

EL ABORDAJE IN SITU EN CELULAS ANIMALES:
ESTUDIO CINETICO DE LOS ENZIMAS
GLICOLITICOS EN ERITROCITOS

Tesis presentada para optar al grado de

DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA

por el Licenciado

JUAN JOSE ARAGON REYES

R.F.M: 2.861.

MADRID, OCTUBRE 1977

UNIVERSIDAD
AUTONOMA
DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
BIBLIOTECA

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de *deberiente cum Laude*.

577 /
Ara
1 / 25

Madrid, 12 Dic. 1977

J. L. S.
G. de la Fuente
P. J. S.
1002.497

A mi madre, a quien todo se lo debo.

Y a Valentina, mi mujer, cuyo cariño,
aliento y ayuda constantes acompa-
ñan siempre mi trabajo.

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Enzimología y Patología Molecular del CSIC y Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Quiero expresar mi agradecimiento al Profesor Alberto Sols, mi maestro, que me acogió en el Departamento y me dió la oportunidad de trabajar a su lado; de él he aprendido no solamente enzimología sino también su talante crítico y clarificador ante el experimento biológico.

Al Dr. Juan E. Feliú, iniciador de mis primeros trabajos en el laboratorio y cuyas investigaciones preliminares en el terreno del abordaje in situ hicieron posible la realización de este trabajo. Al Dr. René Frenkel, cuyos trabajos adaptando nuevos reactivos bifuncionales enriquecieron muy notablemente esta línea de trabajo, y por sus consejos y orientaciones. Al Dr. Armando Giner y a Alberto Tejedor, colaboradores entusiastas en varios aspectos de este abordaje.

A los Dres. Gertrudis de la Fuente, Juana María Gancedo, Carlos Gancedo y Rosario Lagunas, por sus ayudas y consejos críticos cuando a ellos acudí. A todos aquellos compañeros del Departamento cuyo pluralismo intelectual y crítico han favorecido el desarrollo de mi formación científica.

A Valentina Sánchez, que me inició en los primeros pasos del laboratorio, me prestó su ayuda eficaz en muchos aspectos técnicos y ha llevado a cabo la elaboración mecanográfica de este trabajo. A Antonio Fernandez, por la realización de las figuras y fotografías. A José Blanco, Clotilde Estevez, Trinidad López y Renée Clarys, por su ayuda técnica en diferentes campos.

Al Dr. José Luque y a Concepción Tejero, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de Madrid, que me prestaron su colaboración y ayuda en la valoración del 2,3-DPG. Al Dr. Eduardo Echandia, por la realización de las fotografías al microscopio electrónico.

Durante el periodo de realización de este trabajo he disfrutado de una beca del PFPI del Ministerio de Educación (años 1975, 1976 y 1977).

INDICE

SIMBOLOS Y CONVENCIONES EMPLEADOS	1
ABREVIATURAS	2
1. INTRODUCCION	4
2. MATERIAL Y METODOS	12
2.1. PRODUCTOS	13
2.2. APARATOS	15
2.3. MATERIAL BIOLÓGICO	17
2.4. METODOS DE PERMEABILIZACIÓN DE ERITROCITOS	17
2.4.1. <u>Fijación de las proteínas de la membrana</u>	20
2.4.1.1. Grapamiento con DMS	20
2.4.1.2. Grapamiento con DTBP	22
2.4.1.3. Grapamiento con TDI	22
2.4.2. <u>Permeabilización con digitonina</u>	22
2.5. METODO DE LISIS DE ERITROCITOS PERMEABILIZADOS	23
2.6. OBTENCIÓN DE LOS HEMOLIZADOS	24
2.7. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE MUSCULO	24
2.8. VALORACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	25
2.8.1. <u>Valoración de la hexokinasa</u>	27
2.8.2. <u>Valoración de la fosfofructokinasa</u>	28
2.8.3. <u>Valoración de la gliceraldehido-3-fosfato</u> <u>deshidrogenasa: ensayo "lineal"</u>	29
2.9. GLICOLISIS IN SITU E IN VIVO	33
2.10. VALORACIÓN DE METABOLITOS	33
2.10.1. Obtención de las muestras	33
2.10.2. Valoración de los metabolitos	34
2.11. DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA	36

2.12. DETERMINACION DE COLESTEROL	36
2.13. PURIFICACION PARCIAL DE LDH DE ERITROCITOS	37
3. RESULTADOS	38
3.1. DESARROLLO Y ESTUDIO CRITICO DEL ABORDAJE IN SITU EN ERITROCITOS	39
3.1.1. <u>Detección en eritrocitos grapados de</u> <u>actividad enzimática in situ</u>	39
3.1.2. <u>Permeabilización de los eritrocitos grapados</u>	41
3.1.2.1. Congelación y descongelación	43
3.1.2.2. Remoción de lípidos con tolueno	45
3.1.2.3. Remoción de lípidos con digitonina	45
3.1.3. <u>Visualización de enzimas independientes de</u> <u>pirídinnucleótidos</u>	50
3.1.4. <u>Rendimiento del método de permeabilización</u> <u>de eritrocitos</u>	53
3.1.4.1. Contaje del número de células por milímetro cúbico	53
3.1.4.2. Peso seco	53
3.1.4.3. Absorción a 650 nm	54
3.1.5. <u>Estabilidad de los eritrocitos permeabiliza-</u> <u>dos</u>	56
3.1.5.1. Tratamientos fisicoquímicos	56
3.1.5.2. Tratamientos mecánicos	60
3.1.5.3. Estabilidad de enzimas in situ	61
3.1.6. <u>Rotura de los eritrocitos permeabilizados</u>	61
3.2. ESTUDIO CINETICO COMPARADO IN SITU E IN VITRO DE LOS ENZIMAS DE LA GLICOLISIS EN ERITROCITOS DE RATA	64
3.2.1. <u>Hexokinasa</u>	64
3.2.1.1. Puesta a punto del método de ensayo	64

3.2.1.2.	Cinética frente a la glucosa	70
3.2.1.3.	Cinética frente al ATP-Mg	72
3.2.1.4.	Inhibición por glucosa-6-P	72
3.2.1.5.	Comportamiento frente al 2,3-difosfoglicerato	80
3.2.2.	<u>Glucosafosfato isomerasa</u>	83
3.2.3.	<u>Fosfofructokinasa</u>	83
3.2.3.1.	Cinética frente al fructosa-6-P	85
3.2.3.2.	Cinética frente al ITP-Mg	96
3.2.3.3.	Inhibición por ATP	97
3.2.3.4.	Inhibición por citrato	100
3.2.4.	<u>Aldolasa</u>	102
3.2.5.	<u>Triosafosfato isomerasa</u>	105
3.2.6.	<u>Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa</u>	105
3.2.6.1.	Puesta a punto del método de ensayo	105
3.2.6.2.	Cinética frente al NAD^+	108
3.2.6.3.	Cinética frente al gliceraldehido-3-P	110
3.2.6.4.	Cinética frente al fosfato inorgánico	110
3.2.7.	<u>Fosfoglicerato kinasa</u>	110
3.2.8.	<u>Fosfoglicerato mutasa</u>	114
3.2.9.	<u>Enolasa</u>	114
3.2.10.	<u>Piruvato kinasa</u>	117
3.2.11.	<u>Lactato deshidrogenasa</u>	119
3.2.11.1.	Cinética frente al piruvato	123
3.2.11.2.	Cinética frente al NADH	124
3.2.11.3.	Inhibición por exceso de piruvato	124
3.2.11.4.	Efecto del pH sobre la actividad LDH	129
3.2.12.	<u>Sensibilidad de los enzimas a los distintos reactivos grapadores</u>	131
3.3.	GLICOLISIS IN VIVO E IN SITU	134
3.3.1.	<u>Glicolisis in vivo</u>	135

3.3.2. <u>Glicolisis in situ</u>	136
3.3.2.1. Producción de lactato a partir de gliceraldehido-3-P	136
3.3.2.2. Producción de lactato a partir de glucosa-6-P	138
3.3.2.3. Producción de lactato a partir de glucosa o glicolisis entera	140
3.4. APENDICE: <u>la adenilato kinasa</u>	152
 4. DISCUSION	 154
4.1. EL ABORDAJE IN SITU EN CELULAS ANIMALES	155
4.2. ESTUDIOS CINETICOS IN SITU E IN VITRO DE LOS ENZIMAS DE LA GLICOLISIS	157
4.3. CASOS PARTICULARES	161
4.3.1. Hexokinasa	161
4.3.2. Fosfofructokinasa	164
4.3.3. Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	165
4.3.4. Piruvato kinasa	166
4.3.5. Lactato deshidrogenasa	166
4.4. GLICOLISIS IN SITU E IN VIVO	167
4.5. PERSPECTIVAS	168
 5. CONCLUSIONES	 170
 6. BIBLIOGRAFIA	 172
 ANEJOS	 187

SIMBOLOS Y CONVENCIONES EMPLEADOS

La unidad de actividad enzimática viene determinada por la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de substrato por minuto en condiciones definidas. Dichas condiciones se detallan en la sección de valoración de actividades enzimáticas.

El símbolo V_{max} expresa velocidad máxima.

El símbolo K_m indica constante de Michaelis en cinética hiperbólica. El símbolo $S_{0,5}$, en cualquier tipo de cinética, indica la concentración de substrato que da una velocidad mitad de la máxima; en las cinéticas hiperbólicas coincide con la K_m .

El símbolo K_i significa constante de inhibición.

El símbolo n_H significa coeficiente de Hill, expresión del grado de sigmoidicidad.

Con los términos de "in vivo" "in situ" e "in vitro" nos referimos a eritrocitos intactos, eritrocitos permeabilizados y hemolizado, respectivamente.

ABREVIATURAS

Enzimas

ALD	: Aldolasa (EC 4.1.2.13)
ENO	: Enolasa (EC 4.2.1.11)
GAPDH	: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.2.1.12)
HK	: Hexokinasa (EC 2.7.1.1)
LDH	: Lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27)
PFK	: Fosfofructokinasa (EC 2.7.1.11)
PGI	: Glucosafosfato isomerasa (EC 5.3.1.9)
PGK	: Fosfoglicerato kinasa (EC 2.7.2.3)
PGM	: Fosfoglicerato mutasa (EC 2.7.5.3)
PK	: Piruvato kinasa (EC 2.7.1.40)
TIM	: Triosafosfato isomerasa (EC 5.3.1.1)

Otros compuestos

ADP	: Adenosindifosfato
AMP	: Adenosinmonofosfato
Ap ₅ A	: p ¹ ,p ⁵ -Di(adenosin-5'-) pentafofosfato
ATP	: Adenosintrifosfato
c.p.m.	: Cuentas por minuto
2,3-DPG	: 2,3-Difosfoglicerato
DHAP	: Dihidroxiacetona fosfato
DMS	: Dimetil sulforimidato

DTBP	: Dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato
DTE	: Ditioeritritol
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
FDP	: Fructosa-1,6-difosfato
F6P	: Fructosa-6-fosfato
GA3P	: Gliceraldehido-3-fosfato
G6P	: Glucosa-6-fosfato
HEPES	: Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
ITP	: Inosíntrifosfato
MES	: Acido 2-(N-morfilino) etanosulfónico
NAD ⁺	: Nicotinamida-adenindinucleotido oxidado
NADH	: Nicotinamida-adenindinucleotido reducido
NADP ⁺	: Nicotinamida-adenindinucleotido fosfato oxidado
NADPH	: Nicotinamida-adenindinucleotido fosfato reducido
Pi	: Fosfato inorgánico
SSI	: Solución salina intracelular: KCl 125 mM, MgCl ₂ 5 mM, tampón fosfato 5 mM, pH 7,4
SSP	: Solución salina fosfato: NaCl 115 mM, tampón fosfato 5 mM, pH 7,4
TDI	: Toluol-2,4-diisocianato
TES	: Acido N-Tris (hidroximetil) metil-2-aminometanosulfónico
TRIS	: Tris (hidroximetil)-aminometano
U	: Unidades internacionales de actividad enzimática (μmoles/min)

I. INTRODUCCION

Ante el afán de desentrañar el funcionamiento de un mecanismo desconocido, el método científico ofrece el proceder analítico de separación y estudio de las partes que lo integran, previa ruptura de la entidad física que las contiene. Aplicando esta sistemática, los estudios llevados a cabo con preparaciones de enzimas purificados en diverso grado han permitido el gran desarrollo que la enzimología posee en la actualidad, con la elevada cuantía de enzimas aislados y caracterizados a nivel molecular, y el alto porcentaje de efectos descubiertos, que modulan su actividad y que són presuntamente útiles para la regulación metabólica en las células. Ahora bien, frente a estos avances, se plantea la cuestión, aún no resuelta, de hasta que punto la conducta de los enzimas observada in vitro puede reflejar con fidelidad su comportamiento in vivo.

La dificultad de dar una respuesta adecuada surge de las diferencias existentes entre las condiciones en que habitualmente se estudian los enzimas in vitro y las que prevalecen dentro de la célula.

Dichas diferencias pueden resumirse en dos aspectos fundamentales: la concentración de proteínas y metabolitos por un lado, y el mantenimiento de la integridad de las estructuras celulares por otro.

Respecto al primer punto, cabe señalar la diferencia tan notoria que se establece entre las concentraciones de los enzimas que por razones técnicas se emplean en los ensayos in vitro y las que existen in vivo, de forma que en el primer caso suelen ser de 10^{-7} a 10^{-10} M, mientras que en la célula los enzimas están en el orden de 10^{-5} a 10^{-6} M, cientos a miles de veces mayor (130)(127). El interés de

las elevadas concentraciones proteicas intracelulares ha sido puesto de manifiesto en diferentes ocasiones; por una parte afectan de forma decisiva a las interacciones homólogas y heterólogas de los enzimas, siendo de particular importancia cuando se trata de enzimas reguladores, en los cuales pueden influir imprimiendo cambios en sus características alostéricas (57)(56). Por otra parte, estos niveles elevados de concentración son responsables de estados de agregación diferentes que originan modificaciones marcadas en su comportamiento, como ha sido señalado en distintas ocasiones respecto de la fosfofructokinasa, cuya conducta in vivo parece ser en gran parte dependiente de la concentración que alcanza en estas condiciones (78)(158)(149)(96)(101).

Los substratos y efectores, en cambio, suelen emplearse en los ensayos in vitro a concentraciones muy superiores a las que presentan in vivo.

La conjunción de estos dos contrastes ilustra claramente el salto que supone el paso de la cubeta de ensayo a la célula, si en el primer caso la concentración de substratos y efectores es muy superior a la del enzima, en el segundo la concentración de enzima se encuentra en amplio exceso sobre la del substrato; lo que también da lugar a modificaciones relevantes en los condicionamientos cinéticos, como Sols y Marco describieron en 1970 (127).

Por tanto la modificación que suponen los estudios in vitro, no solamente atañe al ambiente macromolecular de los enzimas sino también al micromolecular. En la cubeta de ensayo se incluyen los diversos componentes de la reacción en las condiciones óptimas para su estudio, pero que no siempre coinciden con las de la célula, a ve-

ces ni siquiera són fisiológicas.

Haciendo ahora referencia al segundo de los aspectos enunciados, cabe señalar que en los ensayos habituales con extractos de órganos o preparaciones mas o menos purificadas, desaparece la localización estructural de los enzimas y metabolitos, que ha sido definida como su compartimentación intracelular, lo que puede modificar considerablemente su funcionalidad (127)(48). También hay que tener en cuenta en este sentido los factores nocivos que se introducen en los procesos de aislamiento y purificación de los enzimas, como son por ejemplo las homogeneizaciones y cambios osmóticos que conducen a la ruptura de las vesículas lisosomales, dando suelta a proteasas que al fraccionar las cadenas polipeptídicas son responsables en ocasiones de artefactos y comportamientos engañosos (159).

Ante esta serie de consideraciones, la afirmación de Efrain Racker en un congreso internacional de bioquímica celebrado en Moscú en 1961: "First purify, then think. Do not waste clean thinking on dirty things", no posee hoy la validez que tenía por aquellas fechas.

Frente a la necesidad de acercarnos lo mas posible a las condiciones intracelulares, surgió el abordaje in situ introducido en el laboratorio del Prof. Sols, como una aproximación a la situación in vivo, intermedia entre ésta y la in vitro, y que se asemeja a la fisiológica particularmente en lo que concierne al mantenimiento de la concentración proteica, y las posibles interacciones entre los componentes macromoleculares. En este sentido, Sols y Reeves (108) desarrollaron en 1973 la técnica de estudio in situ de enzimas en E. coli, basada en la permeabilización selectiva por destrucción de la membrana plasmática, manteniendo así la integridad de la célula e impidiendo

la salida de macromoléculas (128)(124), abordaje ampliado luego a las levaduras (121)(42). Ahora bien, estas técnicas solo són válidas para microorganismos; las células animales al carecer de pared no pueden ser tratadas de esa forma sin que se desintegren, con la consiguiente liberación de los enzimas al medio.

Diversos intentos han sido llevados a cabo con objeto de permeabilizar células animales. Se han empleado una serie de agentes y técnicas que de una forma u otra tratan de modificar la estructura de la membrana celular. Entre los mas relevantes cabe mencionar los siguientes: polienos, como la anfotericina B (63) o la nistatina (24); sulfato de dextrano (119); tolueno (55); Tween-80 (15); sometimiento a choque osmótico (120) y aplicación de un pulso eléctrico (64). Con ninguna de estas técnicas se ha conseguido obtener preparaciones de células permeabilizadas, en condiciones que permitan realizar estudios cinéticos in situ con la generalidad de los enzimas del metabolismo intermediario, para lo cual consideramos que se deben reunir como mínimo dos requisitos:

- 1) Estabilidad durante un tiempo no inferior al que duran los ensayos cinéticos normales, con retención de las proteínas intracelulares; dicho intervalo puede estimarse en no menos de 10 a 30 minutos; los tiempos muy cortos que no superan los 5 minutos pueden impedir la visualización de aspectos importantes de la actividad enzimática, como són los fenómenos de histéresis (40)(6).
- 2) Permeabilidad suficiente para los metabolitos intermediarios.

Los procedimientos mencionados anteriormente adolecen de alguna de las siguientes limitaciones:

- Estabilidad escasa, con salida de proteínas intra-

celulares al medio en un porcentaje apreciable (119)(55)(15)(120).

- Permeabilidad insuficiente (63)(24)(119)(64).

En este trabajo hemos emprendido el abordaje in situ de enzimas en células animales, conseguido gracias a un método de permeabilización que hemos desarrollado en nuestro laboratorio y que cumple con las condiciones señaladas mas arriba; procedimiento que nos ha permitido el estudio cinético in situ de enzimas intracelulares. Este abordaje se ha llevado a cabo en eritrocitos de rata, células de fácil obtención, manejo sencillo y metabolismo poco complicado; además los enzimas se encuentran en estas células rodeados de un ambiente macromolecular extremo, debido a la elevada concentración de hemoglobina, por lo que la importancia del mantenimiento de altos niveles de proteínas está especialmente resaltada en este caso.

El proceso de permeabilización consistió en una primera etapa de fijación de las proteínas de la membrana, seguida de una posterior de permeabilización con digitonina; la fijación se ha conseguido con el uso de diversos reactivos bifuncionales.

Hemos estudiado comparativamente, in situ e in vitro, todos los enzimas de la glicolisis juntamente con el funcionamiento de la vía completa, la cual ha sido examinada in situ a partir de diferentes niveles.

La glicolisis, como fué indicado por Sols en 1968 (123), puede ser considerada como una secuencia de dos vías: la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-P y la vía glicolítica común desde glucosa-6-P hasta piruvato (o lactato) con producción de ATP; la glucosa-6-P puede también ser convertida en glucógeno (o almidón) como forma de almacenamiento de carbohidratos, además, puede también penetrar en la

via de las pentosas; el piruvato es principalmente usado en el ciclo de Krebs. Pero el eritrocito carece de reserva de carbohidratos y de mitocondrias, de forma que su metabolismo está reducido casi únicamente a la glicolisis y la vía oxidativa para la regeneración del NADPH. De esta manera la glicolisis posee en el eritrocito una importancia fundamental, constituyendo la única ruta de producción energética; por lo que estas células ofrecen una oportunidad única para el estudio de dicha ruta: no existe interferencia por otras vías metabólicas, no hay compartimentación intracelular y por otro lado las concentraciones de los enzimas son prácticamente constantes (105).

A medida que el trabajo ha ido avanzando ha dado lugar a las siguientes comunicaciones, que he presentado en el extranjero y en España:

"Regulation of enzyme activity in animal cells in situ". J.J. Aragón, M. Martínez-Pardo y A. Sols (1976) Tenth International Congress of Biochemistry, Hamburgo, p. 389 (ver Anejo 1); "Regulación de la actividad enzimática en células animales in situ". J.J. Aragón, R. Frenkel, M. Martínez-Pardo, A. Giner y A. Sols (1976) Primer Congreso de la Federación Española de Sociedades de Biología Experimental, p. 117.

"Behavior in situ of the allosteric enzymes of glycolysis in erythrocytes". J.J. Aragón y A. Sols (1977) 11th FEBS Meeting, Copenhagen, A1-8 053 (ver Anejo 2); "Comportamiento in situ de los enzimas alostéricos de la glicolisis en eritrocitos". J.J. Aragón (1977) VII Congreso de la Sociedad Española de Bio-

química, Pamplona, 14.

Y participación en una publicación del laboratorio:

"Study of enzyme activity in animal cells in tu". A. Sols, J.E. Felíu y J.J. Aragón.
En Metabolic Interconversion of Enzymes 1975 (Shaltiel, S., ed.) Springer-Verlag, Belin, 1976, pgs. 191-197.

Como ejemplo de las comunicaciones presentadas a congresos en forma de paneles, se adjuntan, fotografías de dos de los mismos, constituyendo esto los anejos de esta Tesis.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. PRODUCTOS

Casas comerciales

Abbott (North Chicago, USA)
 Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania)
 Calbiochem (Los Angeles, USA)
 Carlo Erba (Milán, Italia)
 Doesder (Barcelona, España)
 Ferosa (Barcelona, España)
 Koch-Light (Colnbrook, Inglaterra)
 Leo (Madrid, España)
 May&Baker LTD (Dagenham, Inglaterra)
 Merck (Darmstadt, Alemania)
 Packard (Zurich, Suiza)
 Pfanstiel (Bankegan, USA)
 Pharmacia (Uppsala, Suecia)
 Pierce (Rockford, USA)
 Probus (Barcelona, España)
 Radiochemical Centre (Amersham, Inglaterra)
 Riedel de Haen AG (Hannover, Alemania)
 Sigma Chemical Company (St. Louis, USA)

Intermediarios glicolíticos

Glucosa	May & Baker
(U- ¹⁴ C) Glucosa	Radiochemical Centre
Manosa	Pfanstiel
Glucosa-6-fosfato	Boehringer
Fructosa-6-fosfato	"
Fructosa-1,6-difosfato	"
Gliceraldehido-3-fosfato	Sigma
3-Fosfoglicerato	"

2,3-Difosfoglicerato	Boehringer
2-Fosfoglicerato	Sigma
Fosfoenolpiruvato	"
Piruvato	"
Lactato	"

Nucleótidos

NAD ⁺	Boehringer
NADH	Sigma
NADP ⁺	"
ATP	"
ADP	"
AMP	"
ITP	Boehringer

Enzimas auxiliares y proteínas

Adenilato kinasa	Boehringer
Aldolasa	Sigma
Enolasa	Boehringer
Fosfoglicerato kinasa	Sigma
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	Boehringer
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	"
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	"
Glucosafosfato isomerasa	Sigma
Hexokinasa	Boehringer
Lactato deshidrogenasa	Sigma
Piruvato kinasa	"
Triosafosfato isomerasa	Boehringer
Hemoglobina	Sigma

Otros

Acetona	Merck
---------	-------

Ap ₅ A	Boehringer
Arseniato	"
Cloruro amónico	Merck
Cloruro magnésico	"
Cloruro potásico	"
Cloruro sódico	"
Digitonina	Calbiochem
Ditioeritritol	Sigma
Dowex-50	"
Etanol	Merck
EDTA	"
Ficoll	Pharmacia
Fosfato dipotásico	Merck
Fosfato monopotásico	"
2-Fosfoglicolato	Boehringer
Glicerol	Carlo Erba
Glicil-glicina	Sigma
Glicina	Merck
Heparina	Leo
HEPES	Calbiochem
Hidracina	Koch Light
MES	Calbiochem
Nembutal	Abbott
Permablend	Packard
TES	Calbiochem
Tolueno	Doesder
Trietanolamina	Merck
TRIS	"

2.2. APARATOS

La agitación de los eritrocitos en el proceso de

permeabilización se llevó a cabo con un agitador magnético Metrohm. En las centrifugaciones se utilizó una centrífuga Wifug Doctor y para volúmenes mayores una, modelo Sorvall SS-3, instalada en cámara fría.

Para las incubaciones a temperatura controlada se empleó un baño termostatzado Grant con agitación de vaivén.

Las medidas de la actividad enzimática se realizaron en un espectrofotómetro Gilford 2.400 con registrador automático y regulación térmica, usando cubetas apropiadas de 1 ml de volumen y de 1 cm de paso de luz. Cuando la actividad enzimática se midió a través de un método isotópico, la radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Mark II de la casa Nuclear Chicago.

Las medidas colorimétricas correspondientes a la valoración de hemoglobina y colesterol se hicieron en un espectrofotómetro Beckman DB, usando cubetas apropiadas de 3 ml de volumen y 1 cm de paso de luz.

Para los espectros de absorción se usó un espectrofotómetro Beckman 25.

Para las homogeneizaciones se utilizó un homogeneizador Kontes Dual-Grinder.

Las sonicaciones para obtener emulsiones y lisados celulares se efectuaron en un sonicador Branson Sonic Power. El mismo aparato fué utilizado en las pruebas de rotura de células permeabilizadas, junto con otro de mayor potencia, un sonicador MSE modelo 11/75 MK2.

El ajuste de pH de las soluciones empleadas se hizo con un potenciómetro Metrohm Herisau E 300 B.

Las observaciones microscópicas y el conteo de los eritrocitos se llevaron a cabo en una cámara de Neubauer, con un microscopio MeOpta normal.

La obtención de fotografías de eritrocitos permeabilizados y normales se realizó con un microscopio Nikon de contraste de fase.

2.3. MATERIAL BIOLÓGICO

Los eritrocitos eran obtenidos de ratas Swiss albina sangradas por punción aórtica previa anestesia intraperitoneal con Nembutal a una dosis de 5 mg por 100 g de peso y heparinización con 0,02 ml de heparina al 1% por cada 100 g de peso a través de la vena femoral.

Una vez extraída la sangre se centrifugaba a 1000 xg, durante 5 minutos, tras lo cual se eliminaba la capa superior de leucocitos por extracción con una pipeta Pasteur, a continuación el precipitado de eritrocitos se lavaba dos veces con SSP en exceso.

Al final los eritrocitos fueron suspendidos en SSP hasta completar un volumen idéntico al que ocupaba la muestra de sangre inicial.

Cuando en experimentos complementarios se usaron eritrocitos humanos frescos, fueron extraídos por punción de la vena mediana del codo y lavados de idéntica manera que los de rata.

2.4. METODOS DE PERMEABILIZACION DE ERITROCITOS

Los métodos de permeabilización que hemos empleado comprenden dos etapas, en la primera de las cuales se obtiene la fijación de las proteínas de la membrana merced a la utilización de reactivos bifuncionales (153), en una segunda etapa las células son permeabilizadas por

un tratamiento con digitonina. Los métodos difieren entre sí según el tipo de reactivo usado.

Los reactivos bifuncionales que hemos utilizado son los siguientes:

- Toluol-2,4-diisocianato (TDI)
- Dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP)
- Dimetil suberimidato (DMS)

La fórmula química de cada uno de ellos se encuentra en la Figura 1.

Este tipo de reactivos posee dos grupos funcionales capaces de reaccionar con determinados grupos reactivos de las proteínas, por lo que pueden establecer puentes entre moléculas contiguas. Con su utilización se consigue la fijación de la membrana celular, manteniéndose de esta forma íntegro el armazón proteico de la misma, de manera que el reactivo actuaría a modo de "grapas" que mantienen unidos componentes de la membrana; esa es la razón por la cual hemos adoptado el término de "grapamiento" para llamar al proceso de actuación de los diversos reactivos bifuncionales, quedando por tanto "grapadas" las células una vez que han sufrido su ataque.

En el caso del TDI los grupos reactivos son grupos cianato, los cuales, en general, reaccionan con aminas para formar ureas sustituidas y alcoholes formando uretanos. En las reacciones con proteínas y especialmente a pH neutro o alcalino la reacción fundamental es con grupos amino (153), de forma que establecen enlaces covalentes con los ϵ -aminogrupos de lisina de las proteínas, dando lugar a la formación de carbamatos (93)(7).

El DTBP y el DMS son imidoésteres bifuncionales solubles en agua (153)(32)(59), que reaccionan con un alto grado de especificidad con los grupos amino de las protei-

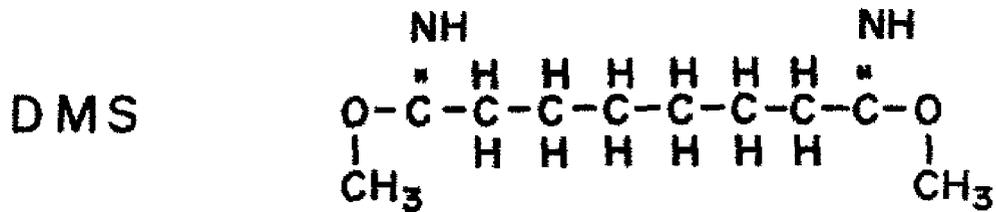
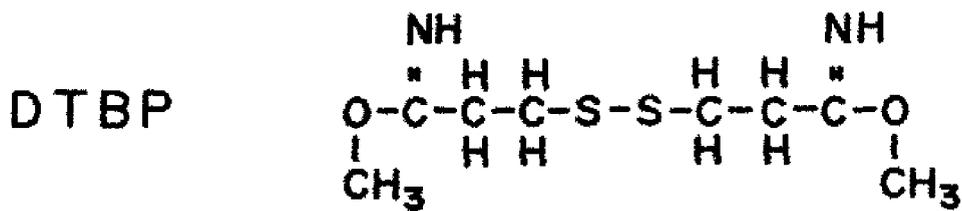
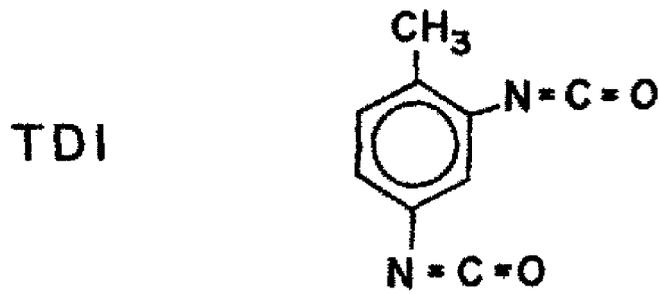


Figura 1. Fórmulas químicas de los reactivos bifuncionales utilizados en los procedimientos de permeabilización de eritrocitos.

nas dando lugar a la formación de imidinas a pH alcalino (7).

En la segunda etapa de permeabilización con digitonina, lo que se persigue es aumentar la permeabilidad de los eritrocitos grapados, merced a la remoción de lípidos de la membrana, principalmente el colesterol, que constituye el 30% de los lípidos de la membrana del eritrocito (22). La digitonina actúa formando con el colesterol un digitónido que es insoluble en soluciones acuosas.

En la Figura 2 exponemos un esquema ilustrativo de lo que pensamos que puede constituir el grapamiento con un reactivo bifuncional y la posterior permeabilización con digitonina.

2.4.1. Fijación de las proteínas de la membrana

La sistemática varía según el tipo de reactivo bifuncional utilizado.

2.4.1.1. Grapamiento con DMS:

- Disolver 24 mg de DMS en 7 ml de una solución de trietanolamina 100 mM, NaCl 75 mM, pH 8,7 y ajustar el pH a 8,5 con NaOH 0,1 N.
- Suspender en la solución anterior 1 g de eritrocitos lavados. El peso molecular del DMS es de 200, por tanto la concentración a la que se usa este reactivo es de 0,12 mmoles por gramo de eritrocitos.
- Incubación durante 30 minutos a 37°C.
- Dilución con varios volúmenes de SSP y centrifugación a 1000 xg durante 5 minutos. El sedimento se resuspende en SSI al 50% (v/v).

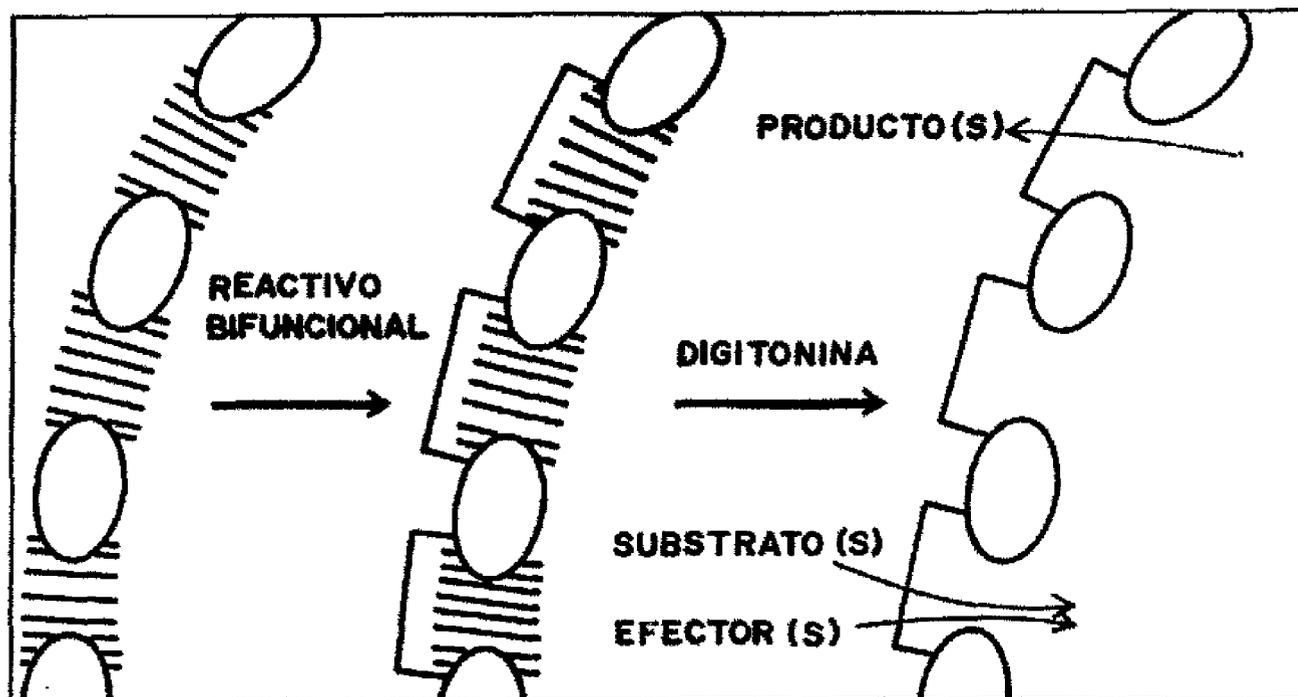
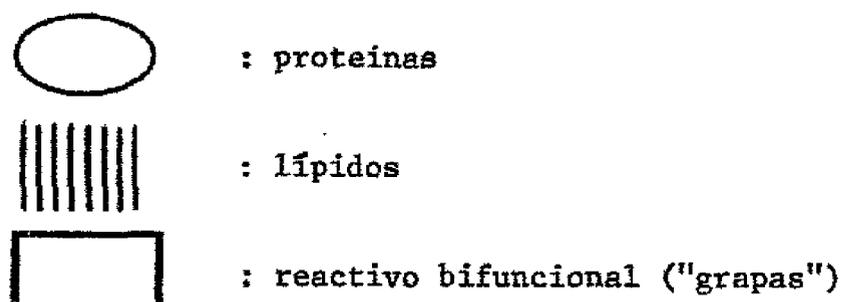


Figura 2. Visión esquemática del procedimiento de grapamiento y permeabilización.



2.4.1.2. Grapamiento con DTBP:

- Disolver 10 mg de DTBP en 8 ml de Tris 50 mM, NaCl 125 mM, pH 9.
- Suspender en la dilución anterior 1g de eritrocitos lavados. Puesto que el peso molecular del DTBP es de 236 la concentración a la que se usa este reactivo es de 0,04 mmoles por gramo de eritrocitos.
- Incubación durante 30 minutos a 37°C.
- Dilución con varios volúmenes de SSP y centrifugación a 1000 xg durante 5 minutos. El sedimento es resuspendido en SSI al 50% (v/v).

2.4.1.3. Grapamiento con TDI:

El procedimiento ha sido adaptado de Kitajima et al. (65).

- Preparar por sonicación una emulsión de TDI en SSP al 0,5% (v/v).
- Adicionar 3 ml de la emulsión anterior a una suspensión de 1 g de eritrocitos en 20 ml de SSP. Dado que el peso molecular del TDI es 174, la concentración a la que se usa este reactivo es de 0,11 mmoles por gramo de eritrocitos.
- Incubación durante 3 minutos a 4°C con agitación.
- Dilución con agua destilada en exceso y centrifugación a 1000 xg durante 5 minutos. El sedimento es resuspendido en SSI al 50% (v/v).

2.4.2. Permeabilización con digitonina

La sistemática es común a los distintos procedimientos de grapamiento descritos en los apartados anteriores.

- Incubación durante 5 minutos a 25°C con agitación

de una suspensión formada por: 1 volumen de eritrocitos grapados suspendidos al 50% (v/v), 9,5 volúmenes de agua destilada y 0,5 volúmenes de digitonina al 1% en etanol. La proporción en que se usa la digitonina es por tanto de 10 mg por gramo de eritrocitos.

- Centrifugación a 1000 xg durante 5 minutos y lavado del precipitado dos veces con SSI, resuspendiéndolo finalmente en este medio hasta el 50% (v/v).

2.5. METODO DE LISIS DE ERITROCITOS PERMEABILIZADOS

Los eritrocitos permeabilizados por alguno de los métodos descritos en el apartado anterior son difíciles de romper por métodos físicos, como luego se describirá en RESULTADOS. No obstante, uno de los reactivos bifuncionales que hemos utilizado, el DTBP, dado que posee en su molécula un puente S-S, presenta la posibilidad de ser escindido por tratamiento con agentes reductores de este tipo de enlaces como puede ser el mercaptoetanol o el ditioeritritol (DTE). De esta manera una vez grapados los eritrocitos con DTBP, al tratarlos con DTE se verifica una rotura de las moléculas del reactivo que mantienen unidos los componentes de la membrana, lisándose de esta manera las células. El procedimiento es como sigue:

- Un gramo de eritrocitos permeabilizados (y grapados con DTBP) son tratados con DTE 10 mM. Tras 10 minutos a 25°C puede observarse lisis total al microscopio.

2.6. OBTENCION DE LOS HEMOLIZADOS

La técnica clásica de hemólisis por hipotonía presenta el inconveniente de la formación espontánea de vesículas discoidales ("ghosts"), constituidos por restos de membranas invertidos que pueden secuestrar en su interior proporciones apreciables de las proteínas del citosol (18) y con ello dar lugar a diferencias en la determinación de la cantidad total de los enzimas que se estudien, diferencias por otro lado frecuentes en la literatura.

Hemos elegido la rotura mecánica por sonicación, con la que se obtiene un fraccionamiento mas completo de la membrana y unas actividades enzimáticas máximas superiores a las obtenidas por hemólisis hipotónica o por congelación-descongelación (98). La sonicación se ha llevado a cabo en un espacio de tiempo lo suficientemente corto, que evite la desnaturalización proteica por calentamiento (o, eventualmente, por vibración, como ha sido descrito posteriormente por Asakura et al. (3)). El procedimiento ha consistido en sonicar a intensidad 6 en nuestro sonificador (vease APARATOS), una suspensión de eritrocitos lavados en SSI al 20% (v/v) durante 10 segundos, manteniendo el recipiente en hielo, con objeto de evitar un calentamiento excesivo.

Cuando en algún experimento fué preciso utilizar un hemolizado concentrado se sonicó de idéntica manera un sedimento de eritrocitos que habían sido centrifugados previamente a 1000 xg durante 5 minutos.

2.7. PREPARACION DE EXTRACTOS DE MUSCULO

Trozos de músculo esquelético, previamente tri-

turados, fueron homogeneizados empleando un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflón acoplado a un dispositivo giratorio. El homogenado se preparó con 5 volúmenes de fosfato 5 mM, KCl 150 mM, KHCO_3 5 mM, Cl_2Mg 1 mM, CaCl_2 0,5 mM, DTE 1 mM, a pH 7,4.

El extracto se obtuvo por centrifugación del homogenado a 30.000 xg durante una hora, tomando el sobrenadante y descartando el sedimento.

2.8. VALORACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

A excepción de la hexokinasa, para cuya valoración hemos empleado un método isotópico, el resto de las actividades enzimáticas se valoraron por métodos espectrofotométricos continuos en los cuales se acoplaba la reacción estudiada con cambios red-ox en un piridinnucleótido, adicionando, cuando fué necesario, un sistema de enzimas auxiliares. Se utilizaron cubetas de vidrio óptico Corex, con paso de luz de 1 cm. Las valoraciones se realizaron a 37°C, registrándose gráficamente la variación de la absorción a 340 nm. En todos los casos se llevaron blancos adecuados. El coeficiente de extinción molar de NADH y NADPH se tomó igual a 6,22 por cm de paso de luz y 1 mM de concentración.

Para el estudio de actividades enzimáticas se adoptó una mezcla base que representa simplícidamente lo más común del medio ambiente micromolecular intracelular: un tampón a pH 7,4 (TES 50 mM), KCl 100 mM y MgCl_2 5 mM, mas Ficoll al 7% con objeto de mejorar la estabilidad de la suspensión. En ensayos preliminares con algunos enzimas se comprobó la no influencia del Ficoll sobre la actividad de los mismos; tampoco provocó agregación de los eritrocitos permeabilizados, como se comprobó por examen al micros-

copio óptico tras una incubación correspondiente al tiempo de los ensayos.

La cantidad de muestra ensayada en las valoraciones espectrofotométricas (eritrocitos permeabilizados o hemolizados) fué de 2 mg. La absorción óptica debida a la turbidez de esta suspensión diluida no interfiere con el método de valoración.

Las reacciones se iniciaron añadiendo el substrato, o uno de los substratos, tras dejar equilibrar la mezcla de reacción -salvo dicho substrato- durante unos 10 minutos a 37°C.

A continuación se indican los sistemas de ensayo utilizados para cada enzima. Los métodos de ensayo empleados para la valoración de hexokinasa, fosfofructokinasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa se describen en particular mas abajo (2.8.1.- 2.8.3.)

Glucosafosfato isomerasa: Mezcla base, fructosa-6-P 2 mM, NADP⁺ 0,5 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1 U.

En los estudios cinéticos se variaron las concentraciones de los reactivos según se indica en cada caso.

Aldolasa: Mezcla base, fructosa 1,6-diP 1 mM, NADH 0,15 mM, α -glicerofosfato deshidrogenasa 0,5 U, triosafosfato isomerasa 5 U.

