Dodge et al., 1963). Nuestros resultados demostraron que con la solución lavadora, tanto de NaCl como de fosfatos, se logró que los eritrocitos de la sangre almacenada perdieran, en la misma proporción en cada lavado, la glucosa que contenían y al final del cuarto lavado quedaron totalmente libres de este azúcar. Sin embargo, en contraste con la pérdida de glucosa que se logró al lavarlos con cualquiera de las dos soluciones, el incremento de la actividad alcalina NADasa causado por el extracto térmico sólo fue aumentando en los eritrocitos que fueron lavados con la solución de fosfatos y no en los lavados con solución de NaCl. (Los eritrocitos lavados con una u otra de las soluciones fueron incubados, para medir su actividad NADasa alcalina,

siempre en amortiguador de fosfatos de sodio 0.1 M y en presencia de extracto térmico.) Al final del tercer lavado, el incremento de la actividad alcalina NADasa provocado por el extracto térmico fue notablemente mayor en los lavados con fosfatos que en los lavados con la solución de NaCl. En estos últimos, el pequeño incremento de la actividad alcalina NADasa observado después de el primer lavado no se modificó con los lavados posteriores. Por el momento, no tenemos explicación para esta diferencia.

Al someter a diálisis al extracto térmico (15 ml contra nueve cambios de un litro de solución 0.005 M de fosfatos, a pH 7.6, en el cuarto frío) se redujeron la concentración de glucosa de 398 a 0 miligramos por decilitro, la de proteínas de 2.4 a 1.7 mg/ml y la capacidad para incrementar la actividad alcalina NADasa de 100 a 57% o sea que sólo conservó el 43% de esta capacidad. Al restituirle al extracto térmico dializado su concentración original de D-glucosa, aumentó el incremento sobre la actividad alcalina NADasa; pero, a pesar de la presencia de glucosa, este incremento fue menor que el observado con el extracto antes de dializarlo. Esto sugiere que posiblemente el extracto térmico contiene dos grupos de compuestos que actúan sobre la NADasa alcalina: uno, de los que no salieron del tubo dializador, o sea, que tienen pesos moleculares mayores de 3,500; y otro, de los que sí atravesaron la membrana, esto es, que tienen pesos menores de 3,500. Entre estos últimos figuran, además de la glucosa, otros compuestos aún no identificados, ya que la adición de glucosa al extracto retenido por la membrana, no fue suficiente para restaurar la capacidad que éste tenía para incrementar la actividad alcalina NADasa de los eritrocitos.

Por otra parte, el incremento de la actividad alcalina NADasa de los eritrocitos provocado por el extracto dializado, reconstituido con su concentración original de glucosa, fue menor que la suma de los incrementos obtenidos al incubar separadamente, por una parte a los eritrocitos resuspendidos en glucosa y por otra a los resuspendidos en extracto dializado (en dos experimentos el incremento fue 25 y 36 % menor que la suma de los incrementos obtenidos en las condiciones mencionadas). Esto indica que el incremento causado por la glucosa, no se sumó aritméticamente al causado por los otros componentes del plasma de pesos moleculares mayores de 3,500, presentes en el extracto dializado. Con los datos hasta ahora obtenidos no podemos explicar esta observación.

La actividad NADasa de los eritrocitos en el medio ácido fue prácticamente igual en presencia del extracto antes y después de dializarlo e igual a su vez a la observada en ausencia de extracto. Esto comprueba que el extracto térmico sólo modifica la actividad alcalina NADasa y no la ácida.

Los componentes plasmáticos de pesos moleculares mayores de 3,500 que incrementan la actividad alcalina NADasa probablemente son péptidos y los de pesos menores son, además de la D-glucosa, péptidos pequeños o compuestos nitrogenados no proteicos. Experimentalmente, en trabajos anteriores de nuestro laboratorio, se han descartado a los lípidos y a los iones inorgánicos del plasma; así como a la mayor parte de los L-aminoácidos (Urbán, 1989).

