

**UNIVERSIDAD MOTOLINIA**

Facultad de Química

---

*Aspectos Cinéticos de  
Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa  
(En Eritrocitos de Rata)*

ESTELA CASTRO AUDELO

MEXICO, D. F.

1 9 6 2



Universidad Nacional  
Autónoma de México

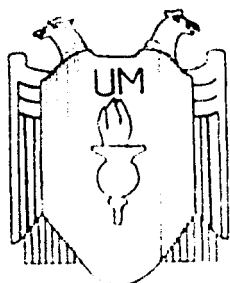


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

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

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

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



**UNIVERSIDAD MOTOLINIA**

Facultad de Química

---

*Aspectos Cinéticos de  
Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa  
(En Eritrocitos de Rata)*

TESIS

que para obtener el título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta:

ESTELA CASTRO AUDELO

MEXICO, D. F.

1 9 6 2

*El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición gracias a la gentileza del Dr. Salvador Zubirán, Director del Instituto, Dr. Guillermo Soberón jefe del Departamento y al Dr. Jesús Torres G. por lo cual hago presente mi agradecimiento por su acertada dirección.*

*Infinitas gracias a Dios.*

*A mis padres con eterno agradecimiento.*

*A mis hermanas.*

*A la Srita. Q. F. B. Evangelina Lee B.  
Por su valiosa colaboración en el presente  
trabajo.*

*A mis compañeras y amigas con  
estimación.*

*A mis maestros y querida escuela  
con cariño y respeto.*



*A mis maestros y querida escuela  
con cariño y respeto.*

Aspectos cinéticos de Glucosa-6-fosfato-Deshidrogenasa (en eritrocitos de rata).

- 1.—Introducción.
- 2.—Material y Métodos.
  - a) Fundamento.
  - b) Procedimiento.
- 3.—Resultados.
- 4.—Discusión.
- 5.—Resumen y Conclusiones.
- 6.—Bibliografía.

## INTRODUCCION

El eritrocito humano, maduro, es una célula que ofrece peculiaridades morfológicas y metabólicas de gran interés. Es en efecto la única célula que carece de partículas subcelulares, es decir, de núcleo, microsomas, mitocondrias y lisosomas; como consecuencia las reacciones enzimáticas localizadas a estos compartimientos celulares están sólo parcialmente presentes (1, 2). El eritrocito como consecuencia exhibe escasa capacidad biosintética y presenta sólo algunas de las enzimas del ciclo de Krebs. El eritrocito, por otra parte, obtiene toda su energía por las reacciones del esquema glicolítico peculiar de que dispone; la particularidad depende de la presencia del ciclo de Rapoport Luebering (3, 4, 5, 6, 7, 8.) que la célula utiliza para destruir el ATP formado en exceso. Todas las enzimas del ciclo colateral de las pentosas están presentes (9, 10, 11, 12, 13.).

Algunas reacciones enzimáticas, son especialmente importantes en el eritrocito y son las conectadas con la función más importante de éste tipo celular, es decir, el transporte del oxígeno por la hemoglobina; estas enzimas son las metahemoglobinas reductasas (14) cuya función es la de reducir la hemoglobina que aunque en cantidades pequeñas se produce de modo continuo. La falla de ésta enzima determina la aparición de la metahemoglobinemia en sus diferentes tipos (15). La glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa están íntimamente relacionadas con la anterior y con las Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, especialmente, en lo que se refiere a la disponibilidad del tri-fosfo-piridin-nucleótido.

Ciertos cofactores son particularmente importantes en el mantenimiento de la integridad celular del eritrocito; en efecto las concentraciones de piridín-nucleótidos, adenosina trifosfato y glutatión van disminuyendo paulatinamente y cuando los dos últimos tipos moleculares alcanzan niveles del 40% de las existencias en el reticulocito, el glóbulo rojo se rompe y esto acontece en el humano, después de una sobre vida de 120-125 días.

Las enzimas del eritrocito se pueden clasificar en tres clases, de acuerdo con su vida media; algunas como la deshidrogenasa láctica y la nucleósido fosforilasa, se clasifican entre las de vida prolongada, ya que su actividad se conserva durante todo el período vital celular; otras disminuyen paulatinamente y su actividad es mínima, en las últimas semanas del eritrocito maduro, tales son, las relaciones al ciclo colateral de las pentosas como la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6 fosfo glucónico deshidrogenasa.

El último grupo, es ejemplificado por todas aquellas enzimas que en el reticulocito se relacionan a procesos biosintéticos, todas estas proteínas desaparecen dentro de la primera semana de vida del eritrocito.

El eritrocito es una célula muy adecuada para realizar estudios de diferente índole por ser una célula fácilmente disponible cuyo aparato enzimático, proteínas estructurales, hemoglobina y cofactores se modifican en múltiples condiciones nutricionales y patológicas.

El estudio de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, nos pareció de especial interés ya que ella cataliza el primer paso del ciclo colateral de las pentosas y su actividad es de primera importancia en el mantenimiento de concentraciones adecuadas de tri-fosfo-piridín- nucleótido reducido, y por consiguiente en la transformación de metahemoglobina a hemoglobina reducida y del glutatien oxidado a glutatión reducido, desempeña por consiguiente un papel primordial en relación al funcionamiento normal y sobre vida del eritrocito.

Es de utilidad correlacionar las modificaciones en la actividad de esta enzima con las diferentes etapas de la vida celular, y tratar de establecer así una mejor relación entre el funcionamiento enzimático y la integridad celular.

## MATERIAL Y METODOS

Se usaron rata Wistar (machos) de 200-300 g. alimentadas con purina.

Los animales fueron anestesiados con éter, se efectuó punción cardíaca y se extrajeron 4-5 ml de sangre por animal, se evitó la coagulación por el uso de heparina (5 ml para el volúmen indicado).

Las células fueron sedimentadas en centrifuga refrigerada a 2000g por 10 minutos el plasma, los glóbulos blancos y las plaquetas fueron eliminadas.

Los glóbulos rojos que constituyen por su mayor densidad la capa inferior fueron lavados tres veces consecutivas con solución isotónica (0.9%) de cloruro de sodio, eliminando en cada ocasión el líquido sobrenadante, la contaminación fue de un leucocito por 20000 eritrocitos.

Los eritrocitos así obtenidos fueron hemolizados con agua destilada a 4°C.

Las diferentes sustancias utilizadas fueron obtenidas de la Nutritional Biochemicals Corporation.

La Glucosa-6-fosfato en la forma de la sal de bario fue convertida a Glucosa-6-fosfato por precipitación del metal, bajo la forma del sulfato de bario como consecuencia de la adición de sulfato de potasio (16).