Triosafosfato isomerasa: Mezcla base, gliceraldehido-3-P 3 mM, NADH 0,15 mM, α -glicerofosfato deshidrogenasa 1 U.

Fosfoglicerato kinasa: Mezcla base, DTE 1 mM, ATP-Mg 1 mM, 3-fosfoglicerato 5 mM, NADH 0,15 mM, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa 1 U.

Fosfoglicerato mutasa: Mezcla base, DTE 1 mM, 2,3-difos-

foglicerato 0,05 mM, 3-fosfoglicerato 1 mM, ADP-Mg 1 mM, NADH 0,15 mM, enolasa 0,1 U, piruvato kinasa 2 U, lactato deshidrogenasa 2 U.

Enolasa: Mezcla base, EDTA 1 mM, 2-fosfoglicerato 0,5 mM, ADP-Mg 1 mM, NADH 0,15 mM, piruvato kinasa 0,5 U, lactato deshidrogenasa 1 U.

Piruvato kinasa: Mezcla base, ADP-Mg 2 mM, fosfoenolpiruvato 5 mM, NADH 0,15 mM, lactato deshidrogenasa 1 U.

Lactato deshidrogenasa: Mezcla base, NADH 0,15 mM, piruvato 2 mM.

Adenilato kinasa: Mezcla base, ADP-Mg 2 mM, NADP^+ 0,5 mM, glucosa 1 mM, hexokinasa 1 U, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1 U.

2.8.1. Valoración de la hexokinasa.

Por tratarse del enzima menos activo de la ruta glicolítica hemos usado un método isotópico adaptado del usado para valorar galactokinasa por Sherman y Addler (122) en *E. coli* y Blume y Beutler (17) en eritrocitos, consistente en la incubación de glucosa marcada con ^{14}C junto con ATP y el enzima (eritrocitos permeabilizados o hemolizado), expresándose la actividad en función de la radiactividad incorporada en forma de glucosa-6-fosfato (o bien ligada a cualquier otro metabolito formado a partir de éste) a un filtro de papel Whatman DE 52 retenedor de aniones y sobre el que se lava la mezcla reaccionante de forma que se elimina la (^{14}C) glucosa no fosforilada. La mezcla de reacción fué: mezcla base, ATP-Mg 5 mM, glucosa 2 mM, ($\text{U-}^{14}\text{C}$) glucosa 0,3 $\mu\text{Ci/ml}$, en un volumen final de 0,4 ml. Se emplearon

20 mg de eritrocitos en cada ensayo.

Las valoraciones se llevaron a cabo a 37°C, tras 15 minutos de incubación, durante los que se comprobó que la reacción era lineal. Se tomaron 50 µl de la mezcla de reacción que se mezclaron con otros 50 de glucosa 1 M, con objeto de diluir la glucosa marcada; de esta mezcla se pusieron 50 µl sobre un círculo de papel Whatman DE 52 de 2,5 cm de diámetro que era lavado con 300 ml de agua destilada. Finalmente se medía la radiactividad incorporada a los filtros de papel secados a temperatura ambiente, utilizando como líquido de centelleo una solución de tolueno conteniendo 0,03% dimetil-p-bis-2-(5-feniloxazolil) benceno (dimetil-POPOP) y 5% 2,5-difeniloxazol (PPO). Sistemáticamente se tomaron alicuotas de la reacción a tiempo cero.

La formación de glucosa-6-fosfato se determinó a través de la diferencia existente entre la radiactividad total incorporada a un filtro sin lavar que contenía una alicuota de la reacción a tiempo cero y la incorporada a un filtro lavado tras adicionarle la mezcla una vez completado el tiempo de reacción.

La extinción inespecífica (quenching) fué fundamentalmente de orden químico, relacionada con el papel de intercambio iónico utilizado en el ensayo y no superó el 15%.

2.8.2. Valoración de la fosfofructokinasa.

La valoración de su actividad se llevó a cabo a través del sistema de enzimas auxiliares, aldolasa, triosa-fosfato isomerasa y α -glicerofosfato deshidrogenasa, acoplado a la producción de fructosa-6-fosfato (100). Salvo

indicación, la mezcla de ensayo fué: Mezcla base, DTE 1 mM, NADH 0,15 mM, ITP-Mg 1 mM, glucosafosfato isomerasa 0,5 U, aldolasa 1 U, α -glicerofosfato deshidrogenasa 1 U, triosa-fosfato isomerasa 10 U. El substrato, fructosa-6-fosfato, se adicionó mezclado con glucosa-6-fosfato en la proporción correspondiente a la K_{eq} de la reacción catalizada por la glucosafosfato isomerasa que es de 0,3 (60), manteniéndose así la concentración de fructosa-6-fosfato independiente de la presencia de este enzima en los eritrocitos permeabilizados o hemolizados.

Con objeto de eliminar el amonio, potente activador de la PFK, presente a concentraciones elevadas en las preparaciones comerciales de enzimas, el sistema de enzimas auxiliares empleado para el ensayo fué previamente dializado durante 4 horas con cuatro cambios, contra TRIS 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5.

En los estudios realizados, el enzima se valoró en dos tipos de condiciones: las indicadas arriba o en presencia de efectores positivos (AMP 0,1 mM, fosfato 5 mM y NH_4^+ 1 mM) cuando se quería obtener la actividad específica, o en otros casos que se especifican en RESULTADOS.

2.8.3. Valoración de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa: ensayo "lineal".

El ensayo espectrofotométrico de este enzima valorando la aparición de NADH, uno de sus productos, presenta inconvenientes importantes. Por un lado, el desarrollo de la reacción en el sentido de la producción de NADH se hace prácticamente imposible a pH fisiológico, puesto que mientras que no sea a pH fuertemente alcalino, el potencial red-ox del par NAD^+/NADH es muy elevado. Por esta razón

uno de los procedimientos clásicos de valoración consiste en la utilización de arseniato en lugar de fosfato como aceptor del grupo acilo y en presencia de NAD^+ en exceso (143) , dando lugar así a la formación virtualmente irreversible de 3-fosfoglicerato. Otro de los sistemas que se han propuesto con objeto de estudiar la reacción a pH fisiológico es la sustitución del NAD^+ por un análogo químico, el 3-acetil-piridín adenín nucleótido, (61), conjuntamente con el uso de un enzima auxiliar después de la deshidrogenasa, (79), de forma que la concentración del producto no coenzimático se mantenga lo mas baja posible, pudiéndose así seguir la reacción en el sentido glicolítico en esas condiciones de pH.

Además este enzima presenta una fuerte inhibición por los productos, tanto por el NADH como por el 1,3-difosfoglicerato. Estas inhibiciones son competitivas no solamente con el substrato precursor homólogo sino también con el cosubstrato opuesto, y con constantes de inhibición muy bajas, del orden de 10^{-6} M (41)(92). Esto da lugar a que la velocidad inicial de la reacción sea difícil de apreciar, pues el acúmulo inmediato de los productos comienza a inhibir el enzima, perdiéndose por tanto la linearidad ya casi desde el principio.

Ante estas dificultades, que rodean de un margen de incertidumbre, a los datos cinéticos obtenidos sobre este enzima, hemos utilizado un método espectrofotométrico de valoración, original de esta tesis y que está pendiente de publicación independiente, al que hemos llamado ensayo "lineal". Con este método se ha conseguido evitar la doble inhibición referida: el 1,3-difosfoglicerato se retira adicionando fosfoglicerato kinasa y ADP, valorándose el ATP formado a través de un sistema auxiliar con glucosa, glu-

cosa-6-fosfato deshidrogenasa y NADP^+ que da lugar a la aparición del NADPH observable a 340 nm; y el NADH se elimina por medio de LDH y piruvato. La interferencia de la adenilato kinasa, capaz de formar directamente ATP a partir de ADP, y que es un enzima ampliamente distribuido en los tejidos, se evita adicionando Ap_5A , potente inhibidor específico de este enzima (73). La secuencia de las reacciones auxiliares que intervienen en el ensayo lineal aparecen esquematizadas en la Figura 3.

La mezcla de reacción fué: Mezcla base, DTE 1 mM, EDTA 1 mM, NAD^+ 0,3 mM, fosfato 50 mM a pH 7,4, gliceraldehido-3-P 3 mM, triosafosfato isomerasa 0,5 U, piruvato 20 mM, lactato deshidrogenasa 1 U, ADP-Mg 1 mM, Ap_5A 0,1 mM, fosfoglicerato kinasa 2 U, glucosa 1 mM, hexokinasa 8 U, NADP^+ 0,5 mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 4 U. El cálculo de la concentración efectiva de gliceraldehido-3-P se hizo teniendo en cuenta que la K_{eq} de la reacción catalizada por la triosafosfato isomerasa es de 0,045 (91).

La preparación comercial de gliceraldehido-3-P utilizada se encuentra en forma de sal de bario. Para obtener el aldehido libre se siguió el siguiente procedimiento: calentamiento de 100 mg de la sal durante 3 minutos a 100°C en 5,5 ml de una suspensión de Dowex-50 al 28% (p/v) seguido de enfriamiento rápido sobre hielo, centrifugación a 1000 xg durante 10 minutos y lavado con 0,5 ml de agua destilada. La concentración total de aldehido presente en el último filtrado se determinó enzimáticamente con NADH y la mezcla de enzimas triosafosfato isomerasa/ α -glicerofosfato deshidrogenasa.

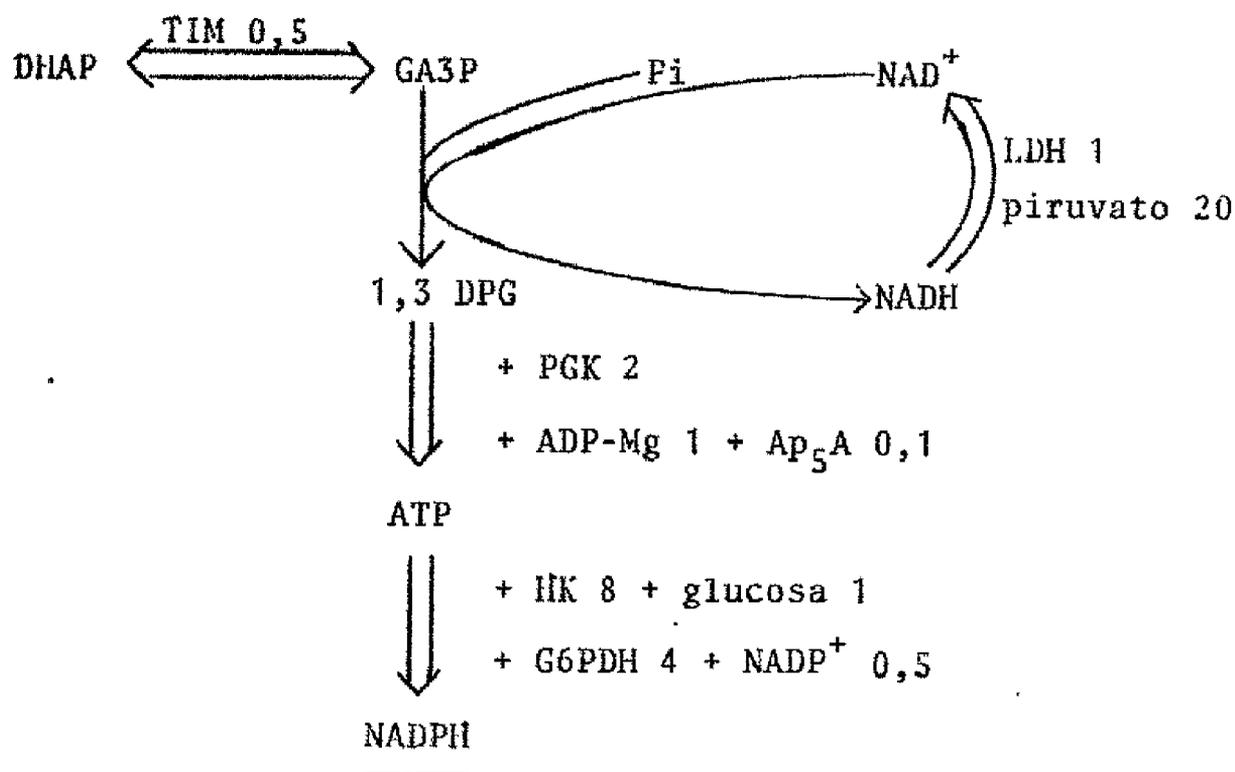


Figura 3. Ensayo "lineal" de gliceraldehido-3-P deshidrogenasa en condiciones fisiológicas.

Enzimas en U/ml; metabolitos en $\mu\text{moles/ml}$

2.9. GLICOLISIS IN SITU E IN VIVO

En los estudios in situ la glicolisis se midió incubando eritrocitos permeabilizados en una concentración final de 0,25 g por ml a 37°C. Las células se suspendieron en TES 50 mM pH 7,4, KCl 0,1 M, Cl₂Mg 5 mM. La composición de las mezclas de ensayo se refiere en RESULTADOS. La glicolisis se inició con glucosa 5 mM, glucosa-6-P 1 mM o gliceraldehido-3-P 5 mM; a tiempos determinados (vease RESULTADOS) se tomaron alicuotas que fueron centrifugadas a 2000 xg durante 5 minutos, valorándose lactato en los sobrenadantes una vez decantados (ver 2.10).

En los estudios in vivo se incubaron eritrocitos normales a 37°C, suspendidos en SSP a una concentración final de 50 mg por ml. La reacción se inició con glucosa 10 mM o bien con dihidroxiacetona 10 mM. Se midió la glicolisis análogamente a lo descrito para los estudios in situ a través de la valoración de lactato.

2.10. VALORACION DE METABOLITOS

La determinación de la concentración de metabolitos se realizó en dos sistemas diferentes, por un lado en las alicuotas tomadas de las mezclas de reacción en que se estudió glicolisis y por otro en preparaciones de eritrocitos permeabilizados.

2.10.1 Obtención de las muestras.

Las valoraciones de intermediarios glicolíticos se llevaron a cabo en las muestras obtenidas para va-

lorar lactato en un sistema que glicolizaba, de forma análoga a como se ha descrito en el apartado anterior.

La obtención de muestras para valorar la posible existencia de determinados metabolitos en eritrocitos permeabilizados fué como sigue: se utilizaron preparaciones de eritrocitos que habían sido grapados con DTBP y lisados con DTE (vease METODO DE LISIS DE ERITROCITOS PERMEABILIZADOS). De la muestra a estudiar se tomaron 4 ml (2 g de eritrocitos, peso húmedo) que fueron congelados en nitrógeno líquido, a continuación se mezclaron con 2 ml de HClO_4 3 M y 0,5 ml de TRIS 0,4 M, manteniéndolos 10 minutos a -10°C y descongelándolos luego a temperatura ambiente con agitación frecuente. Una vez descongelados se centrifugaron a 10.000 xg durante 10 minutos. Los sobrenadantes se ajustaron a pH 6,5 con KOH 10 N. Después de 10 minutos a 0°C se centrifugaron los extractos a 2000 xg durante 10 minutos y los sobrenadantes de esta última operación constituyeron las muestras para la valoración de los metabolitos (115).

2.10.2 Valoración de los metabolitos.

La determinación de la concentración de metabolitos en las muestras obtenidas, se realizó por métodos enzimáticos espectrofotométricos en los cuales se acopló la reacción principal con cambios red-ox en los piridín nucleótidos, siguiéndose la variación en la absorción a 340 nm hasta que la reacción terminó por consumo del metabolito a valorar.

El volumen final de la mezcla de reacción fué de 1 ml. En las valoraciones se utilizaron habitualmente 50 μl de cada muestra.

A continuación se indican los sistemas de ensayo empleados para la valoración de cada metabolito.

Lactato. Su determinación se realizó con LDH y NAD^+ . La mezcla de ensayo fué: glicina 0,43 M pH 9, hidracina 0,34 M, NAD^+ 1,5 mM, LDH 35 U. (49).

Glucosa y mezcla de G6P + F6P. Fueron determinados sucesivamente. La mezcla de ensayo fué: TES 50 mM pH 7,4, KCl 0,1 M, MgCl_2 5 mM, NADP^+ 0,5 mM, ATP-Mg 2 mM, glucosafosfato isomerasa 1 U, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 2 U. La variación en la absorbancia hasta completarse la reacción indicó la concentración de G6P + F6P presente, la adición de 1 U de hexokinasa determinó el consumo de glucosa existente en la muestra. (12).

Fructosa-1-6-diP y mezcla de GA3P + DHAP. Fueron determinados sucesivamente. La mezcla de ensayo fué: TES 50 mM pH 7,4, KCl 0,1 M, MgCl_2 5 mM, NADH 0,3 mM, α -glicerofosfato deshidrogenasa 0,5 U, triosafosfato isomerasa 5 U. La variación en la absorbancia hasta completarse la reacción indicó la concentración de GA3P + DHAP presente, la adición de aldolasa 0,5 U determinó el consumo de FDP existente en la muestra. (86).

2,3-Difosfoglicerato. TRIS 46 mM pH 7,6, MgCl_2 5 mM, EDTA 1 mM, mercaptoetanol 1 mM, ATP 6 mM, NADH 0,3 mM, fosfoglicerato kinasa 22 U, fosfoglicerato mutasa 12 U, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa 4 U, 2-fosfoglicolato 2 mM. (85).

ATP. TES 50 mM pH 7,4, KCl 0,1 M, MgCl_2 5 mM, TPN^+ 0,5 mM, glucosa 2 mM, glucosa-6-P deshidrogenasa 2 U, hexokinasa 1 U (69).

2.11. DETERMINACION DE HEMOGLOBINA

Las muestras de eritrocitos permeabilizados y de hemolizado fueron suspendidas en NaOH 0,1 N al 10% (v/v) y mantenidos en un baño a ebullición durante 15 minutos, juntamente con una solución patrón de hemoglobina al 10% (v/v) también en NaOH 0,1 N. Se tomó una alícuota de estas soluciones y se añadieron 4 ml del reactivo de Drabkin (50 mg de KCN y 200 mg de $K_3Fe(CN)_6$ en 1000 ml de agua destilada) (152). Midiéndose luego la densidad óptica a 540 nm. La cantidad de hemoglobina de las muestras se determinó comparando con una curva patrón de hemoglobina preparada de igual forma.

2.12. DETERMINACION DE COLESTEROL

Se llevó a cabo paralelamente en eritrocitos normales sin sufrir ningún tratamiento, eritrocitos grapados y eritrocitos permeabilizados.

Primeramente se realizó la extracción del colesterol de los distintos tipos de eritrocitos (37). El procedimiento fué como sigue: centrifugación a 1000 xg durante 5 minutos de 2 ml de cada muestra, el sobrenadante se desechó y se añadieron 2 ml de KOH al 30% al precipitado que luego se calentó a 80°C durante 1 hora, se enfrió en hielo y a continuación se mantuvo 2 minutos en agitación tras adicionar 6 ml de cloroformo, luego se centrifugaron las soluciones a 2000 xg durante 15 minutos y con una jeringa y un cateter de polietileno se extrajo la fase inferior de las tres formadas, que es la que contiene el colesterol.

Se pasó entonces a valorar el colesterol extraí-

do de acuerdo con el método de Libermann-Burchard (133). Para ello se preparó una solución patrón de colesterol de 1 mg/ml, se añadieron a ésta y al resto de las soluciones problema 2 ml de reactivo acético-sulfúrico (preparado mezclando 4 partes de anhídrido acético y 1 parte de ácido sulfúrico concentrado, lentamente, con agitación y en matraz contenido en hielo) y se mantuvo en agitación durante 15 minutos. Finalmente se midió la densidad óptica a 625 nm. La cantidad de colesterol extraído de cada muestra se determinó comparando con la curva patrón de colesterol.

2.13. PURIFICACION PARCIAL DE LDH DE ERITROCITOS

Eritrocitos lavados y suspendidos al 50% en SSI (v/v) fueron hemolizados por congelación y descongelación en baño de acetona con nieve carbónica, resuspendiéndose luego en 5 volúmenes de TRIS 50 mM, ClK 100 mM, MgCl₂ 5 mM, a pH 7,4. Tras centrifugación a 30.000 xg durante 1 hora y descartando el sedimento se obtuvo un extracto que fué sometido a fraccionamiento entre el 47 y el 65% de sulfato amónico, empleado en forma de solución saturada a pH 7, adicionándolo gota a gota y con agitación continua. Las proteínas precipitadas se recogieron por centrifugación a 30.000 xg durante 30 minutos y se suspendieron en medio de homogeneización. La eliminación del sulfato amónico de la fracción obtenida se realizó por diálisis de 5 ml de la misma frente a 1 litro de solución de homogeneización durante 12 horas, con renovación del medio de diálisis a las 6 horas.

Todas las operaciones fueron llevadas a cabo en una cámara fría (4°C).

3. RESULTADOS

3.1. DESARROLLO Y ESTUDIO CRITICO DEL ABORDAJE IN SITU EN ERITROCITOS

El primero de los reactivos bifuncionales que se utilizó fué el TDI, cuya puesta a punto y ensayos preliminares fueron llevados a cabo por el Dr. J.E. Felú; con este reactivo iniciamos el método del abordaje in situ de enzimas intracelulares en eritrocitos y se llevaron a cabo los primeros estudios sobre actividad y comportamiento de enzimas en estas condiciones. Posteriormente se introdujo el uso de los otros reactivos, DMS y DTBP, adaptados con éxito en nuestro laboratorio por el Dr. R. Frenkel para permeabilizar leucocitos. Las pruebas referentes a la sistematización del abordaje fueron realizadas con los tres tipos de reactivos.

3.1.1. DETECCION EN ERITROCITOS GRAPADOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA IN SITU

Una vez obtenida la fijación de la membrana de los eritrocitos, utilizando para ello TDI y de acuerdo con el procedimiento explicado en MATERIAL Y METODOS (2.4.1.3.), procedimos a valorar actividad enzimática en la células (aún no habíamos tratado de aumentar la permeabilidad de la membrana usando digitonina).

El enzima que elegimos para este fin fué la LDH, dado que reúne una serie de características muy favorables:

- Posee mucha actividad en eritrocitos.
- Tiene un substrato grande, que además está cargado, el NADH, y con Km baja; lo que le convierte en un buen candidato para los estudios de permeabilidad que mas adelante realizamos (3.1.2.).

- Facilidad de ensayo.
- No presenta alosterismos, ni labilidades, ni requerimientos especiales.

Al valorar entonces LDH en los eritrocitos grapados en condiciones de V_{max} (MATERIAL Y METODOS, 2.8.), en caso de que no estuviesen permeabilizados no encontraríamos actividad enzimática, ya que estaría impedido el paso a substratos y cofactores, como sucede en una célula intacta. Realizado el ensayo se detectó una actividad LDH, que referida a número de eritrocitos y peso seco correspondió a:

- 1,8 U/ 10^9 eritrocitos grapados.
- 6,8 U/100 mg de peso seco de eritrocitos grapados.

A continuación, centrifugamos a 1000 xg durante 5 minutos la suspensión de eritrocitos ensayada y procedimos a valorar actividad enzimática en el sobrenadante; la actividad encontrada fué de:

- 0,08 U/ 10^9 eritrocitos grapados.
- 0,3 U/100 mg de peso seco de eritrocitos grapados.

Esta actividad es del 4% respecto a la encontrada en la suspensión total. Esto nos demostró que la actividad LDH que valoramos se encontraba fundamentalmente ligada a las células grapadas.

De análoga manera, en eritrocitos grapados con DMS o DTBP, la actividad encontrada en el sobrenadante no superó el 5%.

Estos resultados nos indicaron que el tratamiento con los reactivos bifuncionales empleados no solo fija las células sino que ya produce una cierta permeabilización. No obstante, pensamos que pudiera darse el caso de que durante la valoración de la actividad, los eritrocitos grapados sufrieran alguna alteración en la cubeta de ensayo que libera-

se al exterior los enzimas supuestamente intracelulares. Para comprobar esto se llevó a cabo la siguiente prueba: una cubeta funcionando con eritrocitos grapados se centrifugó a 1000 xg durante 5 minutos, recogiénndose el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en 1 ml de mezcla de ensayo, en estas condiciones la actividad LDH valorada en el sobrenadante fué menor del 5% de la valorada en la mezcla de ensayo inicial; por el contrario, el sedimento resuspendido manifestó del 80 al 90% de la actividad. Un examen microscópico despues de esta valoración nos reveló que las células se encontraban intactas.

De esta forma demostramos que durante la valoración de la actividad enzimática los enzimas siguen estando ligados a los eritrocitos grapados y probablemente situados en su interior, ya que como veremos mas adelante existen barreras de permeabilidad, salvadas por el tratamiento con digitonina.

Experiencias posteriores nos demostraron que preparaciones bien lavadas de eritrocitos permeabilizados no tiene nada de enzima soluble y son estables (ver 3.1.5.).

3.1.2. PERMEABILIZACION DE LOS ERITROCOTOS GRAPADOS

Primeramente valoramos actividad LDH en eritrocitos grapados con TDI, realizando un estudio cinético frente a piruvato y NADH.

Cuando se usó el piruvato como substrato variable obtuvimos una curva de saturación típicamente Michaeliana, como puede verse en la Figura 4. La Km calculada fué de 0,1 mM, semejante a la obtenida en hemolizado.

En cambio al realizar el estudio cinético de la LDH frente a NADH como substrato variable, a concentracio-

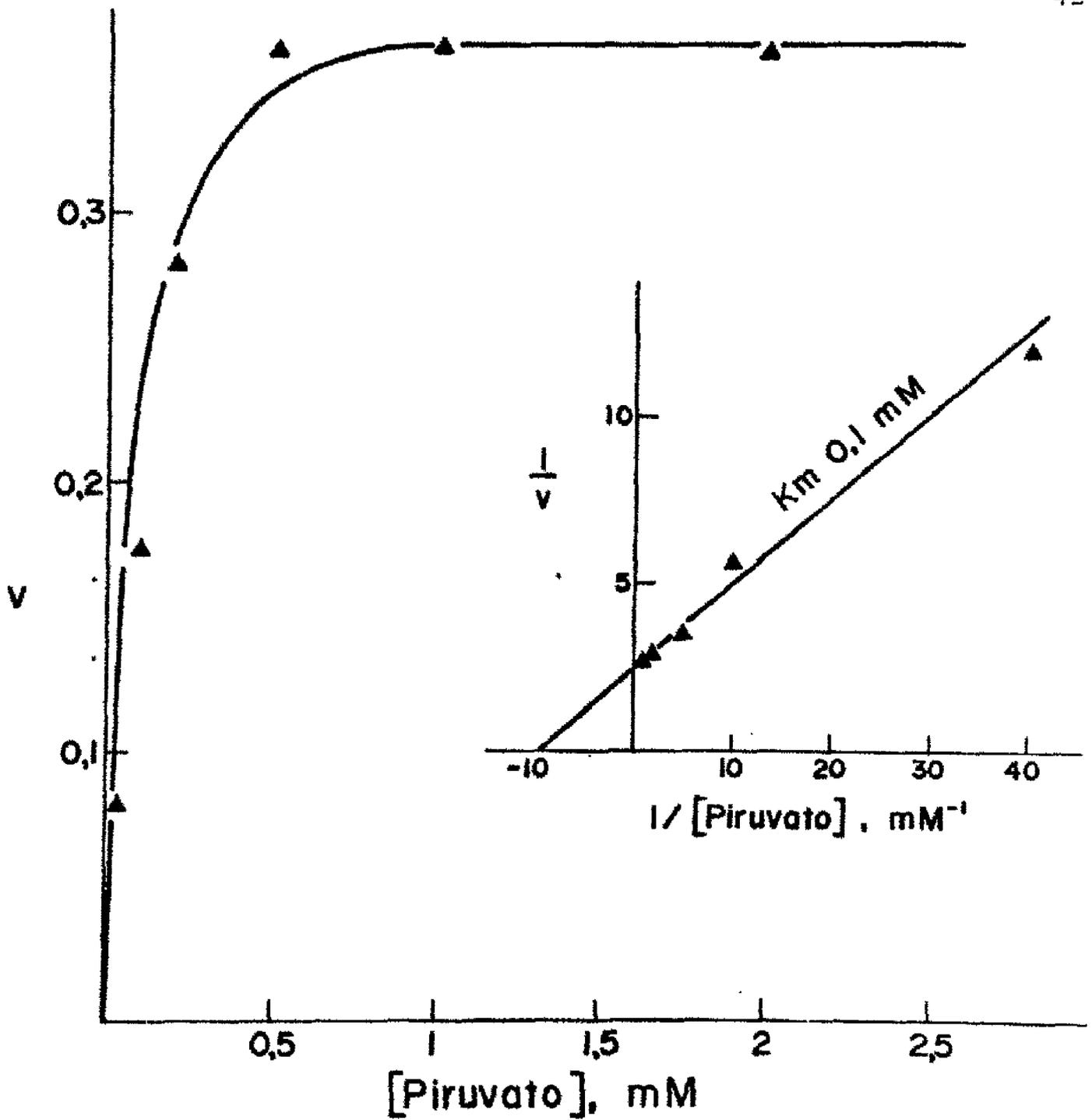


Figura 4. Estudio cinético de lactato deshidrogenasa en eritrocitos "grapados" frente a la concentración de piruvato.

NADH a concentración 0,2 mM.

Las demás condiciones de ensayo según MATERIAL Y METODOS.

nes entre 0,01 y 0,3 mM obtuvimos una curva de saturación en la que al aumentar el NADH no se llegaba a alcanzar una meseta dentro de este rango de concentraciones, como se ve en la Figura 5 (triangulos oscuros). Como puede apreciarse en la representación de Lineweaver-Burk, incluida en la misma Figura (triangulos oscuros), la K_m encontrada fué de 0,4 mM, valor anormalmente elevado de acuerdo con lo descrito (151) y diferente además a lo que encontramos in vitro, en hemolizado, en que un estudio cinético similar indicó una K_m de 0,03 mM (Figura 41). Estos datos nos hicieron pensar que o bien la LDH presenta una K_m in situ anormalmente elevada o bien existía una barrera de permeabilidad en los eritrocitos grapados, barrera manifiesta para el NADH y no para el piruvato debido al mayor tamaño de la molécula de NADH.

Empleamos entonces una serie de técnicas con el objeto de mejorar la permeabilidad de la membrana de los eritrocitos grapados, cuales fueron:

- Congelación y descongelación
- Remoción de lípidos con tolueno
- Remoción de lípidos con digitonina

Valorando LDH tras cada prueba, empleando el piruvato a 1 mM y a una concentración baja de NADH, 30 μ M, puesto que al ser la difusión directamente proporcional a la concentración de sustrato, en el caso de conseguir salvar la barrera de permeabilización y usando concentraciones de NADH por debajo de saturación observaríamos lógicamente un aumento en la actividad enzimática registrada.

3.1.2.1. Congelación y descongelación.

Valoramos LDH en eritrocitos grapados en las

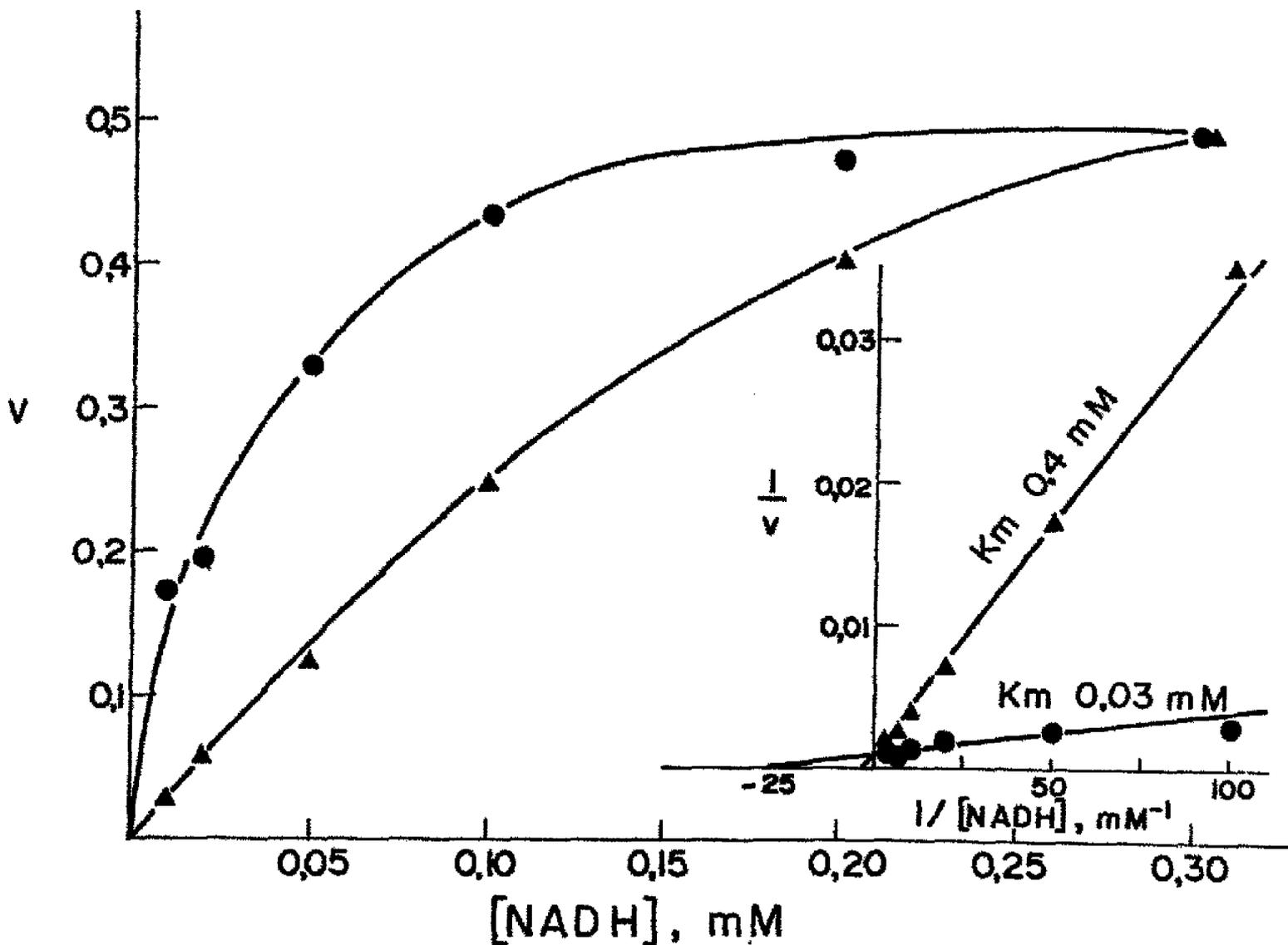


Figura 5. Estudio cinético de lactato deshidrogenasa frente a la concentración de NADH en eritrocitos grapados y en eritrocitos permeabilizados posteriormente con digitonina al 0,05%.

Piruvato a concentración 1 mM

(▲): eritrocitos grapados con TDI

(●): eritrocitos grapados y luego permeabilizados con digitonina al 0,05%

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

condiciones descritas mas arriba y a continuación realizamos una congelación y descongelación brusca de este lote de células empleando para ello un baño de acetona y nieve carbónica a -30°C , volviendo entonces a valorar LDH, la actividad registrada coincidió con la que se determinó antes de congelar.

No conseguimos pues con este intento aumentar la permeabilidad de la membrana al NADH/NAD^+ .

3.1.2.2. Remoción de lípidos con tolueno.

El procedimiento seguido fué añadir $50\ \mu\text{l}$ de tolueno en etanol al 20% a 1 ml de eritrocitos grapados suspendidos en SSI al 10% (v/v), mantenerlos 5 minutos en agitación y lavar, resuspendiendo hasta 1 ml en este mismo medio.

La actividad LDH registrada despues de este proceso superó en un 25% a la que mostró el lote inicial de eritrocitos grapados sin tratarlos con tolueno.

3.1.2.3. Remoción de lípidos con digitonina.

El procedimiento que seguimos fué expuesto en MATERIAL Y METODOS (2.4.2.), pero usando en este caso la digitonina a tres concentraciones, 0,001%, 0,01% y 0,05%.

Las actividades enzimáticas encontradas fueron las siguientes:

	<u>U/10⁹</u> <u>eritrocitos</u>	<u>U/mg de</u> <u>peso seco</u>	<u>% de</u> <u>actividad</u>
- Eritrocitos grapados	0,7	0,02	100
-Eritrocitos grapados + digitonina al 0,001%	0,8	0,02	114 y 109
-Eritrocitos grapados + digitonina al 0,01%	1,3	0,03	185 y 173
-Eritrocitos grapados + digitonina al 0,05%	1,4	0,04	200

Realizando pues un tratamiento posterior a la fijación de las proteínas de la membrana con TDI utilizando digitonina disuelta en etanol, a una concentración final en el tratamiento del 0,05%, conseguimos aumentar la permeabilidad de los eritrocitos grapados al NADH, puesto que aumentó considerablemente la actividad LDH a una concentración de NADH muy por debajo de saturación.

Verificamos entonces un estudio cinético en estos eritrocitos permeabilizados y encontramos una curva de saturación para el NADH ya típicamente Michaeliana, con una K_m para este sustrato de 0,03 mM (Figura 5, círculos oscuros), de acuerdo ahora con los datos obtenidos en hemolizado.

En eritrocitos grapados con DMS y DTBP realizamos un estudio similar. Conociendo ya la posible existencia en estas células de una permeabilidad insuficiente, a la vista de los resultados obtenidos con el TDI, procedimos a valorar LDH a dos concentraciones de NADH, una en el rango de la K_m , 30 μ M, y a otra a saturación, y de forma simultánea en dos lotes de células: uno de eritrocitos grapados con DMS o DTBP y otro en que después de graparlos fueron tratados con digitonina al 0,05%. De esta manera la relación entre la actividad LDH con NADH a concentración alta y baja nos indicaría el nivel de permeabilidad de las células grapadas y el efecto posterior de la digitonina, puesto que una vez permeabilizadas las células y de acuerdo con la definición de K_m la relación referida deberá ser de 2. La actividad fué referida a U/g de células, parámetro que finalmente adoptamos para referir la actividad específica.

Los resultados aparecen en la Tabla 1. Puede apreciarse que cuando se usa como reactivo grapador el DMS, exis-

TABLA 1. Actividad LDH en eritrocitos grapados con DMS o DTBP y luego tratados con digitonina, a las concentraciones de NADH que se indican.

La actividad enzimática está expresada en U/g de células

A) Reactivo grapador: DMS

	<u>NADH 0,3 mM</u>	<u>NADH 0,03 mM</u>	<u>NADH 0,3 mM/NADH 0,03 mM</u>
Eritrocitos grapados	11	4	2,8
Eritrocitos permeabilizados	20	9,3	2,1

B) Reactivo grapador: DTBP

	<u>NADH 0,3 mM</u>	<u>NADH 0,03 mM</u>	<u>NADH 0,3 mM/NADH 0,03 mM</u>
Eritrocitos grapados	12,6	6	2,1
Eritrocitos permeabilizados	14,8	7,5	2

te una barrera de permeabilidad análoga a en el caso del TDI, puesto que la relación de la actividad LDH a NADH alto y bajo es de 2,8, barrera que se elimina con el uso de la digitonina. Cuando el reactivo grapador es el DTBP, puede verse que las células grapadas están ya suficientemente permeabilizadas. No obstante, dada la aparente inocuidad para los enzimas intracelulares de la digitonina y el etanol a las concentraciones empleadas y en beneficio de una mayor uniformidad para el procedimiento, adoptamos a partir de aquí la adición de una segunda etapa de permeabilización con digitonina sistemáticamente tras el proceso de grapamiento con cualquiera de los tres reactivos bifuncionales que hemos utilizado, siguiendo la pauta detallada en MATERIAL Y METODOS.

El aumento de permeabilidad encontrado con el uso de la digitonina pensamos que debería estar relacionado en parte con la liberación del colesterol de la membrana por parte de la digitonina, una vez que forma con él un compuesto insoluble. Hicimos entonces una valoración de este lípido (MATERIAL Y METODOS, 2.12.) en cada uno de los tipos de eritrocitos, intactos, grapados y permeabilizados. En la Tabla 2 exponemos el resultado de esta valoración incluyendo los tres tipos de reactivos grapadores. Como era de esperar la cantidad de colesterol disminuyó notablemente tras la utilización de la digitonina, de forma que el porcentaje del colesterol extraído en eritrocitos permeabilizados osciló entre un 50 y un 70% del total existente en eritrocitos normales.

Puesto que el tratamiento con digitonina en las condiciones en que se realiza (2.4.2.) supone un choque hipotónico drástico para las células grapadas se pensó que el incremento de la permeabilidad conseguido podría estar

TABLA 2. Valoración de colesterol en eritrocitos intactos, grapados (con TDI, DMS y DFBP respectivamente) y posteriormente permeabilizados con digitonina.

El colesterol se expresa en mg/g de eritrocitos

	<u>TDI</u>	<u>DMS</u>	<u>DFBP</u>
Eritrocitos intactos	1,1	1,1	1,1
Eritrocitos grapados	0,96	0,96	0,92
Eritrocitos permeabilizados	0,3	0,6	0,48
% de colesterol extraído	73	45	56

tambien relacionado con la desestructuración que la membrana grapada puede sufrir en este choque. Con objeto de aclarar esta cuestión, realizamos un estudio de permeabilidad en eritrocitos que además de graparlos y tratarlos luego con digitonina habian sufrido una etapa intermedia entre los dos tratamiento en que fueron lavados con agua destilada, valorando LDH a concentración alta y baja de NADH como hicimos anteriomenete.

En la Tabla 3 aparecen los resultados obtenidos en eritrocitos que fueron grapados con DMS y DTBP, los dos reactivos que mas hemos utilizado. A partir de estos datos puede apreciarse (y fundamentalmente en el caso del DMS), que el choque hipotónico contribuye marcadamente a un aumento en la permeabilidad. aunque la digitonina puede contribuir a suprimir por completo la barrera para la difusión del NADH.

3.1.3. VISUALIZACION DE ENZIMAS INDEPENDIENTES DE PIRIDINNUCLEOTIDOS.

En el caso de enzimas no dependientes de piridin-nucleótidos la sistemática del ensayo espectrofotométrico consistió en adicionar a la mezcla de reacción un sistema auxiliar que comprendiese alguna deshidrogenasa piridin-nucleótido dependiente, conjuntamente con la suspensión de eritrocitos permeabilizados. De esta manera, los productos (o el producto) de la reacción principal, una vez fuera de las células son transformados por el sistema del enzima o enzimas auxiliares, condicionandose así el cambio red-ox en el piridin-nucleótido y que es observable a 340 nm.

En la Figura 6 ilustramos este caso con el ejemplo del método de ensayo para la valoración in situ de la glucosafosfato isomerasa de forma que nos permite seguir

TABLA 3. Estudio de permeabilidad en eritrocitos grapados con DMS o DTBP, que luego fueron lavados con agua destilada y finalmente tratados con digitonina.