En vista de que el extracto térmico activa a la NADasa alcalina casi tanto como el plasma original, podemos suponer que la mayor parte de los posibles péptidos involucrados, tanto aquéllos de pesos moleculares mayores como los menores de 3,500, no fueron modificados por el calentamiento del plasma a la temperatura de ebullición del agua. Esto posiblemente significa que los supuestos péptidos son ricos en carbohidratos y no se desnaturalizaron, o que su desnaturalización fue reversible (fenómeno de renaturalización) (Oser, 1965; pág. 186-187). La pepsina, por ejemplo, si es calentada a una cierta temperatura puede ser desnaturalizada y perder sus propiedades proteolíticas; las cuales recobra al ser enfriada en solución (Oser, 1965; pág. 186-187). En general es excepcional que la renaturalización resulte en la restauración completa de la proteína desnaturalizada (Oser, 1965; pág. 187), por lo que, nosotros pensamos que es más probable que el calentamiento del plasma, en las condiciones en que se realizó, no desnaturalice a los supuestos péptidos que incrementan a la actividad alcalina NADasa de los eritrocitos.

El grado de activación de la NADasa alcalina de los eritrocitos provocado por el plasma o el extracto térmico, fue variable entre los diferentes donadores de sangre, esto es, dependió tanto del donador de eritrocitos como del donador de plasma (Urbán, 1989). Por otra parte, aun cuando algunos de los extractos térmicos tuvieron la misma concentración de glucosa, la cuantía del incremento de la actividad alcalina NADasa no fue la misma en

las preparaciones de eritrocitos de diferentes personas.

Soluciones puras de D-glucosa de igual concentración no provocaron un incremento semejante de la actividad de la actividad alcalina NADasa en preparaciones de eritrocitos de diferentes donadores y, además, dichos incrementos en cada caso no siempre fueron porcentualmente los mismos con respecto al causado por el extracto térmico, ya que variaron entre el 40 y el 75% del provocado por este último.

La respuesta de la actividad alcalina NADasa de los eritrocitos lavados exhaustivamente, y por lo mismo desprovistos de glucosa, a concentraciones progresivamente crecientes de D-glucosa fue del tipo "todo o nada" o sea que la respuesta tuvo un umbral definido de concentración. El incremento máximo se alcanzó, en el experimento particular que ilustra estos resultados, a partir de la concentración inicial de 3 miligramos de D-glucosa por decilitro de mezcla de incubación. Este incremento se mantuvo casi el mismo, a pesar de que se llegó a tener una concentración inicial de D-glucosa, en la mezcla de incubación, hasta de 42 veces el valor umbral. Este tipo de respuesta revela que la acción de la D-glucosa, por sí sola, no parece representar un factor biológico regulador de la actividad NADasa del eritrocito humano, al menos en las condiciones experimentales que utilizamos.

En contraste con los resultados anteriores, la respuesta de la actividad alcalina NADasa de los eritrocitos a volúmenes crecientes de extracto térmico, que por supuesto contenía glucosa, fue de tipo aparentemente hiperbólico. El incremento máximo se obtuvo con un volumen de extracto térmico que en términos de glucosa equivalió a haber añadido 60 miligramos de glucosa por decilitro de mezcla de incubación. La respuesta al extracto térmico difirió cualitativa y cuantitativamente de la obtenida con la solución de D-glucosa pura. Cualitativamente porque el incremento de la actividad alcalina NADasa en función del volumen de extracto térmico fue de tipo hiperbólico en vez de todo o nada. Esto sugiere que los componentes del plasma, incluyendo en ellos a la glucosa, posiblemente sí puedan ejercer un papel regulador de la actividad alcalina NADasa de los eritrocitos humanos. Cuantitativamente difieren porque, con excepción de los más pequeños volúmenes de extracto

térmico, la respuesta a una cierta concentración de glucosa fue siempre mayor con el extracto térmico, que contiene este azúcar y otros componentes no identificados, que con la solución pura de glucosa. El papel de los componentes del plasma, que no son glucosa, parece ser importante para regular y aumentar la actividad alcalina NADasa de los eritrocitos humanos, siempre que en la glucosa esté presente a una concentración mayor que la umbral.