*Fundamento.*—Los electrones cedidos por la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa son transportados a través de una cadena constituida por el tri-fosfo-piridín-nucleótido, el metil-sulfato de fenazina que funciona como transportador de electrones, y por el 2,6, dicloro indofenol que acepta los electrones para reducirse y transformarse en un compuesto incoloro cuya aparición puede seguirse colorimétricamente (17).

El sistema se incuba durante 10 minutos y los cálculos se verifican en función de la zona correspondiente a la velocidad inicial.

La reacción se inicia por la adición de Glucosa-6-fosfato, la enzima se prehincuba a 37 °C. durante una hora.

Las concentraciones de los reactivos son las siguientes:

Glucosa-6-fosfato 1.66 mM, tri-fosfo-piridín-nucleótido oxidado 166 uM, cloruro de magnesio 16.6 mM, tri-hidroxi metil amino metano 83.5 mM, 2,6 dicloro-indofenol 33.2 uM, metil sulfato de fenazina 13.6 uM.

## RESULTADOS

La actividad enzimática se expresó como u Moles de Tri-fosfo-piridín-nucleótido reducido formado por minuto por ml de glóbulos rojos empacados.

La absorción máxima se obtiene a 605 m $\mu$ , sin embargo, debido a la interferencia de otros componentes del sistema, se prefiere utilizar la longitud de onda de 620 m $\mu$ . El coeficiente de extinción molar fue de  $11.4 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/mola. (Fig. 1).

La reacción enzimática es de orden cero durante los cinco primeros minutos, posteriormente la velocidad disminuye, prácticamente no hay transformación neta más allá de los 10 minutos. (Fig. 2).

La actividad catalítica se conserva sin modificación importante durante 10 días aproximadamente, con hemolizado diluido cuando se refrigera a 4 C. (Fig. 3).

La enzima se satura para dar reacción de orden cero, cuando la concentración de glucosa-6-fosfato es superior a 660 uM y la actividad enzimática es suficiente para liberar alrededor de 36 mmoles de tris-fosfo-piridín nucleótido reducido (TPNH por minuto).

La constante de Michaelis obtenida por el método de las recíprocas es de  $7.75$  a  $9 \times 10^{-7}$  M (Figs. 4 y 5).

El pH óptimo se encuentra entre 7.25 y 7.60. No se efectuaron pruebas para determinar si la disminución de la velocidad a ambos



lados de la zona óptima era debido a cambios en la estabilidad enzimática o a modificaciones en la afinidad o velocidad máxima. (Fig. 6).

La variación de Tri-fosfo-piridín-nucleótido oxidado, resultó en incremento progresivo de la velocidad. La saturación se obtiene cuando la concentración de la coenzima es superior a 100  $\mu\text{M}$ . La constante de Michaelis para la coenzima es de  $12 \times 10^{-6}$  (Fig. 7).

La actividad fue directamente proporcional a la cantidad de enzima hasta 65  $\mu\text{ml}$  de glóbulos rojos empacados; sin embargo este comportamiento fue constante cuando se trabajó con hemolizado dializados, cuando se trabajo con hemolizado directamente se obtuvo inhibición al trabajar con concentraciones altas de enzima.

Cuando a la enzima dializada se le adicionó parte del líquido de diálisis, la inhibición en la actividad se produjo en todos los casos. (Fig. 8).

La curva nos demuestra que la temperatura óptima en las condiciones de nuestro método es de 45  $^{\circ}\text{C}$ , la energía de activación es alrededor de 9000 calorías por mole. (Fig. 9).

La concentración mínima necesaria para transportar, los electrones del tri-fosfo-piridín nucleótido reducido (TPNH) al 2,6, di-cloro-indofenol es de 6  $\mu\text{M}$  (Fig. 10).

La concentración de este aceptor de electrones debe ser entre 10 y 35  $\mu\text{M}$ , a concentraciones superiores se produjo inhibición de cerca del 20%. (Fig. 11).

La preparación dializada tiene menor actividad que la que no ha sido sometida a este procedimiento lo cual sugiere que durante el proceso se elimine un inhibidor (Fig. 12).

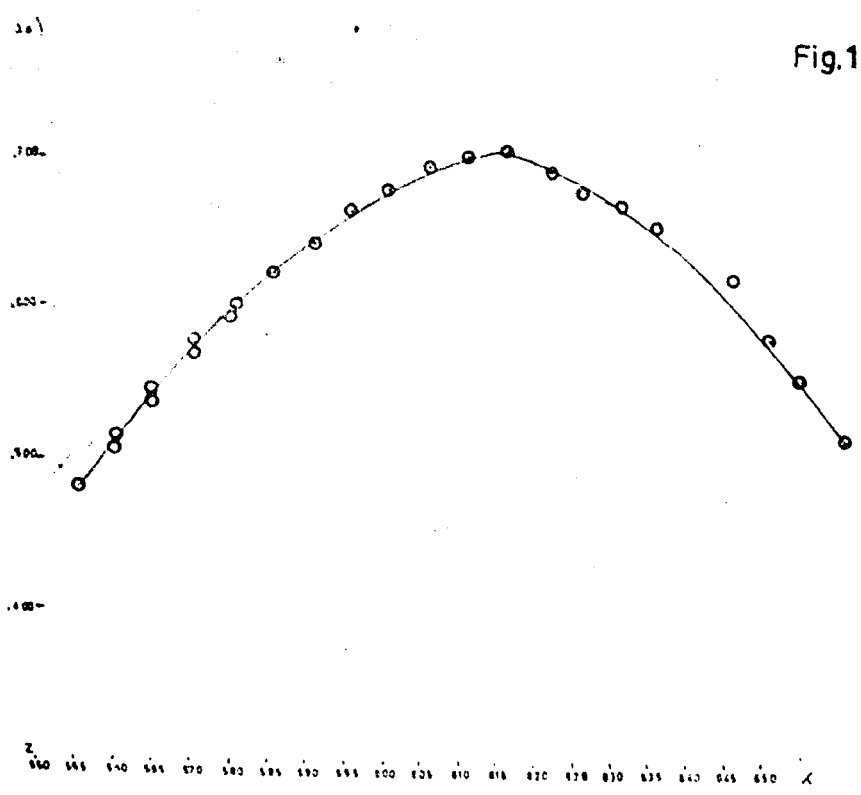


Fig. 1.—ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL 2, 6, DICLORO-INDOFE-NOL. La concentración de la solución estudiada fue de 20 ug. por ml.