Se expresa la actividad LDH en U/g valoradas a las concentraciones de NADH que se indican

A) Reactivo grapador: DMS			
<u>Etapas</u>	<u>NADH 0,3 mM</u>	<u>NADH 0,03 mM</u>	<u>NADH 0,3 mM/NADH 0,03 mM</u>
1 ^a : Grapamiento	11	4	2,8
2 ^a : Lavado con agua	13,2	6	2,2
3 ^a : Tratamiento con digitonina	20	9,3	2,1

B) Reactivo grapador: DTBP			
<u>Etapas</u>	<u>NADH 0,3 mM</u>	<u>NADH 0,03 mM</u>	<u>NADH 0,3 mM/NADH 0,03 mM</u>
1 ^a : Grapamiento	12,6	6	2,1
2 ^a : Lavado con agua	13,3	6,7	2
3 ^a : Tratamiento con digitonina	14,8	7,5	2

ENSAYO DE ENZIMA IN SITU (GLUCOSA-6-FOSFATO ISOMERASA)

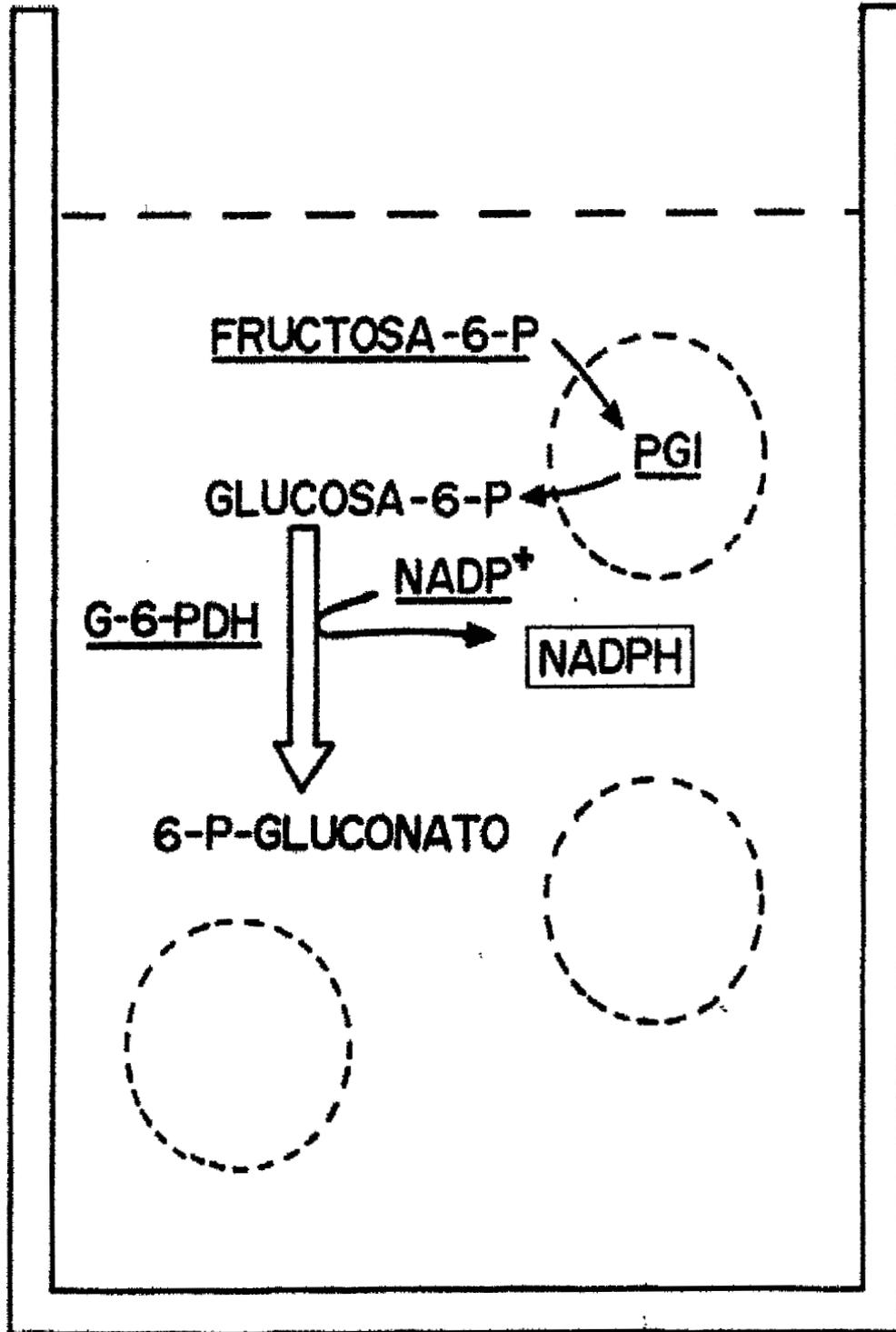


Figura 6. Suspensión diluida de eritrocitos permeabilizados en un medio conteniendo el sustrato y el sistema auxiliar que permite seguir la actividad espectrofotométricamente.

su actividad espectrofotométricamente.

3.1.4. RENDIMIENTO DEL METODO DE PERMEABILIZACION DE ERITROCITOS

El rendimiento del método de permeabilización de eritrocitos se valoró de acuerdo con los siguientes criterios:

- Contaje del número de células por milímetro cúbico.
- Peso seco.
- Absorción a 650 nm.

Los tres criterios se ensayaron sucesivamente en eritrocitos permeabilizados empleando TDI, DMS y DTBP.

3.1.4.1. Contaje del número de células por milímetro cúbico

De una porción de eritrocitos intactos se tomó una fracción de los mismos que fueron permeabilizados y luego suspendidos en SSP a la misma concentración que la del lote inicial de células intactas, al 50% (v/v). Se tomaron alicuotas de ambos tipos y se contaron en una cámara de Neubauer.

El número de células por milímetro cúbico en los eritrocitos permeabilizados fué del 77% respecto a los sin permeabilizar.

3.1.4.2. Peso seco

Se tomaron alicuotas de eritrocitos de los dos tipos mencionados en el apartado anterior, se pusieron sobre sendos filtros Whatman, previamente pesados y fueron secados durante 3 horas bajo una lámpara de 220 W al cabo de las cuales se calculó el peso neto de los dos lotes de eri-

trocitos desecados.

El peso seco de los eritrocitos permeabilizados resultó ser el 77% respecto a los sin permeabilizar.

3.1.4.3. Absorción a 650 nm

Nos interesaba encontrar un procedimiento para valorar el rendimiento de la permeabilización de forma mas rápida que con los criterios anteriores de contaje y peso seco. En este sentido pensamos en buscar un parámetro que nos permitiera valorar con facilidad la turbidez propia de las células íntegras.

Con este objeto realizamos los espectros de absorción de las siguientes suspensiones:

- Control de eritrocitos intactos en SSP
- Eritrocitos intactos en agua destilada
- Eritrocitos permeabilizados en SSP

Y las tres a la misma concentración de células, el 0,2% (v/v).

Como puede apreciarse en la Figura 7, en que aparecen los espectros de absorción correspondientes, los tres presentan un máximo de absorción entre 400 y 450 nm, típico de la oxihemoglobina. En cambio a 650 nm la densidad óptica del lisado (eritrocitos intactos en agua destilada) es nula, mientras que los eritrocitos íntegros (intactos en SSP y permeabilizados) presentan a esa longitud de onda densidades ópticas que oscilan en los distintos espectros entre 1,2 y 1,4 u.o.; absorción que lógicamente corresponde a la turbidez propia de la presencia de células íntegras.

Aplicando este criterio a la medida de la densidad óptica a 650 nm a eritrocitos intactos y a la fracción de eritrocitos permeabilizados suspendidas ambas en

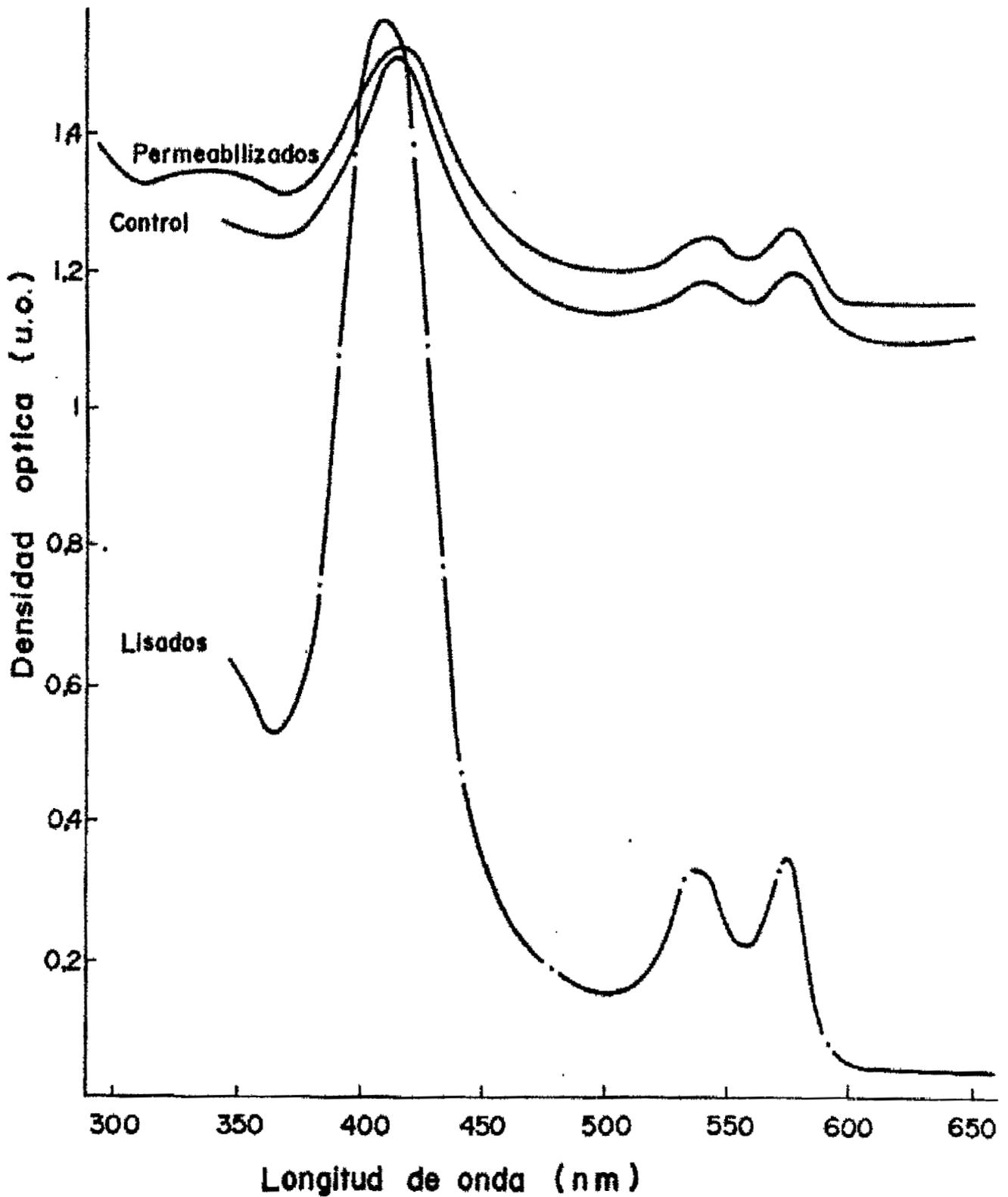


Figura 7. Espectros de absorción verificados en eritrocitos permeabilizados e intactos.

Los eritrocitos permeabilizados y el control de eritrocitos intactos fueron suspendidos en SSP. El lisado fué obtenido suspendiendo eritrocitos intactos en agua destilada. La concentración fué la misma en los tres casos: 0,2% (v/v)

SSP al 0,2% (v/v) resultó un porcentaje del 80% de células íntegras tras los procesos de permeabilización.

De acuerdo con estos tres criterios, hemos encontrado que el rendimiento del método de permeabilización de eritrocitos está alrededor del 80%, siendo esta cifra similar con los tres tipos de reactivos bifuncionales utilizados.

3.1.5. ESTABILIDAD DE LOS ERITROCITOS PERMEABILIZADOS

Con objeto de conocer la estabilidad de las células permeabilizadas se llevaron a cabo una serie de pruebas, empleándose distintos tratamientos.

La estabilidad fué estudiada paralelamente en eritrocitos que habían sufrido los tres procedimientos de permeabilización descritos (2.4.1.)

3.1.5.1. Tratamientos fisicoquímicos.

Se prepararon dos lotes de eritrocitos:

- Lote A: eritrocitos intactos.
- Lote B: eritrocitos permeabilizados.

Ambos lotes se mezclaron por separado y sucesivamente a una concentración final del 0,3% (v/v) con los siguientes productos:

1. Agua destilada
2. Alcohol etílico al 30% en SSP
3. Acetona al 30% en SSP
4. Saponina al 0,1% en SSP
5. Diditonina al 0,1% en SSP

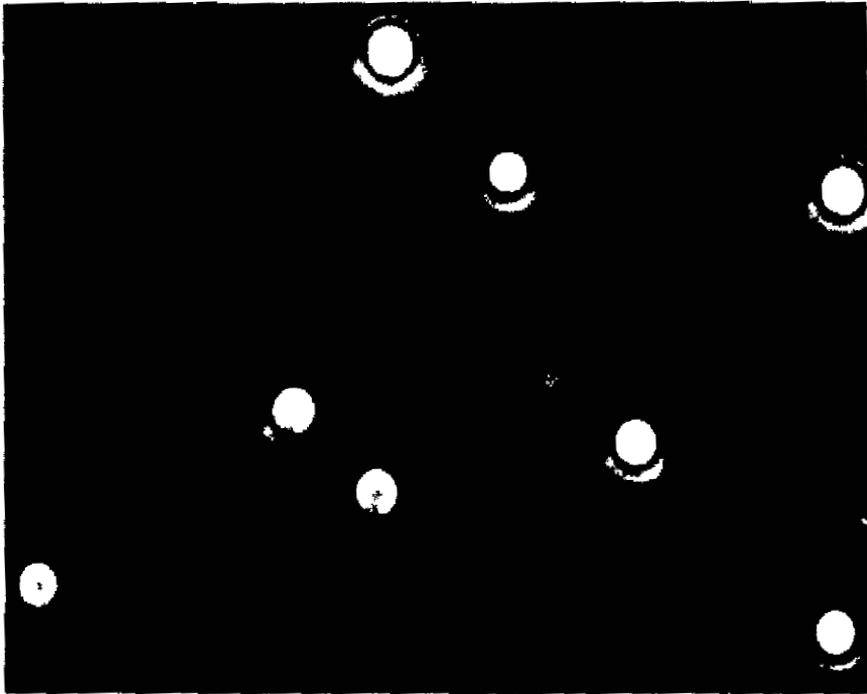
Se consideró el 100% de hemólisis a la obtenida al suspender los eritrocitos en 6 ml de agua destilada a

dicha concentración, y el 0% de hemólisis (siempre hay algo de hemólisis debida a la manipulación de las células, como la centrifugación, aún en medio isotónico) a la obtenida suspendiendo igual cantidad de eritrocitos en SSP. El grado de hemólisis fué valorado por lectura espectrofotométrica a 540 nm del sobrenadante que resultó de centrifugar las suspensiones de eritrocitos a 1000 xg durante 5 minutos y situando los valores obtenidos entre el 0 y el 100% de hemólisis. Se procuró seleccionar una suspensión de eritrocitos de tal forma que con el 100% de hemólisis no se perdiese la linealidad de la ley de Lambert-Beer.

Con el lote B, de eritrocitos permeabilizados, apareció una hemólisis menor del 5%, contrastando con el lote A, de eritrocitos intactos, que presentó una hemólisis del 100% al enfrentarse con cada uno de los agentes empleados.

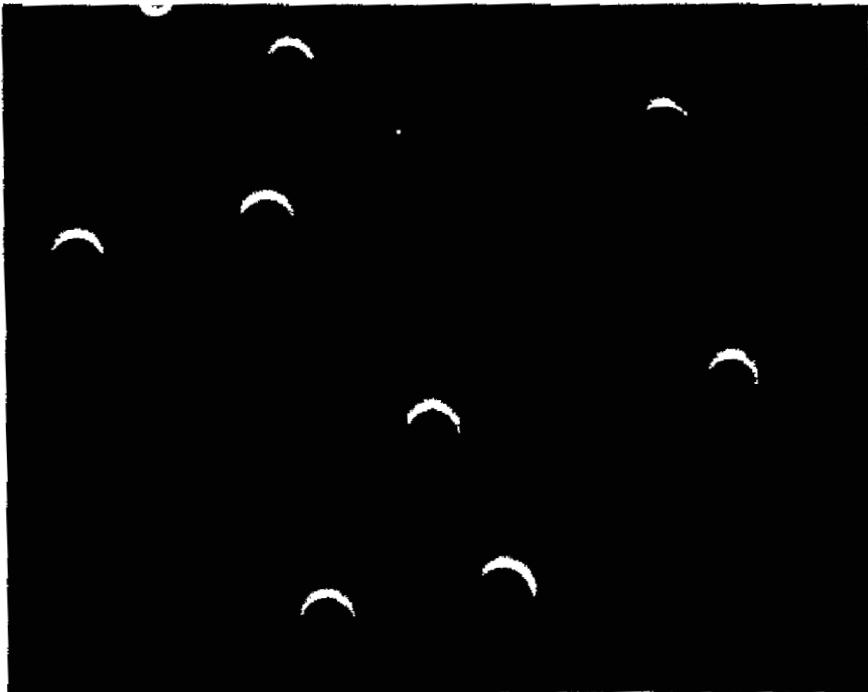
El sedimento de 1000 xg, de los eritrocitos permeabilizados, que no habían sufrido hemólisis, fué suspendido en SSP y examinados los eritrocitos microscópicamente, en todos los casos presentaron forma normal. Como ejemplo de la resistencia a la hemólisis, presentada por los eritrocitos permeabilizados, presentamos una fotografía (Figura 8,B) en que aparecen algunos de estos suspendidos en agua, mostrando el mantenimiento de su forma característica, como puede observarse comparando con la fotografía acompañante en que se ven eritrocitos normales, sin permeabilizar, disueltos en SSP.

En la Figura 9 presentamos fotografías de eritrocitos permeabilizados y normales obtenidas al M.E.



A

Eritrocitos normales, sin permeabilizar, suspendidos en SSP



B

Eritrocitos permeabilizados suspendidos en agua destilada

Figura 8. Fotografías obtenidas con un microscopio Nikon de contraste de fase a 400 aumentos.



Control de eritrocitos intactos



Eritrocitos permeabilizados
(TDI-digitonina)



Eritrocitos permeabilizados
(DTBP-digitonina)

Figura 9. Fotografías al microscopio electrónico de eritrocitos intactos y permeabilizados (x38.000)

3.1.5.2. Tratamientos mecánicos

Los eritrocitos permeabilizados fueron sometidos a las siguientes pruebas:

a) Homogeneización: 5 ml de eritrocitos permeabilizados fueron homogeneizados durante 2 minutos utilizando un homogeneizador de vidrio Kontes con vástago también de vidrio, acoplado a un motor corriente usado a velocidad media.

b) Congelación-descongelación: durante 12 horas, 5 ml de eritrocitos permeabilizados permanecieron congelados a -15°C , al cabo de los cuales fueron descongelados.

Otro lote de eritrocitos permeabilizados fué congelado y descongelado bruscamente dos veces, usando un baño de acetona y nieve carbónica a -70°C .

c) Rotura en mortero con alúmina: fueron centrifugados a 2000 xg durante 5 minutos 4 ml de eritrocitos permeabilizados; el sedimento se mezcló con alúmina o arena fina (en una cantidad triple del peso del precipitado) en un mortero donde se machacó durante 10 minutos, el polvo obtenido se diluyó en 10 ml de SSI y fué centrifugado a 30.000 xg durante 15 minutos, el sedimento fué luego resuspendido en SSI hasta el volumen inicial.

d) Sonicación: los eritrocitos permeabilizados fueron sometidos a sonicación en el Branson Sonic Power, puesto a intensidad 7 y durante 1 minuto. A otro lote de los mismos eritrocitos se le agregó polvo de vidrio (1/1, en peso) antes de la sonicación.

Tras finalizar cada prueba se valoró en todos los casos la hemoglobina liberada de acuerdo con el método descrito en el apartado anterior, observándose tras todas las pruebas una hemólisis menor del 5%.

3.1.5.3. Estabilidad de enzimas in situ

Con objeto de conocer la estabilidad in situ de algunos de los enzimas estudiados, preparamos un lote de eritrocitos permeabilizados (grapados con TDI) y valoramos en V_{max} (MATERIAL Y METODOS) glucosafosfato isomerasa (PGI), triosafosfato isomerasa (TIM) y lactato deshidrogenasa (LDH). A continuación se conservaron suspendidos en glicerol y a -20°C . Los tres enzimas se volvieron a valorar a los 20 y 60 días mas tarde; para ello se tomaron alicuotas que se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 xg, el sedimento se diluyó al 20% en SSI, ensayándose los enzimas en esta suspensión final.

Los resultados aparecen en la Tabla 4, donde puede apreciarse como la actividad de los tres enzimas estudiados se conservó a lo largo de dos meses en mas de un 90%.

Los sobrenadantes de cada muestra presentaron aspecto incoloro y transparente y no mostraron absorción de luz apreciable a 540 nm, indicando esto que no hubo practicamente liberación de hemoglobina a partir de los eritrocitos permeabilizados, manteniéndose por tanto íntegros a lo largo de los dos meses de observación. Tampoco se observó en los sobrenadantes actividad significativa de ninguno de los enzimas in situ valorados en la prueba.

3.1.6. ROTURA DE LOS ERITROCITOS PERMEABILIZADOS

A la vista de los resultados expuestos en 3.1.5.1. y 3.1.5.2., que muestran la resistencia que los eritrocitos permeabilizados ofrecen a las técnicas de lisis celular habituales, decidimos someterlos a procedimientos

TABLA 4. Actividad de PGI, TIM y LDH en eritrocitos permeabilizados conservados al 50% en glicerol a -20°C durante dos meses.

La actividad enzimática está expresada en U/g de células

	<u>Ensayo inicial</u>	<u>20 días mas tarde</u>	<u>60 días mas tarde</u>
PGI:	12	12	11
TIM:	200	200	180
LDH:	40	40	37

tos de sonicación mas intensos.

Llegamos a conseguir una lisis celular sustancial cuando se realizó una sonicación de 4 ml de eritrocitos permeabilizados junto con 2 ml de glicerol a -20°C y 10 gramos de polvo de vidrio. No obstante la hemoglobina que se valoró en el sobrenadante tras centrifugar fué solamente del 31% respecto de la tasa de hemoglobina que poseían estas células.

Aún con un aparato mas potente (MSE modelo 11/75 MK 2), con sesiones de sonicación de 15 segundos y 30 de descanso la hemólisis no superó el 33%. Un examen al M.O. reveló la presencia de fragmentos celulares alternando con células íntegras que predominaban de forma mayoritaria.

Las técnicas habituales de hidrólisis ácida o alcalina aunque eficientes con los eritrocitos grapados, no nos ofrecían utilidad, ya que implican desnaturalización de las proteínas.

El uso del DTBP como reactivo grapador que posee en su molécula un puente S-S nos ofreció la posibilidad de lisis celular completa con relativa inocuidad utilizando DTE, como ha sido descrito en MATERIAL Y METODOS (2.5.). La hemólisis de eritrocitos permeabilizados conseguida por este procedimiento fué del 100%.

3.2. ESTUDIO CINETICO COMPARADO IN SITU E IN VITRO DE LOS ENZIMAS DE LA GLICOLISIS EN ERITROCITOS DE RATA

Se han estudiado todos y cada uno de los enzimas de la glicolisis, aunque no con la misma intensidad pres-tándose mayor atención a aquellos que por tener mecanismos reguladores o cinéticas complejas ofrecen mayor interés para su estudio polifacético in situ.

Los estudios cinéticos fueron realizados en eritrocitos permeabilizados y en hemolizados, preparados tal y como se indica en la sección de MATERIAL Y METODOS a partir de células recién obtenidas, llevándose a cabo el estudio durante las dos o tres horas siguientes.

3.2.1. HEXOKINASA

3.2.1.1. Puesta a punto del método de ensayo

Como se ha explicado en MATERIAL Y METODOS (2.8.1.), hemos utilizado un método isotópico para valorar este enzima, habida cuenta de su escasez en el eritrocito, 0,2 U/g (31). Con nuestro método de valoración la actividad HK vino expresada en función de la radiactividad retenida por un filtro fijador de aniones una vez que fué lavado tras la adición de una alícuota de una mezcla de reacción en que se incluyó (U-¹⁴C) glucosa, ATP y el enzima (eritrocitos permeabilizados o hemolizado), habiendo sido la mezcla incubada previamente a 37°C durante un periodo de tiempo determinado.

Con objeto de conocer el intervalo de tiempo en que la producción de glucosa-6-P era lineal, se hicieron valoraciones en un hemolizado a intervalos sucesivos, empleando glucosa 0,38 mM, ATP-Mg 5 mM, (U-¹⁴C) glucosa 0,2 µCi/ml

y 60 mg de eritrocitos, en un volumen final de 0,4 ml. Los resultados se exponen en la Figura 10. Como puede apreciarse comenzó a perderse la linealidad a partir de los primeros 15 o 30 minutos de incubación; considerando la producción de glucosa-6-P en este periodo, la actividad específica calculada fué de 0,06 U/g, inferior por tanto a las 0,2 U/g descritos por Christensen (31).

La pérdida de linealidad observada podría deberse a la aparición del glucosa-6-P, que además de ser el producto de la reacción catalizada por la hexokinasa es un inhibidor alostérico de este enzima, como fué descrito por Crane y Sols en 1954 (28) y luego señalado en eritrocitos por Rose y O'Connell en 1964 (113). Pero también cabía la posibilidad de que una ATP-asa con actividad considerable provocara el consumo de ATP, reduciéndose por tanto la actividad de la hexokinasa una vez que la concentración de ATP cayese por debajo de saturación.

En caso de ser cierta la segunda posibilidad, si realizáramos paralelamente a una valoración como la anterior otra en que el ATP y el hemolizado se incubasen previamente a la adición de la glucosa durante unos 30 minutos, la actividad hexokinasa debería reducirse puesto que habría disminuido ostensiblemente el nivel de ATP durante la incubación inicial. Realizamos este experimento y como puede verse en la Figura 11 en que exponemos el resultado, no encontramos diferencia significativa en la actividad HK en las dos condiciones. Por tanto cabe explicar la disminución de actividad como debida a la inhibición producida por la formación de glucosa-6-P.

A la vista de estos resultados procedimos a realizar valoraciones paralelas de hexokinasa *in situ* e *in vitro* en condiciones idénticas en los dos casos, tomando

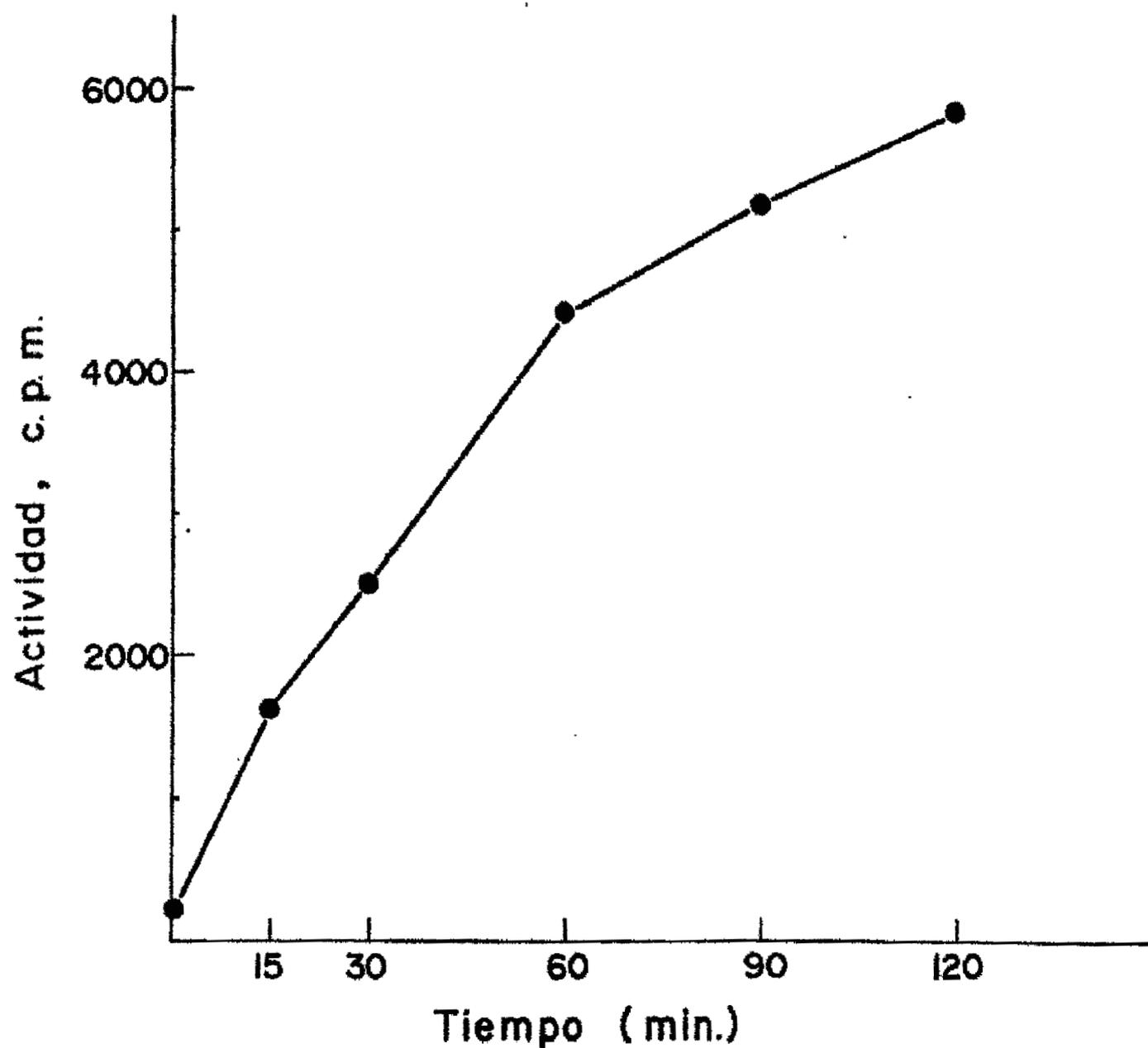


Figura 10. Actividad hexokinasa in vitro valorada utilizando (U-¹⁴C) glucosa.

Glucosa 0,38 mM, ATP-Mg 5 mM

Las demás condiciones de ensayo según MATERIAL Y METODOS

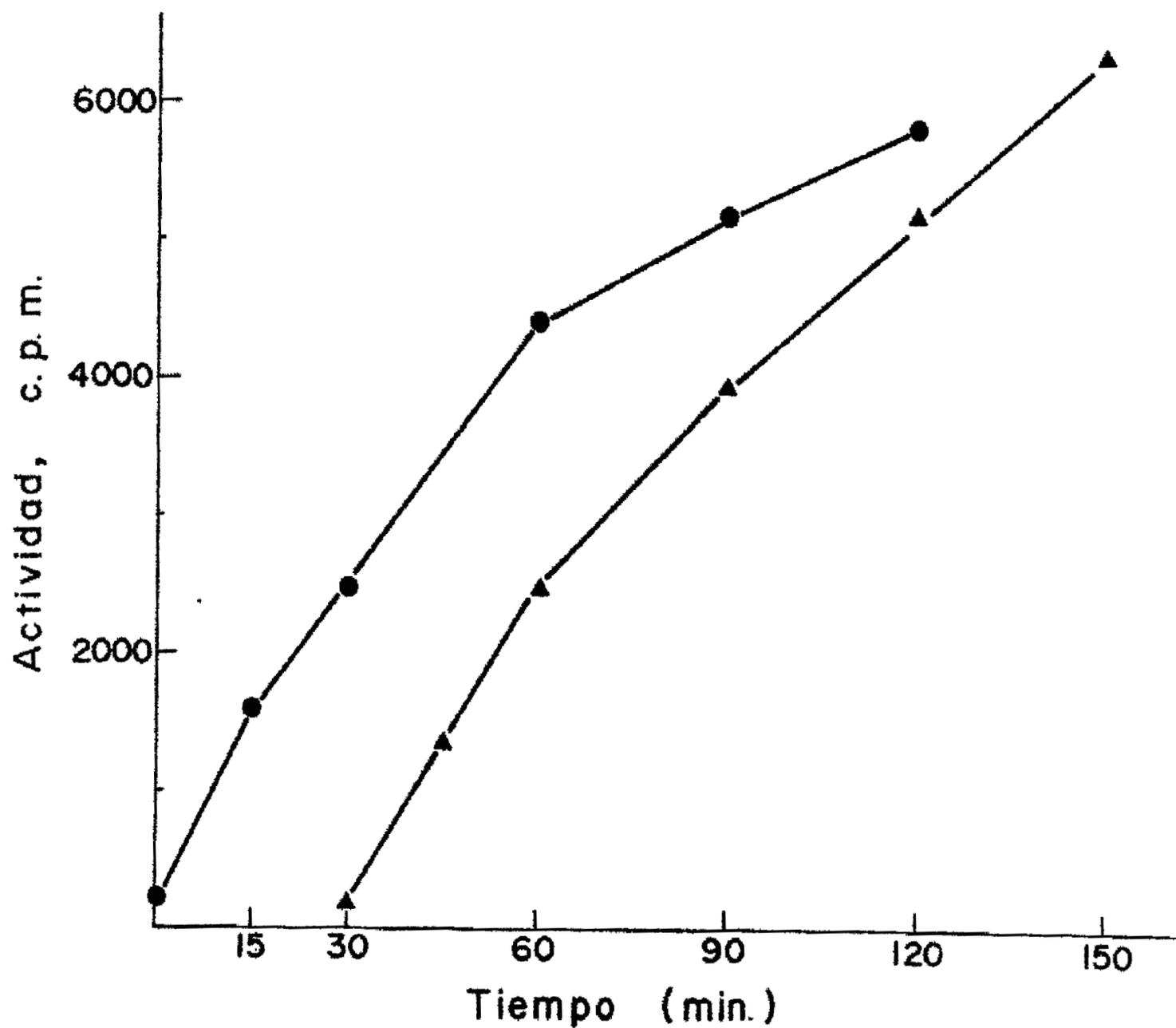


Figura 11. Actividad hexokinasa in vitro.

Glucosa 0,38 mM, ATP-Mg 5 mM

(●): sin incubación previa

(▲): tras incubar el hemolizado con ATP-Mg
durante 30 minutos

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

alícuotas sucesivas de la mezcla de reacción hasta un intervalo no superior ya a los 30 minutos y empleando concentraciones variables de glucosa, desde 0,04 mM hasta 1 mM, con objeto de determinar un tiempo de reacción óptimo aún a concentraciones bajas. En todos los casos encontramos que in vitro la producción de glucosa-6-P fué lineal dentro de los 15 primeros minutos aún a las concentraciones mas bajas de glucosa empleadas, por tanto adoptamos este intervalo de 15 minutos como tiempo de reacción in vitro. In situ y contrastando con esto en cierto modo, encontramos que durante los 30 minutos de observación se mantuvo lineal el curso de la reacción. Esto puede apreciarse en la Figura 12, en que exponemos una valoración paralela in situ e in vitro. También encontramos que la actividad in situ fué sensiblemente inferior a in vitro, a causa de esto decidimos alargar a 45 minutos el tiempo de reacción óptimo in situ, dado que así obtendríamos mayor número de cuentas por minuto al final de la incubación, lo que supondría una mayor seguridad en las medidas. Experiencias posteriores nos confirmaron que la linealidad era mantenida in situ durante ese periodo de tiempo. Sobre estos dos aspectos diferenciales de linealidad a lo largo del tiempo y actividad máxima en hexokinasa volveremos mas adelante.

Con objeto de asegurarnos de que el enzima que estábamos valorando era hexokinasa y eliminar fundamentalmente el manejo de una posible glucokinasa, aprovechamos el hecho de que la hexokinasa presenta una afinidad para la D-manosa unas dos veces superior que para la D-glucosa, con una actividad máxima mas reducida, como fué descrito en cerebro por Sols y Crane en 1954 (125). En un caso así, en que un enzima actue simultaneamente sobre dos substratos con

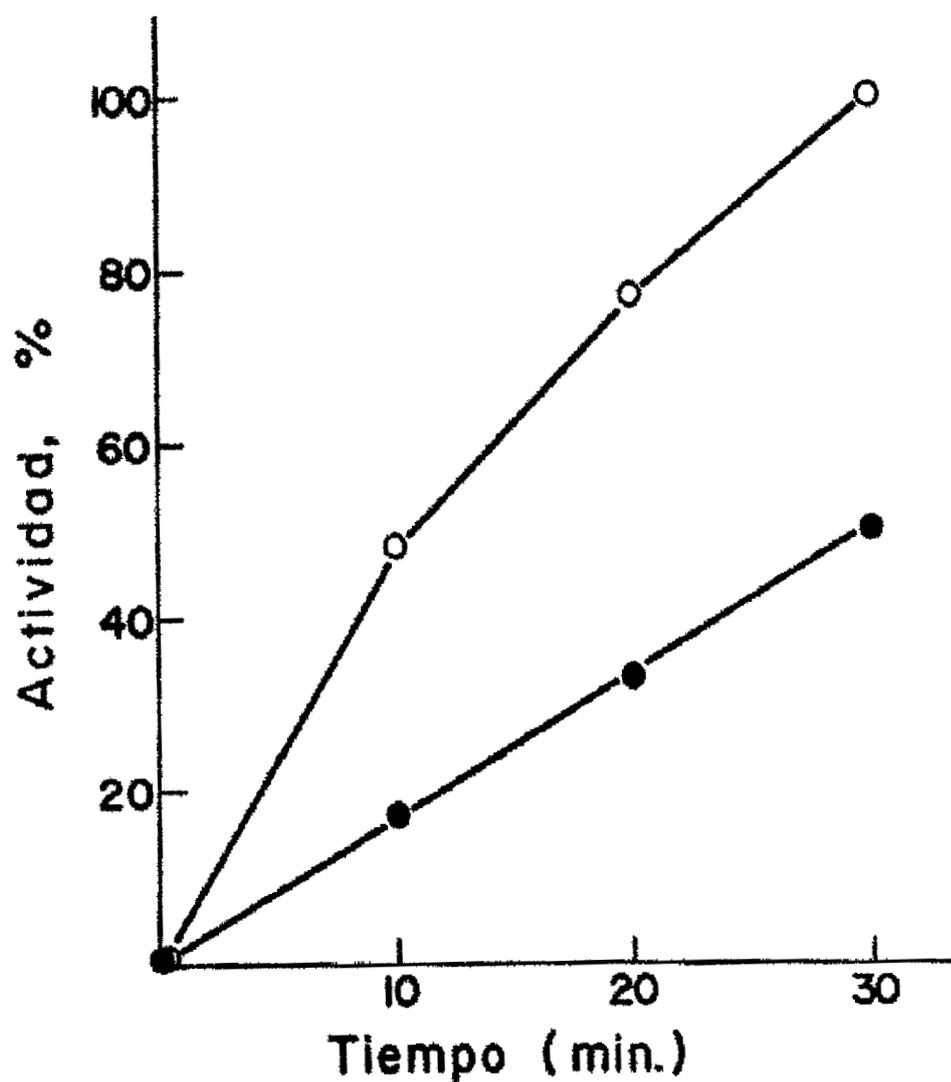


Figura 12. Actividad hexokinasa in situ e in vitro.

Glucosa 0,12 mM, ATP-Mg 5 mM

(●): in situ

(○): in vitro

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: TDI

afinidades y velocidades máximas diferentes para cada uno, la relación de las velocidades iniciales frente a cada substrato está en razón directa de las velocidades máximas y las concentraciones de los substratos e inversa de las K_m , como se desprende del tratamiento de las ecuaciones cinéticas que en esta situación se plantean. De esta manera, la actividad del enzima de un hemolizado, utilizando glucosa marcada a 1 mM y en presencia de manosa fría 10 mM debería ser sensiblemente inferior que en ausencia de este último azúcar, del orden del 10 al 15%, dado que en estas condiciones el enzima utilizaría manosa preferentemente y siendo por tanto escasa la proporción de glucosa-6-P marcada que se formaría. Esto no ocurriría así si se tratase de una glucoquinasa, puesto que su afinidad por la manosa es muy reducida (116). Realizamos esta experiencia y fué confirmada nuestra hipótesis, con manosa 10 mM y glucosa 1 mM la radiactividad incorporada al filtro fué del 11% comparada con la que se incorporó en ausencia de manosa. Por tanto el enzima que estábamos manejando era efectivamente hexokinasa.

Puesto a punto el sistema de valoración de la actividad de este enzima, procedimos a realizar los estudios cinéticos que a continuación se detallan.

3.2.1.2. Cinética frente a la glucosa.

La curva de saturación frente a la glucosa manifestó un comportamiento hiperbólico, la concentración de ATP-Mg empleada fué 5 mM. Como puede apreciarse en la Figura 13 en que se representa gráficamente el estudio cinético por el método de Lineweaver y Burk, la K_m obtenida fué de 0,2 mM, tanto in situ como in vitro. La V_{max} fué de

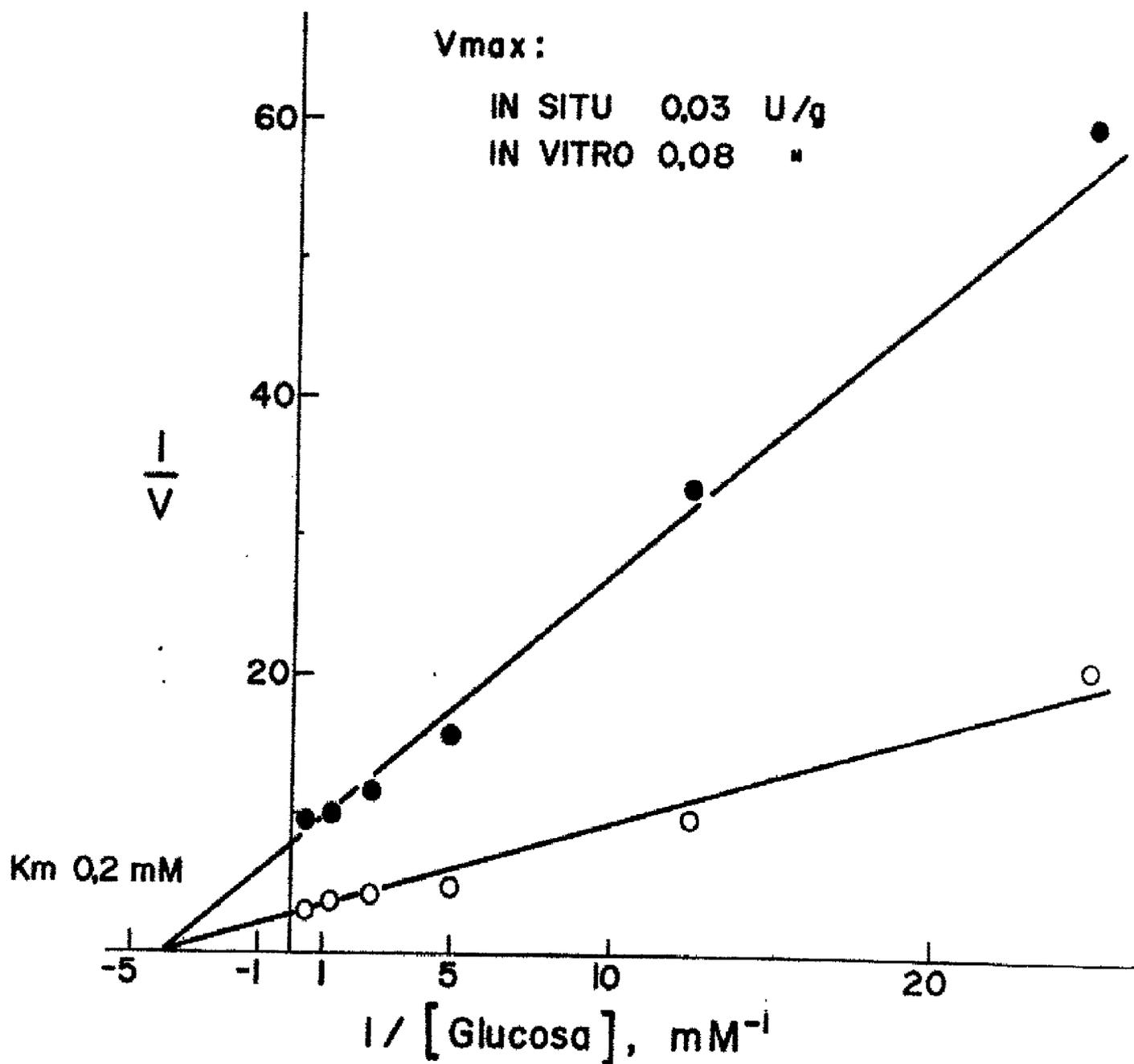


Figura 13. Hexokinasa in situ e in vitro. Cinética frente a la glucosa.