En el futuro será necesario, primero, identificar la naturaleza de los compuestos del plasma diferentes de la glucosa que participan en la activación de la NADasa alcalina de los eritrocitos y luego, dilucidar si tienen capacidad para incrementar directamente a la NADasa alcalina o lo hacen a través de condicionar el efecto de la glucosa.

En resumen en el presente trabajo demostramos que la glucosa por sí sola activa, aunque sea parcialmente, a la NADasa de la membrana del eritrocito humano cuando el ensayo se hace en el medio de incubación alcalino y esta activación es del tipo todo o nada.

De todos los azúcares y sus derivados ensayados en este trabajo, solamente fueron efectivos la D- glucosa y la D-fructosa. La D-glucosa a concentración milimolar equivalente superó con el doble de efectividad a la D-fructosa, en lo que se refiere al incremento que causó en la actividad alcalina NADasa de los eritrocitos humanos. Se sabe que el 57% de las moléculas de D-fructosa en solución adquieren, en el estado de equilibrio de todas las formas conformacionales posibles, la conformación beta-D-fructopiranos (Doddrell y Allerhand, 1971). Esta conformación de la D-fructosa se parece mucho a la conformación predominante de la D-glucosa, la beta-D-glucopiranos. (La forma beta-D-fructofuranosa que es la que habitualmente se presenta en los tratados de bioquímica no es la conformación más probable de esta cetosa en solución). Por otra parte, la L-glucosa, aun cuando es enantiómero de la D-glucosa, no modificó la actividad de esta enzima.

Más adelante convendrá hacer estudios para establecer el mecanismo molecular a través del cual la D-glucosa

activa a esta enzima.

Es posible que la D-glucosa actúe sobre la NADasa de la membrana de los eritrocitos humanos, expuestos a un medio relativamente alcalino, directamente sobre la molécula enzimática o bien indirectamente a través de la proteína acarreadora de este azúcar o a través de las reacciones de la vía glicolítica o de la vía de las pentosas que ocurren en la matriz del eritrocito.

Con respecto a la primera hipótesis, sabemos de otra enzima, diferente de la NADasa de los eritrocitos humanos, cuya actividad es modificada, en este caso inhibida, por la glucosa. La enzima a la que nos referimos es la glucógeno fosforilasa. Esta fosforilasa existe en dos formas: la forma "a" y la forma "b". La forma "b" es convertida en la forma "a" por fosforilación de los residuos serina-14 en cada una de sus dos subunidades. Esta modificación covalente es catalizada por una enzima específica, la fosforilasa cinasa, descubierta por Edmond H. Fischer y Edwin G. Krebs. (Investigadores que obtuvieron el premio Nobel de Fisiología o medicina en 1992.) La fosforilasa "a" a su vez es convertida a fosforilasa "b" por la acción de una fosfatasa específica, la proteína fosfatasa 1, que cataliza la hidrólisis del grupo fosforilo de la serina-14 de cada una de sus dos subunidades. Consecuentemente, la proporción de las fosforilasas "a" y "b" está determinada fundamentalmente por las velocidades de fosforilación y desfosforilación de este grupo serina. Por otra parte e independientemente del estado de fosforilación, la glucógeno fosforilasa, tanto en su forma "a" como en la "b", puede adoptar una conformación tensa (T) inactiva o una conformación relajada (R) activa. En el caso de la fosforilasa "a", el equilibrio entre las formas T y R es favorable hacia la conformación R; a menos de que el nivel de glucosa en el medio sea alto, en cuyo caso, la reacción se desplaza hacia la forma T. La glucosa causa la inactivación de la fosforilasa "a" porque al unirse al sitio activo de la enzima en su conformación R provoca el cambio a la conformación T. (La unión en el sitio activo de la enzima es en forma diferente a como lo hace el glucógeno que es el sustrato natural.) (Se sabe que la cantidad de fosforilasa "a" activa disminuye rápidamente cuando se trasfunde glucosa al hígado; Stalmans et al., 1974.) La proteína fosfatasa 1, aunque está siempre fuertemente unida a la forma "a" de la fosforilasa, no actúa sobre ella mientras tiene la conformación R. La inactivación causada por la glucosa se debe a que luego que adquiere la conformación T, conversión que,