Fig. 2

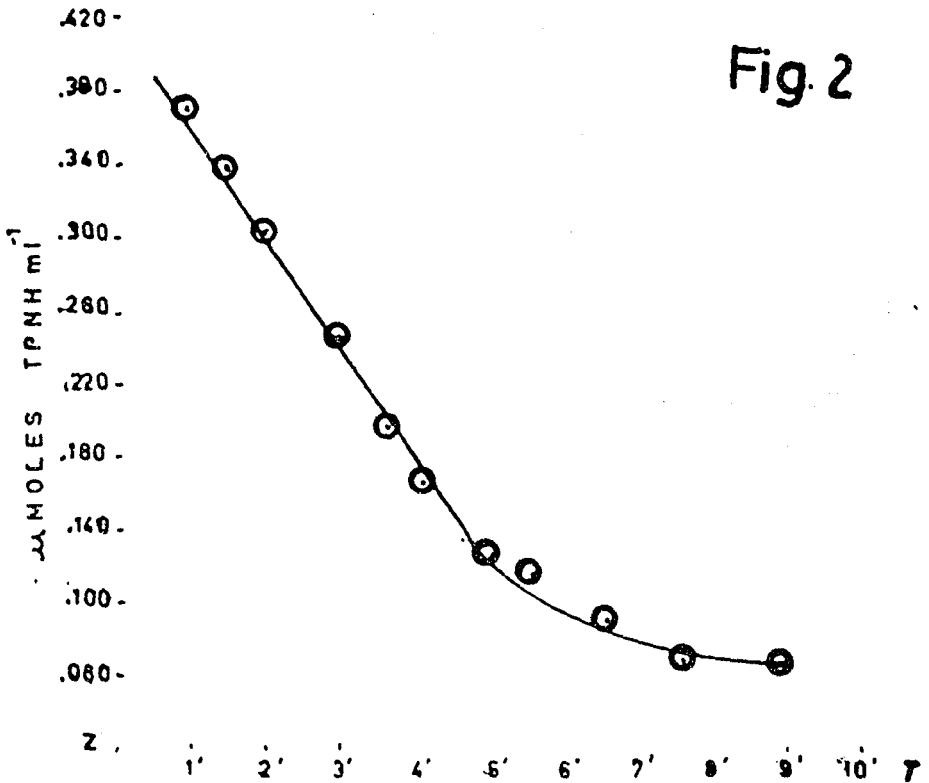


Fig. 2.—CURVA DE PROGRESO DE LA ENZINA. El sistema de incubación contiene en un volumen de 3 ml. 5  $\mu\text{M}$ . de Glucosa-6-fosfato, 500  $\mu\text{M}$ . de TPN oxidado, 50  $\mu\text{M}$ . de cloruro de magnesio, 100  $\mu\text{M}$ . de 2, 6, dicloro-indofenol, 40  $\mu\text{M}$ . de Metil sulfato de fenazina y 250  $\mu\text{M}$ . de buff r Tris pH 7.5.

Fig. 3

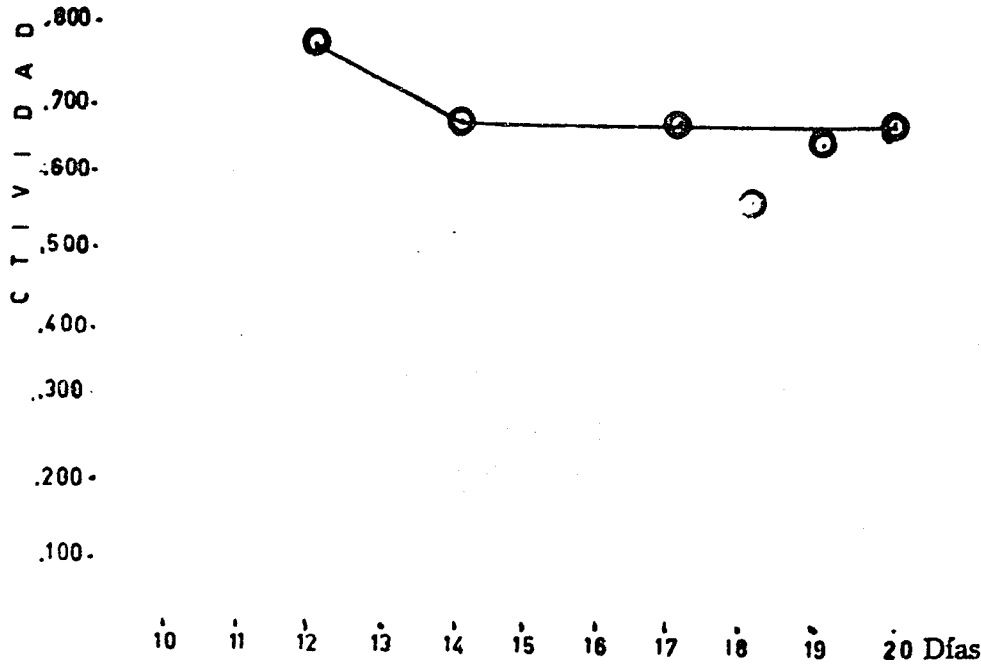


Fig. 3.—ESTABILIDAD DE LA ENZINA. El hemolizado de eritrocitos se guardó a 4°C durante 8 días, a los tiempos indicados, se hizo determinación de la actividad en zimática en las mismas condiciones señaladas en la Fig. 2.