ATP-Mg a concentración 5 mM

(●): in situ

(○): in vitro

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: TDI

0,026 U/g de eritrocitos in situ y de 0,08 U/g in vitro.

Tanto estos como el resto de los datos cinéticos referentes a los enzimas estudiados se encuentran reunidos en la Tabla 9, pag. 133.

El valor de K_m encontrado por nosotros en eritrocitos de rata difiere de los datos obtenidos en eritrocitos humanos en que Rijksen y Staal (109) y Temkine (137) describen esta constante en el orden de 0,05-0,07 mM.

3.2.1.3. Cinética frente al ATP-Mg.

Empleando una concentración de glucosa de 2 mM encontramos in situ una doble cinética con K_m s respectivas de 0,15 y 1,5 mM. In vitro la cinética de saturación respecto al ATP-Mg presentó aspecto michaeliano típico con K_m de 0,3 mM.

Estos datos estan expuestos en la representación de la Figura 14.

El valor de la K_m encontrado in vitro está en el rango de lo descrito en eritrocitos humanos por Rijksen y Staal (110) y Temkine (137) y contrasta con el valor citado por Rapoport en 1968 (103) señalando una K_m para el ATP-Mg en hexokinasa de eritrocitos de 3 mM.

3.2.1.4. Inhibición por glucosa-6-P.

Desde los trabajos de Crane y Sols (27)(28) con hexokinasa de cerebro se conoce que este enzima presenta una inhibición alostérica por glucosa-6-P, cinéticamente competitiva con ATP-Mg y virtualmente independiente del pH (34). Inhibición luego descrita en eritrocitos humanos por Rose y O'Connell en 1964 (113).

El efecto del glucosa-6-P lo estudiamos en primer lugar empleando simultaneamente dos concentraciones de

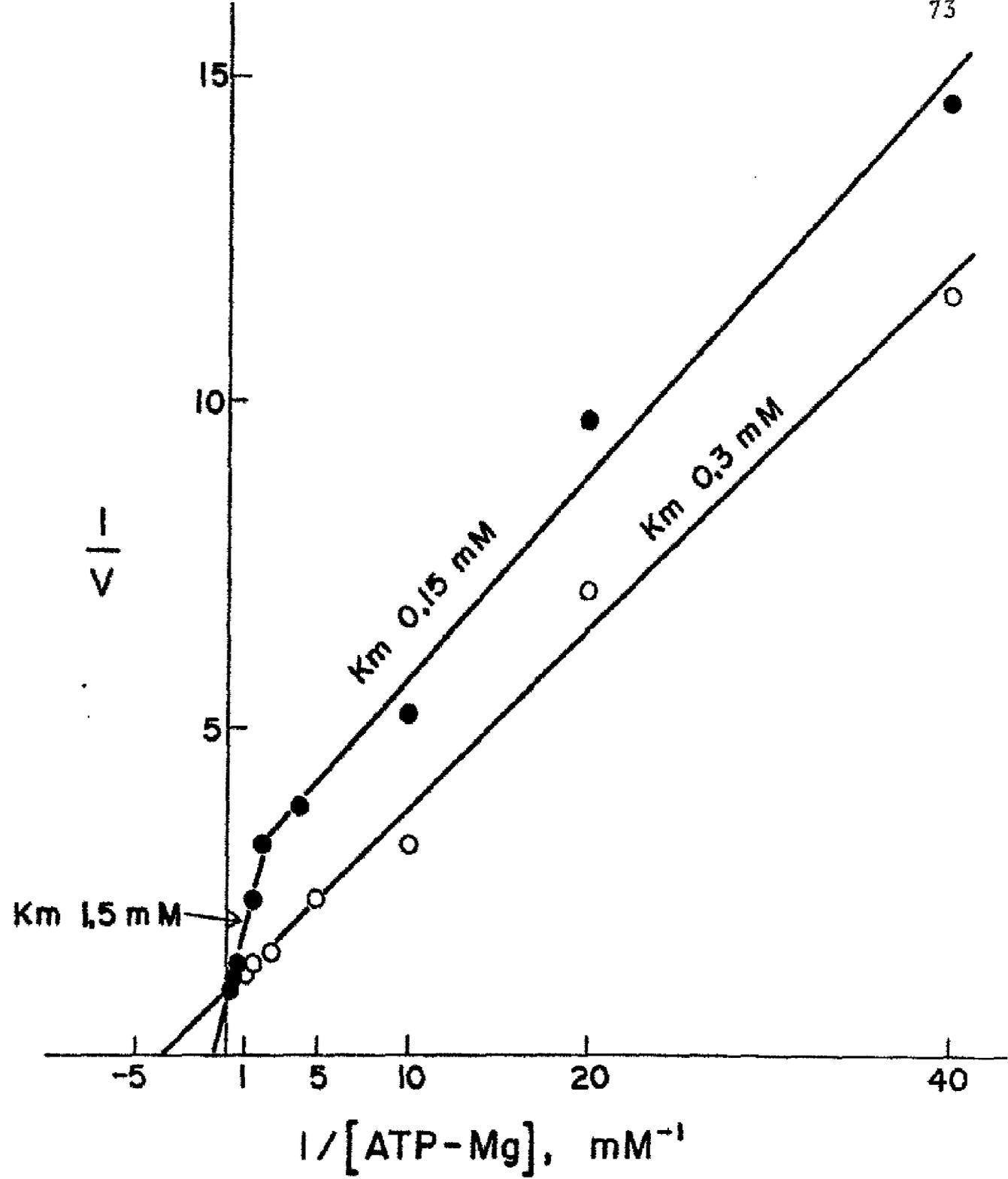


Figura 14. Hexokinasa in situ e in vitro. Cinética frente al ATP-Mg.

Glucosa a concentración 2 mM

(●): in situ

(○): in vitro

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: TDI

ATP-Mg, una saturante, 5 mM, y otra en el rango de lo fisiológico, 0,5 mM (103). El glucosa-6-P se equilibró previamente con glucosafosfato isomerasa comercial con objeto de mantener su concentración independientemente de la presencia de ese enzima en los eritrocitos.

Los primeros resultados aparecen en la Figura 15. Como puede verse la inhibición por G6P se da también in situ (círculos y triángulos oscuros) pero con menor intensidad que in vitro (círculos y triángulos claros). La actividad de la hexokinasa a concentraciones altas de G6P y en los dos rangos de ATP-Mg se mantiene in situ por encima de in vitro. Cabría pensar que la fosfofructokinasa consumiese algo del G6P de forma que no llegase por ello a anularse la actividad de la hexokinasa. Esta posibilidad se descartó dado que cuando se valoró G6P en la mezcla de reacción tras los 45 minutos de incubación no varió sensiblemente su concentración.

Procedimos entonces a realizar una serie de experiencias sucesivas con objeto de confirmar la menor sensibilidad de la hexokinasa in situ al G6P, empleando ATP-Mg 0,5 mM y aumentando también la proporción de glucosa marcada con objeto de tener mayor garantía en las medidas. En la Tabla 5 se exponen estos resultados que vinieron a confirmar la observación inicial; tomando valores medios representamos en la Figura 16 los porcentajes de inhibición por G6P in situ (círculos oscuros) e in vitro (círculos claros). En experiencias posteriores observamos que empleando glucosa-6-P 5 mM la actividad hexokinasa era virtualmente nula tanto in vitro como in situ.

Con objeto de reproducir lo mas posible las condiciones de elevada concentración proteica que prevalecen in situ, estudiamos a continuación la inhibición por G6P

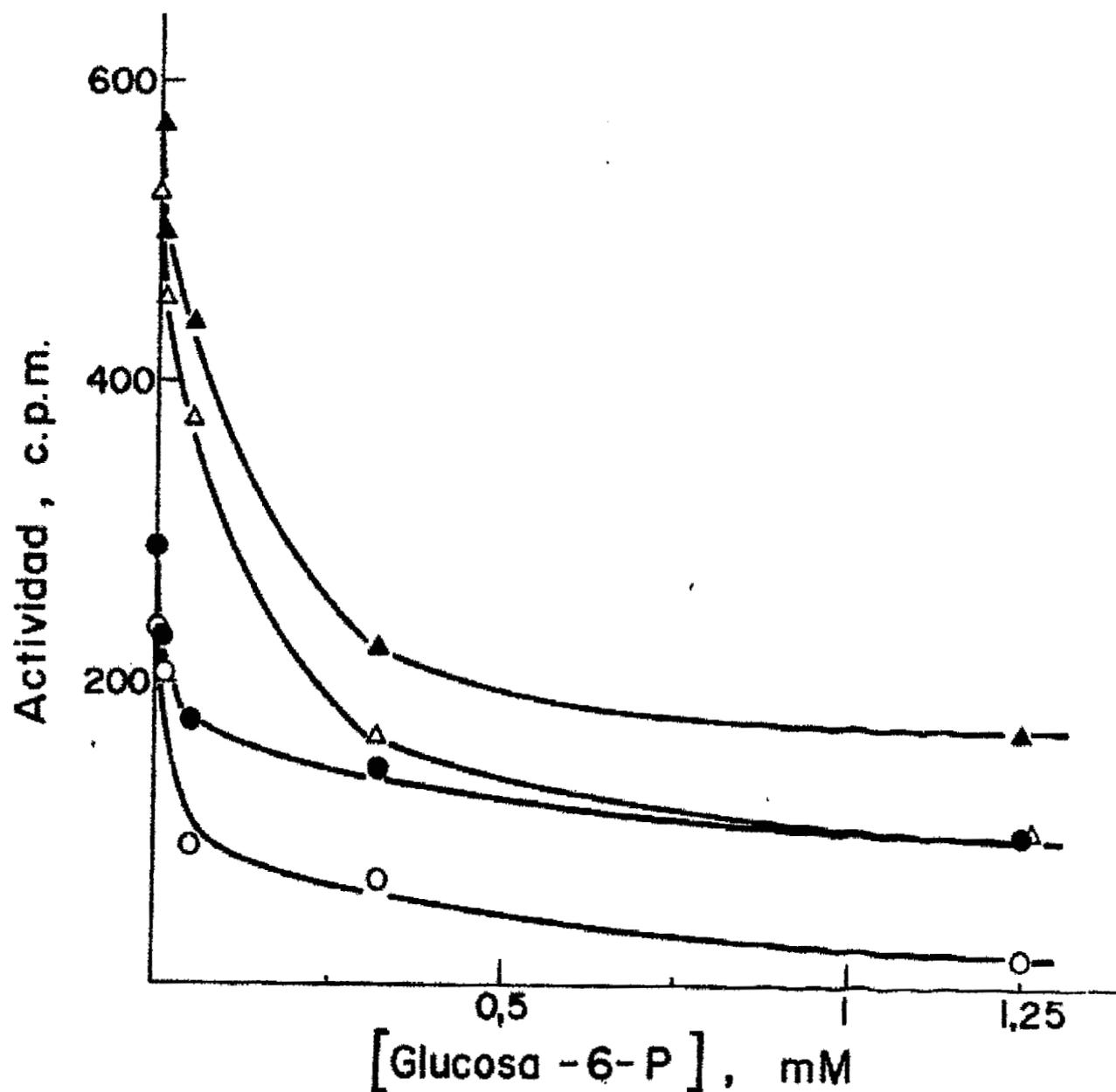


Figura 15. Inhibición alostérica de la hexokinasa por glucosa-6-P a diferentes concentraciones de ATP-Mg in situ e in vitro.

Glucosa 2 mM

(▲): in situ, ATP-Mg 5 mM

(●): " ATP-Mg 0,5 mM

(△): in vitro, ATP-Mg 5 mM

(○): " ATP-Mg 0,5 mM

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: TDI

TABLA 5 Inhibición alostérica de hexokinasa por glucosa-6-P in situ e in vitro

La actividad de la hexokinasa está expresada en c.p.m.; ATP-Mg a concentración 0,5 mM. Las restantes condiciones según MATERIAL Y METODOS. Reactivo grapador: TDI

[G6P], mM:	0	0,01	0,05	0,32	1,25
A) In situ:	231	226	172	148	101
	420	291	218	201	138
	1690	1656	1041	602	553
B) In vitro:	236	203	88	72	19
	880	778	486	176	72
	2480	2145	1454	570	232

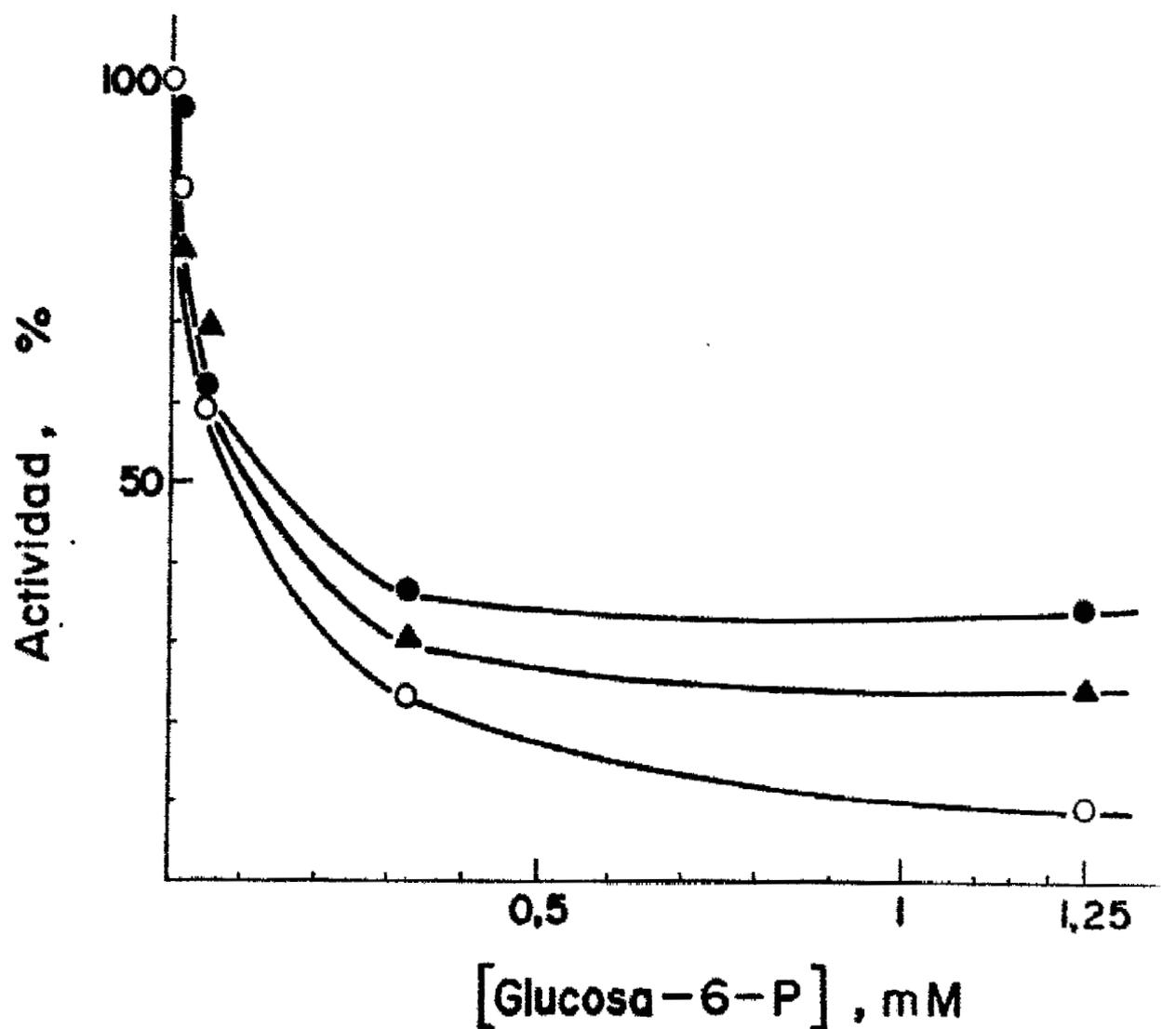


Figura 16. Inhibición alostérica de la hexokinasa por glucosa-6-P in situ e in vitro.

Glucosa 2 mM, ATP-Mg 0,5 mM

●): in situ

○): in vitro

▲): hemolizado concentrado

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grafador: TDI

empleando un "hemolizado concentrado" obtenido por sonicación (MATERIAL Y METODOS 2.6.) de un sedimento de eritrocitos intactos, y añadiendo el resto de los componentes de la reacción en un volumen mínimo, de forma que se emplearon 100 μ l de hemolizado concentrado y unos 20 μ l de la mezcla de ensayo, al final del periodo de incubación diluíamos diez veces la mezcla total con objeto de evitar en lo posible la elevada extinción inespecífica por color que en estas condiciones podía presentarse. Realizamos entonces el estudio de inhibición por glucosa-6-P paralelamente en un hemolizado diluido a la concentración habitual en los ensayos in vitro (1/10, v/v) y en el hemolizado concentrado. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 6. Puede apreciarse como en las condiciones de elevada concentración proteica que implica el hemolizado concentrado, la sensibilidad al glucosa-6-P es menor que en el hemolizado diluido (in vitro). En la Figura 16, en triángulos oscuros, aparecen incluidos los porcentajes de inhibición de la actividad hexokinasa en estas condiciones de hemolizado concentrado conjuntamente con los datos encontrados in situ (círculos oscuros) e in vitro (círculos claros). Los valores de K_i para la glucosa-6-P en presencia de ATP-Mg 0,5 mM y obtenidos a partir de la Figura 16 son de 0,04 mM in situ, 0,07 mM in vitro y 0,05 mM en el hemolizado concentrado. La K_i encontrada in vitro coincide con el rango de valores descritos por Rose (113) y Rapoport (103).

También estudiamos la V_{max} de la hexokinasa en el hemolizado concentrado y paralelamente en uno diluido. Experiencias repetidas mostraron que la actividad máxima en el hemolizado concentrado está reducida al 50% respecto a las condiciones habituales in vitro. De Verdier en 1965 (34) y Brewer en 1969 (19) describieron también una reducción en

TABLA 6 Inhibición alostérica de hexokinasa por glucosa-6-P en un hemolizado concentrado y en otro diluido (in vitro).

La actividad de la hexokinasa está expresada en c.p.m.; ATP-Mg a concentración 0,5 mM. Las restantes condiciones según MATERIAL Y METODOS.

[G6P], mM:	0	0,01	0,05	0,32	1,25
A) Hemolizado concentrado	660	510	420	180	140
	1146	904	860	467	321
B) Hemolizado diluido (in vitro)	880	778	486	176	72

la V_{max} de hexokinasa en eritrocitos intactos respecto a en hemolizado.

3.2.1.5. Comportamiento frente al 2,3-difosfoglicerato

A la vista de la actualidad que está cobrando este metabolito como posible regulador de la actividad de varios enzimas glicolíticos y principalmente de la hexokinasa, decidimos estudiar en nuestras condiciones el efecto que dicho compuesto pueda ejercer sobre este enzima.

El 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) es el compuesto de fosfato orgánico mas abundante en eritrocitos (8). Fué aislado a partir de células rojas de cerdo por Greenwald en 1925 (46), quién describió la elevada concentración a que se encuentra en estas células. En eritrocitos humanos su concentración es del orden de 4,5-5 mM (104), en la rata alcanza valores similares(105); por tanto está en relación practicamente de 1/1 con la hemoglobina, cuya concentración es de aproximadamente 5 mM. Este nivel de 2,3-DPG tan elevado está relacionado con su papel de actuar de modulador alostérico de la función de la hemoglobina como fué encontrado por Chanutin y Curnish (29) y por Benesch y Benesch (9) en 1967; se une fuertemente a la hemoglobina con una constante de afinidad de 6×10^{-6} M, según Benesch, Benesch y Yu (11), combinándose preferentemente con la desoxihemoglobina en un sitio de ligamiento específico y a razón de una molécula por tetrámero (97)(2).

Diversos autores han tratado de darle también al 2,3-DPG un papel de regulador de la actividad de ciertos enzimas del eritrocito y entre ellos algunos de la glicolisis. De estos últimos, la hexokinasa y la fosfofructokinasa han sido en los que mas hincapié se ha hecho.

En la hexokinasa, Dische en 1941 (35) describió por primera vez una inhibición por 2,3-DPG. Posteriormente y empleando siempre concentraciones de 2,3-DPG por encima de 2 mM, Brewer (19), Ponce et al. (99) y el grupo de Rapoport (58) entre otros, han descrito este efecto. Ponce presenta una K_i para el 2,3-DPG de 5 mM incluyendo también inhibición por parte de este metabolito sobre las restantes kinasas de la glicolisis, fosfofructokinasa, fosfoglicerato kinasa y piruvato kinasa, igualmente con 2,3-DPG en el rango de concentración en el eritrocito (99). Recientemente, Rijksen y Staal (111) han descrito valores de K_i para el 2,3-DPG en hexokinasa de eritrocitos humanos del mismo orden que los descritos por Ponce et al. (99).

El hecho de que la inhibición descrita sobre hexokinasa por 2,3-DPG se da a las concentraciones a que este compuesto se encuentra en el eritrocito, hizo pensar a los autores mencionados que el 2,3-DPG actuaría como un efector alostérico de este enzima en ese tipo de células, y por ende como regulador de la glicolisis conjuntamente con el ATP. Para Brewer (19), esto explicaría además el hecho de que en eritrocitos intactos la actividad de la hexokinasa se encuentre disminuida, ya que el enzima estaría en un estado inhibido a causa del 2,3-DPG presente. No obstante, otros autores como Garby y De Verdier (43) han negado la existencia de esta inhibición.

A la vista de estos datos, procedimos a estudiar el efecto del 2,3-DPG sobre la hexokinasa in situ e in vitro a concentraciones de 1,25 y 2,5 mM, empleando ATP-Mg 0,5 mM, glucosa 2 mM y el resto de las condiciones de acuerdo a lo descrito en MATERIAL Y METODOS. En la Tabla 7 aparecen los resultados obtenidos in situ. Como puede apreciarse, en nuestras condiciones de ensayo, tratando de acer-

TABLA 7 Comportamiento in situ de hexokinasa de eritrocitos frente al 2,3-difosfoglicerato.

ATP-Mg 0,5 mM, glucosa 2 mM, (U-¹⁴C) glucosa 0,3 μ Ci/ml, eritrocitos permeabilizados 40 mg/ml, 45 minutos a 37°C. El resto de las condiciones según MATERIAL Y METODOS. Reactivo grapador: TDI.

2,3-difosfoglicerato mM	V (c.p.m.) (3 experimentos por separado)
ninguno	504 \pm 5
1,25	461 \pm 27
2,5	497 \pm 72

carnos a aquellas que prevalecen in vivo, no hemos encontrado inhibición significativa por parte del 2,3-DPG. Resultados similares obtuvimos en el estudio in vitro realizado paralelamente.

3.2.2. GLUCOSAFOSFATO ISOMERASA

Se llevó a cabo un estudio cinético frente al fructosa-6-P como substrato a concentraciones variables.

Los resultados aparecen en la Figura 17 en que se representan las cinéticas in situ e in vitro. La K_m obtenida in situ fué de 0,14 mM, que no difiere significativamente del valor encontrado in vitro 0,1 mM. La V_{max} fué de 7 U/g in situ y de 15 U/g in vitro.

3.2.3. FOSFOFRUCTOKINASA

El estudio in situ de determinados aspectos de la fosfofructokinasa ha tenido para nosotros particular interés. Este enzima constituye el punto de control fundamental de la glicolisis (89)(74)(117). Se han presentado evidencias que apuntan hacia una influencia de la concentración proteica sobre el grado de agregación del enzima, motivándose por tanto diferencias importantes en sus características cinéticas y reguladoras (78)(158)(149)(57)(96).

Al tener en nuestras manos un método que nos permite estudiar la conducta de los enzimas a concentraciones fisiológicas de proteína, la fosfofructokinasa se mostró como uno de los candidatos mas favorables en el sentido de que su estudio a través del abordaje in situ aporta-se luz importante sobre su comportamiento y regulación in vivo.

Vmax:

IN SITU : 7 U/g

IN VITRO: 15 "

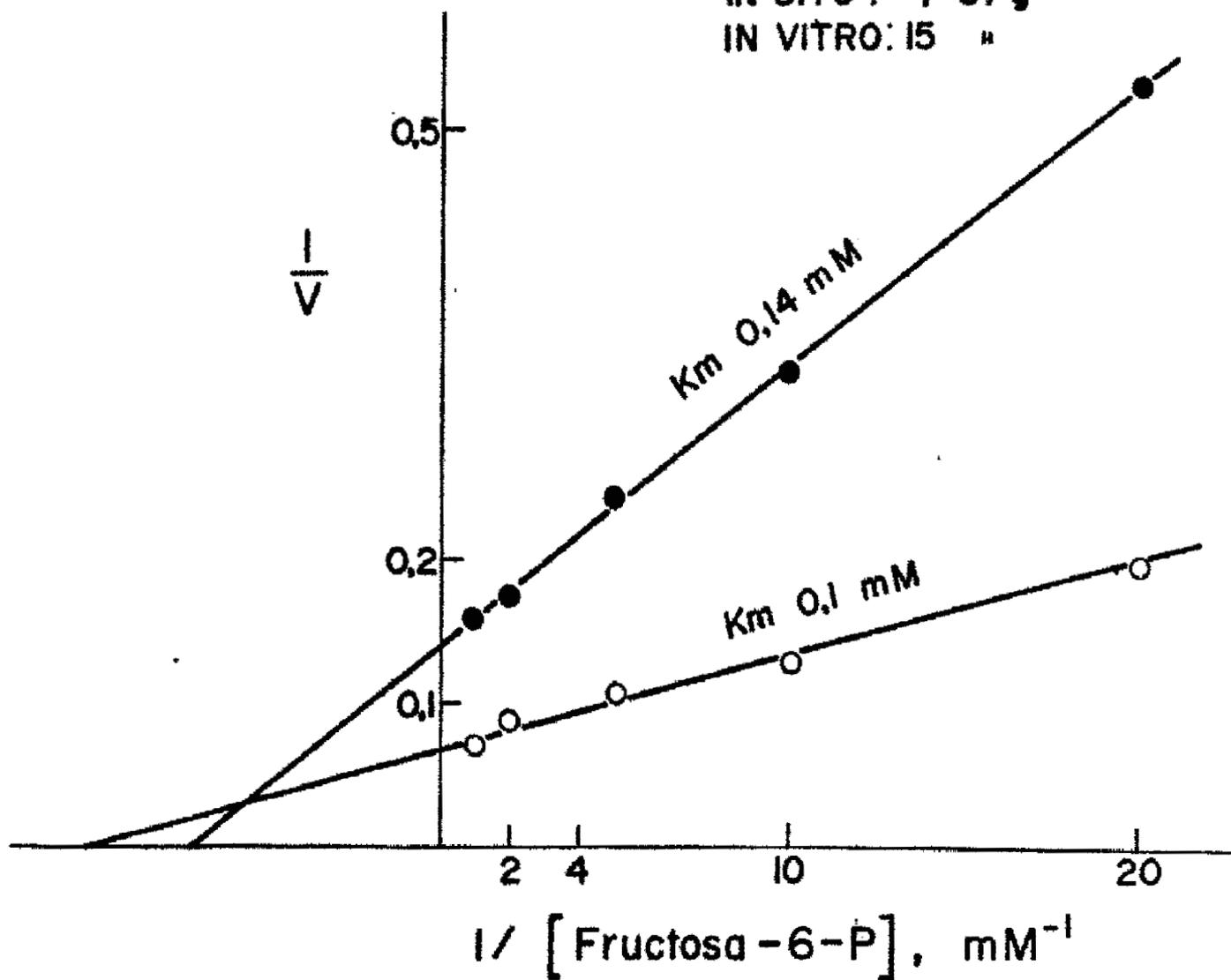


Figura 17. Glucosafosfato isomerasa in situ e in vitro.

Cinética frente al fructosa-6-P.

●: in situ

○: in vitro

Las condiciones de ensayo según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: TDI

No obstante, dado que el objetivo de nuestro trabajo ha sido el estudio in situ de todos los enzimas de la vía glicolítica, nos hemos limitado a investigar solamente aquellas características cinéticas de mayor relevancia que posee este enzima, ya que la complejidad de su regulación, sujeta a una multiplicidad de efectores (132)(126)(67)(77), requeriría para sí sola la extensión de esta tesis doctoral.

3.2.3.1. Cinética frente al fructosa-6-P.

La cinética de saturación de la fosfofructokinasa frente al fructosa-6-P ha sido descrita clásicamente como una típica cinética sigmoideal, que en presencia de sus efectores positivos se transforma en hiperbólica (16)(78)(58). No obstante, Ramaiah y Teswani en 1970 estudiando la fosfofructokinasa de hígado de conejo (101) y los grupos de Kurganov y Hofmann en 1976 con enzima de eritrocito (149) han presentado datos a favor de que aún en ausencia de activadores la forma de la cinética se transforma en hiperbólica cuando se ensaya a concentraciones elevadas de enzima.

A la vista de estos datos realizamos un estudio de la actividad de la fosfofructokinasa frente a concentraciones variables de fructosa-6-P en presencia y ausencia de sus efectores positivos: AMP, Pi y NH_4^+ , empleados a concentraciones prácticamente saturantes (94)(88)(129)(82). Por otro lado, dado que el ATP, además de ser uno de los substratos del enzima es también un fuerte inhibidor alostérico, como fué observado por Lardy y Parks en 1956 (70), hemos usado en su lugar ITP como donador de fosfato, que presenta la ventaja de ser un buen substrato y no provocar inhibición (142)(58).

El estudio cinético fué llevado a cabo empleando

el ITP-Mg a una concentración de 1 mM. Las concentraciones de efectores usadas fueron: AMP 0,1 mM, fosfato 5 mM y NH_4Cl 1 mM.

Los resultados encontrados fueron los siguientes:

- La curva de saturación in vitro en ausencia de efectores positivos manifestó un comportamiento sigmoide (Fig 18, círculos claros) con un valor de n_H de 1,6 y un $S_{0,5}$ de 2,2 mM (Fig 19, círculos claros).

- In situ y en ausencia también de efectores, la cinética de saturación ofreció en cambio un comportamiento prácticamente hiperbólico (Fig 18, círculos oscuros) con un valor de n_H de 1,1 y un $S_{0,5}$ de 0,2 mM (Fig 19, círculos oscuros).

- En presencia de los efectores se apreció una fuerte activación en los dos casos, pero claramente mas intensa in vitro, pasando la cinética de sigmoide a hiperbólica (Fig 18, círculos y cuadrados claros). El n_H fué de 1,0 tanto in situ como in vitro (Fig 19, cuadrados oscuros y claros respectivamente). Los valores de K_m ($S_{0,5}$) en presencia de activadores fueron de 0,04 mM in situ y 0,025 mM in vitro (Figs 19 y 20, los mismos símbolos).

- La actividad específica, calculada en presencia de efectores positivos fué de 3,8 U/g in situ y 8 U/g in vitro (Fig 20).

A la vista de estos resultados se confirmó in situ la sensibilidad de la fosfofructokinasa a los efectores alostéricos, pero nos llamó poderosamente la atención el hecho de que in situ la actividad en ausencia de activadores es drásticamente mas elevada que in vitro, mostrando por tanto el enzima en esas condiciones una afinidad por el fructosa-6-P diez veces superior en eritrocitos permeabilizados que cuando se ensaya en el hemolizado (valores de

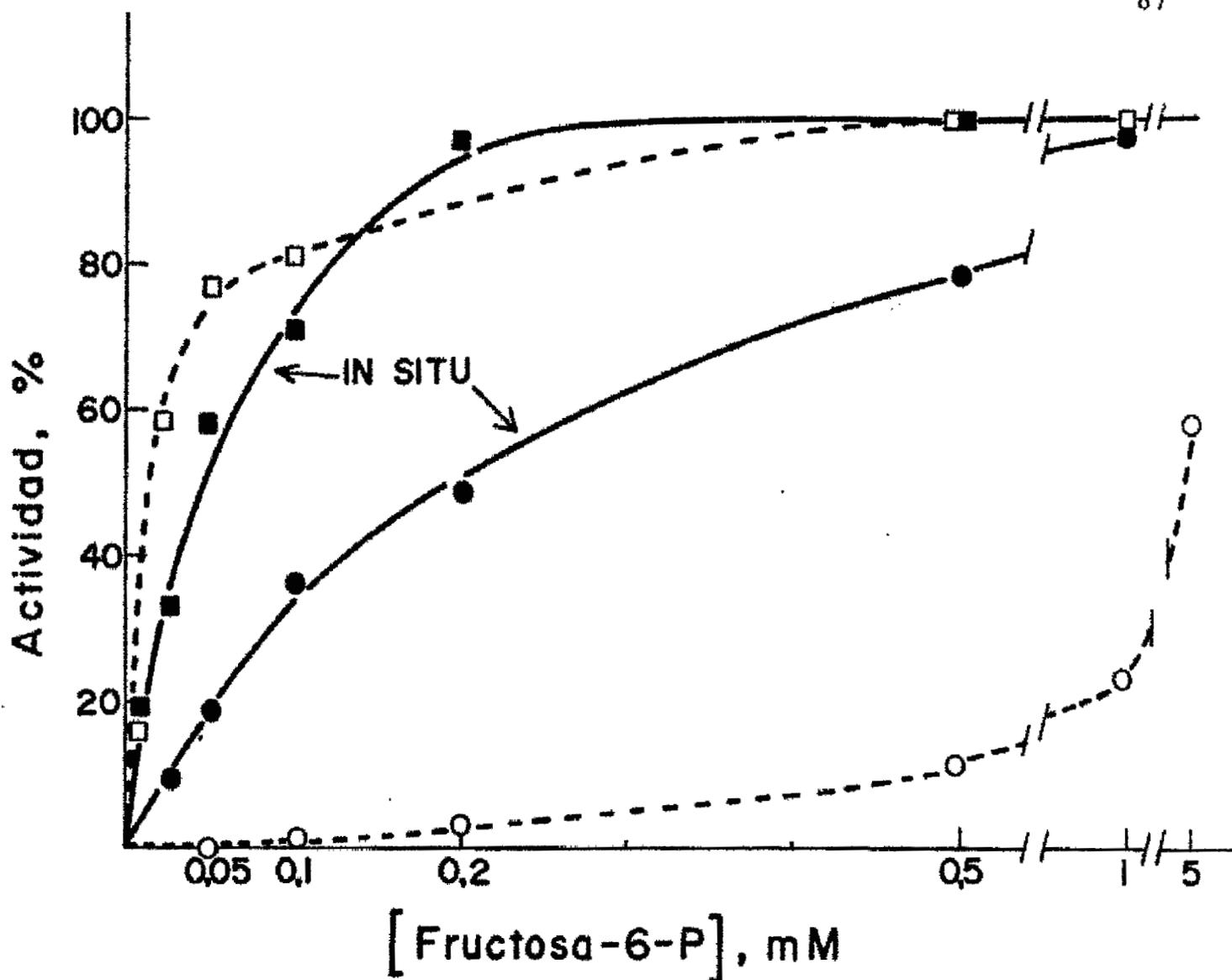


Figura 18. Fosfofructokinasa in situ e in vitro. Cinética frente al fructosa-6-P en ausencia y presencia de efectores alostéricos positivos.

ITP-Mg a concentración 1 mM. Efectores: AMP 0,1 mM, Pi 5 mM y NH_4^+ 1 mM

(●): in situ menos efectores

(■): " mas efectores

(○): in vitro menos efectores

(□): " mas efectores

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: DMS

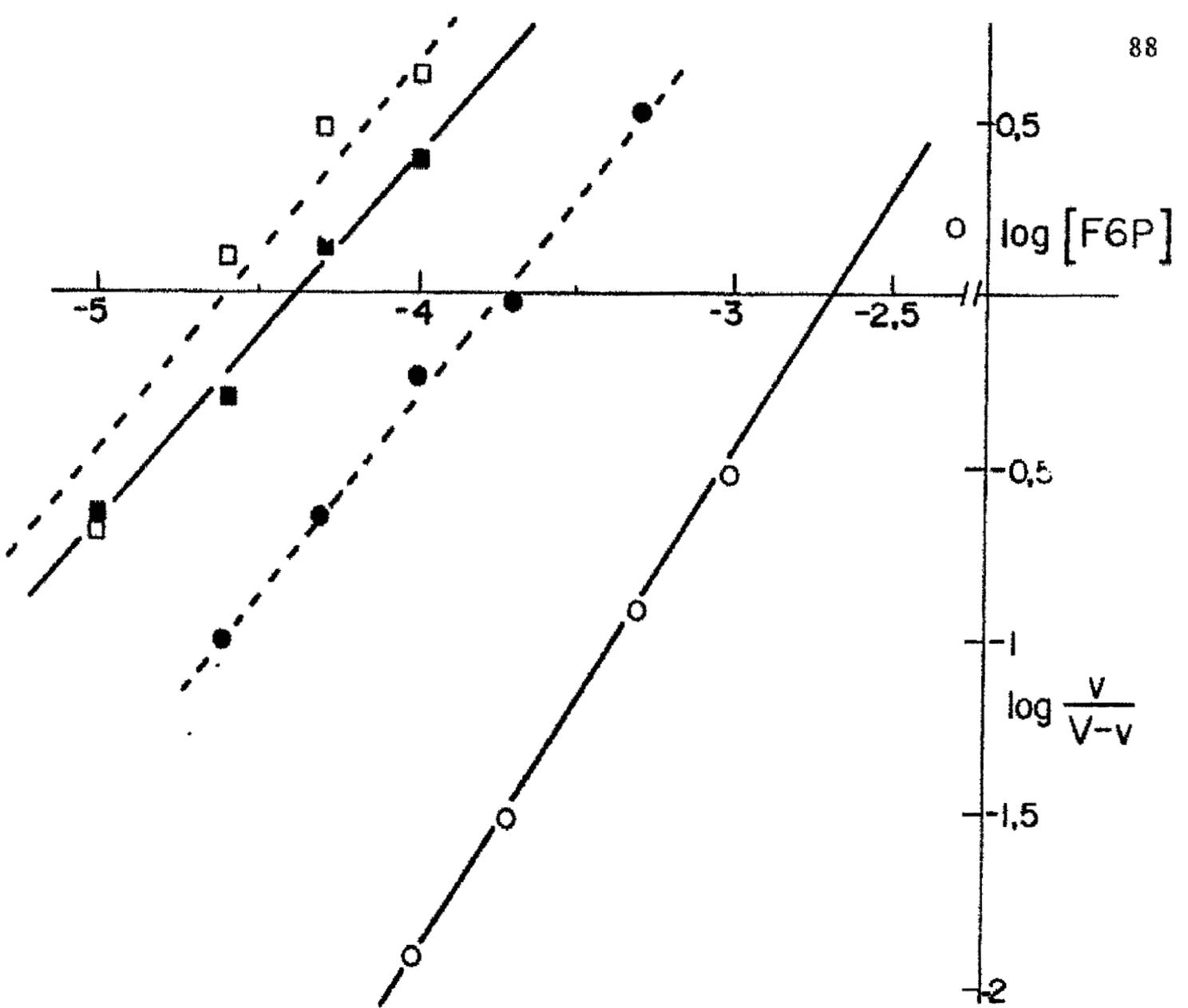


Figura 19. Fosfofructokinasa in situ e in vitro. Representación de Hill de la cinética frente al fructosa-6-P en ausencia y presencia de efectores alostéricos positivos.

ITP-Mg a concentración 1 mM. Efectores: AMP 0,1 mM, Pi 5 mM y NH_4^+ 1 mM

	n_H	$S_{0,5}$
(○): in vitro menos efectores	1,6	2,2 mM
(●): in situ menos efectores	1,1	0,2 "
(□): in vitro mas efectores	1,0	0,025"
(■): in situ mas efectores	1,0	0,04 "

las demás condiciones de ensayo según MATERIAL Y METODOS
Reactivo grapador: DMS

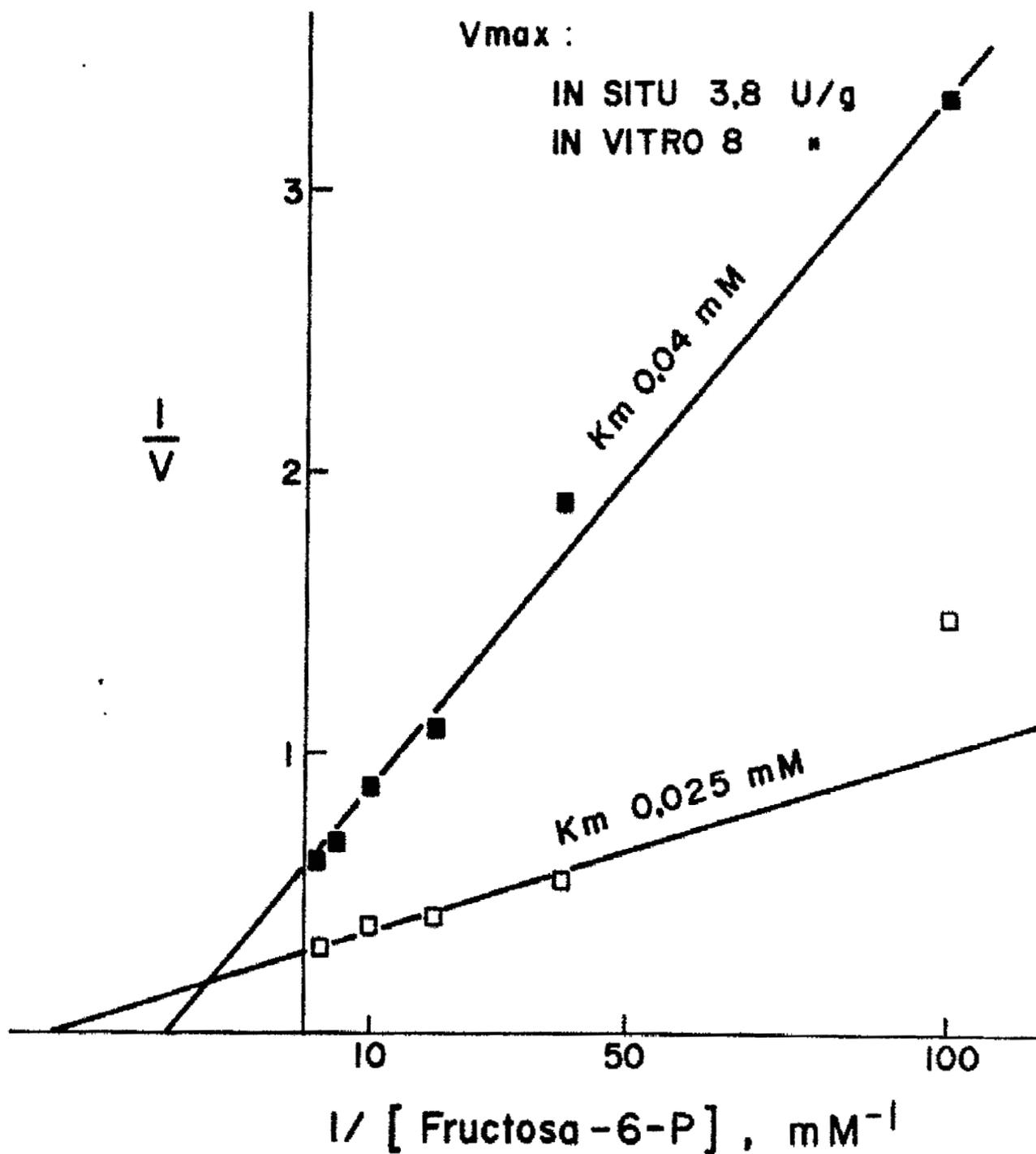


Figura 20. Fosfofructokinasa in situ e in vitro. Cinética frente al fructosa-6-P en presencia de efectores alostéricos positivos.