como se mencionó antes, es favorecida por niveles altos de glucosa, quedan expuestos los grupos fosforilo de la serina-14 en las dos subunidades de la enzima y la fosfatasa ejerce su acción hidrolítica sobre estos grupos. Al ocurrir la pérdida del grupo fosfato de las serinas-14, la fosforilasa "a" de conformación (T) se transforma en fosforilasa "b" también de conformación (T) ambas inactivas. La glucosa tiene otra acción, aunque ésta es indirecta, en relación con el metabolismo del glucógeno y ésta es la de activar a la glucógeno sintetasa. Esta activación ocurre en la siguiente forma: al transformarse la fosforilasa "a" (T) en fosforilasa "b" (T), como se describió antes, se libera la proteína fosfatasa 1, que estaba fuertemente unida a la forma "a" de la fosforilasa, tanto en su forma R como en su forma T, y al quedar libre esta fosfatasa actúa entonces sobre la enzima glucógeno sintetasa y esta última en su forma desfosforilada es más activa que en su forma fosforilada (Stryer, 1988; pag. 459-464; Stalmans et. al., 1974).

Nosotros pensamos, basados en este ejemplo de la glucógeno fosforilasa, que la D-glucosa pudiera unirse alostéricamente a la molécula de la enzima NADasa de la membrana del eritrocito, cuando la enzima tenga la conformación determinada por el medio alcalino y no cuando tenga la determinada por el medio ácido. Ya unida la glucosa a la enzima, este azúcar pudiera favorecer la acción catalítica sobre el NAD, por algún otro cambio en la conformación de esta enzima; además en esta interacción glucosa-NADasa quizá participen algunos péptidos del plasma, todavía no identificados.

Con respecto a la segunda posibilidad mencionada anteriormente, se sabe que los eritrocitos, como sucede en la mayor parte de las células animales, toman la glucosa del medio extracelular, si en éste se encuentra la glucosa a mayor concentración que en el interior de la célula. El transporte de la glucosa a través de la membrana del eritrocito se hace utilizando una proteína acarreadora. Se supone que esta proteína uniporteadora de la glucosa sufre un cambio conformacional reversible durante el proceso de transporte que permite el paso de glucosa del exterior al interior de la célula o viceversa (Alberts et al., 1989; pag. 303-4). Nosotros pensamos que este cambio conformacional del acarreador de la glucosa en el eritrocito pudiera modificar en alguna forma, y simultáneamente al paso de la glucosa, a la conformación alcalina de la NADasa, ya que ésta es una proteína

integrada a la membrana del eritrocito, como lo es también el acarreador de la glucosa, incrementando su actividad catalítica. Además si esto fuera así, virtualmente la NADasa alcalina también incrementaría su actividad durante el lavado de los eritrocitos, porque entonces la glucosa también es transportada, sólo que en el sentido inverso, del interior al exterior de la célula.

La tercera posibilidad merece explorarse, para investigar si es a través del proceso glicolítico o de la vía de las pentosas como la D-glucosa provoca la activación de la NADasa alcalina.

En los eritrocitos hemolizados o en sus fantasmas, a pesar de que en ambos tipos de preparaciones se manifestó esta actividad, el plasma no produjo incremento de la actividad alcalina NADasa (Méndez, 1985; Urbán, 1989). Esto sugiere que, aparentemente, la membrana debe conservar su morfología y su integridad funcional para que se manifieste la activación de esta enzima causada por el plasma y refuerza la idea de que el incremento causado por el plasma, el extracto térmico o la glucosa, involucra cambios conformacionales de la molécula NADasa, ya que este incremento solamente se observó en los eritrocitos que aparentemente no estaban alterados.

Los estudios sobre los cambios morfológicos de los eritrocitos, ocurridos durante el almacenamiento de la sangre, mostrarán que estas células se volvieron esféricas y aumentaron su volumen y sobre todo aumentó su densidad electrónica. En estos eritrocitos la NADasa no respondió a la presencia del extracto térmico. Luego de ser lavados, los eritrocitos disminuyeron de tamaño y tendieron a tomar su forma bicóncava original y aunque no se modificó su alta densidad electrónica, la NADasa si respondió al efecto activador del extracto térmico.