Fig. 4

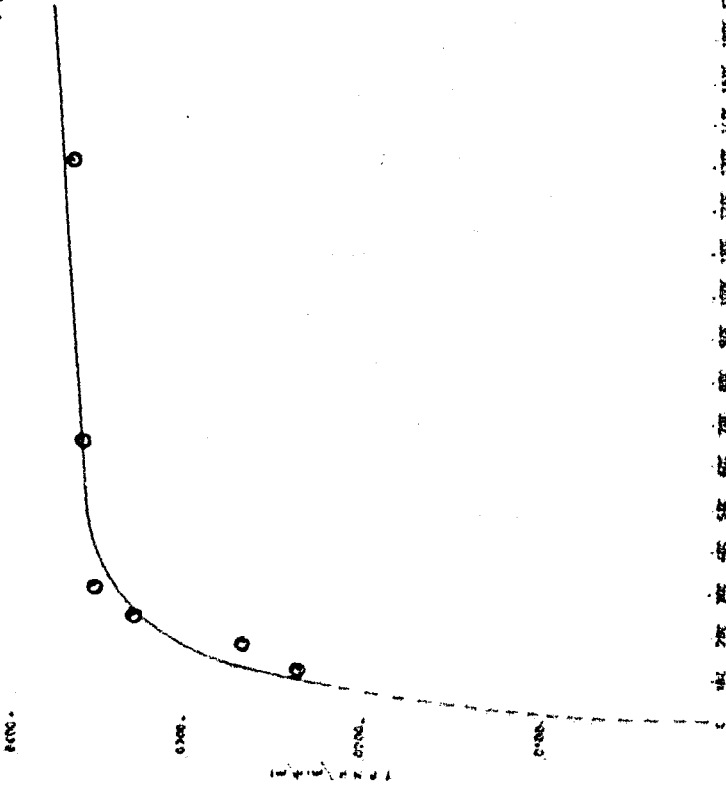


Fig. 4.—EFECTO DE VARIACION DE SUSTRATO. Un volumen de tres ml. se colocó Glucosa-6-fosfato desintegrándose en la concentración indicada en le abscise. Las otras condiciones son las ya señaladas en la Fig. 2.

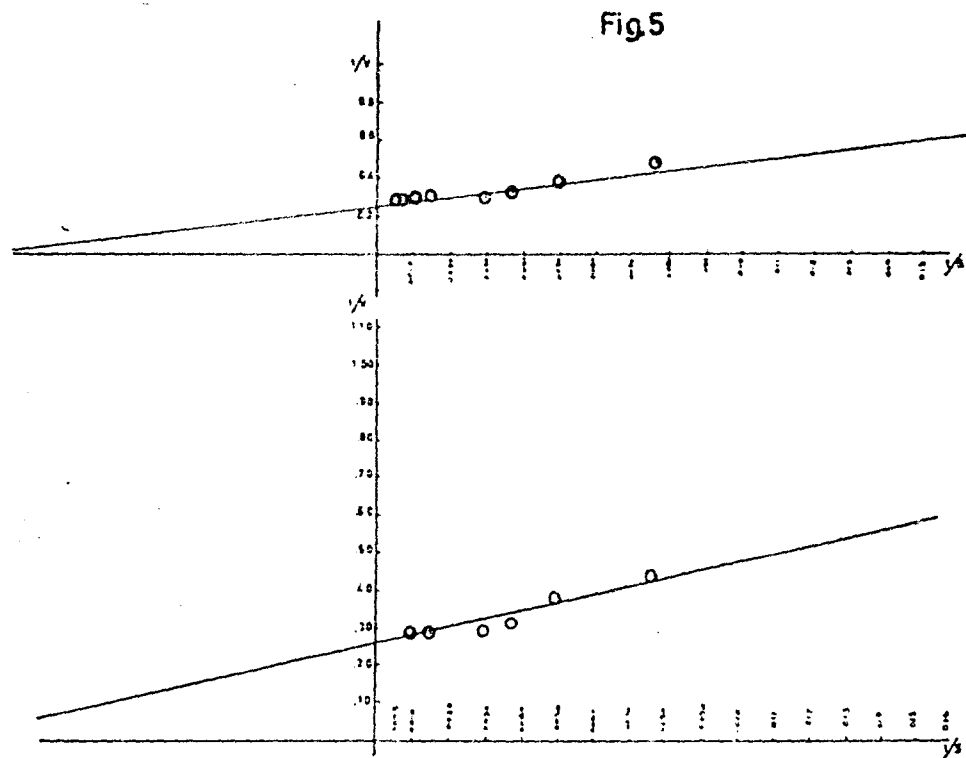


Fig. 5.—CURVA DE TIPO LINEWEAVER-BURK. De experimentos en los que se hizo variación de sustrato.

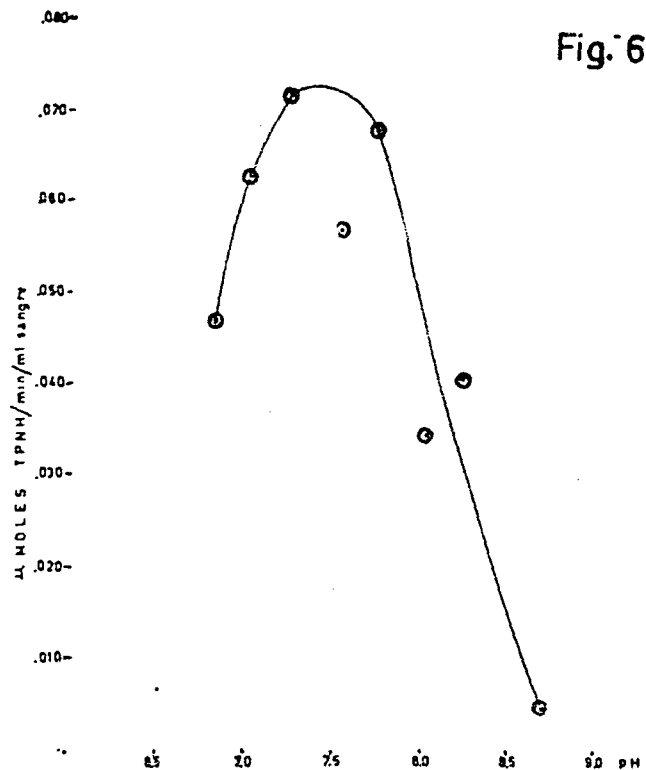


Fig 6.—EFECTO DE VARIACION DE pH SOBRE LA VELOCIDAD ENZIMATICA. En todos los puntos experimentales se uso buffer Tris, las otras condiciones son las ya señaladas en la Fig. 2.