ITP-Mg a concentración 1 mM. Efectores: AMP 0,1 mM, Pi 5 mM y NH_4^+ 1 mM

●: in situ

□: in vitro

Las restantes condiciones según MATERIAL Y METODOS

$S_{0,5}$ 0,2 y 2,2 mM respectivamente).

Esta diferencia tan apreciable podía ser un fenómeno genuino in situ, pero también podría estar relacionada con una serie de posibilidades artefactuales.

Por un lado, cabía pensar en la posibilidad de que el reactivo bifuncional empleado en el proceso de grapamiento (DMS) pueda penetrar en las células permeabilizadas de manera que afectase de alguna forma al enzima en cuestión, modificando su comportamiento. En este sentido realizamos un estudio cinético usando en este caso un hemolizado previamente tratado con DMS a la misma concentración y siguiendo idénticas pautas que en la sistemática del método de grapamiento. En la Figura 21 aparecen los resultados de este experimento comparados con las observaciones iniciales, puede apreciarse como la actividad de la fosfofructokinasa en ausencia de efectores en el hemolizado tratado con DMS (triángulos claros) está muy por debajo de lo observado in situ en las mismas condiciones (círculos oscuros), relacionándose mas con el comportamiento inicial encontrado in vitro (el hemolizado sin tratar con el reactivo bifuncional, círculos claros).

Dado que contábamos con otro reactivo grapador distinto del DMS, el DTBP, que como explicamos en MATERIAL Y METODOS (2.5.), mediante un tratamiento con DTE permite la rotura de las células permeabilizadas, estudiamos entonces la cinética de saturación frente a fructosa-6-P en eritrocitos permeabilizados empleando DTBP como reactivo bifuncional y paralelamente en otro lote de las mismas células que habían sido rotas con DTE. En la Figura 22 aparecen los resultados en que puede verse por un lado como la actividad in situ en ausencia de efectores está elevada, (triángulos oscuros) y es prácticamente coincidente

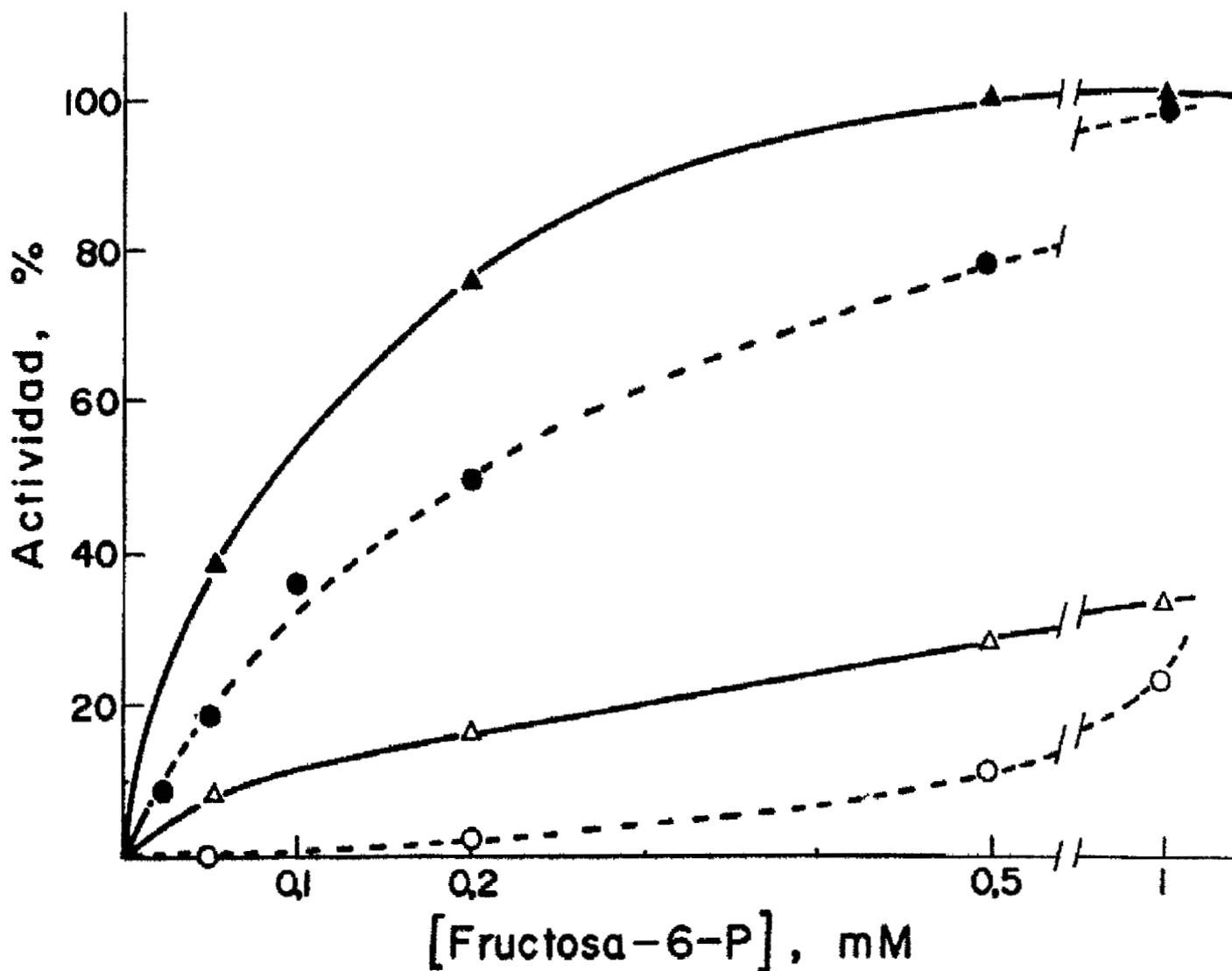


Figura 21. Fosfofructokinasa. Cinética frente al fructosa-6-P in situ, in vitro y en un hemolizado tratado con DMS, y en ausencia y presencia de efectores alostéricos positivos.

ITP-Mg a concentración 1 mM. Efectores: AMP 0,1 mM, Pi 5 mM y NH_4^+ 1 mM

(△): hemolizado tratado con DMS menos efectores

(▲): " " " " mas efectores

(●): in situ menos efectores

(○): in vitro menos efectores (hemolizado sin tratar con DMS)

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: DMS

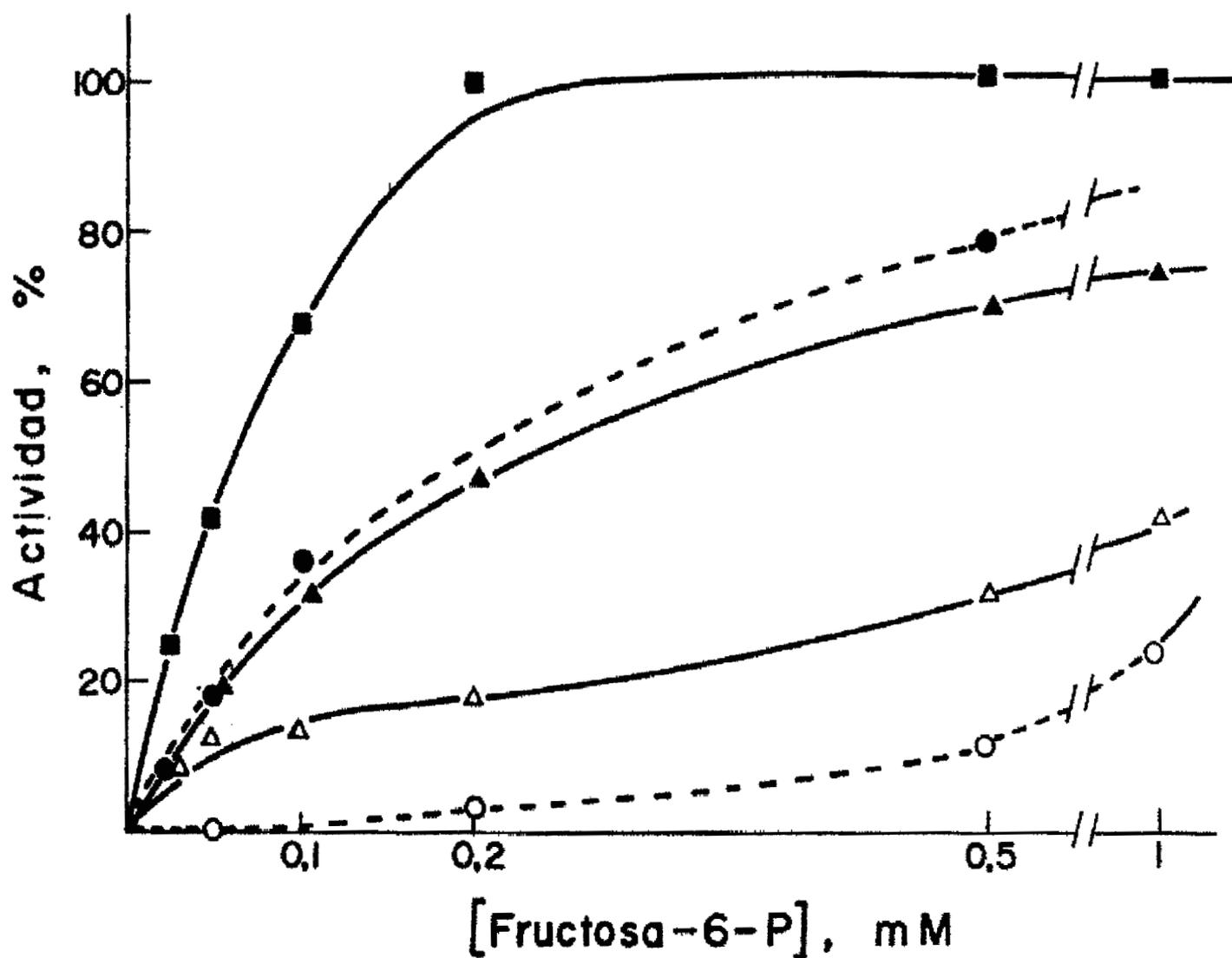


Figura 22. Fosfofructokinasa. Cinética frente al fructosa-6-P in situ, in vitro y en un hemolizado de eritrocitos permeabilizados rotos con DTE. Y en ausencia y presencia de efectores alostéricos positivos.

ITP- μ g a concentración 1 mM. Efectores: AMP 0,1 mM, Pi 5 mM y NH_4^+ 1 mM

(Δ): eritrocitos permeabilizados empleando DTBP como reactivo grapador y luego lisados con DTE, menos efectores

(\blacksquare): idem mas efectores

(\blacktriangle): in situ menos efectores (DTBP como reactivo grapador)

(\bullet): " " " (DMS como reactivo grapador)

(\circ): in vitro menos efectores (hemolizado simple)

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

a cuando se empleó DMS como grapador (círculos oscuros), en cambio cuando se estudia la actividad de las células lisadas con DTE (triángulos claros), la actividad decrece considerablemente, reproduciéndose los resultados encontrados en el hemolizado tratado con DMS (Fig 21) y que son del mismo rango que la observación inicial in vitro (círculos claros); la cinética en presencia de efectores en los eritrocitos permeabilizados lisados con DTE (cuadrados oscuros) muestra similar activación del enzima que la encontrada en un principio in situ e in vitro (Fig 18).

Otra de las posibilidades que podrían explicar el aumento de actividad de la fosfofructokinasa encontrado in situ en ausencia de efectores sería que hubiese alguna dificultad en los eritrocitos permeabilizados para la salida del producto de la reacción principal, el fructosa difosfato, acumulándose entonces este metabolito dentro de las células y dado que ha sido descrito como un activador de la fosfofructokinasa aún a concentraciones en el rango μ molar (94)(114)(58)(138) podría dar lugar a un aumento de la actividad del enzima in situ en ausencia de los efectores positivos ensayados. Con objeto de conocer indirectamente el efecto que un acúmulo de FDP producido a lo largo del ensayo podría tener sobre la actividad de la fosfofructokinasa realizamos una serie de valoraciones de este enzima en un hemolizado reduciendo la aldolasa del sistema auxiliar, de manera que al no estar en exceso sobre la fosfofructokinasa el sistema auxiliar se convertiría en deficitario y se acumularía el producto de la reacción principal, el FDP, que si se comportase como un activador a concentraciones muy bajas debería provocar un aumento en la actividad de la fosfofructokinasa. Los resultados de este experimento aparecen en la Tabla 8, como pue-

TABLA 8 Actividad PFK in vitro en ausencia de efectores empleando cantidades decrecientes de aldolasa en el sistema de ensayo.

La actividad PFK está expresada en m.u.o./min. Fructosa-6-P 0,5 mM, ITP-Mg 1 mM, 1 mg de hemolizado (aproximadamente 0,01 U de PFK). El resto de las condiciones de ensayo según MATERIAL Y METODOS.

Aldolasa empleada (U)	Actividad PFK
2	76
0,2	54
0,05	58

de verse empleando 1 mg de hemolizado (aproximadamente 0,01 U de fosfofructokinasa) y reduciendo la aldolasa desde 2 U (en el orden de la cifra habitual en el ensayo de la fosfofructokinasa) hasta 0,02 U no se observó aumento alguno en la actividad de la fosfofructokinasa.

También pensamos que otra de las razones que podía dar cuenta del fenómeno observado in situ podía ser que los eritrocitos permeabilizados conservasen cantidades significativas de metabolitos y entre ellos algunos de los efectores de la fosfofructokinasa, o bien que mantuviesen algún nivel de producción de los mismos. Una forma de excluir esta posibilidad consistía en someter la preparación de eritrocitos permeabilizados a una diálisis exhaustiva con objeto de eliminar los metabolitos presuntamente atrapados, pusimos en práctica este procedimiento, pero tras 48 horas de diálisis contra cuatro cambios de una solución de KCl 125 mM y TES 10 mM pH 7,4 encontramos que se había inactivado la fosfofructokinasa, lo que en parte fué de esperar dada la inestabilidad de este enzima. Procedimos entonces a realizar una valoración directa en eritrocitos permeabilizados de algunos de los efectores mas significativos capaces de modificar la conducta de este enzima, entre ellos FDP, ATP y 2,3-DPG; respecto a AMP además de su escasez en eritrocitos intactos tampoco existen procedimientos de valoración lo suficientemente precisos como para determinarlo a las pequeñas concentraciones en que lógicamente pudiera conservarse en una célula permeabilizada; esta última consideración era también válida para otro de los efectores clásicos de la fosfofructokinasa, el ión amonio. Las valoraciones de FDP, ATP y 2,3-DPG se hicieron en un lote de eritrocitos permeabilizados que fueron incubados

previamente con la mezcla de ensayo habitual de fosfofructokinasa y en ausencia de efectores, de esta forma podríamos además tener en cuenta la posibilidad ya mencionada del acúmulo de FDP a lo largo del ensayo por posible barrera de salida de las células permeabilizadas, como control empleamos un lote de eritrocitos intactos, las determinaciones se hicieron de forma paralela en las dos preparaciones siguiendo las pautas descritas en MATERIAL Y METODOS (2.10.).

Realizadas las valoraciones encontramos que mientras en los eritrocitos intactos se valoró FDP, 2,3-DPG y ATP dentro de los niveles descritos que alcanzan estos metabolitos en el eritrocito, en las células permeabilizadas y dentro del margen de sensibilidad máximo que los métodos empleados nos permitieron, de 2 a 5 μM , no detectamos la presencia de ninguno de los tres efectores investigados.

Quedaba finalmente la posibilidad de abordar el estudio de la actividad fosfofructokinasa en ausencia de efectores empleando un hemolizado concentrado, con objeto de saber si en esta situación en que se reproduce la elevada concentración proteica que prevalece in situ se confirmaría la diferencia cinética encontrada en los eritrocitos permeabilizados, como hicimos en el estudio de la inhibición de la hexokinasa por glucosa-6-P (apartado 3.2.1.4.). Este abordaje, que en el caso de la hexokinasa se mostró apto, no presentó en el ensayo de la fosfofructokinasa unas condiciones mínimas de fiabilidad y precisión, quizás motivado por la mayor complejidad de este enzima sujeta por otro lado a una gran variedad de efectores, presentes en el hemolizado concentrado.

3.2.3.2. Cinética frente al ITP Mg.

Tanto en éste como en el resto de los estudios in situ llevados a cabo con la fosfofructokinasa el reac-

tivo bifuncional empleado fué el DMS.

Al igual que en el estudio cinético frente al fructosa-6-P la curva de saturación frente al ITP-Mg fué realizada en ausencia y presencia de efectores positivos: AMP 0,1 mM, Pi 5 mM y NH_4^+ 1 mM. El fructosa-6-P se empleó a concentración de 1 mM.

Los resultados pueden apreciarse en la Figura 23. De forma análoga a en el caso de la cinética frente al fructosa-6-P, expuesta en el apartado anterior, se aprecia también aquí una actividad in situ en ausencia de efectores (círculos oscuros) mas elevada que in vitro en condiciones similares (círculos claros); la forma de la curva de saturación, en estas condiciones, tanto in situ como in vitro, es hiperbólica. La activación por parte de los efectores se realiza a través de un aumento en la V_{max} (de forma mas drástica in vitro) sin cambio aparente en la afinidad por el substrato; la K_m en ausencia y presencia de activadores tanto in situ como in vitro se mantiene en el rango de 0,3 mM, como se puede ver en la Figura 24.

3.2.3.3. Inhibición por ATP.

La inhibición de la fosfofructokinasa por ATP constituye uno de los mecanismos fundamentales a través de los cuales se regula alostericamente la actividad de este enzima (70)(146)(94). En eritrocitos fué descrita por Layzer et al. en 1969 (71), en estas células se ha mostrado una menor sensibilidad al ATP que en músculo (71)(58).

La inhibición por ATP es fuertemente dependiente del pH de forma que la sensibilidad es máxima a pH 6,9-7 y decrece drásticamente en el rango alcalino (142)

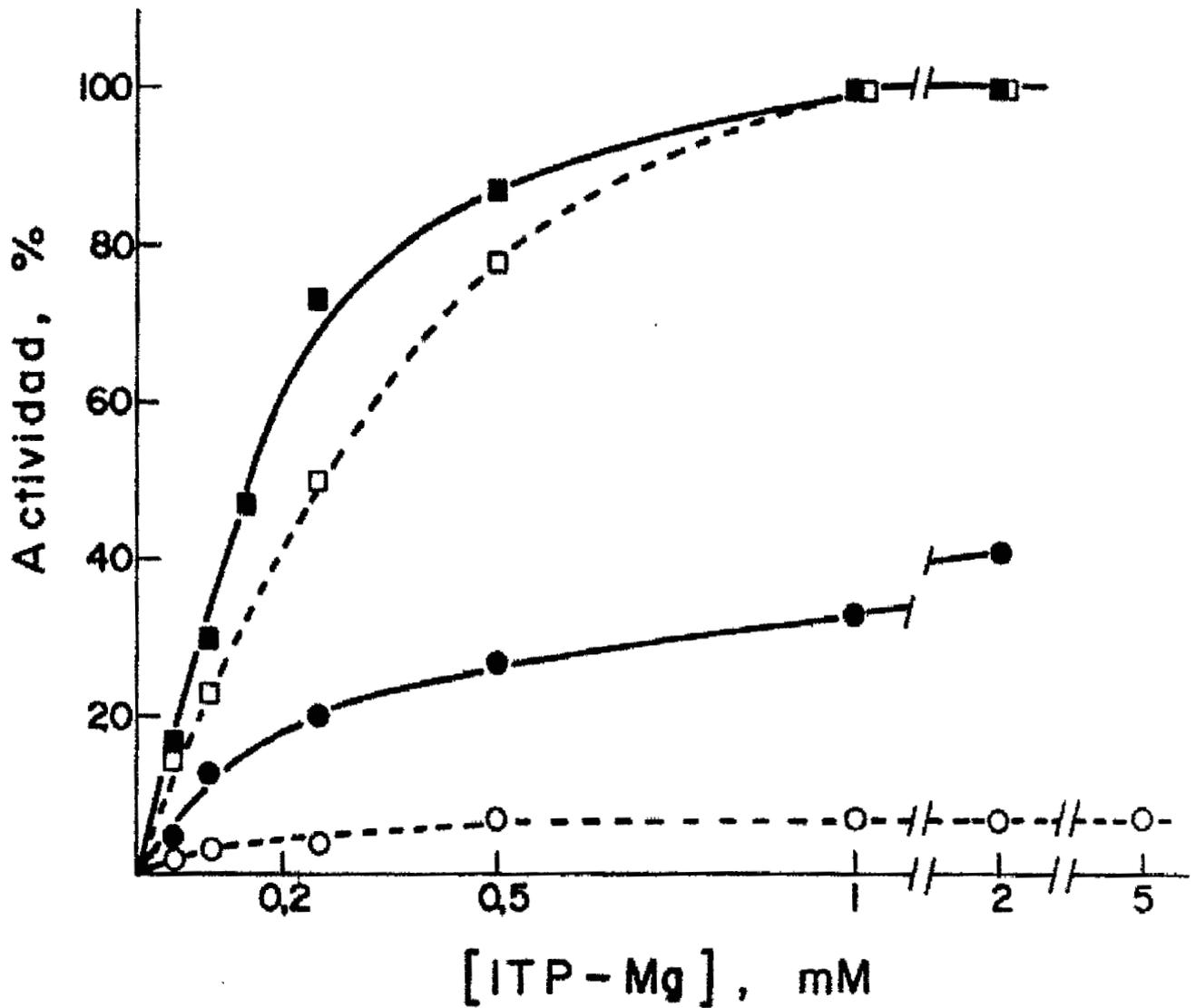


Figura 23. Fosfofructokinasa in situ e in vitro. Cinética frente al ITP-Mg en ausencia y presencia de efectores alostéricos positivos.

Fructosa-6-P a concentración 1 mM. Efectores: AMP 0,1 mM, NH_4^+ 1 mM

(○): in vitro menos efectores

(●): in situ " "

(□): in vitro mas efectores

(■): in situ " "

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: DMS

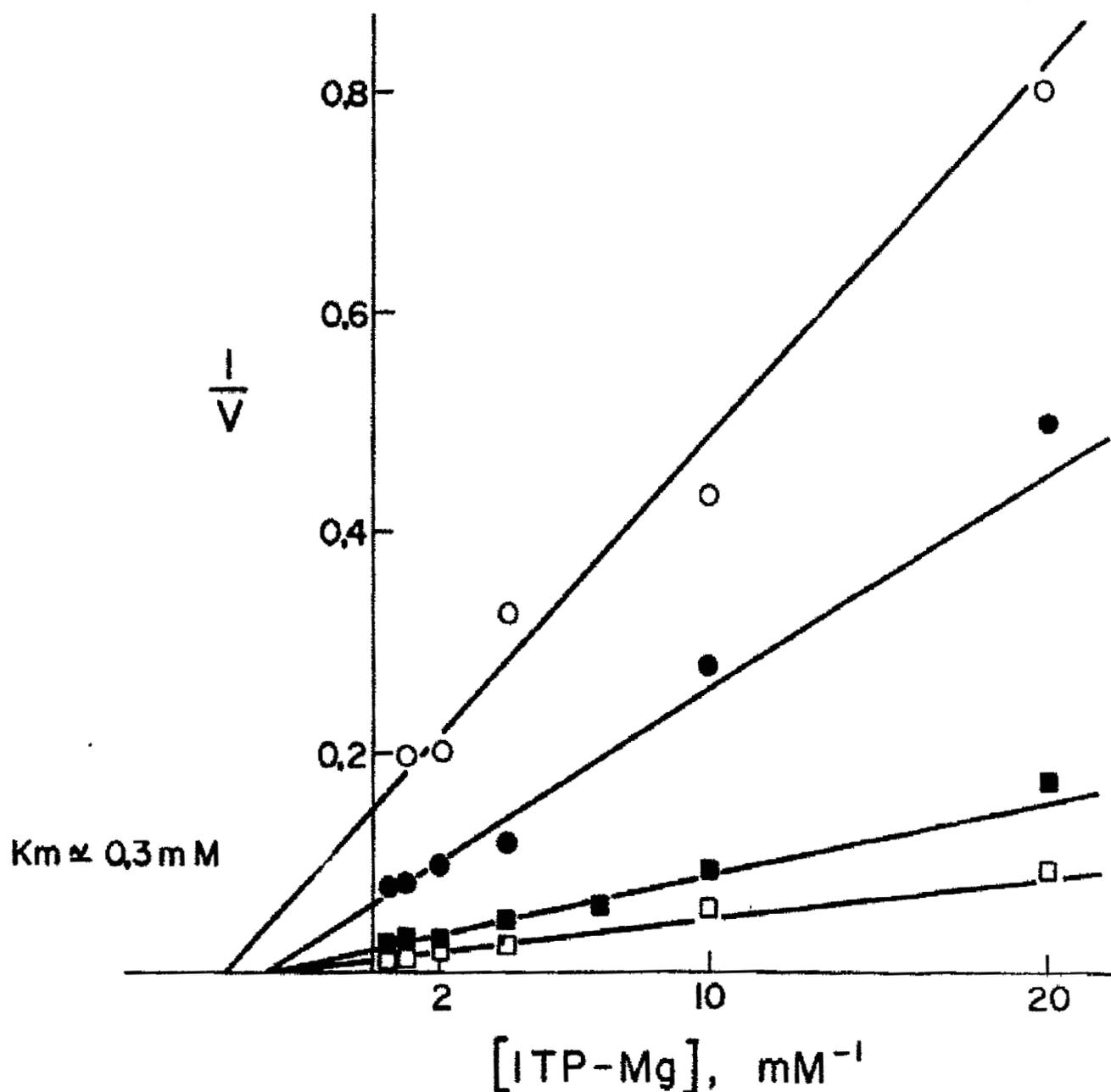


Figura 24. Fosfofructokinasa in situ e in vitro. Representación de Lineweaver y Burk de la cinética frente al ITP-Mg en ausencia y presencia de efectores alostéricos positivos.

Fructosa-6-P_a concentración 1 mM. Efectores: AMP 0,1 mM, Pi 5 mM y NH₄⁺ 1 mM

(○): in vitro menos efectores

(●): in situ " "

(□): in vitro mas efectores

(■): in situ " "

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: DMS

(58)(16). Por otro lado Hulme y Tripton en 1971 (57), y otros autores (56)(141) trabajando con enzima purificado han mostrado que la inhibición por ATP es también dependiente de la concentración de enzima, de manera que la sensibilidad es menos patente a concentraciones elevadas.

Estudiamos entonces el efecto del ATP empleando fructosa-6-P 0,04 mM y la mezcla de efectores positivos: AMP 0,1 mM, Pi 5 mM, NH_4^+ 1 mM, dado que in vitro y como ha sido mostrado en el apartado 3.2.3.1. no se detecta actividad fosfofructokinasa a concentraciones bajas de fructosa-6-P en ausencia de activadores. Simultáneamente realizamos el estudio a pH 7,4 y pH 6,9 en que la inhibición es máxima. Los resultados aparecen expresados en la Figura 25, como puede verse, se confirma in situ la inhibición alostérica por ATP pero es menos intensa que in vitro, los valores calculados de K_i fueron: 0,9 mM y 0,5 mM in situ a pH 7,4 y 6,9 respectivamente y 0,4 mM y 0,03 mM in vitro a pH 7,4 y 6,9 respectivamente.

3.2.3.4. Inhibición por citrato.

Otra de las señales reguladoras importantes a que responde la fosfofructokinasa es el citrato, que provoca una marcada inhibición alostérica sobre su actividad (44)(95). Conjuntamente con la inhibición por ATP, la inhibición por citrato, uno de los productos finales del ciclo de los ácidos tricarbónicos, se ha señalado como un mecanismo esencial de control feedback de la glicolisis aerobia (124 bis)(117)(102).

En eritrocitos algunos autores han señalado que esta inhibición de la fosfofructokinasa por citrato se presenta, pero de forma menos aparente que en músculo (71)(68)

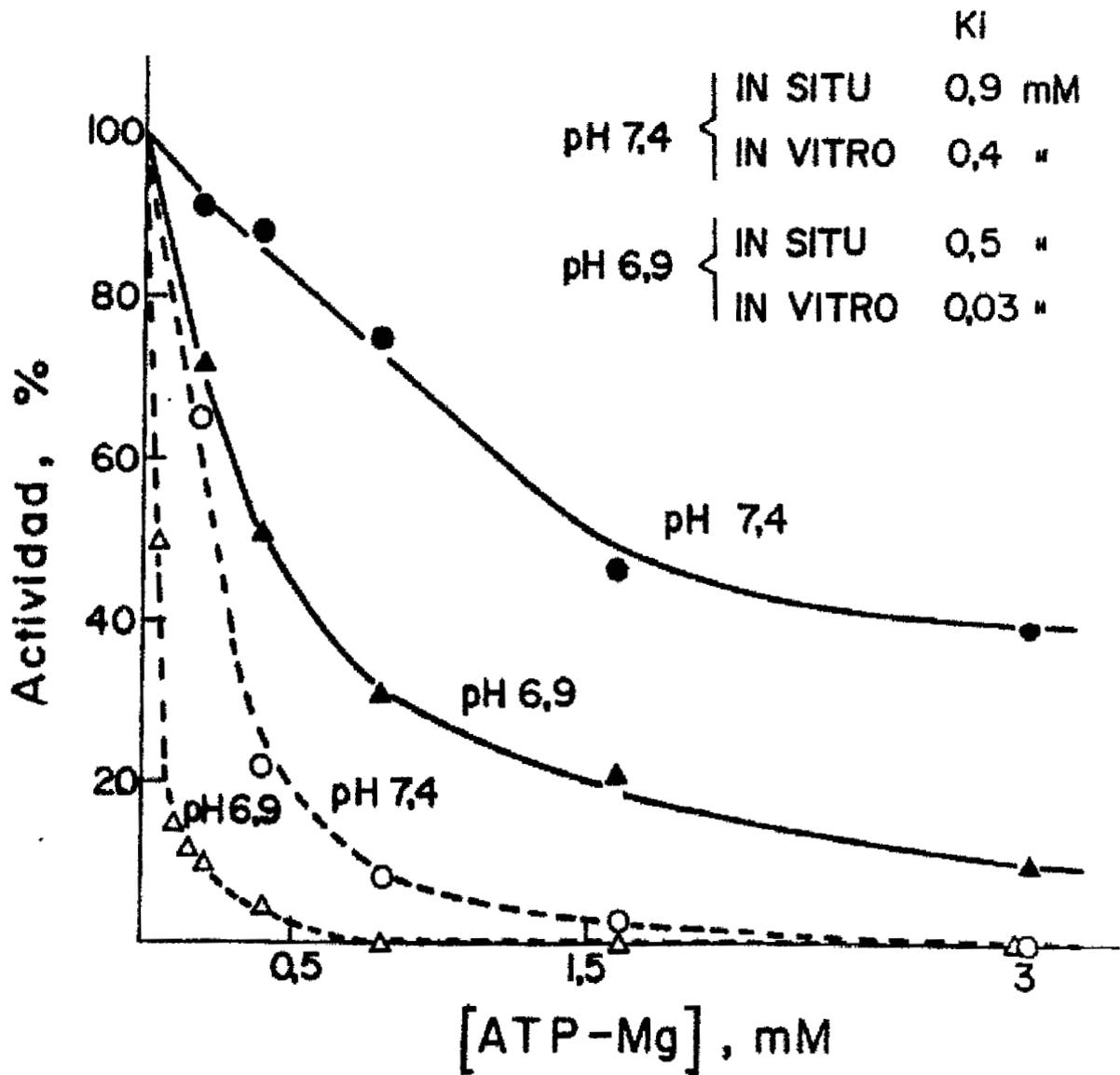


Figura 25. Inhibición alostérica de la fosfofructokinasa por ATP in situ e in vitro.

Fructosa-6-P 0,04 mM, AMP 0,1 mM, Pi 5 mM, NH_4^+ 1 mM.

(●): in situ, pH 7,4

(▲): " pH 6,9

(○): in vitro pH 7,4

(△): " pH 6,9

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: DMS

(140). Staal et al. (131) han negado la existencia de esta característica en el enzima de estas células.

A la vista de estos datos hemos estudiado en nuestras condiciones el efecto del citrato empleando fructosa-6-P 0,04 mM, ITP-Mg 1 mM y la mezcla de efectores positivos: AMP 0,1 mM, Pi 5 mM, NH_4^+ 1 mM puesto que como anteriormente se mostró (3.2.3.1.) la actividad de la fosfofructokinasa in vitro en ausencia de ellos es nula. El citrato se usó a concentración 3 mM. Pensando que su efecto estuviese en dependencia del pH como sucede en el caso del ATP lo hemos estudiado a tres valores de pH: 7,4, 7,2 y 7,0. En la Figura 26 mostramos los resultados en que se representa la actividad PFK residual in situ e in vitro en porcentajes respecto a la actividad control en ausencia de citrato, como puede verse no hay inhibición por citrato a pH 7,4 pero sí se presenta en los rangos de pH ligeramente inferiores, aunque el enzima in situ es marcadamente menos sensible.

3.2.4. ALDOLASA

En eritrocitos este enzima posee una gran afinidad por su substrato (137), el fructosa-1,6-difosfato, de tal forma que la determinación precisa de la constante de Michaelis requiere métodos de valoración mas sensibles que el espectrofotométrico, por esta razón no pudimos explorar la curva de saturación por debajo de concentraciones en el rango de 5 μM , como se puede ver en la Figura 27. No obstante, de ella puede deducirse que la K_m in situ e in vitro debe ser igual o menor a 20 μM . La V_{max} encontrada fue de 0,2 U/g in situ y 0,5 U/g in vitro.

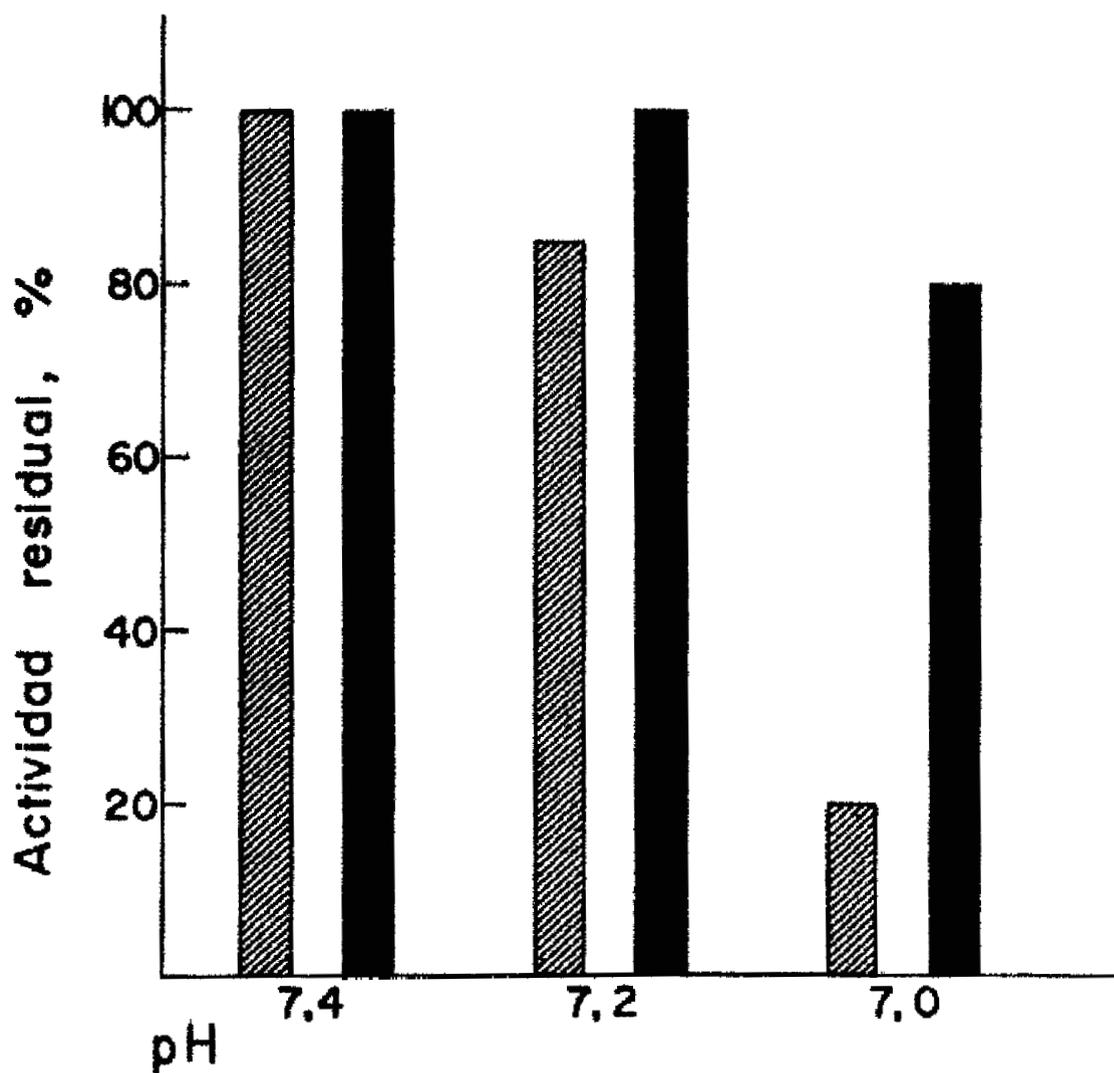


Figura 26. Inhibición de la fosfofructokinasa por citrato
(3 mM) in situ e in vitro.

Fructosa-6-P 0,04 mM, ITP-Mg 1 mM, AMP 0,1 mM,
Pi 5 mM, NH_4^+ 1 mM

●: in situ

▨: in vitro

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: DMS

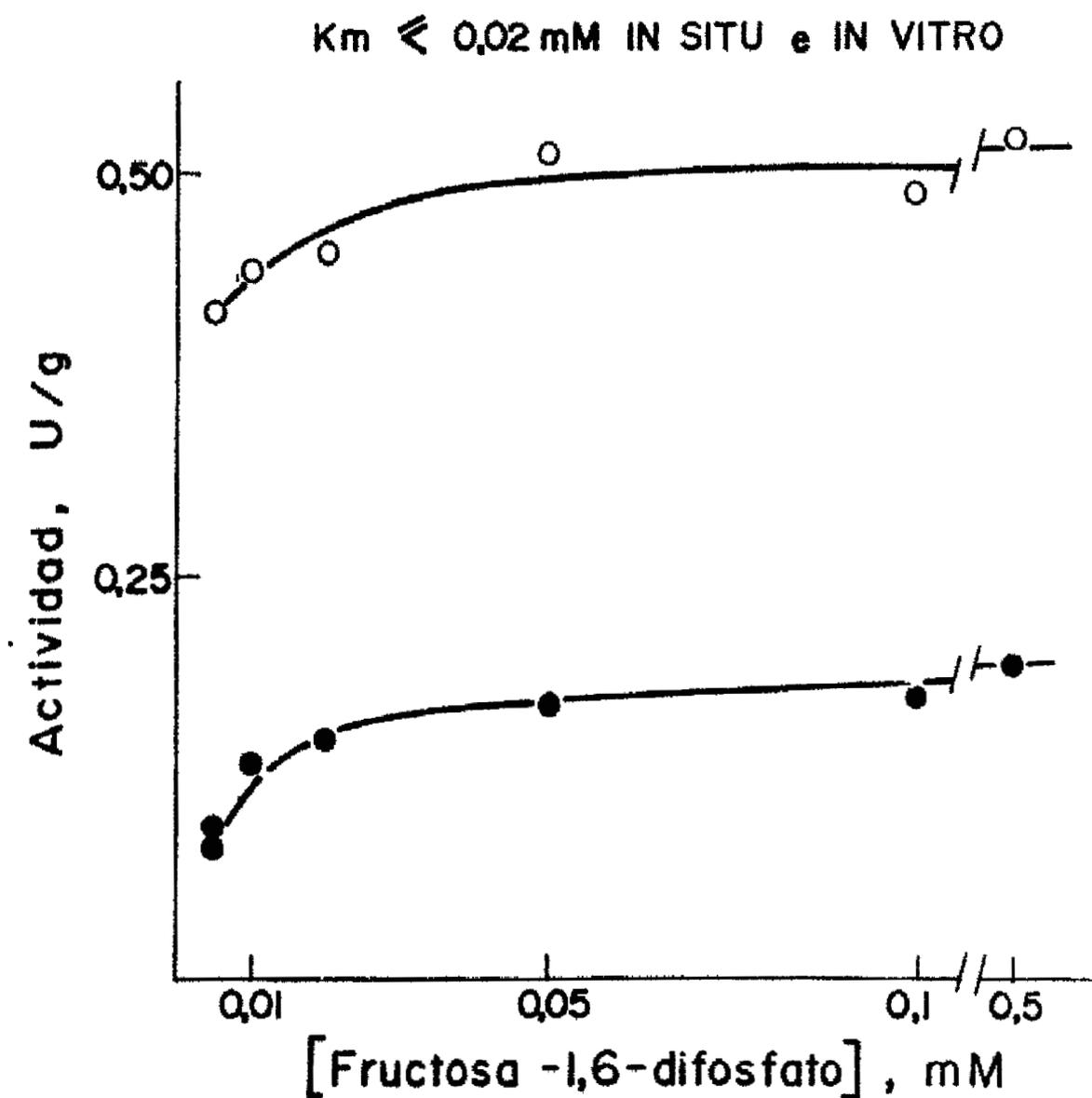


Figura 27. Aldolasa in situ e in vitro. Curva de saturación frente al fructosa difosfato.

●: in situ

○: in vitro

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: TDI

3.2.5. TRIOSAFOSFATO ISOMERASA

Se trata de un enzima con una actividad catalítica extraordinaria, su actividad específica está descrita en el rango de 200 unidades por gramo de eritrocitos (58), alrededor de dos mil veces superior a la hexokinasa, el enzima de menor actividad específica de toda la vía glicolítica en células rojas (apartado 3.2.1.).