CONCLUSIONES

1. Las actividades específicas de la NAD glicohidrolasa, la ácida, pH óptimo 6.5, y la alcalina pH óptimo 7.9, fueron prácticamente las mismas en los eritrocitos lavados de sangre humana recién extraída y en eritrocitos lavados de sangre almacenada; tanto en ausencia de plasma, valores más bajos, como en presencia de este medio de suspensión, valores más altos.
2. Los eritrocitos lavados de sangre almacenada fueron apropiados para los propósitos de este trabajo; por lo cual, no fue necesario prepararlos de sangre recién extraída.
3. El extracto térmico y el extracto ultrafiltrado, preparaciones semipurificadas obtenidas del plasma, incrementaron la actividad específica alcalina NAD glicohidrolasa de los eritrocitos lavados y no la ácida, tal y como ocurrió cuando se utilizó el plasma.
4. El extracto térmico se utilizó para provocar el incremento de actividad alcalina NADasa de los eritrocitos lavados; porque, aunque estimula un poco menos que el plasma, tiene la ventaja de que la concentración de proteínas sólo es el 3% de la original y la de la glucosa se mantiene la misma.
5. La solución isotónica de fosfatos usada para lavar los eritrocitos resultó mejor que la solución de cloruro de sodio; porque la actividad específica alcalina NADasa de los eritrocitos, ensayada en presencia de extracto térmico, aumentó sucesivamente con cada lavado, mientras que usando la solución de cloruro de sodio se mantuvo la misma a partir del primero y por lo mismo no alcanzó el valor final obtenido con la solución de fosfatos.
6. La concentración de glucosa en los eritrocitos se redujo a cero con cuatro lavados sucesivos, usando la solución de fosfatos o la de cloruro de sodio.

7. La diálisis eliminó del extracto térmico algunos componentes del plasma que incrementaban la actividad específica alcalina de la NADasa de los eritrocitos, entre ellos la D-glucosa; pero también retuvo otros.
8. El incremento de la actividad específica NADasa de los eritrocitos lavados causado por la D-glucosa no se sumó aritméticamente al causado por los otros componentes químicos del plasma retenidos durante la diálisis.
9. La D-glucosa en solución pura incrementó la actividad específica NADasa de los eritrocitos lavados, aunque el aumento fue menor que el causado por un volumen de extracto térmico que contenía la misma concentración de glucosa que la solución pura.
10. El incremento de la actividad alcalina NADasa de los eritrocitos lavados que se obtuvo con concentraciones crecientes de D-glucosa en solución pura, fue del tipo todo o nada, con un umbral de 3 mg de glucosa por decilitro de mezcla de reacción. En cambio, la respuesta a volúmenes crecientes de extracto térmico, que contenían D-glucosa a concentraciones semejantes a las diluciones de la solución pura, fue de tipo aparentemente hiperbólico.
11. El incremento de la actividad específica alcalina NADasa a una misma concentración de D-glucosa, no fue porcentualmente el mismo cuando éste se relacionó con la respuesta provocada por el extracto térmico, en eritrocitos preparados de diferentes donadores.
A su vez, se obtuvo un porcentaje similar de activación de la NADasa usando concentraciones relativamente diferentes de D-glucosa.
12. Ningún otro azúcar de la docena que se probó incrementó la actividad específica alcalina de la NADasa de los eritrocitos, con excepción de la D-fructosa, con la cual, sin embargo, el incremento apenas fue la mitad del observado con la D-glucosa.