Fig. 7

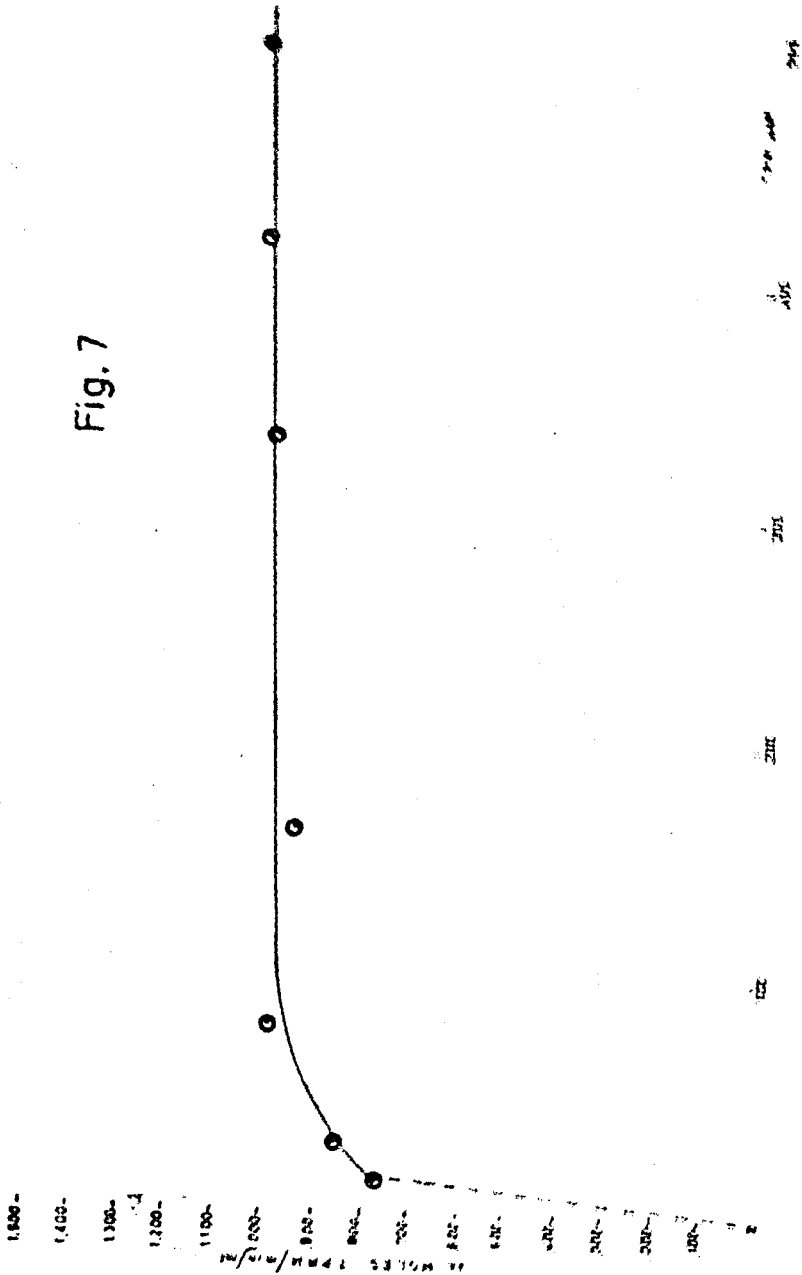


Fig. 7.—EFECTO DE LA VARIACION EN LA CONCENTRACION DE  
 LOS OXIDOS DE LOS ELEMENTOS EXPUESTOS EN LOS CASOS DE  
 LA Fig. 2.



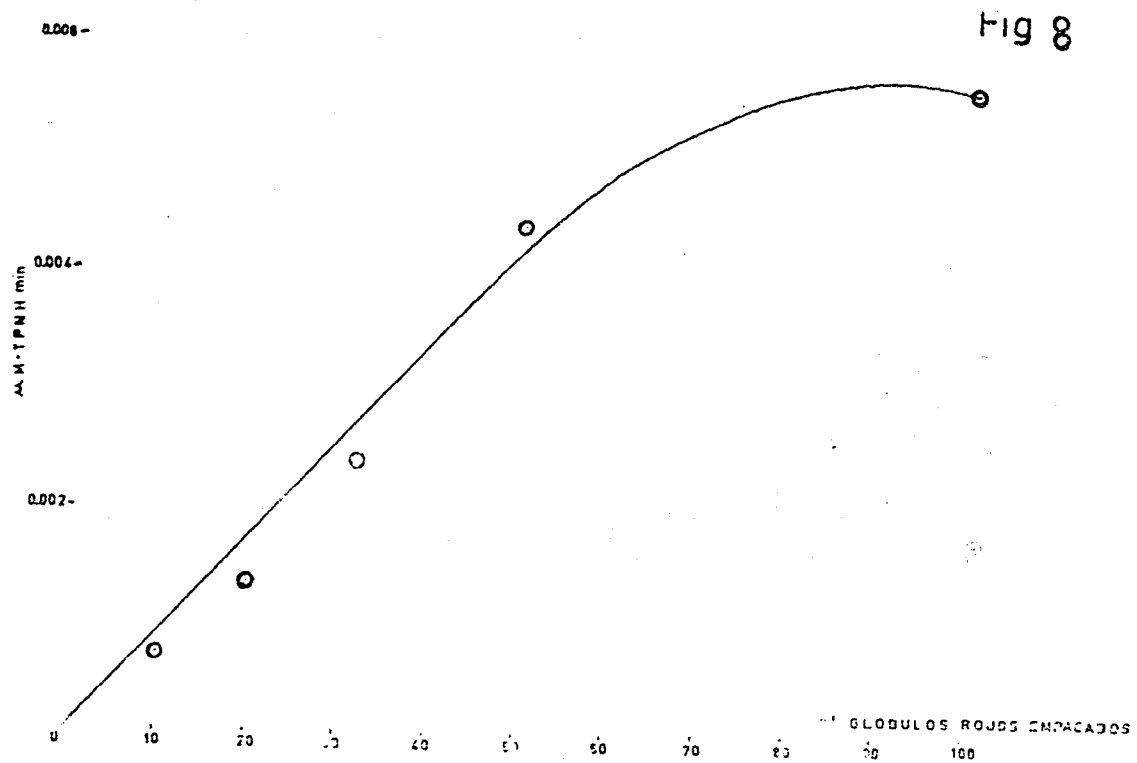


Fig. 8.—EFECTO DE VARIACION DE CONCENTRACION DE ENZIMA. Las condiciones experimentales son las descritas en la Fig. 2.