El estudio cinético fué llevado a cabo frente a gliceraldehido-3-fosfato como substrato. En la Figura 28 se representan graficamente las cinéticas in situ e in vitro. La K_m obtenida fué de 0,4 mM tanto in situ como in vitro. La V_{max} fué de 80 U/g in situ y 200 U/g in vitro.

3.2.6. GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA

3.2.6.1. Puesta a punto del método de ensayo

Como se ha explicado en MATERIAL Y METODOS (2.8.3.) dadas las dificultades que el estudio de la actividad de este enzima presenta, cuales són la escasa viabilidad de la reacción a pH fisiológico por un lado, y que por otro la fuerte inhibición que sufre por parte de los productos de la misma, inconvenientes que no son sorteados con los métodos espectrofotométricos clásicos (143)(61)(79), hemos desarrollado un nuevo sistema de valoración al que hemos llamado ensayo "lineal" con el que se evita el acúmulo de ninguno de los productos de la reacción.

Los primeros ensayos realizados con objeto de poner el método a punto fueron llevados a cabo empleando gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) comercial de musculo de conejo. En la Figura 29 presentamos una valoración espectrofotométrica de la actividad de este enzima realizada en las condiciones que se detallan en el aparta-

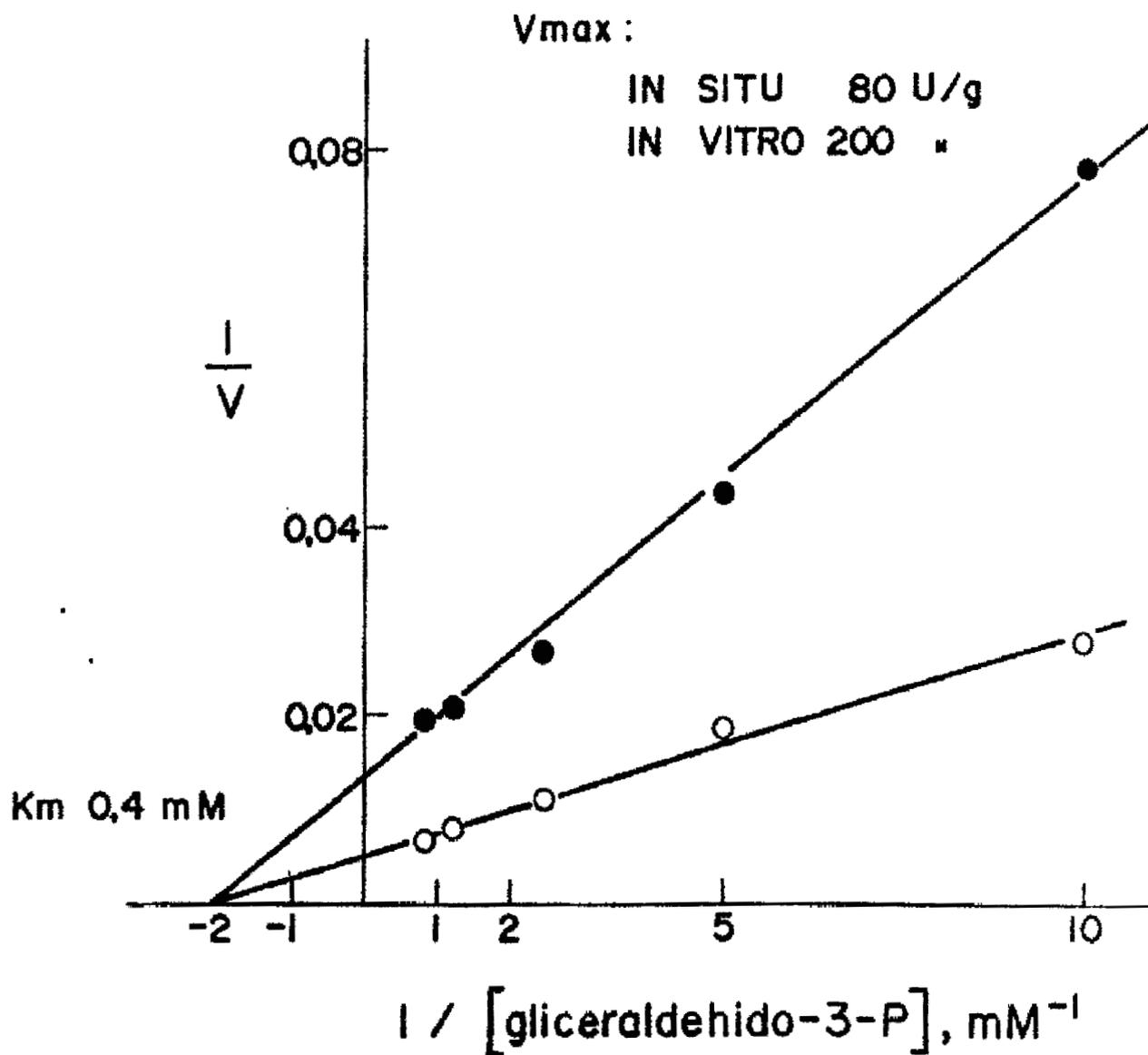


Figura 28. Triosafofosfato isomerasa in situ e in vitro. Cinética frente al gliceraldehido-3-P.

(●): in situ

(○): in vitro

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador : TDI

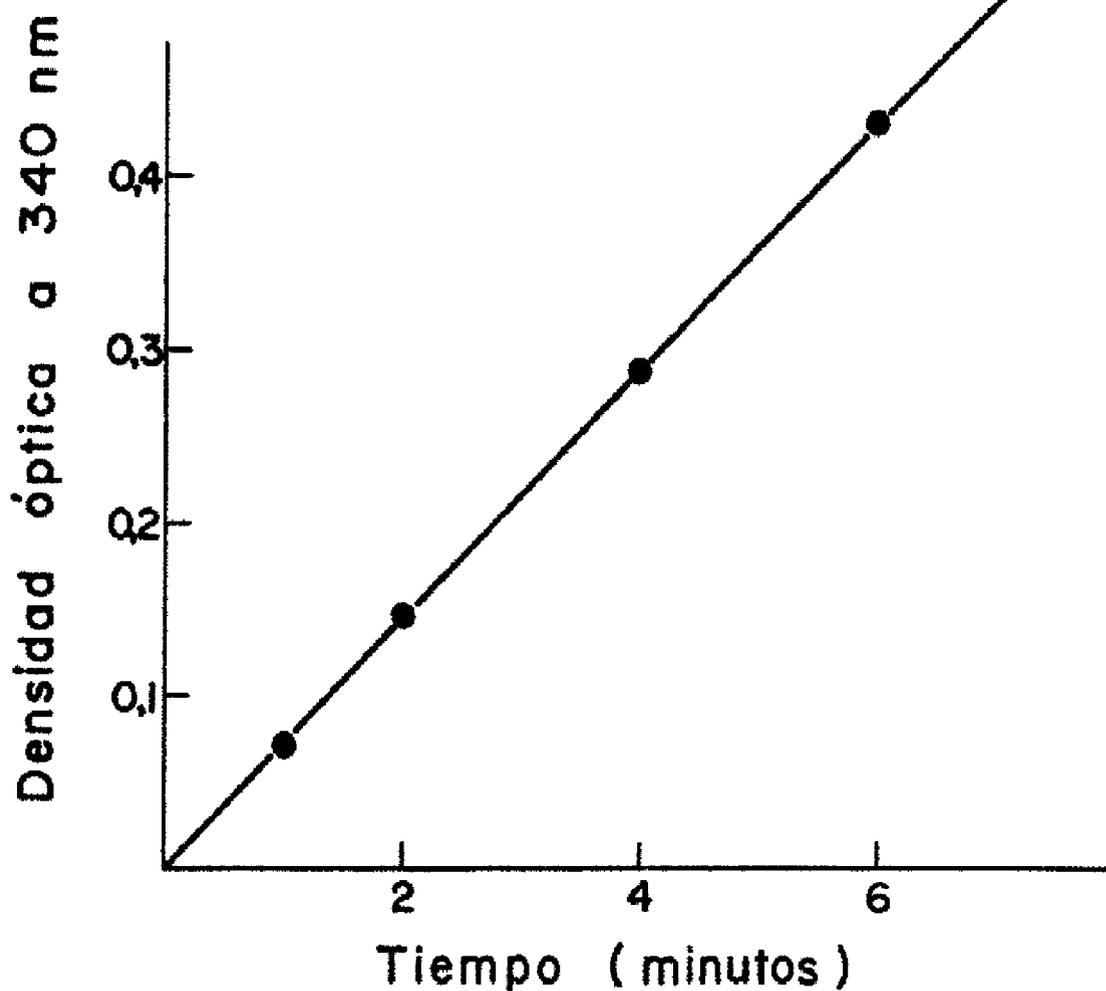


Figura 29. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Ensayo "lineal".

Curso de la reacción seguida através del cambio en la densidad óptica a 340 nm. Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa purificada de músculo de conejo 0,03 U/ml.

El resto de las condiciones del ensayo según MATERIAL Y METODOS

do 2.8.3. de MATERIAL Y METODOS; como puede apreciarse, el curso de la reacción es perfectamente lineal durante por lo menos 6 minutos, tiempo suficiente que nos permite determinar la velocidad inicial con toda garantía.

Antes de pasar a estudiar con este método la actividad de la GAPDH de eritrocitos, comprobamos primeramente que se mantenía la linealidad de la velocidad de reacción (dentro de los límites de la ley de Beer) respecto a la cantidad de enzima, como puede verse en la Figura 30 en que representamos la actividad enzimática observada frente a cantidades crecientes de enzima. Posteriormente verificamos que el ensayo "lineal" empleando ya un extracto crudo (de músculo esquelético de rata), ofrecía las mismas garantías de fiabilidad que con el enzima purificado, la posibilidad de interferencia por parte de la adenilato kinasa fué obviada gracias a la adición de Ap_5A , un inhibidor potente y específico (73), como ya explicamos en MATERIAL Y METODOS. Cuando en estas condiciones se sustituyó el fosfato por arseniato no se detectó cambio alguno en la absorción a 340 nm, lo que nos sirvió de prueba adicional de que el método de ensayo era eficaz, ya que al no formarse 1,3-difosfoglicerato, uno de los productos de la reacción, el sistema auxiliar empleado (fosfoglicerato kinasa, hexokinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) no podía visualizar nada.

A continuación comprobamos que utilizando el ensayo "lineal" podía determinarse con precisión la actividad de la GAPDH en eritrocitos tanto in vitro como in situ.

3.2.6.2. Cinética frente al NAD^+ .

En 1968 Conway y Koshland (26), mostraron en el enzima de músculo de conejo una cinética compleja de satu-

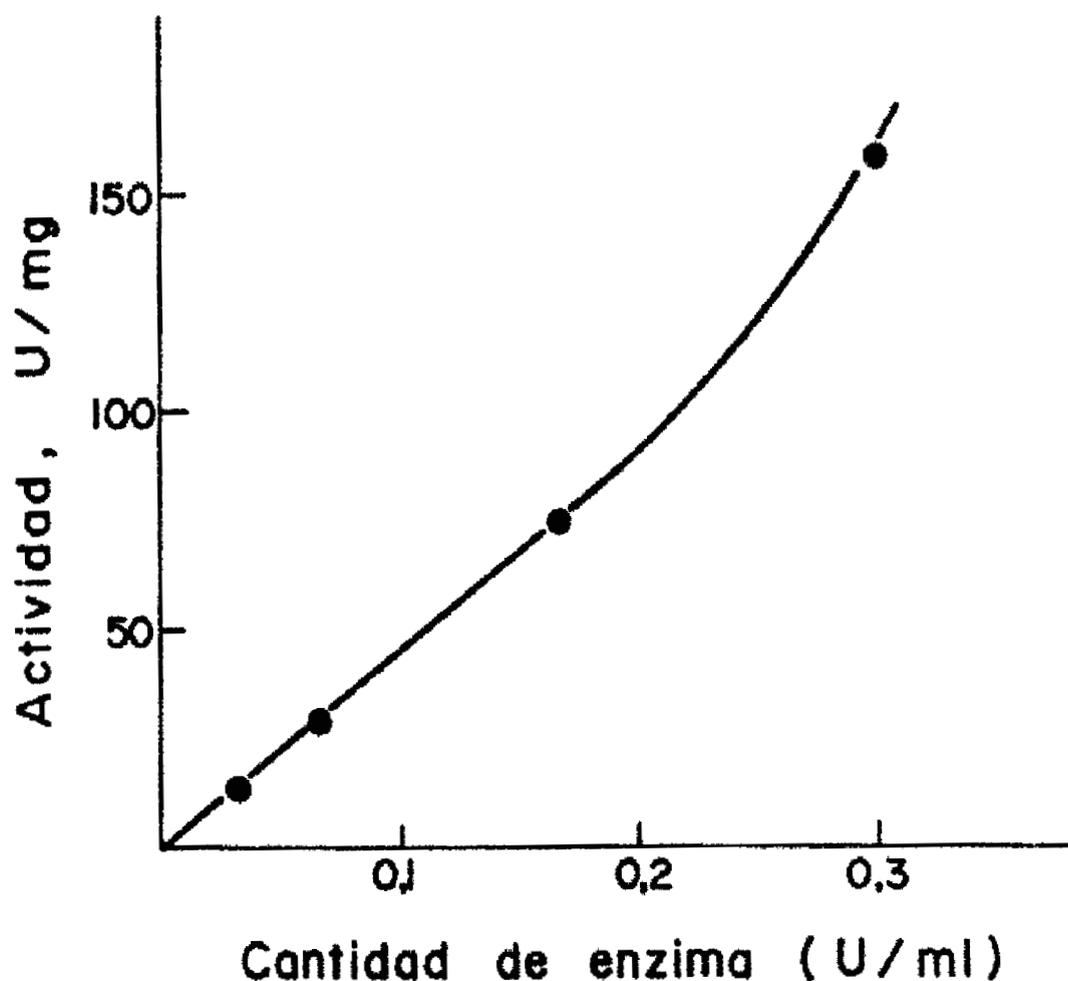


Figura 30. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Ensayo "lineal".

Representación de la actividad enzimática encontrada frente a cantidades crecientes de enzima. Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa purificada de músculo de conejo. Las condiciones de ensayo según MATERIAL Y METODOS

ración para el NAD^+ que explicaron de acuerdo con el modelo de Koshland-Filmer-Nemethy según el cual, el ligamiento del NAD^+ al enzima ocurriría con cooperatividad negativa (66), de forma que el acoplamiento sucesivo de cada molécula de NAD^+ daría lugar a una disminución en la afinidad para las moléculas siguientes ($n_H < 1$).

En nuestras condiciones de concentración fisiológica de enzimas y determinando la actividad de la GAPDH por medio del ensayo "lineal", hemos realizado un estudio cinético frente a la concentración de NAD^+ empleando gliceraldehído-3-P 3 mM y fosfato 50 mM. La curva de saturación mostró forma sigmoidal tanto in situ como in vitro aunque de forma mas acusada en el primer caso, con un n_H de 2,6 in situ y 1,6 in vitro y un $S_{0,5}$ de 0,18 in situ y 0,05 in vitro, lo que indica una afinidad por el NAD^+ sensiblemente inferior in situ (Fig. 31).

3.2.6.3. Cinética frente al gliceraldehído-3-P.

Utilizando una concentración de NAD^+ de 0,5 mM y fosfato a 50 mM encontramos una K_m para el gliceraldehído-3-P de 0,3 mM tanto in situ como in vitro. La V_{max} encontrada fué de 5 U/g in situ y 9 U/g in vitro (Fig. 32).

3.2.6.4. Cinética frente al fosfato inorgánico.

Fué realizado este estudio cinético empleando NAD^+ 0,5 mM y gliceraldehído-3-P 3 mM. La K_m obtenida fué de 10 mM, tanto in situ como in vitro (Fig. 33).

3.2.7. FOSFOGLICERATO KINASA

La reacción catalizada por este enzima representa el primer punto de la cadena glicolítica en que se ge-

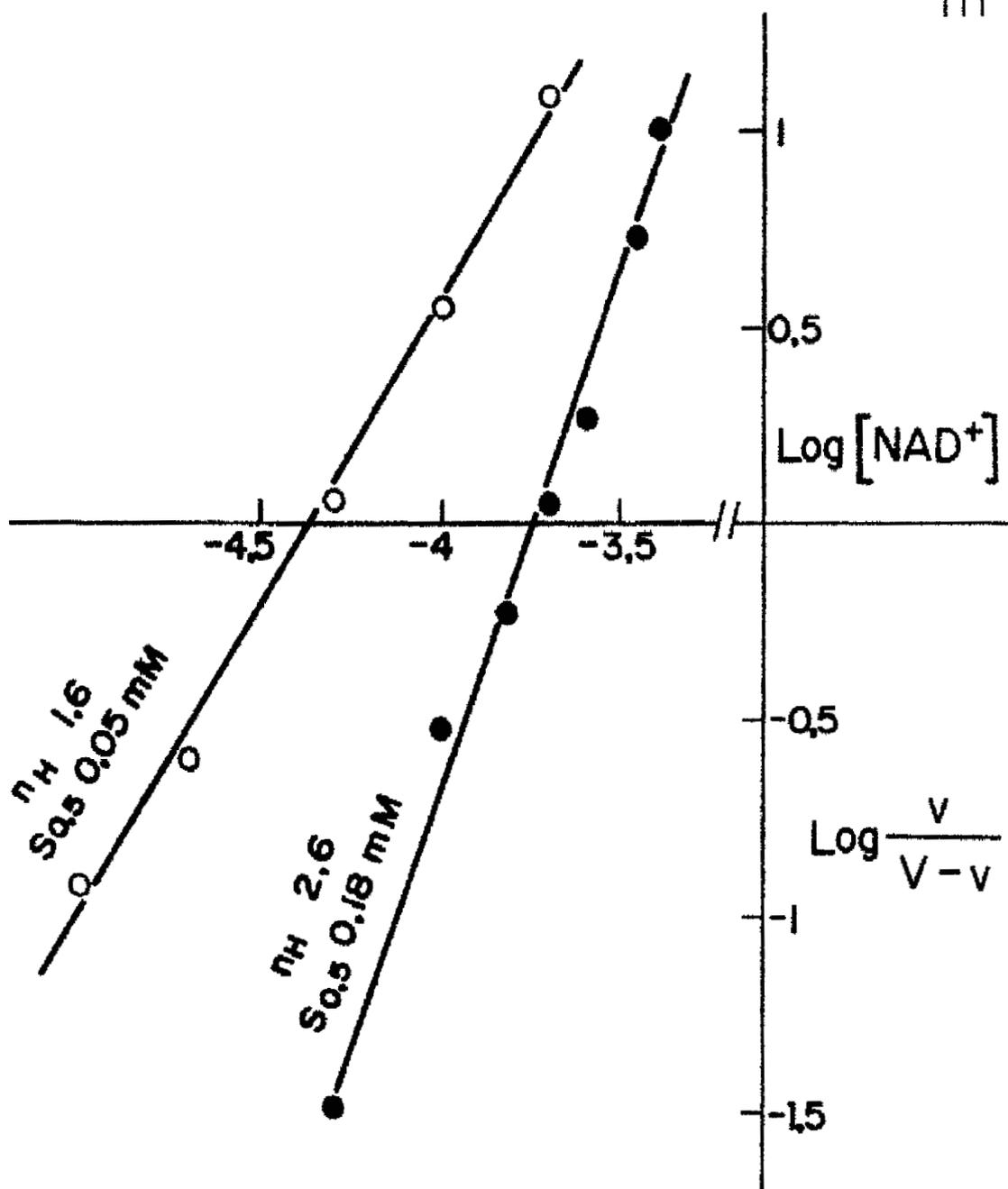


Figura 31. Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa in situ e in vitro. Representación de Hill de la cinética frente al NAD^+ .

Gliceraldehido-3-P 3 mM, Pi 50 mM

(●): in situ

(○): in vitro

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

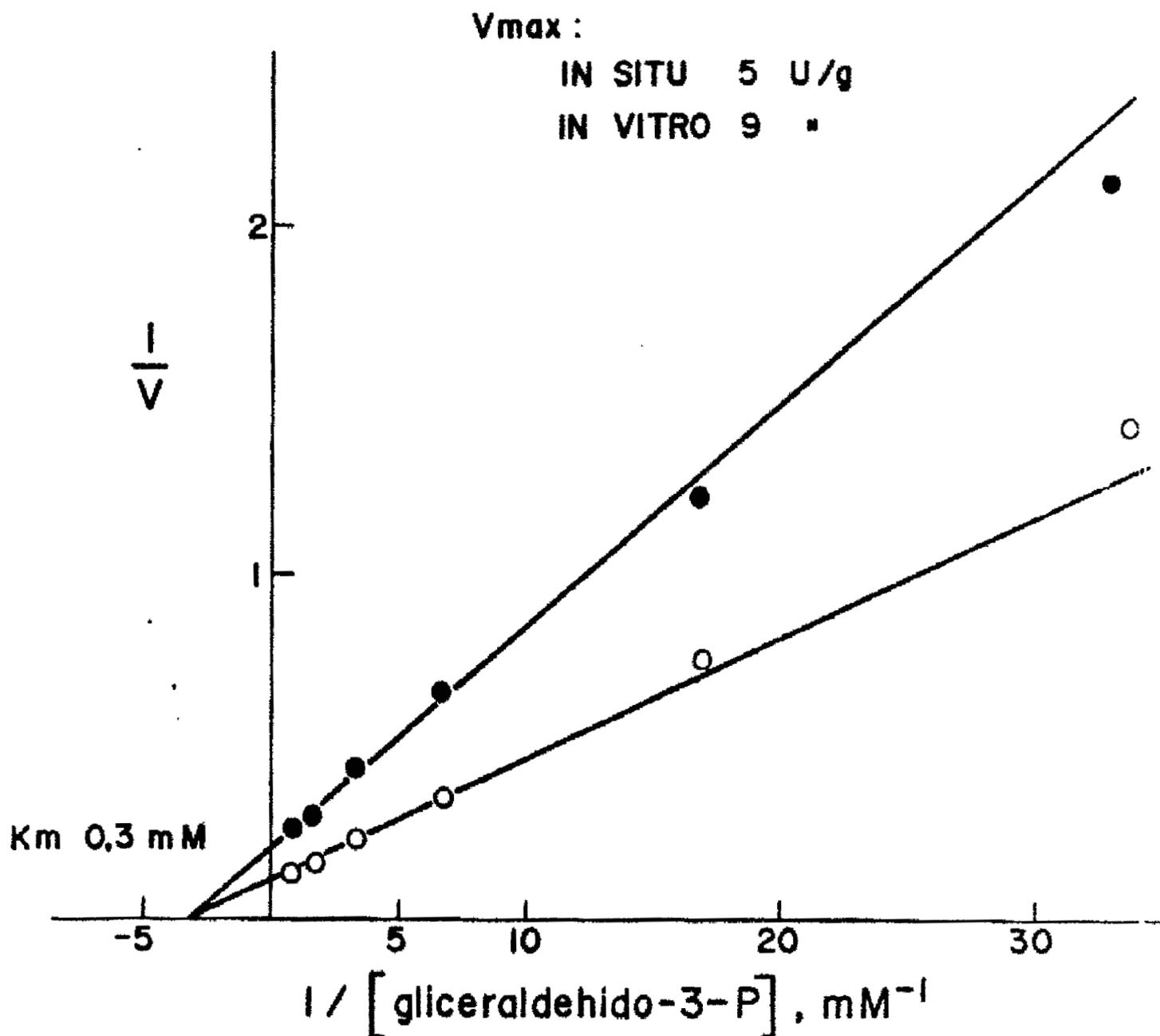


Figura 32. Glicerinaldehido-3-P deshidrogenasa in situ e in vitro. Cinética frente al glicerinaldehido-3-P.

NAD^+ 0,5 mM, fosfato inorgánico 50 mM

(●): in situ

(○): in vitro

Las restantes condiciones de ensayo según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: DMS

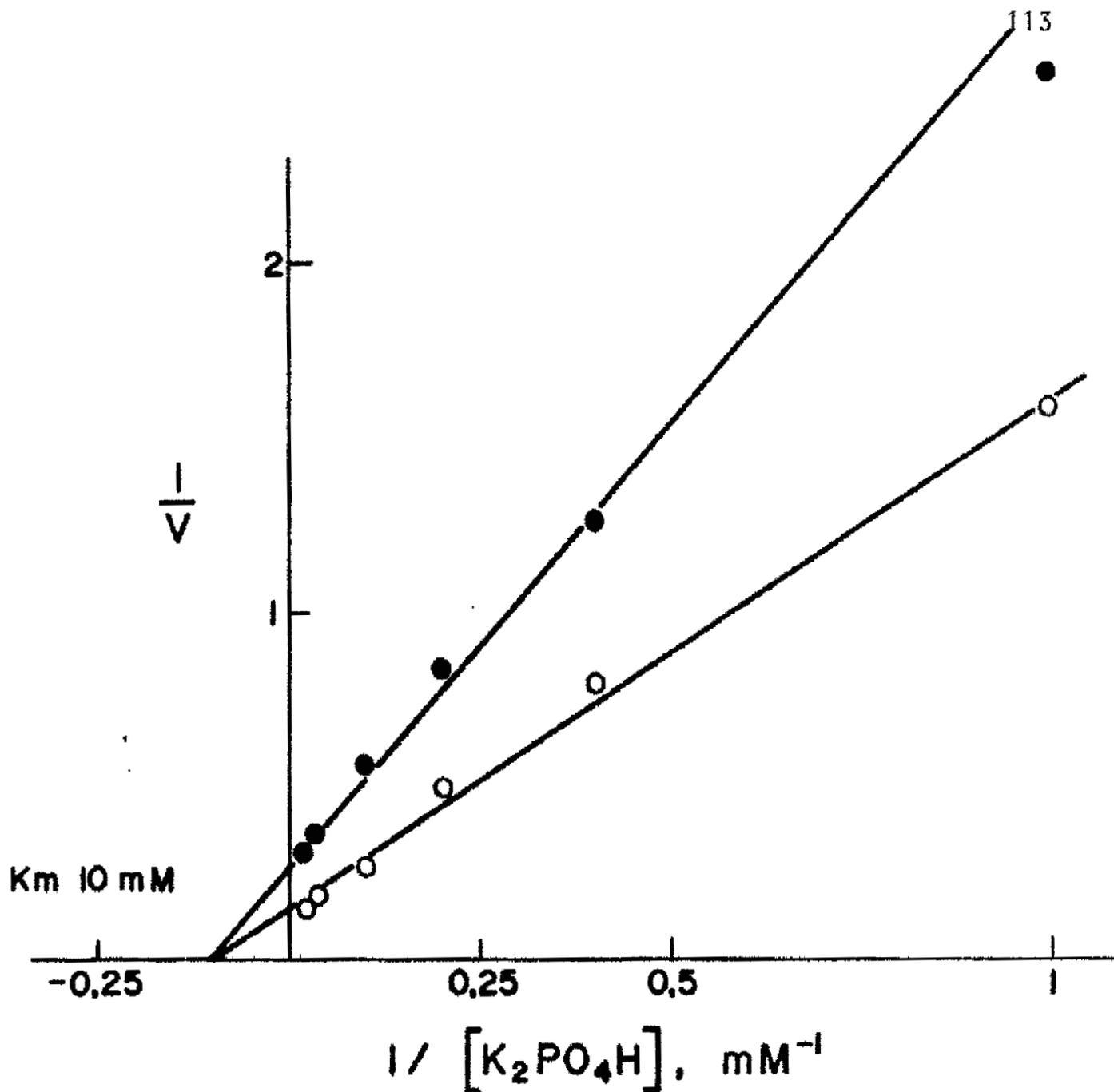


Figura 33. Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa in situ e in vitro. Cinética frente al fosfato inorgánico.

Gliceraldehído-3-P 3 mM, NAD^+ 0,5 mM

●): in situ

○): in vitro

Las restantes condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: DMS

nera ATP.

Dada la inestabilidad del 1,3-difosfoglicerato, su substrato junto con el ADP en el sentido glicolítico, hemos estudiado su comportamiento en reverso.

Como puede verse en la Figura 34 en que representamos la curva de saturación frente al 3-fosfoglicerato, con ATP-Mg 1 mM, la K_m encontrada fué de 0,7 mM in situ e in vitro. La V_{max} obtenida fué de 7 U/g in situ y de 16 U/g in vitro.

3.2.8. FOSFOGLICERATO MUTASA

De los enzimas pertenecientes a la porción de la vía glicolítica comprendida entre gliceraldehido-3-P y lactato (donde tiene lugar las reacciones de oxido-reducción y producción de ATP), la fosfoglicerato mutasa es la que menor actividad específica muestra en eritrocitos. Junto con otros dos enzimas más, la difosfoglicerato mutasa y la 2,3-difosfoglicerato fosfatasa, forma el llamado ciclo del 2,3,-difosfoglicerato, un pequeño ciclo colateral a la glicolisis, en que tiene lugar la formación de este metabolito en los eritrocitos (106)(107). Por otro lado el 2,3-DPG actúa de cofactor de este enzima, por el que presenta un requerimiento absoluto (47)(20).

Realizamos un estudio cinético frente a la concentración de 3-fosfoglicerato, que exponemos en la Figura 35, obteniendo una K_m de 0,1 mM tanto in situ como in vitro. La V_{max} determinada fué de 0,45 U/g in situ y 0,73 U/g in vitro.

3.2.9. ENOLASA

Se trata de un enzima que ha recibido particular

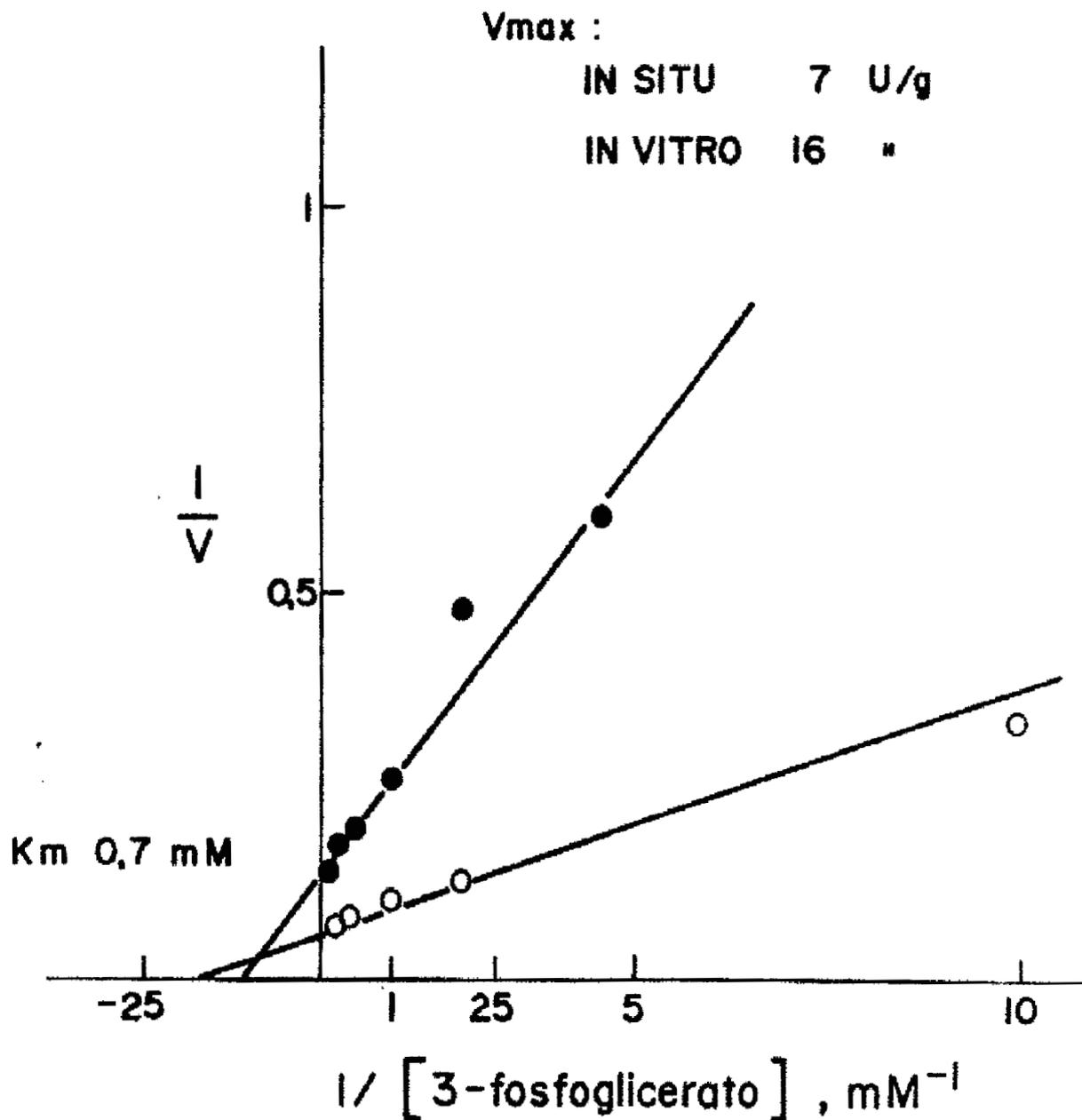


Figura 34. Fosfoglicerato kinasa in situ e in vitro. Cinética frente al 3-fosfoglicerato.

(●): in situ

(○): in vitro

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: DMS

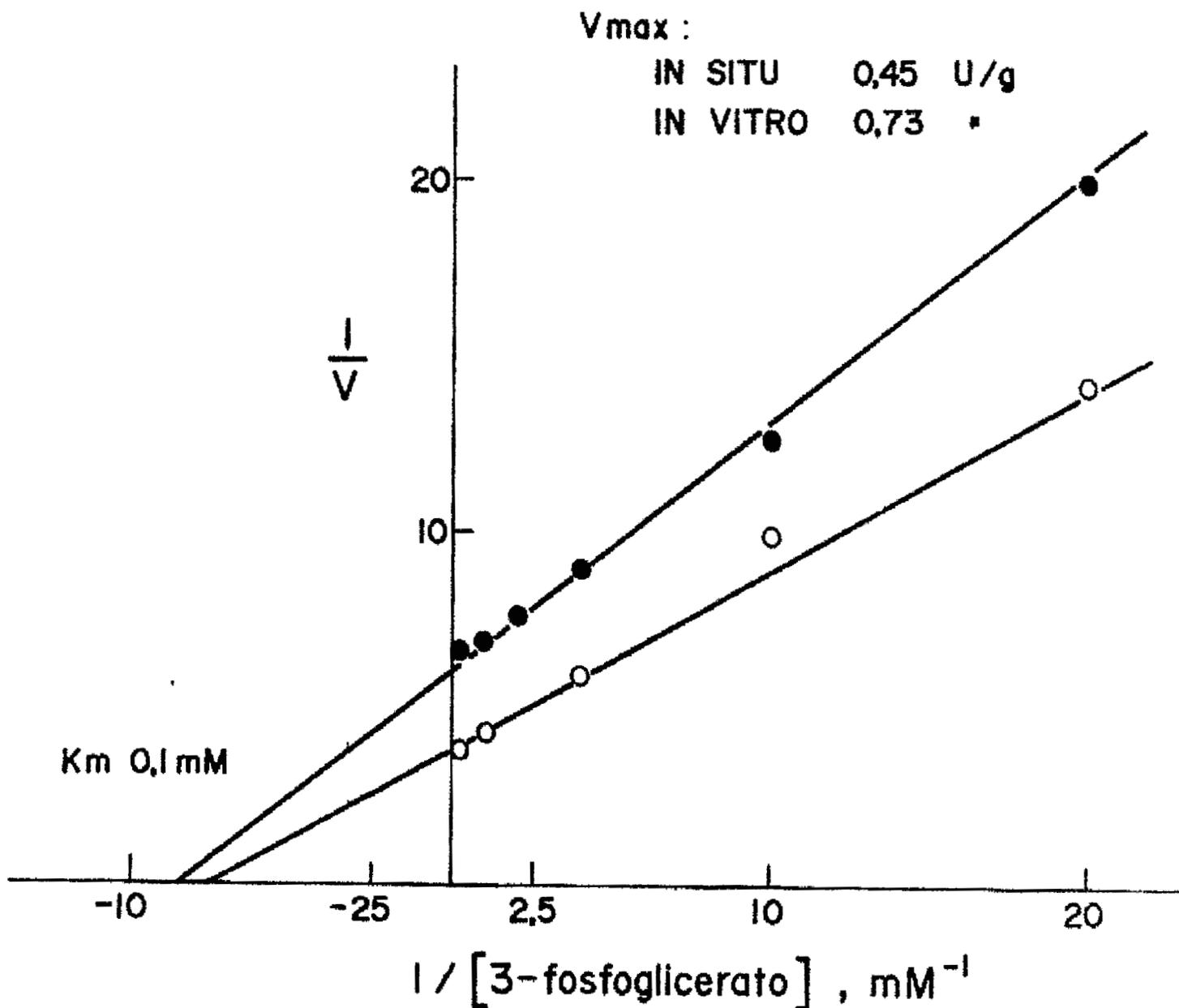


Figura 35. Fosfoglicerato mutasa in situ e in vitro. Cinética frente al 3-fosfoglicerato.

●: in situ

○: in vitro

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: DMS

atención como un típico metalo-enzima, de forma que su actividad está fuertemente influenciada por determinados iones metálicos, dándose lugar a la formación de un complejo ternario enzima-substrato-metal (76)(154).

Su actividad es muy sensible a cambios en la composición del medio de ensayo, principalmente trazas de metales pesados, de aquí la necesidad de adicionar a la mezcla de ensayo algún compuesto quelante como EDTA. Posee un inhibidor muy bien conocido, el fluor (76).

Hemos llevado a cabo un estudio cinético frente al 2-fosfoglicerato como substrato variable, que representamos en la Figura 36. La K_m obtenida fué de 20 μM in situ e in vitro. La V_{max} encontrada fué de 4,6 U/g in situ y 8 U/g in vitro.

3.2.10. PIRUVATO KINASA

Junto con la hexokinasa y la fosfofructokinasa la piruvato kinasa cataliza una de las tres reacciones virtualmente irreversibles de la glicolisis, se trata de un enzima alostérico, como los otros dos, cuya actividad puede modularse por la presencia de determinados metabolitos efectores, constituyendo entonces otro de los puntos donde la vía glicolítica es susceptible de regulación. Cataliza la segunda reacción generadora de ATP en la glicolisis.

Este enzima ha sido extensamente estudiado, particularmente desde que se descubrió que su deficiencia estaba relacionada con una mutación en el enzima de eritrocitos de forma que exhibe características cinéticas y electroforéticas distintas a las normales y se acompaña de una anemia hemolítica (134)(87)(1).

Clasicamente se han distinguido tres tipos de iso-

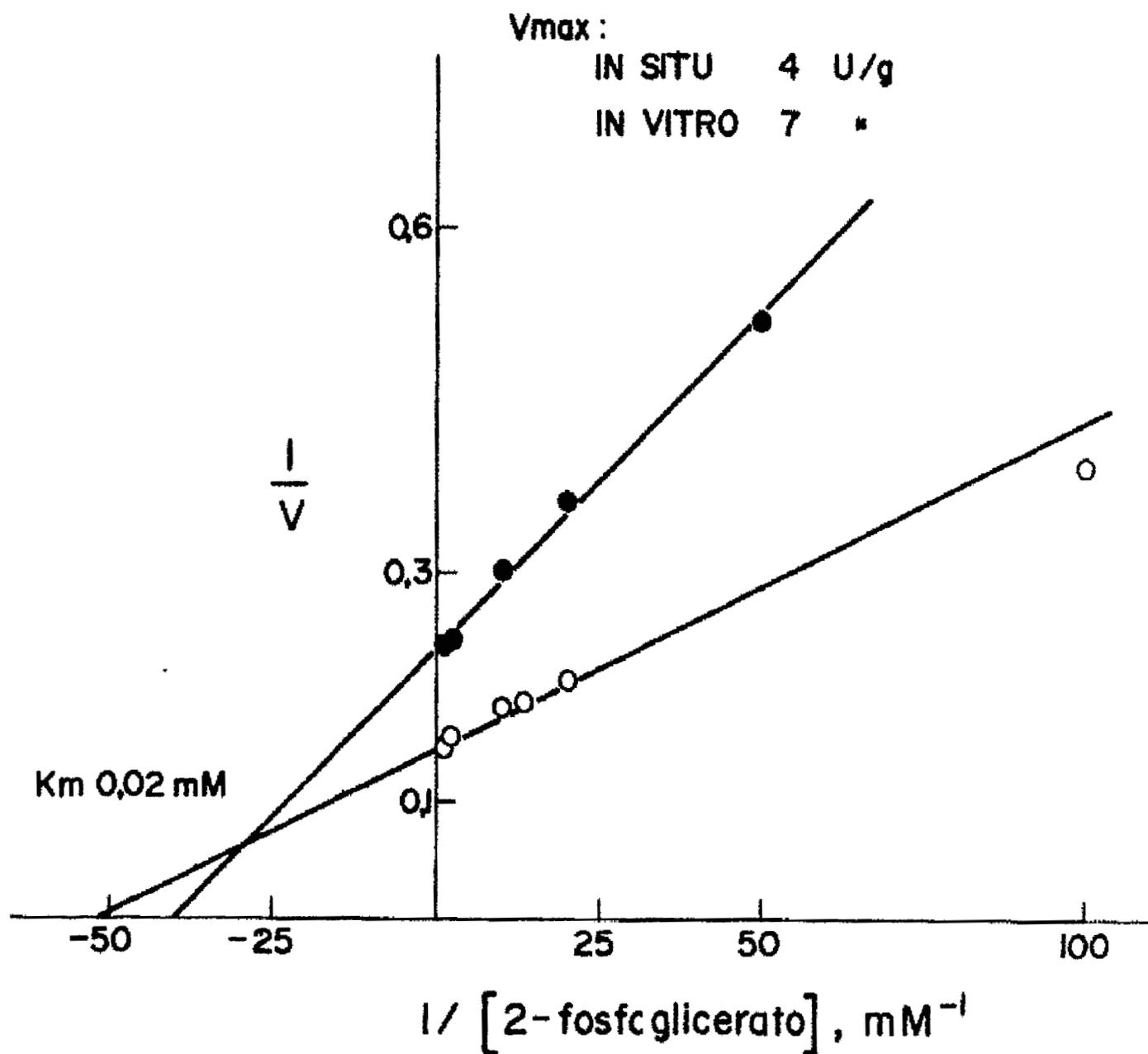


Figura 36. Enolasa in situ e in vitro. Cinética frente al 2-fosfoglicerato.

●: in situ

○: in vitro

las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: TDI

zimas: el tipo L predominante en hígado, el tipo M que predomina en músculo y leucocitos y el tipo A mayoritario en riñón y tejido adiposo. El enzima en los eritrocitos, corresponde enteramente al tipo L de hígado (14)(80) que muestra cinética sigmoide para el fosfoenolpiruvato, inhibición alostérica por ATP y alanina, y activación por fructosa-1,6-difosfato que contrarresta las inhibiciones (135)(136)(23).

Empleando ADP-Mg 1 mM, el enzima mostró cinética sigmoide frente al P-enolpiruvato con cooperatividad positiva, tanto in vitro como in situ aunque menos acusada en este último caso, los valores de n_H fueron de 1,4 in situ y 2,5 in vitro, y un $S_{0,5}$ de 1,5 mM in situ y 0,8 mM in vitro. Estos resultados pueden apreciarse en las Figuras 37 y 38.