13. El lavado de los eritrocitos separados de sangre recién extraída ocasionó cierto grado de polimorfismo de las formas bicóncavas.
14. El almacenamiento de la sangre produjo eritrocitos esféricos y con digitaciones según mostró la muestra analizada antes de los lavados.
15. El lavado de los eritrocitos de sangre almacenada hizo que algunos recobraran la forma bicóncava mientras otros permanecieron esféricos.
16. La D-glucosa por sí sola no parece ser un regulador fisiológico de la actividad alcalina NADasa del eritrocito humano.
17. Los componentes químicos del plasma, que no son glucosa, parece que son los responsables de regular y aumentar la respuesta a la D-glucosa.
18. Se plantea que la D-glucosa actúe directamente sobre la molécula de la NADasa, la cual se encuentra en la superficie externa del eritrocito, o indirectamente a través de la proteína acarreadora de este azúcar o de las reacciones de la vía glicolítica o de la vía de las pentosas.
19. La membrana del eritrocito debe conservar su morfología y su integridad funcional para que se manifieste el incremento de la actividad específica alcalina NADasa causado por el plasma, el extracto térmico o la D-glucosa.
20. Los eritrocitos en la sangre almacenada mostraron cambios morfológicos y en una proporción importante de células estos cambios fueron reversibles con los lavados.

REFERENCIAS

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Ralf, M., Roberts, K, y Watson, J.D. (1989) *Molecular Biology of the Cell*, 2ª edición, Garland Pu., New York.

Alivisatos, S.G.A. y Denstedt, O.F. (1951) Lactic Deshydrogenase and DPNase activity of blood. *Science* 114:281-283.

Beltrán, A. (1981) Cinética de la actividad enzimática NAD glicohidrolasa en la sangre humana. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN, bajo la Dirección del Dr. Edmundo Calva y la M. en C. Rosario Núñez.

Calva, E., Mújica, A., Núñez, R., Aoki, K., Bistení, A., y Sodi-Pallares, D. (1966) Mitochondrial biochemical changes and glucose-KCl-insulin solution in cardiac infarct. *Am. J. Physiol.* 211: 71-76.

Doddrell, D. y Allerhand, A. (1971) Study of Anomeric Equilibria of Ketoses in Water by Natural-Abundance Carbon-13 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance. D-Fructose and D-Turanose. *J. Am Chem. Soc.* 93:2779-2781.

Dodge, U.T., Mitchell, C. y Hanahan, O. J. (1963) The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 100:119-130.

Frischer, H., Nelson, R., Noyes, C., Carson, P. E., Bowman, J. E., Rieckman, K. H. y Ajmar, F. (1973) NAD(P) glycohydrolase deficiency in human erythrocytes and alteration of cytosol NADH-methemoglobin diaphorase by membrane NAD-glycohydrolase activity. *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.* 70:2406-2410.

Goodman, S.I., Wyatt, R.J., Trepel, J. B. y Neckers, L.M. (1982) NAD glycohydrolase: enzyme characterization using intact mammalian erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B:333-336.

Jain, S.K. (1989) Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red cells. *J. Biol. Chem.* 264:21340-21345.

Méndez, G.A. (1985) Algunas características cinéticas de la enzima NAD glicohidrolasa en fantasmas de eritrocitos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. Edmundo Calva y de la Dra. Rosario Núñez.

Núñez, R., Calva, E., Marsch, M., Briones, E: y López-Soriano, F. (1976) NAD glycohydrolase activity in hearts with acute experimental infarction. *Am. J. Physiol.* 231:1173-1177.

Oser, B.L. (1965) *Hawk's Physiological Chemistry*, 14^a edición, McGraw-Hill, New York.

Oyama, V.J. e Eagle, H. (1956) Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-Ciocateu). *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 91:305-307.

Racker, E. (1950) Crystalline alcohol dehydrogenase from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* 184:313-319.

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

Stalmans, W., De Wulf, H., Hue, L., y Hers, H.G. (1974) The sequential inactivation of glycogen phosphorylase and activation of glycogen synthetase in liver after administration of glucose to mice and rats. *Eur. J. Biochem.* 41:127-134.

Strayer, L. (1988) *Biochemistry*, 3ª edición, W.H. Freeman, New York.

Urbán, M.C. (1989) Caracterización de los factores del plasma responsables de la activación de la NAD glicohidrolasa de los glóbulos rojos. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias, UNAM. Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. Edmundo Calva y de la Dra. Rosario Núñez.