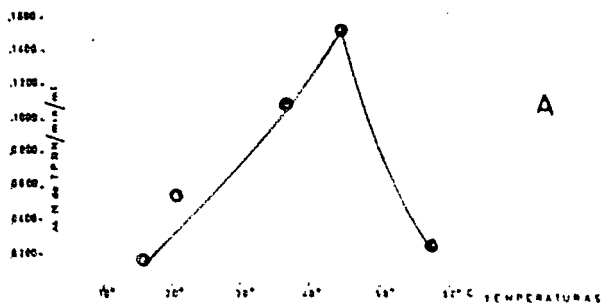


Fig. 9

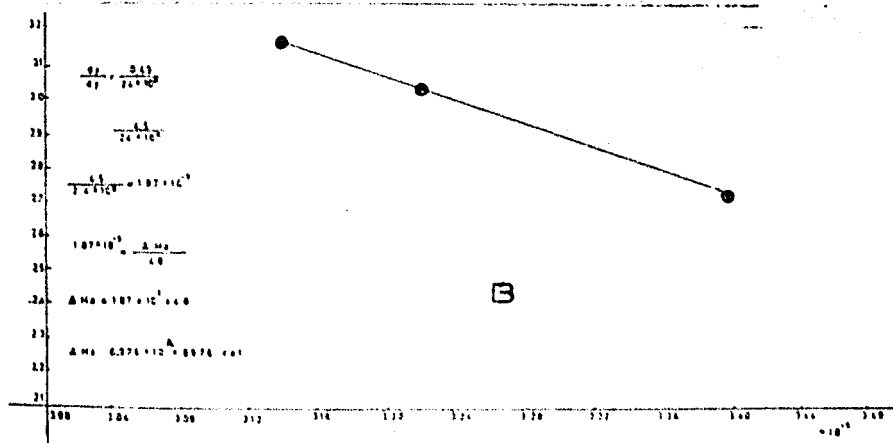


Fig. 9.—EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA. En la parte A se expresa la relación entre velocidad y temperatura en grados centígrados; en la parte B los datos se graficaron de acuerdo con la ecuación de Arrhenius a fin de obtener la energía de activación.

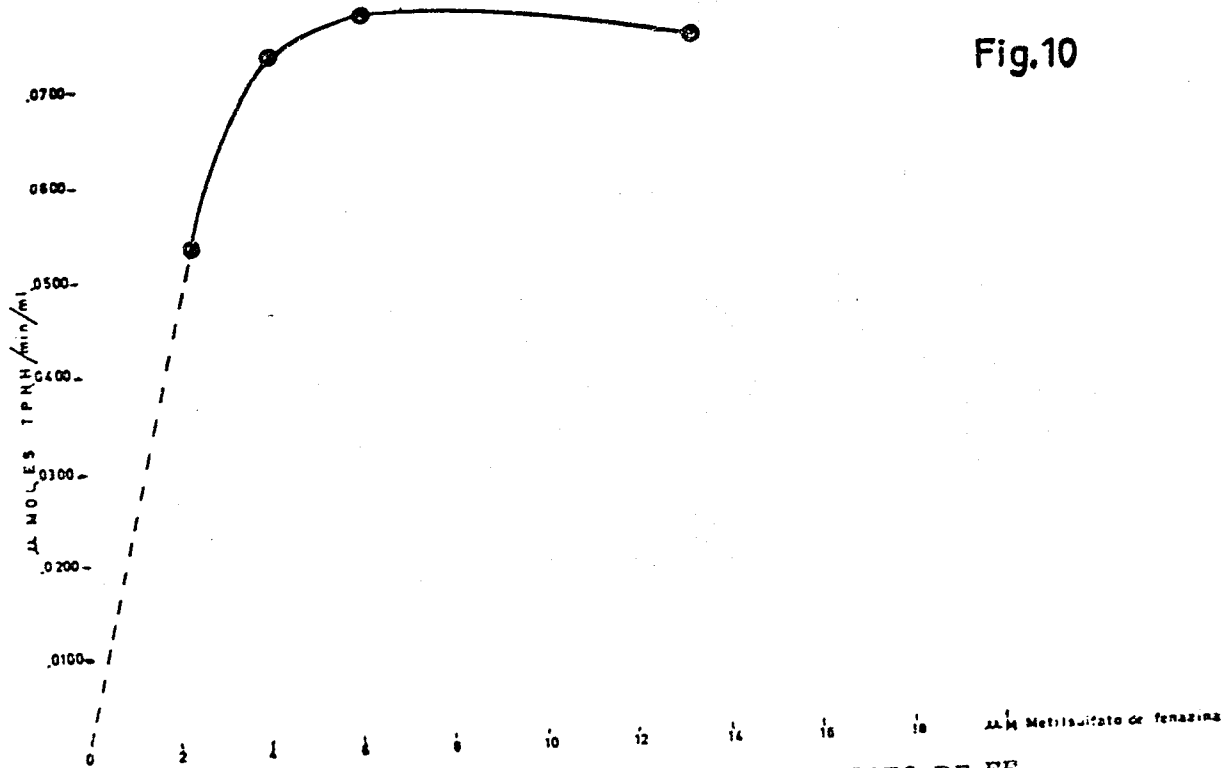


Fig.10

Fig. 10.—EFECTO DE VARIACION DEL METIL SULFATO DE FERROSA. Las condiciones experimentales son las descritas en la Fig. 2.