El enzima in situ exhibe también activación alostérica por el fructosa-1,6-difosfato, al igual que in vitro, como se puede ver en la Figura 38 en que se expone la cinética de saturación para el P-enolpiruvato en presencia y ausencia de FDP 10 μ M. Puede apreciarse como esta activación promueve el cambio de cinética de sigmoidal a hiperbólica dando lugar así a un aumento muy considerable en la afinidad por el P-enolpiruvato, con un $S_{0,5}$ (Km) en presencia de FDP de 0,4 mM in situ y 0,2 mM in vitro (Fig. 39). La V_{max} determinada en presencia de FDP, fué de 3,4 U/g in situ y 6 U/g in vitro (Fig. 39). También mostró la PK in situ inhibición alostérica por ATP que era contrainhibida por FDP e inhibición por alanina.

3.2.11. LACTATO DESHIDROGENASA

Es un enzima de gran actividad en eritrocito y uno

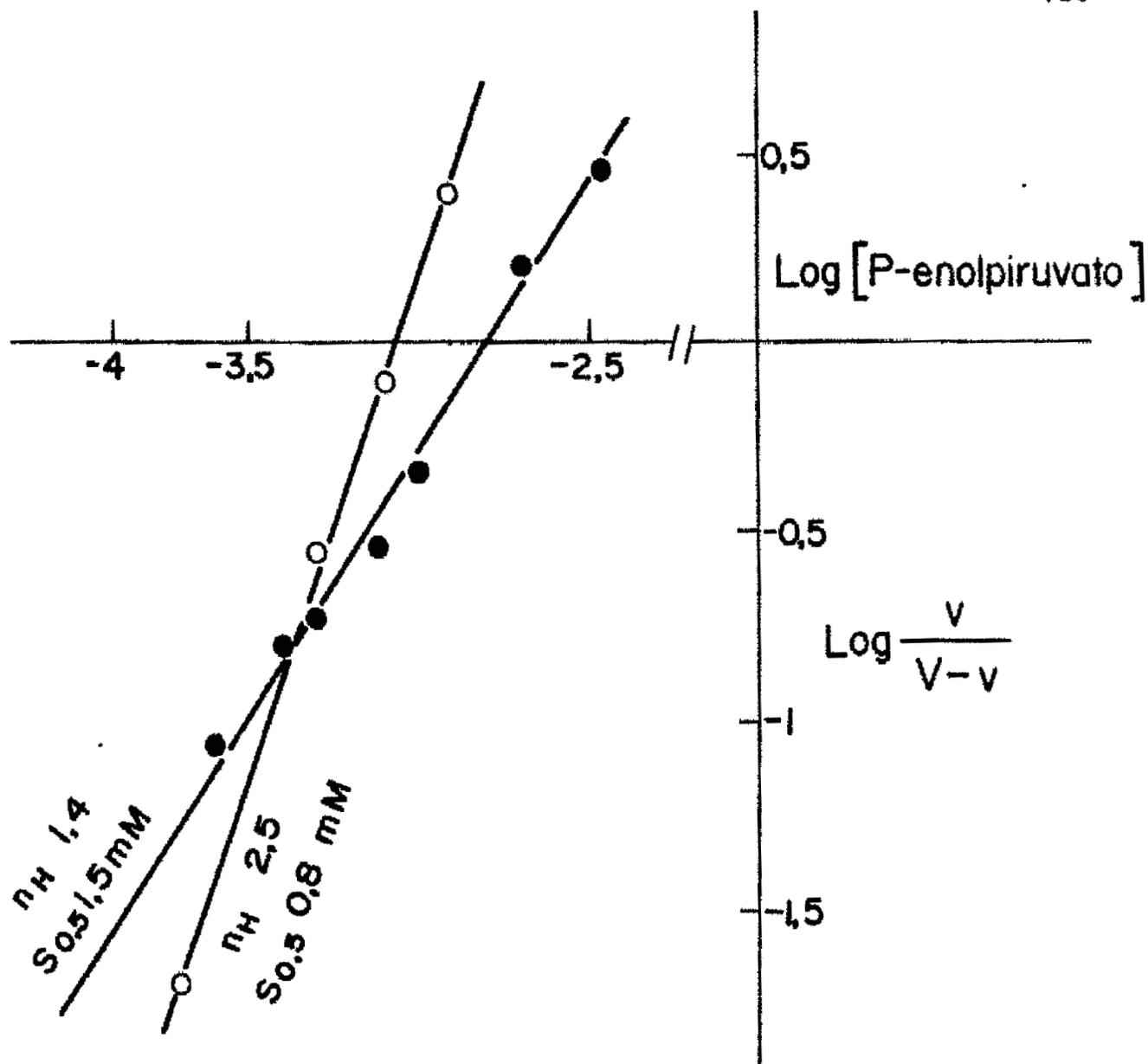


Figura 37. Piruvato kinasa in situ e in vitro. Representación de Hill de la cinética frente al P-enolpiruvato.

ADP-Mg a concentración 1 mM

●: in situ

○: in vitro

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: DMS

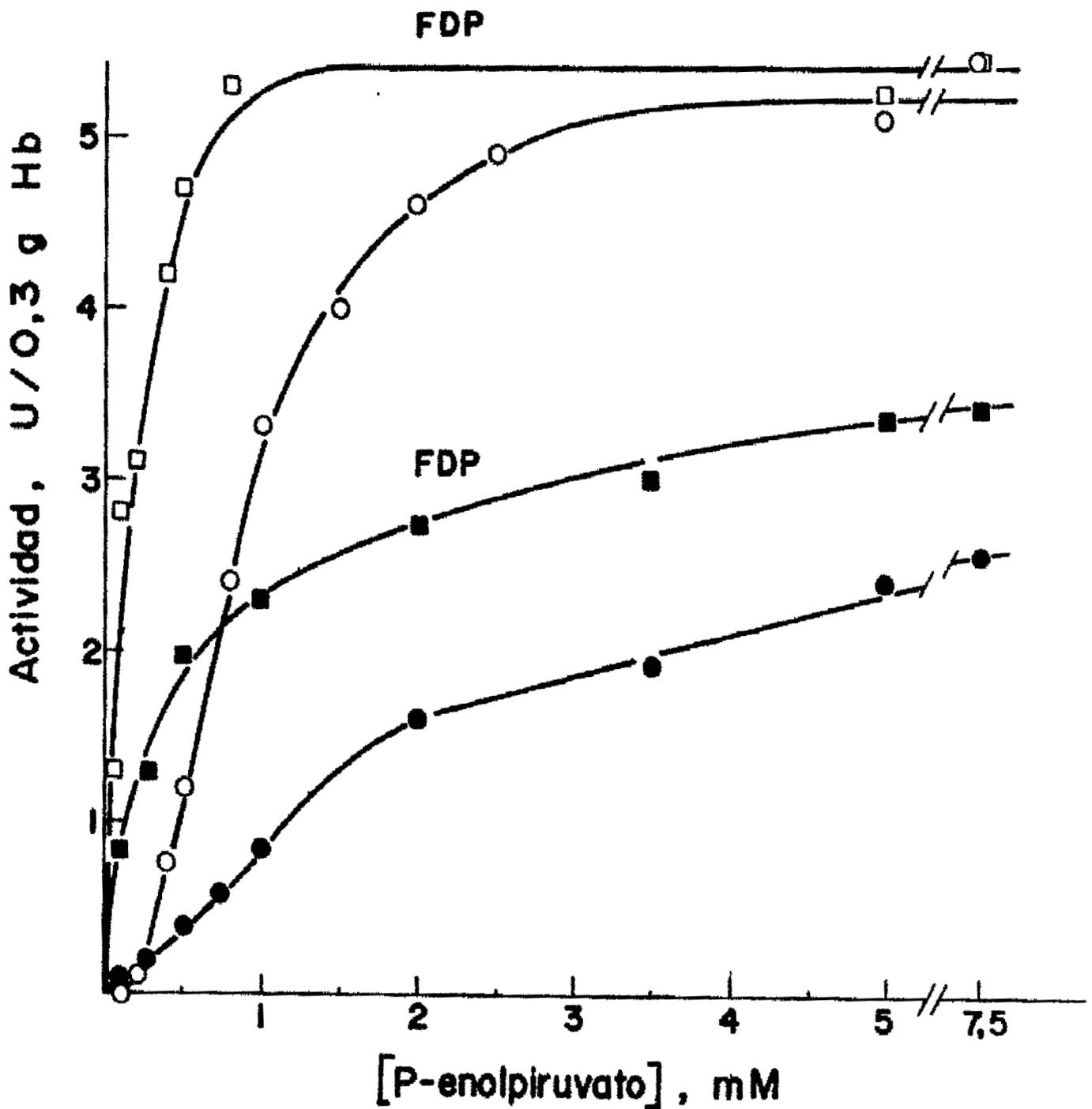


Figura 38. Piruvato kinasa in situ e in vitro. Cinética en presencia y ausencia de fructosa-1,6-difosfato.

ADP-Mg a concentración 1 mM

●): in situ

■): in situ + FDP 10 μmolar

○): in vitro

□): in vitro + FDP 10 μmolar

Las demás condiciones de ensayo según MATERIAL Y METODOS.

Reactivo grapador: DMS

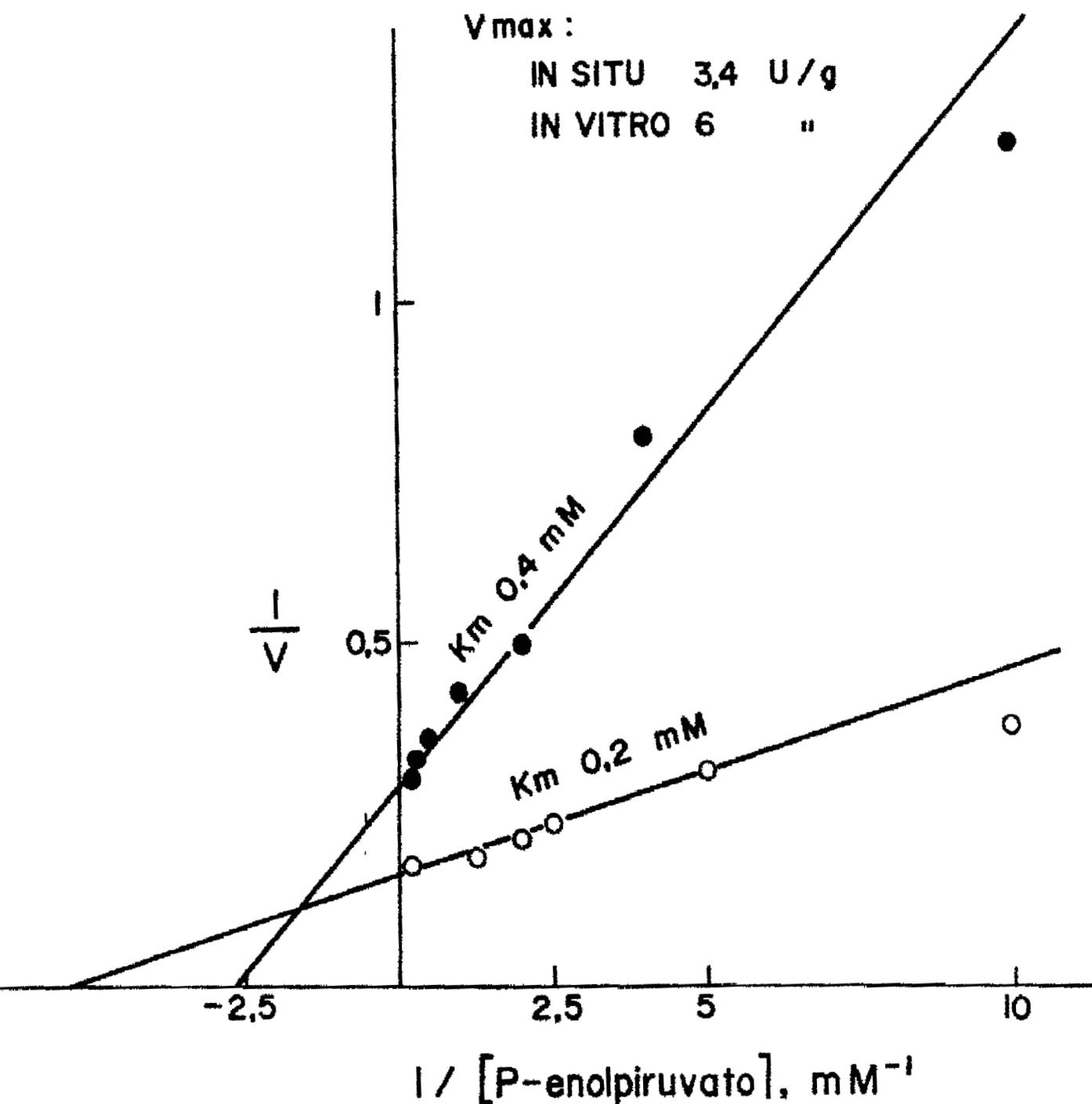


Figura 39. Piruvato kinasa in situ e in vitro. Cinética frente al P-enolpiruvato en presencia de fructosa-1,6-difosfato.

ADP-Mg a concentración 1 mM

●): in situ + FDP 10 μM

○): in vitro + FDP 10 μM

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: DMS

de los mas estudiados en lo que se refiere a estructura cuaternaria y formas de sus distintos isozimas. Ya en 1950, Meister (83), llamó la atención sobre la heterogeneidad de la lactato deshidrogenasa (LDH) de corazón de vaca. Más tarde, Vessel y Bearn (145) en 1957, y Markert y Moller en 1959 (81), a través de estudios con electroforesis revelaron la presencia en suero humano de múltiples formas de LDH, y fueron Cahn, Kaplan, Levine y Zwilling (21), quienes en 1962 aislaron los cinco tipos de isozimas que hoy se conocen, encontrando que entre ellos existen dos formas puras, la M, predominante en músculo esquelético y la H mayoritaria en corazón, el resto son formas intermedias que aparecen a través del periodo embrionario, tratándose entonces de enzimas híbridos a partir de los componentes de los tipos M y H. Su estructura cuaternaria es un tetrámero compuesto de cuatro cadenas polipeptídicas, resultantes de la asociación repetida de dos subunidades distintas, la M y la H, dando lugar así a cinco estados de agregación de las mismas y por ende a los cinco isozimas en que se distribuye la LDH en la mayoría de los tejidos, a saber: H_4 (LDH-1), H_3M (LDH-2), H_2M_2 (LDH-3), HM_3 (LDH-4) y M_4 (LDH-5).

En el eritrocito Rosa y Schapira (112) encontraron solo dos bandas electroforéticas correspondientes a los isozimas LDH-1 y LDH-2, y solo en eritrocitos jóvenes aparecen trazas del resto de las formas, que según Friedemann y Rapoport (39) se reparten de la siguiente manera: LDH-1 30-40%, LDH-2 40-45%, LDH-3 14-16%, LDH-4 3-5%, LDH-5 2%.

3.2.11.1. Cinética frente al piruvato

La concentración empleada de NADH fué de 0,3 mM,

se ensayó a concentraciones variables de piruvato, como puede verse en la Figura 40 en que se representa graficamente el estudio cinético. La K_m obtenida fué de 0,18 mM, tanto in situ como in vitro. La V_{max} fué de 23 U/g in situ y de 44 U/g in vitro.

3.2.11.2. Cinética frente al NADH

La concentración de piruvato usada fué de 1 mM. En la Figura 41 exponemos los resultados. La K_m obtenida fué de 0,03 mM, tanto in situ como in vitro.

3.2.11.3. Inhibición por exceso de piruvato

Existe una amplia polémica en torno a la inhibición de LDH por exceso de piruvato y al posible papel fisiológico que jugaría dicha inhibición. Kaplan y colaboradores (21) encontraron en 1962, que el tipo H de la LDH, esto es, el isozima LDH-1 compuesto por cuatro cadenas H (como se ha explicado en el apartado anterior) presentaba una inhibición por piruvato en exceso a concentraciones comprendidas entre 1 y 10 mM; en cambio no aparecía inhibición cuando el isozima usado era el M (LDH-5, compuesto por cuatro cadenas M). Mas tarde, el grupo de Kaplan (38) explicó esta inhibición como debida a la formación de un complejo ternario abortivo piruvato- NAD^+ -LDH (aunque recientemente se han propuesto otros mecanismos (147)). Esta inhibición explicaría según ellos, la especificidad de tejido para los distintos isozimas de la LDH, habida cuenta de que el tipo H es predominante en los tejidos con un metabolismo puramente aerobio o respiratorio, como es el corazón, en los cuales la formación del complejo inhibitor impediría la reducción del piruvato a lactato, mientras

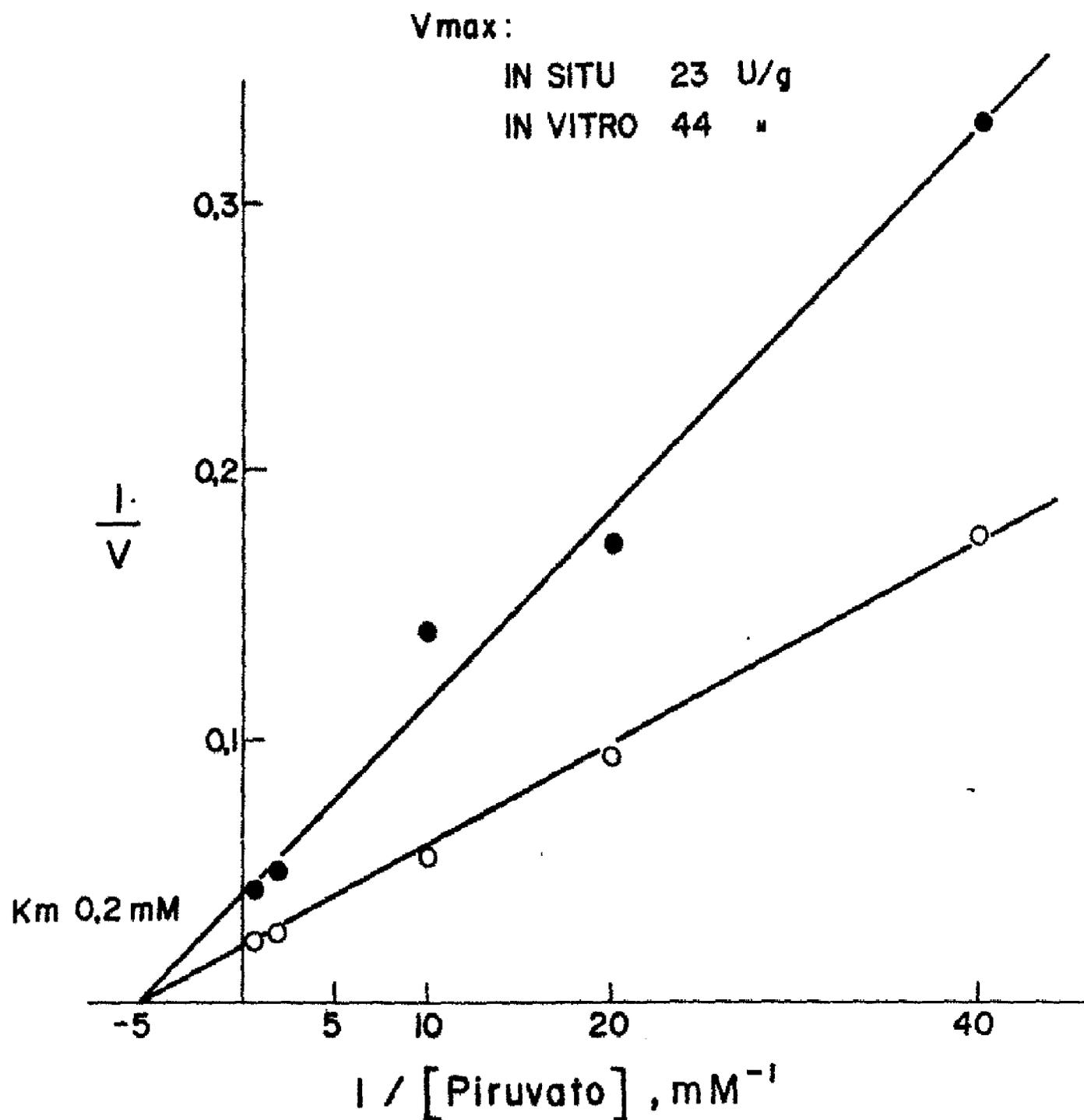


Figura 40. Lactato deshidrogenasa in situ e in vitro. Cinética frente al piruvato, a concentración 0,3 mM.

●): in situ

○): in vitro

Las demás condiciones de ensayo según MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivo grapador: TDI

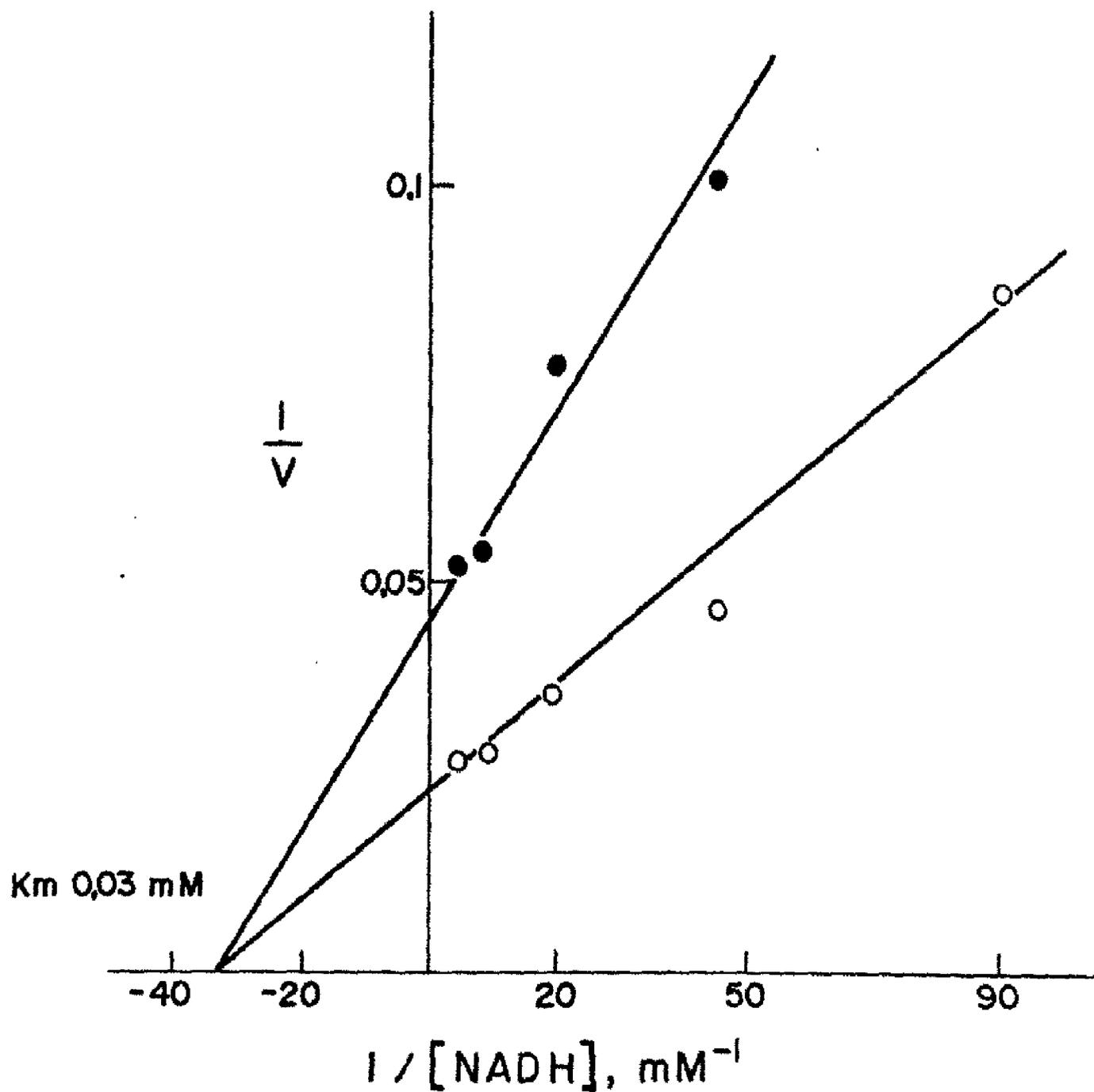


Figura 41. Lactato deshidrogenasa in situ e in vitro. Ci-
nética frente al NADH.

Piruvato a concentración 1 mM

●: in situ

○: in vitro

Las demás condiciones de ensayo según MATERIAL Y
METODOS

Reactivo grapador: TDI

que el tipo M predomina en los tejidos preferentemente anaerobios y por tanto muy dependientes de la glicolisis para sus necesidades energéticas, como es el músculo esquelético, en los cuales escasea la forma H por lo que no se formaría el complejo abortivo responsable de la inhibición del enzima. Según esta teoría, que se ha dado en llamar "aerobia-anaerobia" (144), el tipo H operaría como un regulador del metabolismo del piruvato en células altamente aerobias.

Contrariamente a lo expuesto por el grupo de Kaplan, Wuntch et al. (157)(155), sostienen que la inhibición de la LDH-1 sería un proceso dependiente del estado de dilución del enzima, debido a que a concentraciones bajas (156) sí encontraron inhibición por exceso de piruvato, pero a concentraciones altas de enzima (157) (155), en el rango de las que existen en células de mamíferos no la obtuvieron. Según estos autores, pues, la inhibición descrita sería un artefacto del sistema de ensayo y no tendría por tanto significación in vivo.

Así las cosas, hemos estudiado el efecto del piruvato a concentraciones ampliamente en exceso (hasta 50 mM) sobre la LDH contenida en eritrócitos (en los que predominan las formas H, LDH-1 y LDH-2, como ya se ha citado), paralelamente in vitro e in situ, situación esta última en la que manejamos el enzima a su concentración fisiológica. Usamos piruvato a ocho concentraciones comprendidas entre 25 μ M y 50 mM, como puede verse en la Figura 42, en que representamos gráficamente las actividades obtenidas para cada concentración de sustrato. Hemos encontrado primero una actividad enzimática progresiva hasta concentraciones de piruvato de 2 mM (100% de actividad), como corresponde a la paulatina saturación del

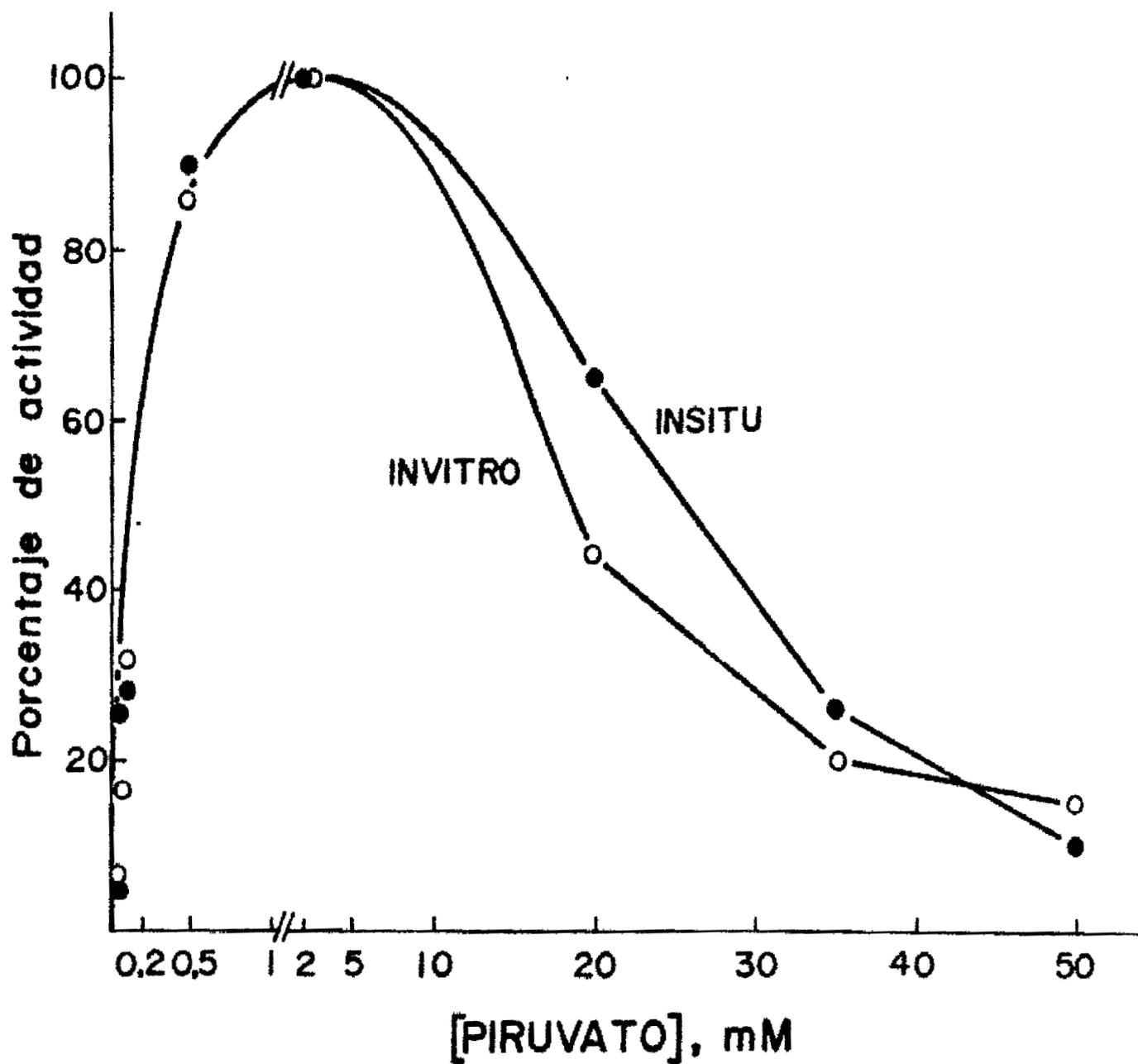


Figura 42. Inhibición de lactato deshidrogenasa por exceso de piruvato in situ e in vitro.

NADH a concentración 0,3 mM

●: in situ

○: in vitro

Las demás condiciones según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: TDI

enzima por el sustrato, para observar a medida que el piruvato aumenta una fuerte inhibición, que a concentraciones de piruvato de 35 a 50 mM llegó a ser del 80%, como puede apreciarse en la Figura 42. Esta inhibición la hemos encontrado de forma paralela in situ e in vitro.

Observaciones a concentraciones moderadamente altas de piruvato sugieren que la inhibición por exceso de este metabolito disminuye en medio fuertemente alcalino (pH 10).

3.2.11.4. Efecto del pH sobre la actividad LDH

Dentro del objetivo fundamental de nuestro trabajo de estudiar el comportamiento de los enzimas glicolíticos in situ de forma comparativa con el que se observa cuando se ensaya a concentraciones diluidas de enzima (in vitro), estudiamos el efecto del pH sobre la LDH, por una parte con el interés de saber si el hecho de emplear concentraciones fisiológicas de enzima (in situ) podía modificar en algo el efecto del pH y por otra con el de conocer si este enzima, de gran utilidad como enzima auxiliar, sería apto como tal en los casos en que por alguna razón fuera preciso acoplarla en ensayos a pH extremo.

Realizamos una curva de sensibilidad al pH empleando el piruvato a concentración 5 mM y NADH 0,3 mM, explorando la actividad LDH en el rango de pH entre 5,4 y 9,6; no trabajamos en la zona más ácida ya que por debajo de pH 5 el NADH es demasiado inestable (75). El resultado lo exponemos en la Figura 43, como se puede apreciar la máxima actividad se mantiene en forma de meseta entre pH 5,4 y 8, tanto in situ como in vitro, lo que por otro lado

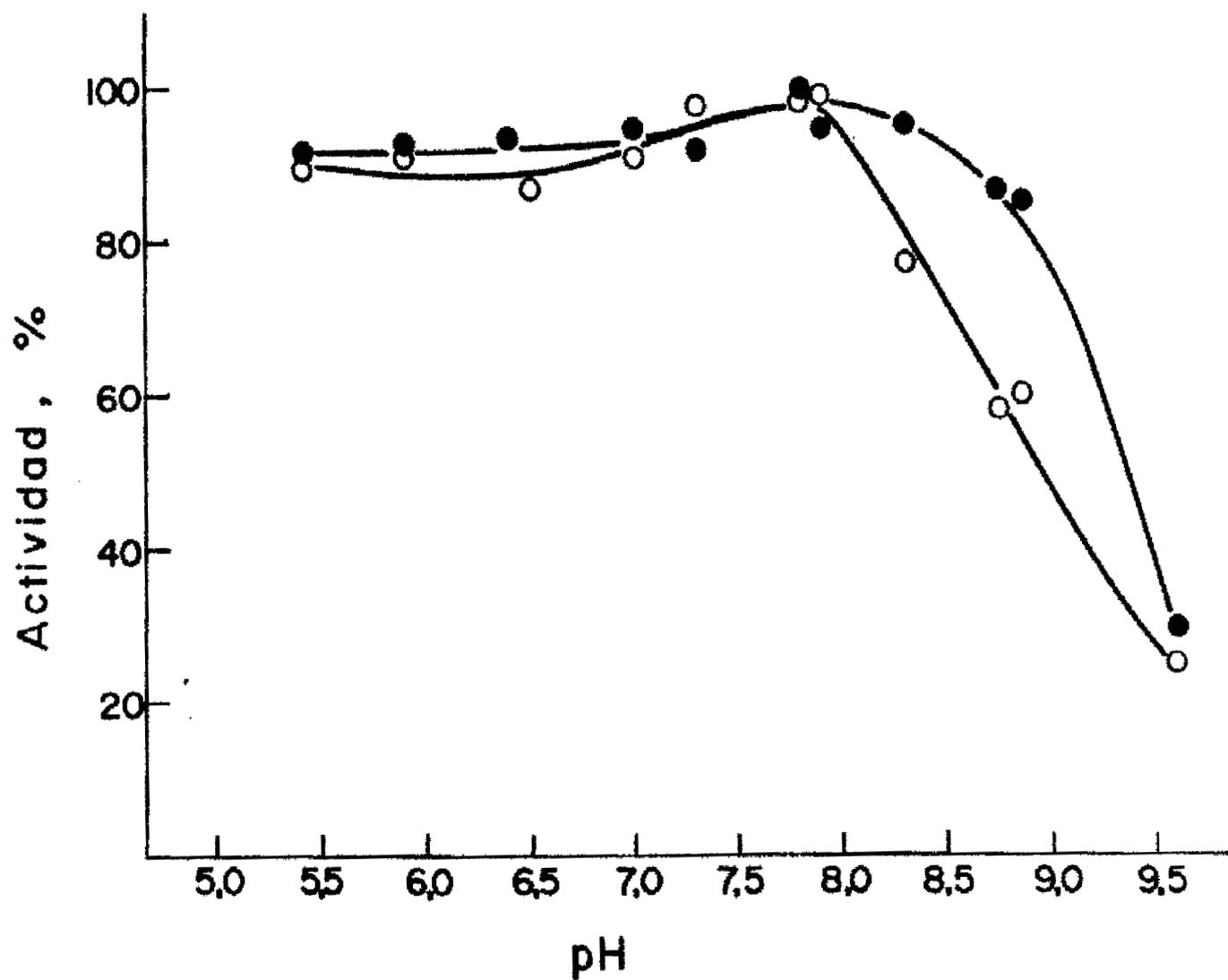


Figura 43. Lactato deshidrogenasa in situ e in vitro. Curva de pH.

●: in situ

○: in vitro

Las demás condiciones de ensayo según MATERIAL Y METODOS

Reactivo grapador: TDI

coincide con lo descrito en los ensayos habituales (150). La actividad decrece en el rango alcalino, aunque algo más deprisa in vitro, a pH 10 solo se detecta el 20-25% de la actividad máxima; no obstante, podría ser apto como enzima auxiliar en ensayos a ese rango de pH siempre que se mantuviera la afinidad por el piruvato dentro de un rango aceptable, bastando entonces con elevar la dosis de enzima. En este sentido verificamos un estudio cinético frente al piruvato a pH 10, encontrando que la afinidad estaba considerablemente disminuida, la K_m subió de 0,2 mM, que es el valor encontrado a pH 7,4, a 10 mM. Este valor fué confirmado cuando se empleó enzima de eritrocitos parcialmente purificada, lo que la descarta como enzima auxiliar en estas condiciones.

3.2.12. SENSIBILIDAD DE LOS ENZIMAS A LOS DISTINTOS REACTIVOS GRAPADORES

La mayor parte de los enzimas estudiados in situ lo han sido empleando los tres reactivos grapadores que hemos utilizado en los procesos de permeabilización de eritrocitos (MATERIAL Y METODOS apartado 2.4.1.).

Las propiedades cinéticas de los enzimas in situ se han mostrado idénticas con uno u otro reactivo, como así mismo las variaciones en las propiedades alostéricas que han sido encontradas in situ. Las velocidades máximas, en general, oscilaron alrededor del 50% de las detectadas in vitro, si bien en algunos enzimas se mostraron más reducidas, dependiendo del tipo de reactivo utilizado.

Dado que existe la posibilidad de que el reactivo grapador que se emplee pueda penetrar en las células permeabilizadas y afecte a una proporción substancial de las

proteínas intracelulares incluyendo todos o algunos de los enzimas estudiados in situ, hemos llevado a cabo un estudio de la sensibilidad que estos enzimas presentan a los distintos reactivos. En este sentido, realizamos valoraciones en V_{max} de los diferentes enzimas en una serie de hemolizados que previamente fueron tratados por separado con los distintos reactivos. Estas velocidades máximas fueron comparadas con las encontradas inicialmente in vitro, esto es, en un hemolizado sin tratar con ningún reactivo. Los valores encontrados en estas condiciones se representan en la Tabla 9 paralelamente a los valores de V_{max} obtenidos in situ empleando los diferentes reactivos y conjuntamente con las V_{max} que se observaron in vitro. En la misma Tabla se muestran también los valores de K_m encontrados in situ e in vitro en los enzimas estudiados.

TABLA 9. Enzimas glicolíticos de eritrocitos de rata in situ.

	Vmax in vitro U/g	Reactivo grapador	Vmax in situ %	Actividad in vitro más el reactivo, %	Km o S _{0,5} (mM) in situ in vitro
HK.....	0,08	TDI	33	75	Glu ← 0,2 → ATP 0,15/1,5 0,3
PGI.....	15	TDI	47	15	F6P ← 0,1 →
		DTBP	40	33	
PFK.....	8	DMS	48	36	ITP ← 0,3 →
		DTBP	30	20	
ALD.....	0,5	TDI	40	35	FDP ← <0,02 →
TIM.....	200	TDI	40	57	GA3P ← 0,4 →
GAPDH.....	9	TDI	17	30	NAD ⁺ 0,18 0,05
		DTBP	31	28	GA3P ← 0,3 →
		DMS	57	60	Pi ← 10 →
PGK.....	16	TDI	10	37	3PGA ← 0,7 →
		DTBP	60	48	
		DMS	44	44	
PGM.....	0,7	TDI	<5	15	3PGA ← 0,1 →
		DTBP	40	40	
		DMS	62	35	
ENO.....	8	TDI	57	48	2PGA ← 0,02 →
PK.....	6	TDI	<5	25	
		DTBP	33	20	
		DMS	58	22	
LDH.....	44	TDI	52	30	PIR ← 0,2 →
		DTBP	52	39	NADH ← 0,03 →
		DMS	51	45	

3.3 GLICOLISIS IN VIVO E IN SITU

Una vez estudiados la totalidad de los enzimas glicolíticos por separado, observando in situ su comportamiento cinético y peculiaridades particulares, pasamos a realizar un estudio de la glicolisis completa.

Como ya se mencionó en la INTRODUCCION, el eritrocito ofrece una oportunidad única para el estudio de esta ruta metabólica, como queda avalado por las razones siguientes: la posibilidad de interferencia por otras vías está virtualmente eliminada, no existe compartimentación intracelular y las concentraciones de todos los enzimas son prácticamente constantes (105).

Los estudios in situ han sido comparados directamente con estudios in vivo, habida cuenta de que la vía puede ser evaluada en células intactas a partir de substratos que permean libremente a través de la membrana celular.

Por otro lado y como también fué mencionado en la INTRODUCCION, el abordaje in situ, debido a que se lleva a cabo en células permeabilizadas, nos permite el estudio de la glicolisis a partir de cualquiera de los metabolitos intermedarios que integran la vía, lo que favorece la evaluación de su funcionamiento a distintos niveles en condiciones de concentraciones fisiológicas de enzimas.

La glicolisis se ha medido a través de la valoración de la producción de lactato a lo largo del tiempo, como fué explicado en MATERIAL Y METODOS (apartado 2.9.).

Los substratos que se emplearon fueron glucosa y dihidroxiacetona in vivo y glucosa, glucosa-6-P y gliceraldehido-3-P in situ.

3.3.1. GLICOLISIS IN VIVO

Como se ha mencionado en el apartado anterior además de estudiar la producción de lactato a partir de glucosa se ha hecho también a partir de dihidroxiacetona, que penetra en la vía una vez que se fosforila por medio de la acción de la triquinasa (53), convirtiéndose así en dihidroxiacetona fosfato, un intermediario glicolítico a nivel de la reacción catalizada por la triosafosfato isomerasa. La triquinasa es un enzima de actividad muy escasa en eritrocitos (13), en los cuales el sustrato normal de la vía glicolítica es la glucosa, aunque hay un cierto tipo de células rojas, como son las de cerdo, donde curiosamente la dihidroxiacetona es un potente sustrato, a la vez que su membrana es impermeable al paso de la glucosa (62).

La producción de lactato fue medida en una mezcla conteniendo el sustrato y eritrocitos intactos a una concentración de 0,25 g por ml diluidos en SSP hasta un volumen final de 10 ml, a lo largo de 8 horas de incubación a 37°C.

Cuando se empleó glucosa 10 mM como sustrato la producción de lactato fue de 0,08 μ moles por gramo de eritrocitos y por minuto, lo que teniendo en cuenta que por cada molécula de glucosa que se degrada a través de la vía glicolítica se generan dos de lactato, equivalen aproximadamente a unos 2,4 μ moles de glucosa por gramo y por hora. La vía de las pentosas es minoritaria en eritrocitos, siendo el porcentaje de glucosa que se metaboliza a su través de solamente el 5% (30)(114)(51), de forma que el 95% lo hace a través de la glicolisis.

Las velocidades de producción de lactato a partir

de glucosa y otros substratos se encuentran reunidas en la Tabla 10, pag. 151.

En la Figura 44 se representa la producción de lactato in vivo a lo largo del tiempo a partir de los dos substratos ensayados. Puede apreciarse como el curso de la producción de lactato presentó en principio una corta fase de latencia seguida de una segunda fase de velocidad máxima, finalizando con otra de velocidad residual correspondiente al agotamiento del substrato. A partir de dihidroxiacetona 10 mM se observó glicolisis en un rango similar a desde glucosa (Figura 44 y Tabla 10), la velocidad de producción de lactato fué de 0,1 μ moles/g/min. Este valor es expresión de la capacidad de la triokinasa en eritrocitos, ya que es inferior a las actividades de los enzimas glicolíticos desde la etapa de triosas a lactato. Esta actividad triokinasa como puede apreciarse, se encuentra en un rango similar al de la hexokinasa y por tanto no evaluable espectrofotométricamente en un ensayo continuo.