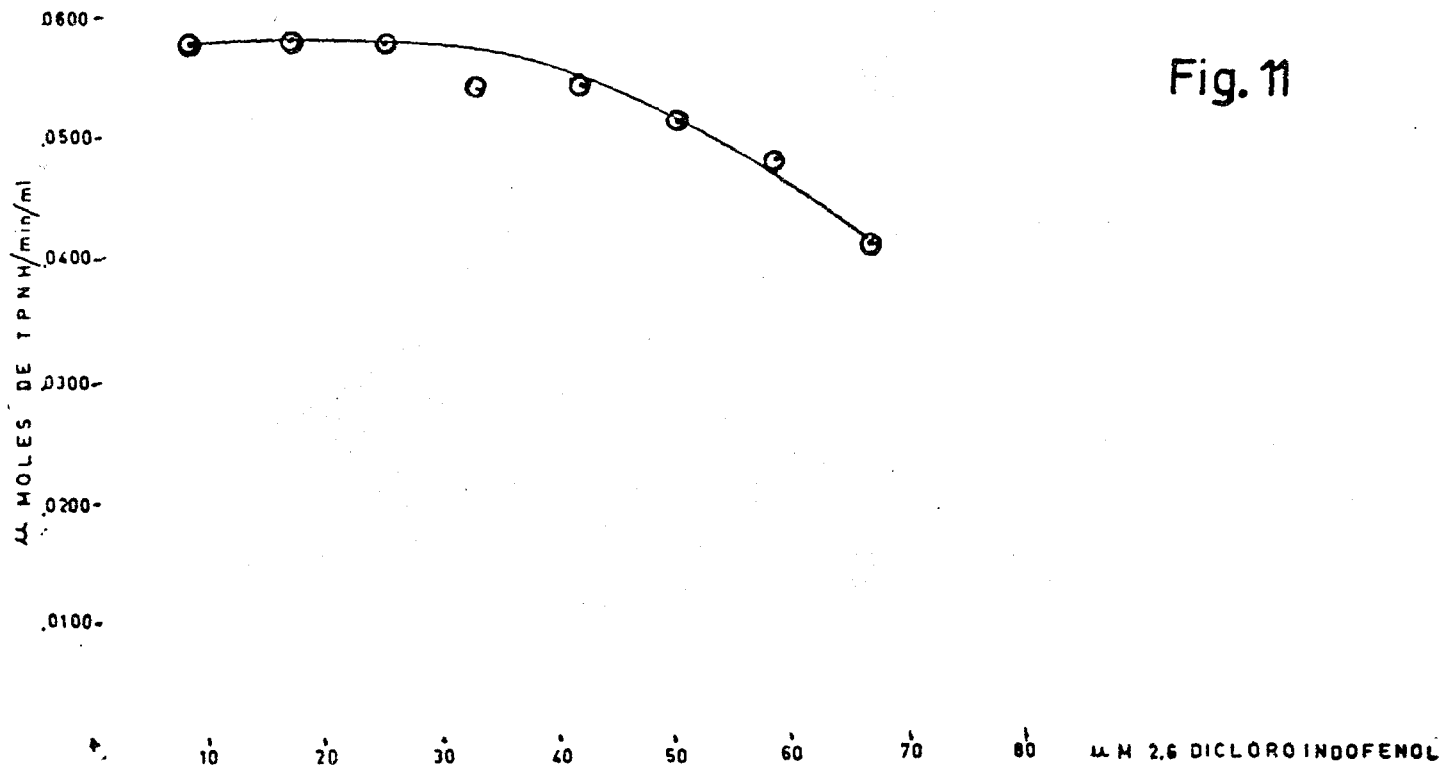


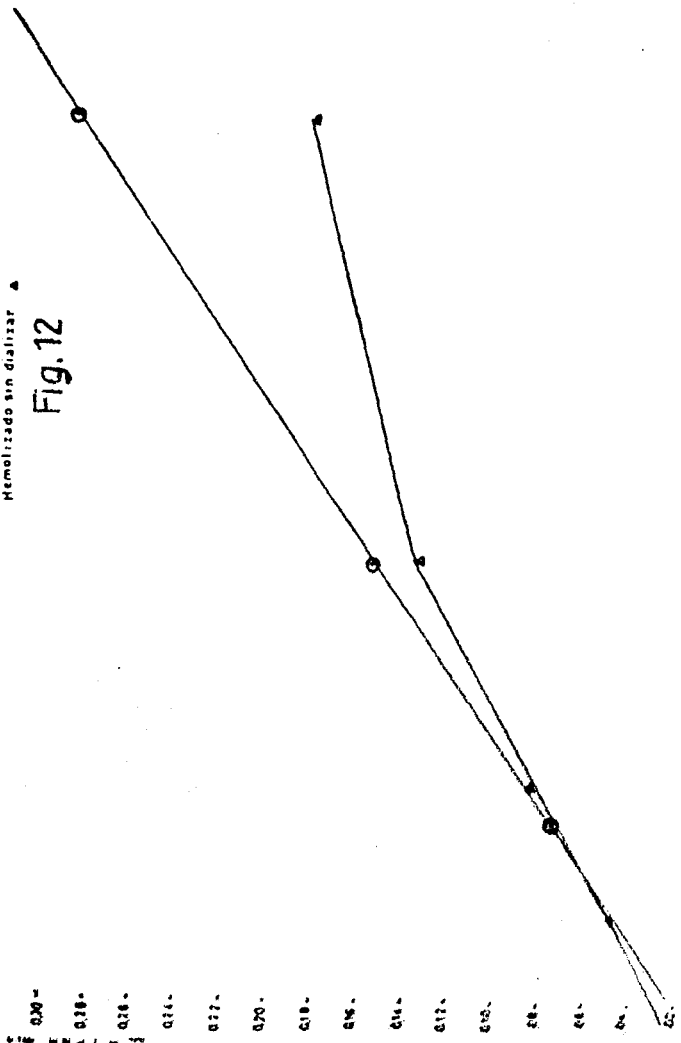
Fig. 11

Fig. 11.—EFECTO DE VARIACION DEL 2, 6, DICLORO INDOFENOL. Las condiciones experimentales son las descritas en la Fig. 2.

0.00  
 0.10  
 0.20  
 0.30  
 0.40  
 0.50  
 0.60  
 0.70  
 0.80  
 0.90  
 1.00

Hemolizado dializado \*  
 Hemolizado sin dializar ▲

Fig. 12



AL M. CUBIENDO PUNTO EMPACADO  
 EN EL A. EN EL C. EN EL D. EN EL E. EN EL F. EN EL G. EN EL H. EN EL I. EN EL J. EN EL K. EN EL L. EN EL M. EN EL N. EN EL O. EN EL P. EN EL Q. EN EL R. EN EL S. EN EL T. EN EL U. EN EL V. EN EL W. EN EL X. EN EL Y. EN EL Z.

Fig. 12.—INFLUENCIA DE DIALISIS DEL HEMOLIZADO DE ERI.  
 TROCITOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. Las condiciones  
 experimentales son las dadas en la Fig. 2.

## DISCUSION

El método usado demostró ser de fácil manipulación, bajo costo, muy sensible y con reproductibilidad muy aceptable.

Los resultados obtenidos son muy similares a los reportados por Kirkman Marks y colaboradores (18) y otros autores, aunque es necesario aclarar, que todos estos investigadores han trabajado con glóbulos rojos de humanos en efecto la constante de Michaelis para la Glucosa-6-fosfato y tri-fosfo-piridín-nucleótido, así como la energía de activación para la reacción enzimática son idénticas a las por ellos reportados. Como resultado interesante se puede mencionar la presencia en el hemolizado no dializado, de un inhibidor de peso molecular bajo, cuya naturaleza no se trató de aclarar.

Numerosos reportes en la literatura mencionan la existencia de sustancias activadores e inhibidores de la actividad de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (19,20); el proceso de activación parece depender de un factor de naturaleza proteínica en relación con el estroma; los inhibidores más importantes que se mencionan son diferentes esteroides y parece ser que la presencia de un grupo ceto en la posición 17 ó 20 es esencial para que este fenómeno se presente (21).

Otros inhibidores importantes son aquellas sustancias que provienen de modificaciones estructurales en la molécula del TPN requerido o íntimamente relacionada a la estructura de nicotinamida

La Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se ha convertido en el

punto de convergencia para la explicación de numerosos fenómenos relacionados directa o indirectamente con el eritrocito; en efecto se pretende encontrar en la disminución natural de la actividad de esta enzima, la explicación lógica para el incremento de metahemoglobina, disminución de glutatión reducido, disminución de ATP y activación de enzimas hidrolíticas; fenómenos todos ellos que aparecen cuando el eritrocito va a desaparecer y ser destruido en el sistema retículo endotelial.

Numerosos fármacos tienen una influencia definida sobre la actividad de la enzima discutida; en efecto la primaquina, los nitrofuranos, las sulfanilamidas, naftaleno, disminuyen la actividad de esta enzima a niveles mínimos en los sujetos con sensibilidad a estas drogas (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31); esto conduce a la disminución de los niveles de glutatión reducido (32, 33, 34.), ATP, incremento de metahemoglobina y aparición de los cuerpos de heins (35) con hemólisis muy importante en ocasiones. Los glóbulos rojos de estos individuos son así mismo más sensibles a las soluciones hipotónicas; en los estudios que bajo este aspecto se realizaron se pudo demostrar el rompimiento por hipotonicidad se produce fácilmente por debajo de 0.48% de NaCl (36, 37, 38, 39.)

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1.—Se discuten los datos más importantes encontrados en la literatura en relación con el metabolismo normal del eritrocito y las alteraciones que diferentes procesos enzimáticos experimentan en algunas condiciones patológicas.
- 2.—Los datos cinéticos presentados nos permiten afirmar la presencia de un inhibidor para la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, este inhibidor es probablemente de bajo peso molecular, ya que es eliminado por diálisis.
- 3.—Las diferentes constantes en relación con la variación de diferentes factores como el sustrato, la coenzima, la temperatura, el pH, nos ha permitido encontrar una serie de constantes comparables en magnitud a los reportados por varios investigadores en relación al eritrocito humano.
- 4.—Se analiza el efecto de la variación de los transportadores y aceptores artificiales de electrones.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.—Prankerd, T. A. J. and Altman, K. J. *Biochem. J.*; 58:622, 1954.
- 2.—Bartlett, G. R. *Am. New York Acad. Soc.*; 75:110, 1958.
- 3.—Rothstein, A. *Symp. Soc. Exper. Biol.*; 8:165, 1954.
- 4.—Löhr, G. W.; Waller, H. D.; Karges, O.; Schlegel, B. and Müller, A. A. *Klin. Wchnschr* 36:1008, 1958.
- 5.—Löhr, G. W. and Waller, H. D. *Klin. Wchnschr* 36:865, 1958.
- 6.—Rapoport, S. and Luebering, J. J. *Biol. Chem.*; 183:507, 1950.
- 7.—Rapoport, S. and Luebering, J. J. *Biol. Chem.*; 189: 683, 1951
- 8.—Manyai, S. and Várady, Z. *Biochim. et Biophys. acta*, 20: 594, 1958.
- 9.—Schweiger, H. G. and Rapoport, S. *Ztschr. Physiol Chem.*; 313: 97, 1958.
- 10.—Bruns, F. H.; Noltmann, E. and Vahlhaus, E. *Biochem. Ztschr* 330:483, 1958.
- 11.—Guarino, A. J. and Sable, H. Z. *J. Biol. Chem.*; 215: 515, 1955.

- 12.—Bruns, F. H.; Dünwald, E. and Noltmann, E. *Biochem. Ztschr.*; 330: 497, 1958.
- 13.—Tsuboi, K. K. and Hudson, P. B. *J. Biol. Chem.*; 224: 879, 1957.
- 14.—E. M. Scott, Dale D. Hoskins *Blood* 13: 795, 1958.
- 15.—Robert C. Griggs; Russell Weisman, J. R. and Hohn W. Harris *J. Clin. Invest.* 39: 89, 1960.
- 16.—A. Kornberg and B. L. Horecker. *Methods in Enzymology* Vol. 1, 323. By Colowich S. P. and Kaplan N. O. Academic Press, Inc. New York 1955.
- 17.—Kirkman H.; N. Ellis; H. A.; *Proc. Soc. Exp. Biol Acad.* 106: 607, 1961.
- 18.—Marks Paul A, Szeinberg, A.; and Banks J. J. *Biol. Chemistry* 236: 10; 1961.
- 19.—Bracha Ramot, Isrhel, Ashkenazi, Abraham Rimona, Avionam Adam. *J. Clin. Invest.* 40: Number 3, 1961.
- 20.—Paul E. Carson, M. D Stanley L. Schrier M. D. and Alf. S. Alving M. D. Joliet. *J. Lab. Clin. Med.* 48: 794, 1956.
- 21.—Paul A. Marks and Julia. Banks. *Proc., Natl. Acad. Sci. U. S.* 46: 447, 1960.
- 22.—Kirkman H. N. *Nature*, 184: 1291, 1959.
- 23.—Carson P. E; Flanagan, C. L. Ickes, C. E. and Alving A. S. *Science* 124: 484, 1956.
- 24.—Marks, P. A. and Gross R. T. *J. Clin. Invest.* 38: 2253, 1959
- 25.—Beutler E; Dern, R. J. Flanagan, C. L. and Alving, A. S. *J. Lab. Clin. Med.*; 45: 286, 1955.
- 26.—Beutler; E. Robson, M. and Bittenwieser, E. *J. Clin. Invest.*; 36: 617, 1957.

- 27.—Paul E. Carson, M. D. Stanley, L. Schrier M. D. and Alf. S. Alving M D; Joliet. J. Lab. Clin. Med; 48: 794, 1956.
- 28.—Zinkham W. H. and Childs, B. A. Pediatrics 22: 461, 1958.
- 29.—Marks, P. A. and Gross, R. T. Bull. New York Acad. Med; 35: 433, 1959.
- 30.—Beutler, E. Blood, 14: 103, 1959.
- 31.—Szeinberg, A. Sheba, C; and Adam A. Nature 181: 1256, 1958.
- 32.—Beutler, E; Robson, M. J. and Bittenwieser E. J. Lab. Clin. Med. 49: 84, 1957.
- 33.—Szeinberg, A; Sheba C; and Adam, A. Blood, 13: 1043, 1958.
- 34.—Szeinberg, A; Asher, and Sheba, C. Blood, 13: 348, 1958.
- 35.—Brenner, S. and Allison, A. C. Experientia 11: 381, 1953.
- 36.—Marks, P. A. Johnson A. B; Hirschberg, E. and Banks, J. Ann. New York Acad. Sc; 75: 95, 1958.
- 37.—Marks. P. A. and Johnson; A. B. J. Clin. Invest. 37: 1542, 1958.
- 38.—Marks P. A. Science 127: 1338, 1958.
- 39.—Laurence, E. Young. Mary, Jane Izzo, Kurtl Altman and Scohn, Swisher, Blood XI: 977, 1956