Cuando se mezclaron glucosa y dihidroxiacetona la glicolisis no se aceleró. La adición de glicerol 10 mM no varió apreciablemente la velocidad glicolítica.

3.3.2. GLICOLISIS IN SITU

Con objeto de poder visualizar la glicolisis in situ, a la vista de la naturaleza de este abordaje, adicionamos cofactores a la mezcla de incubación a concentraciones catalíticas, dado que lógicamente se pierden en el proceso de permeabilización de los eritrocitos.

3.3.2.1. Producción de lactato a partir de gliceraldehido-3-P.

Se midió la aparición de lactato a lo largo de 2

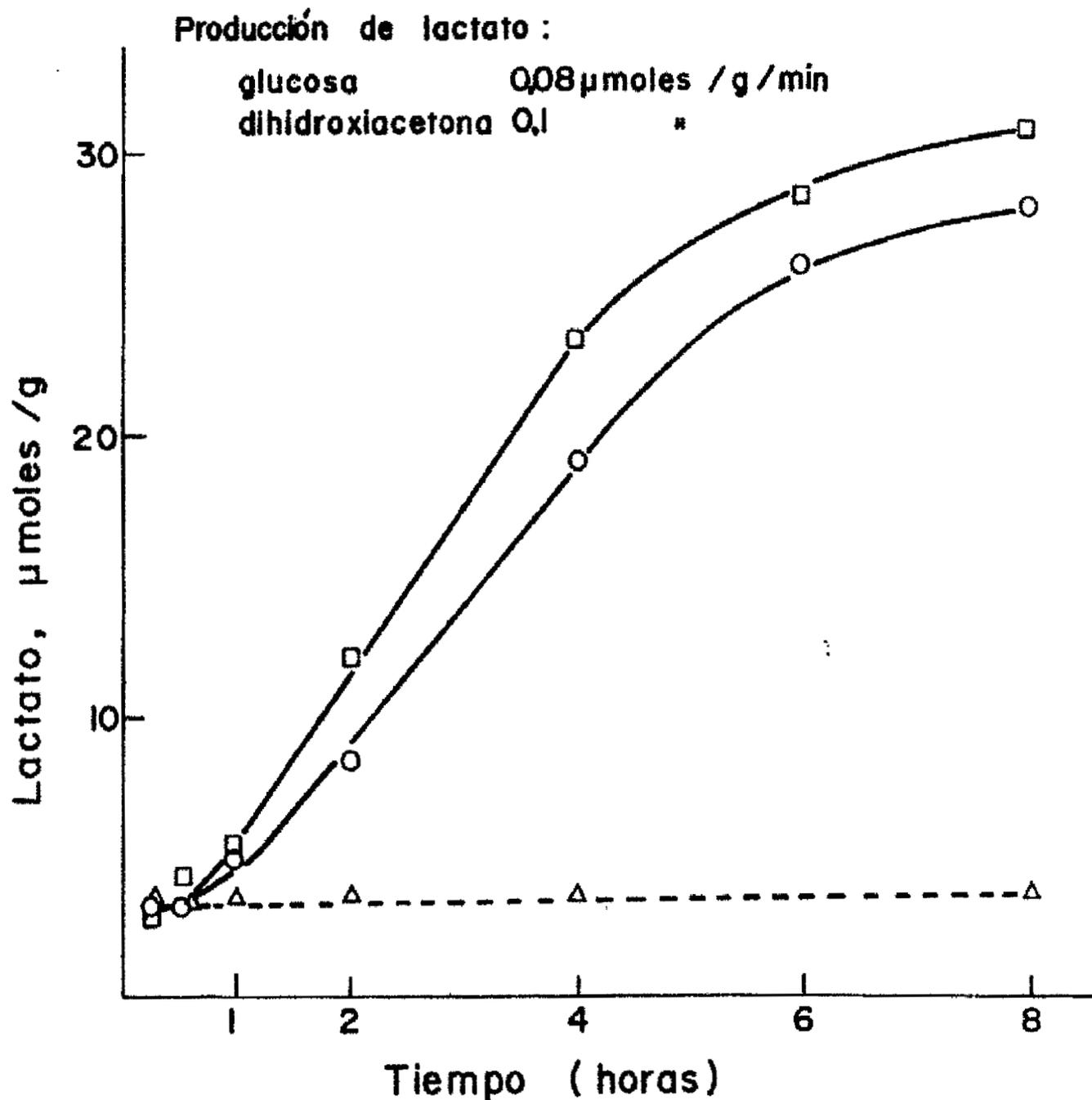


Figura 44. Glicolisis in vivo.

Se midió la formación de lactato a lo largo de 8 horas de incubación a 37°C de una mezcla conteniendo el sustrato y eritrocitos intactos a una concentración de 0,25 g/ml diluidos en SSP hasta un volumen final de 10 ml

(□): dihidroxiacetona 10 mM
 (○): glucosa 10 mM
 (△): control de eritrocitos sin sustrato

horas en una mezcla incubada a 37°C que contenía ADP-Mg 5 mM, Pi 20 mM, Ap₅A 0,1 mM, DTE 1 mM, gliceraldehido-3-P 5 mM, una mezcla iónica básica similar a la empleada sistemáticamente en las valoraciones de actividades enzimáticas que contenía TES 50 mM pH 7,4, KCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM, mas eritrocitos permeabilizados a una concentración de 0,25 g/ml, en un volumen final de 2 ml.

En la Figura 45 pueden apreciarse los resultados. Cuando se empleó NAD⁺ a una concentración de 0,1 mM la velocidad de producción de lactato fué de 0,06 μ moles/g/min, lo que estaba muy por debajo de la actividad del enzima mas escaso de este sector de la via glicolítica, la fosfoglicerato mutasa, que como se vió en el apartado 3.2.8. presenta una actividad in situ de 0,45 U/g. Pensamos entonces en aumentar la concentración de NAD⁺ puesto que a 0,1 mM la gliceraldehido-3-P deshidrogenasa no debería estar funcionando en condiciones de Vmax ($S_{0,5}$ para el NAD⁺ de 0,18 mM in situ, vease apartado 3.2.6.2.). Cuando empleamos NAD⁺ 0,5 mM la velocidad de aparición de lactato aumentó a 0,12 μ moles/g/min, como puede apreciarse en la Figura 45, acercándose ya a la actividad del enzima de capacidad mas limitada

La producción de lactato desde gliceraldehido-3-P in situ es por tanto de un rango similar e incluso ligeramente superior a cuando se midió in vivo a partir de una triosa homóloga y sin fosforilar, la dihidroxiacetona. Por otro lado se observa también que la fase inicial de latencia es de menor cuantía en las condiciones ensayadas in situ.

3.3.2.2. Producción de lactato a partir de glucosa-6-P.

Se determinó la aparición de lactato a partir de glucosa-6-P en condiciones de Vmax para la via, incluyendo

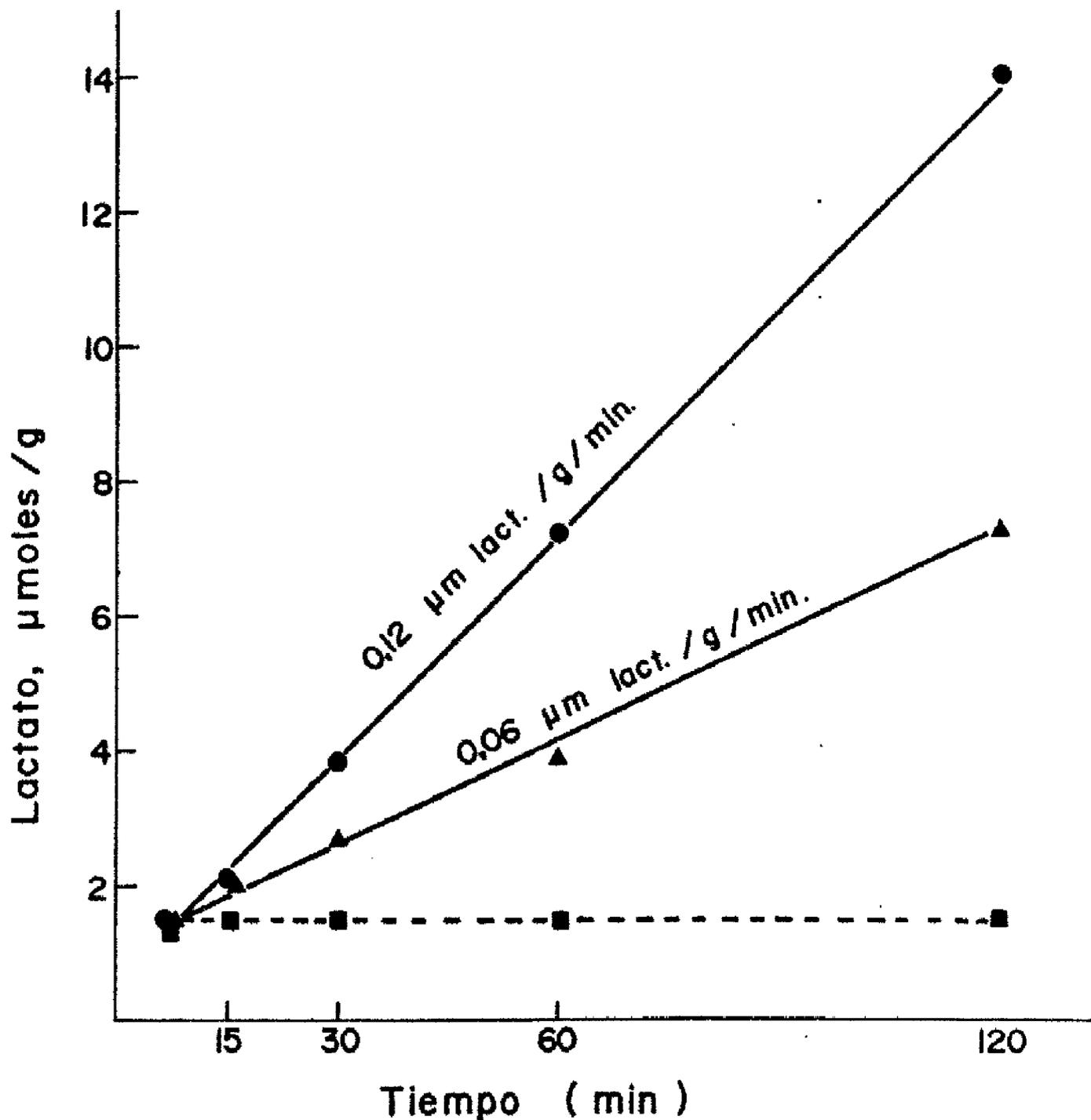


Figura 45. Producción de lactato in situ a partir de gliceraldehido-3-P.

Mezcla de ensayo: ADP-Mg 5 mM, Pi 20 mM, Ap_iA 0,1 mM, DTE 1 mM, gliceraldehido-3-P 5 mM. Incubación a 37°C. NAD⁺ a las concentraciones que a continuación se señalan

●: NAD⁺ 0,5 mM

▲: NAD⁺ 0,1 mM

■: Control en ausencia de sustrato (NAD⁺ 0,5 mM)

Reactivo grapador: DMS

por tanto los efectores positivos de la fosfofructokinasa. La mezcla de incubación comprendió: glucosa-6-P 1 mM, ITP-Mg 1 mM, ADP-Mg 5 mM, NAD^+ 0,5 mM, Pi 20 mM, AMP 0,1 mM, NH_4^+ 1 mM, Ap_5A 0,1 mM, DTE 1 mM, la mezcla iónica básica y 0,25 g/ml de eritrocitos permeabilizados, en un volumen final de 2 ml. Se midió la aparición de lactato a lo largo de 2 horas en la mezcla incubada a 37°C. El resultado puede apreciarse en la Figura 46. La producción de lactato a partir de glucosa-6-P fué de 0.07 $\mu\text{moles/g/min}$.

Con objeto de confirmar si la fosfofructokinasa estaba limitando o no el flujo de la vía valoramos fructosa-1,6-difosfato paralelamente al lactato a lo largo de la incubación, como puede apreciarse en la Figura 47 en que mostramos esta determinación la aparición del fructosa difosfato fué concordante con la de lactato, se acumula en los primeros 15 a 30 minutos para luego descender paralelamente con el consumo del glucosa-6-P y a la vez que la producción de lactato va aumentando, luego la fosfofructokinasa, a la alta concentración inicial empleada, no limita el flujo desde glucosa-6-P, la etapa limitante debe estar por tanto por debajo de la reacción catalizada por este enzima.

3.3.2.3. Producción de lactato a partir de glucosa o glicolisis entera.

En los primeros estudios de glicolisis entera la mezcla de incubación que empleamos comprendió: glucosa 5 mM, ITP-Mg 1 mM, ADP-Mg 5 mM, NAD^+ 0,5 mM, Pi 20 mM, AMP 0,1 mM, NH_4^+ 1 mM, Ap_5A 0,1 mM, DTE 1 mM y la mezcla iónica básica en un volumen final de 1 ml.

De forma paralela estudiamos la posibilidad, que ofrece el abordaje in situ, de sortear la hexokinasa intra-

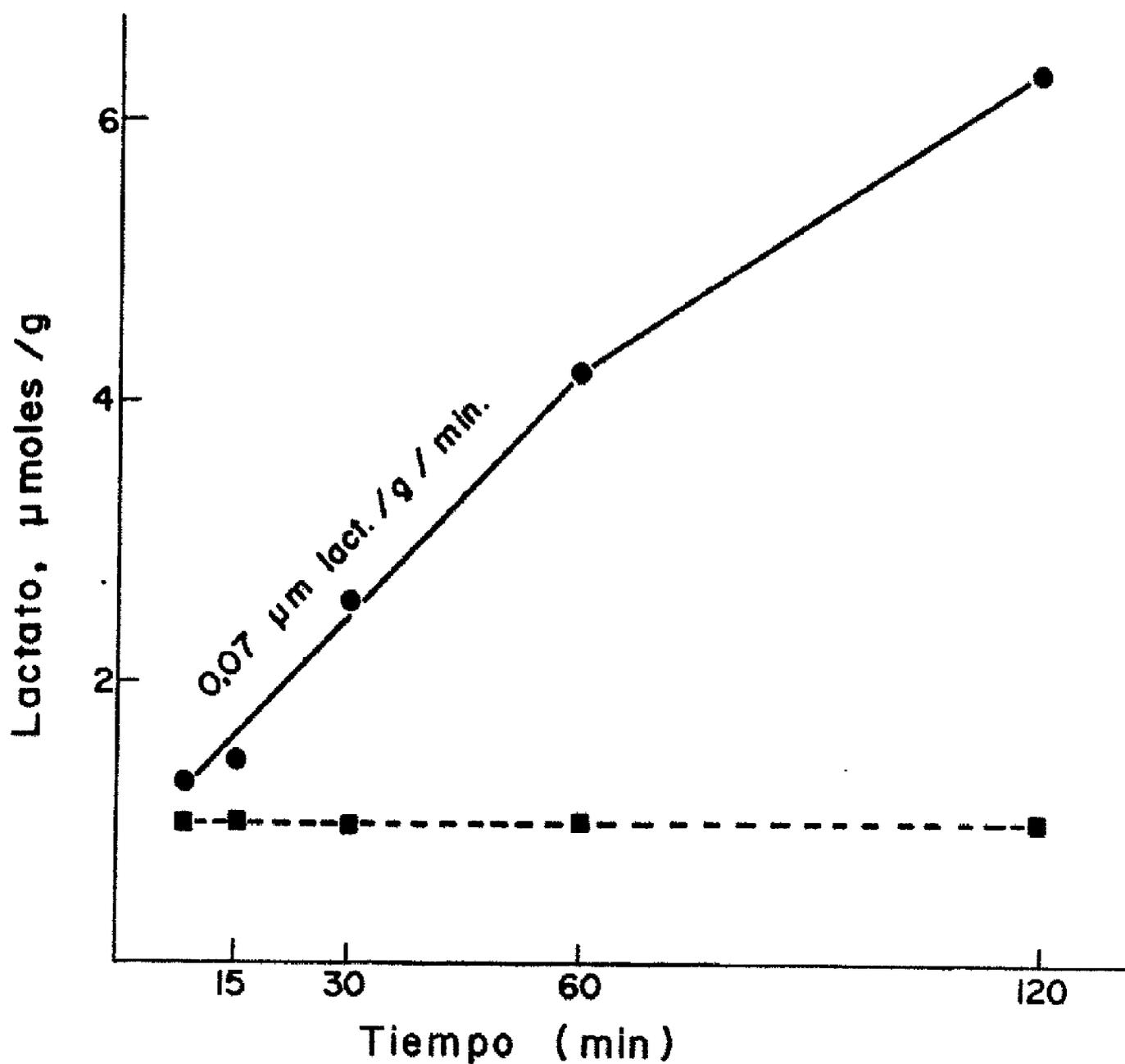


Figura 46. Producción de lactato in situ a partir de glucosa-6-P.

Mezcla de ensayo: ITP-Mg⁺ 1 mM, ADP-Mg 5 mM, NAD⁺ 0,5 mM,
 Pi 20 mM, AMP 0,1 mM, NH₄⁺ 1 mM, Ap₅A 0,1 mM, DTE 1 mM.
 Incubación a 37°C

(●): glucosa-6-P 1 mM

(■): control sin sustrato

Reactivo grapador: DMS

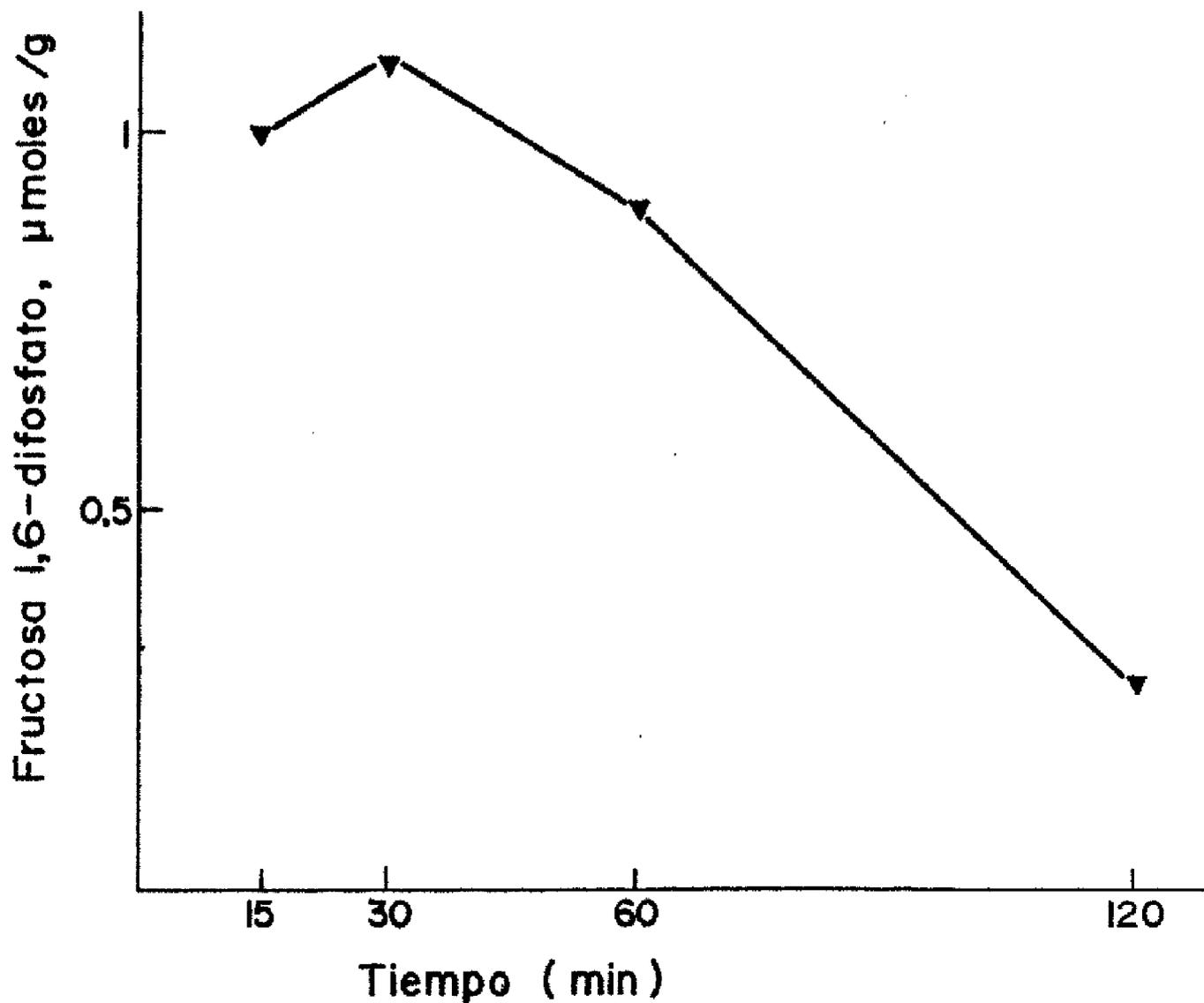


Figura 47. Glicolisis in situ a partir de glucosa-6-P. Determinación de fructosa-1,6-difosfato a lo largo de la incubación.

Mezcla de ensayo: ITP-Mg $\frac{1}{2}$ mM, ADP-Mg 5 mM, NAD^+ 0,5 mM, Pi, 20 mM, AMP 0,1 mM, NH_4^+ 1 mM, Ap_5A 0,1 mM, DTE 1 mM
 Incubación a 37°C.
 Reactivo grapador: DMS

celular adicionando hexokinasa comercial en exceso (4 U/ml). De esta forma, la glucosa-6-P formada en proporción abundante fuera de las células permeabilizadas, se incorporaría una vez dentro a la cadena glicolítica de enzimas intracelulares; en estas condiciones, la producción de lactato debería ser superior lógicamente a la de la glicolisis entera desde glucosa, y equiparable a la que se encontró cuando se inició la vía a partir de glucosa-6-P. Así tendríamos un método óptimo para constatar in situ la limitación que la hexokinasa supone al flujo glicolítico en el eritrocito, dado que como ya hemos descrito anteriormente, es el enzima que presenta actividad mas escasa.

La producción de lactato encontrada cuando se midió glicolisis entera fué de 0,04 μ moles de lactato por gramo de eritrocitos y por minuto, lo que corresponde aproximadamente a 1,4 μ moles de glucosa/g/hora. Cuando se adicionó hexokinasa en exceso la producción de lactato aumentó hasta 0,07 μ moles/g/min, exactamente el valor encontrado cuando se midió la producción de lactato desde glucosa-6-P, descrito en el apartado anterior.

Peró como puede apreciarse en la Figura 48, en que se exponen los resultados, se apreció un periodo de latencia muy extenso, de mas de una hora, que en contra de lo que cabía esperar también se presentó cuando se sorteó la hexokinasa intracelular, lo que no parecía lógico, puesto que no fué observado cuando medimos glicolisis directamente a partir de glucosa-6-P. Con objeto de conocer la etapa responsable de esta latencia, realizamos la determinación de una serie de metabolitos intermediarios glicolíticos, cuales fueron: glucosa, glucosa-6-P mas fructosa-6-P, fructosa-1,6-difosfato y dihidroxiacetona-P mas gliceraldehido-3-P. Determinaciones que fueron hechas paralelamente a la apari-

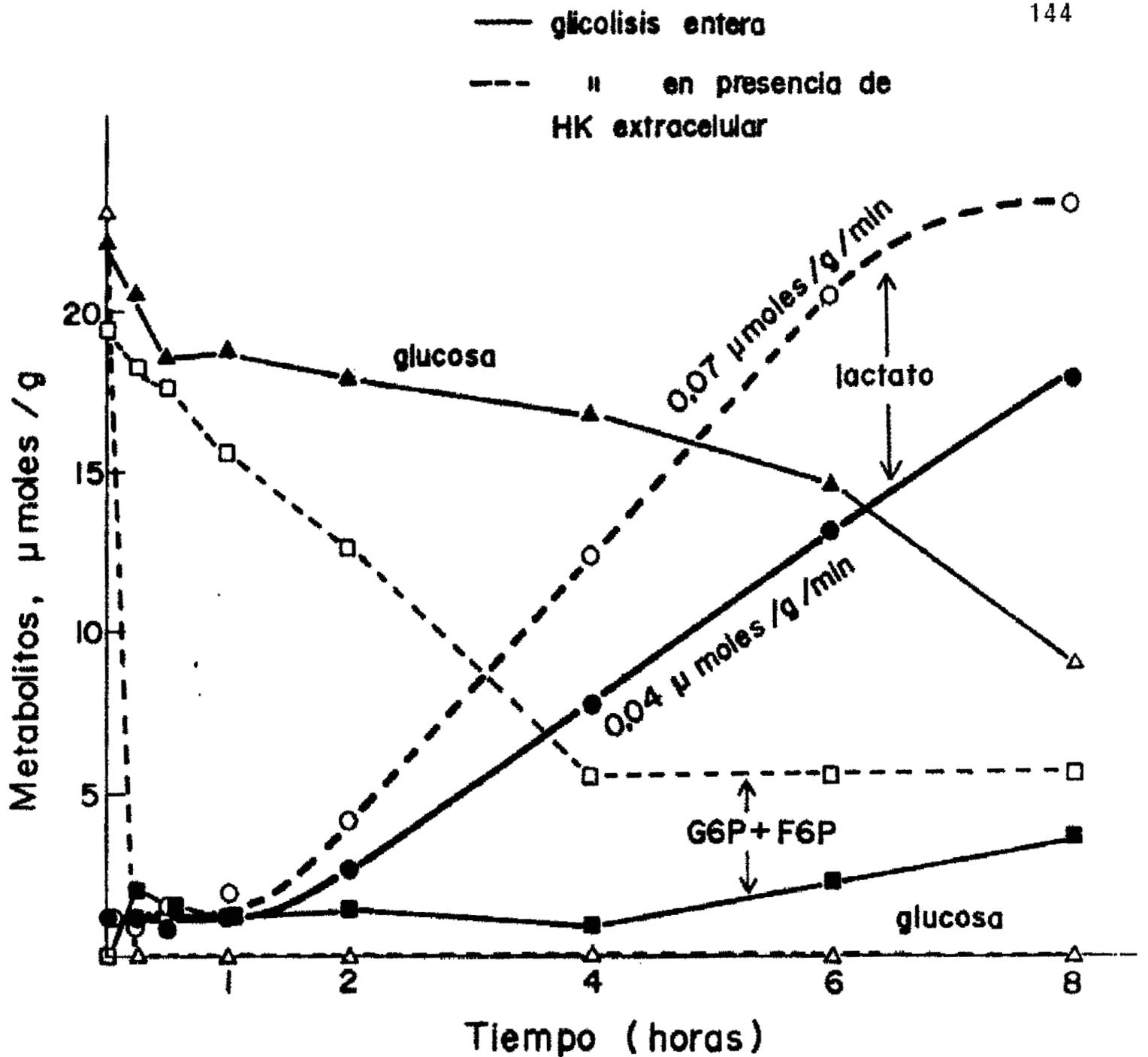


Figura 48. Glicolisis in situ y determinación de intermediarios glicolíticos.

Mezcla de ensayo: glucosa 5 mM, ITP-Mg 1 mM, ADP-Mg 5 mM, NAD^+ 0,5 mM, Pi 20 mM, AMP 0,1 mM, NH_4^+ 1 mM, Ap_5A 0,1 mM, DTE 1 mM. Incubación a 37°C
 Reactivo grapador: DMS

ción de lactato, de forma similar fueron llevadas a cabo cuando se incubó la mezcla en presencia de hexokinasa comercial en exceso.

En la Figura 48 puede verse como la desaparición de glucosa fué concordante con la aparición de lactato cuando se midió glicolisis entera, en que la velocidad de consumo fué practicamente coincidente con la de producción del último metabolito de la ruta. Como también sucedió con la desaparición de glucosa-6-P cuando se adicionó hexokinasa a la mezcla de incubación, por tanto, la limitación debería forzosamente estar mas abajo de la glucosafosfato isomerasa. Cuando valoramos fructosa difosfato y triosas pudimos apreciar como no comenzaban a acumularse hasta pasada la primera hora de incubación (Fig. 49), lo que demostraba que la limitación inicial estaba localizada a nivel de la fosfofructokinasa, limitación que probablemente estaba motivada porque al emplear el ITP-Mg a una concentración inferior a la de glucosa (1 mM el ITP-Mg y 5 mM la glucosa) el nucleósido trifosfato era consumido por la hexokinasa, quedando entonces deficitario el enzima siguiente que es dependiente del mismo nucleótido, la fosfofructokinasa, de forma que no aumentaba su actividad hasta que el ITP era reciclado, lo que tenia lugar pasada la primera hora, poniéndose en marcha entonces el resto de la maquinaria glicolítica. Esta hipótesis se confirmaria si al poner en la mezcla de incubación el ITP-Mg en exceso sobre la glucosa, se redujese drásticamente el periodo de latencia encontrado. Medimos entonces de nuevo el flujo glicolítico en ausencia y presencia de hexokinasa extracelular, pero con ITP-Mg 6 mM y glucosa 5 mM, manteniendo igual el resto de la mezcla de incubación y volviendo a determinar la serie de intermediarios glicolíticos que evaluamos en la

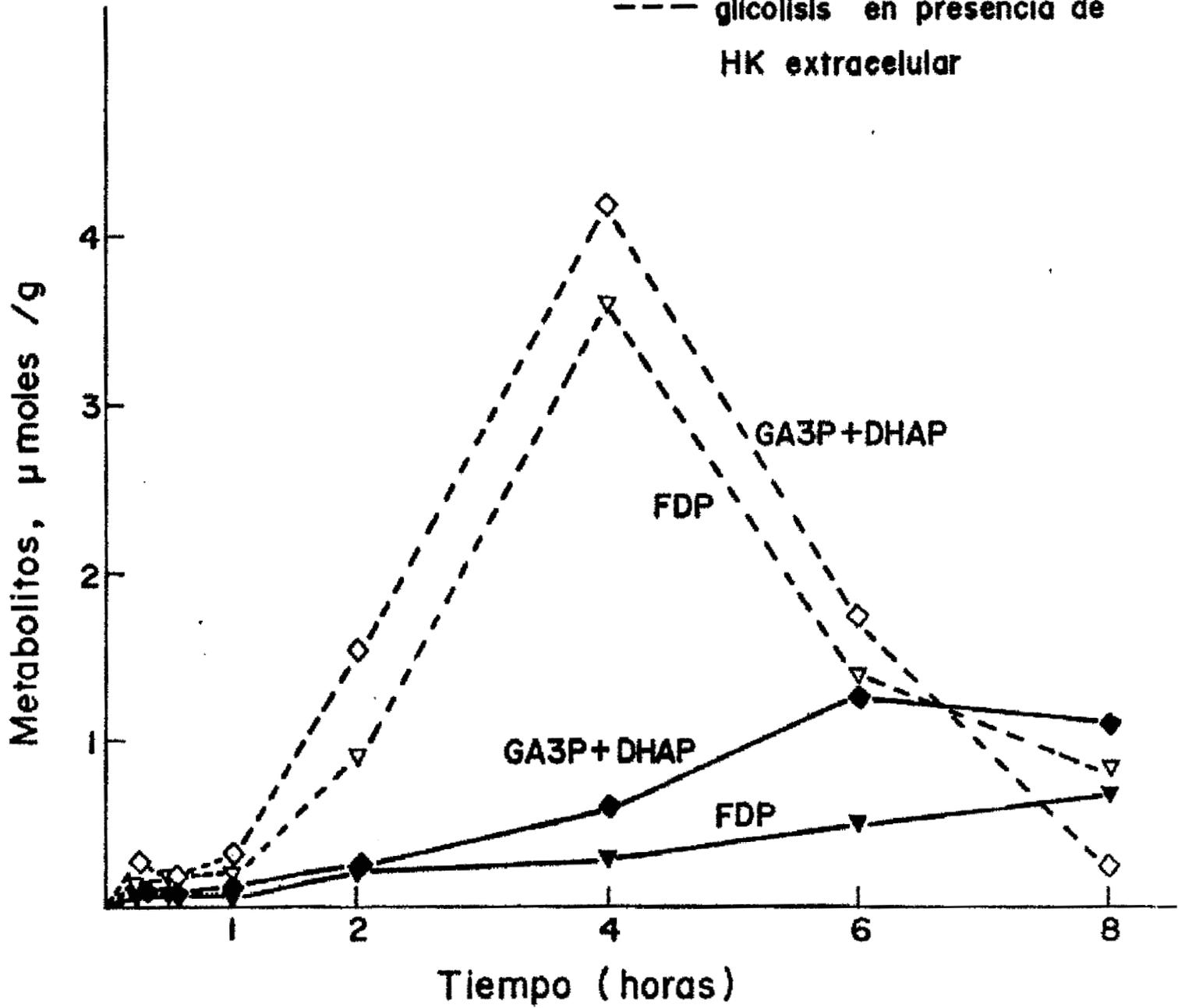


Figura 49. Glicolisis in situ. Determinación de fructosa-1,6-difosfato y gliceraldehido-3-P + Dihidroxiacetona-P.

Mezcla de ensayo: glucosa 5 mM, ITP-Mg 1 mM, ADP-Mg 5 mM, NAD⁺ 0,5 mM, Pi 20 mM, AMP 0,1 mM, NH₄ 1 mM, Ap₅A 0,1 mM, DTE 1 mM, Incubación a 37°C.
Reactivo grapador: DMS

incubación anterior. En la Figuras 50 y 51 exponemos los resultados, que describimos como sigue:

- La fase de latencia se ha reducido muy considerablemente y desapareció del todo cuando se sorteó la hexokinasa intracelular (Fig. 50). Este periodo alcanza in situ unos 15 minutos, diferente por tanto a in vivo en que fué de 30 a 60 minutos (Fig. 44).

- El flujo glicolítico fué similar al encontrado en la incubación que realizamos con ITP-Mg deficitario, 0,04 μ moles de lactato/g/min en glicolisis entera y 0,07 cuando se sorteó la hexokinasa Fig. 50).

- La desaparición de glucosa fué concordante en ambos casos con la producción de lactato, como así mismo la del glucosa-6-P (Fig. 50).

- El acúmulo de fructosa difosfato y la mezcla de triosas se adelantó hacia el inicio del periodo de incubación (Fig. 51). Lo que confirmó la hipótesis inicial puesto que demuestra que la limitación superada al incubar con exceso de ITP estaba localizada a nivel de la fosfofructokinasa.

En la Figura 52 exponemos globalmente los resultados in situ e in vivo obtenidos en este estudio de glicolisis evaluando la producción de lactato a partir de distintos niveles de la ruta. Los valores correspondientes a los flujos respectivos encontrados se hallan también reunidos en la Tabla 10.

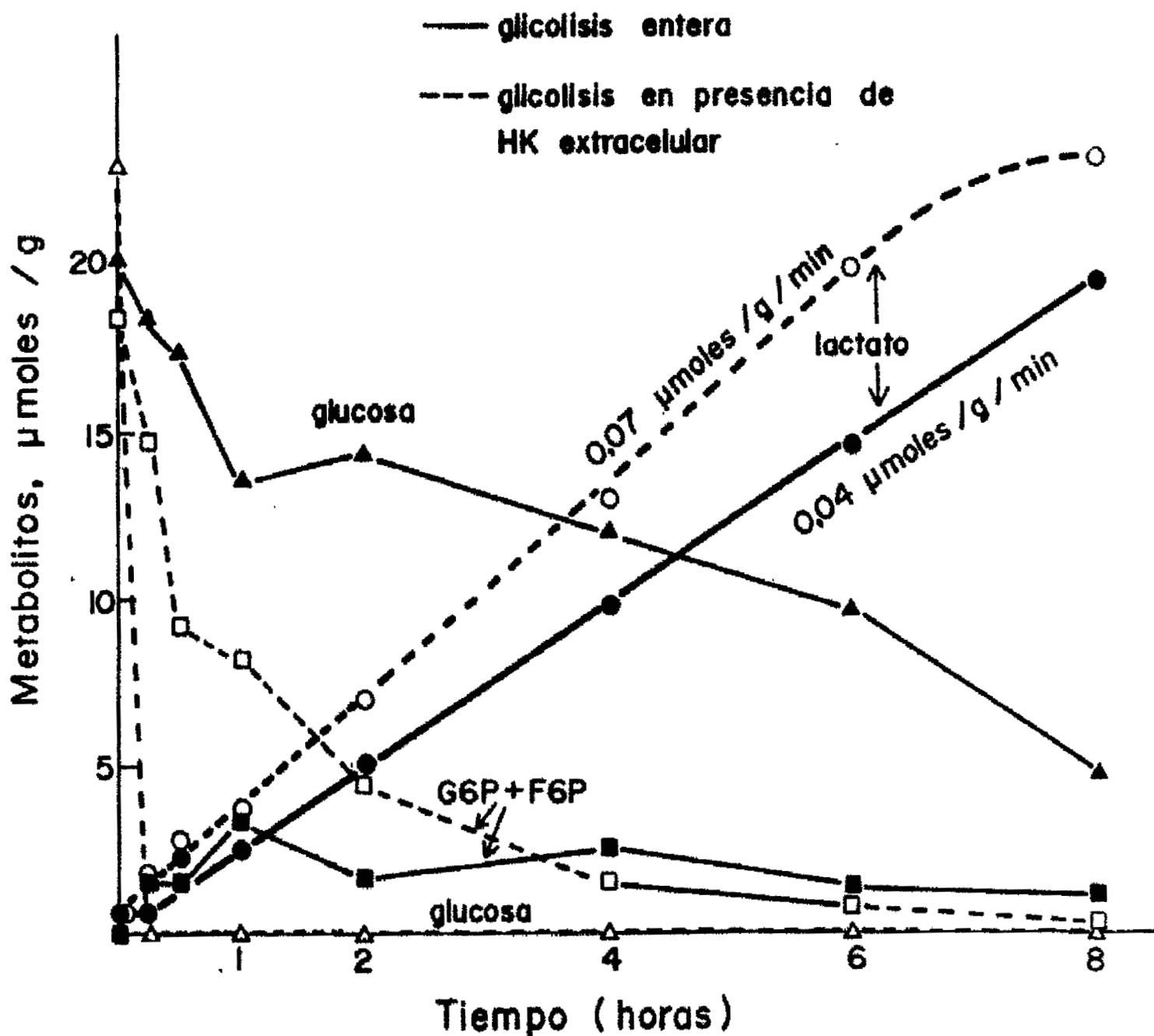


Figura 50. Glicolisis in situ y determinación de intermediarios glicolíticos. ITP-Mg en exceso sobre glucosa.

Mezcla de ensayo: glucosa 5 mM, ITP-Mg 6 mM, ADP-Mg 5 mM, NAD^+ 0,5 mM, Pi 20 mM, AMP 0,1 mM, NH_4^+ 1 mM, Ap_5A 0,1 mM, DTE 1 mM. Incubación a 37°C.
 Reactivo grapador: DMS

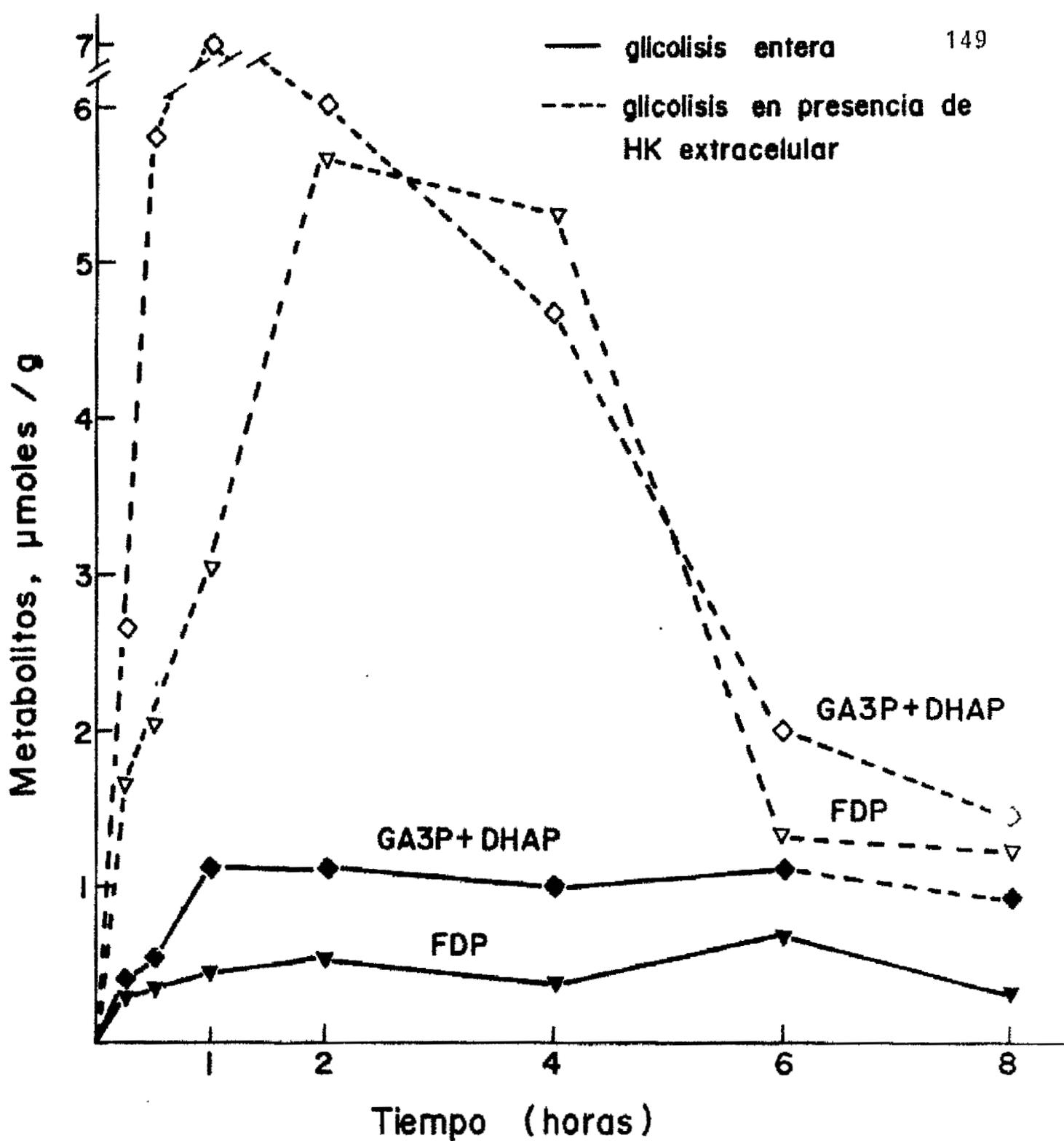


Figura 51. Glicolisis in situ. Determinación de la fructosa-1,6-difosfato y gliceraldehido-3-P + dihidroxiacetona-P. ITP-Mg en exceso sobre glucosa.

Mezcla de ensayo: glucosa 5 mM, ITP-Mg 6 mM, ADP-Mg 5 mM, NAD⁺ 0,5 mM, Pi 20 mM, AMP 0,1 mM, NH₄⁺ 1 mM, Ap₅A 0,1 mM, DTE 1 mM. Incubación a 37°C.
 Reactivo grapador: DMS

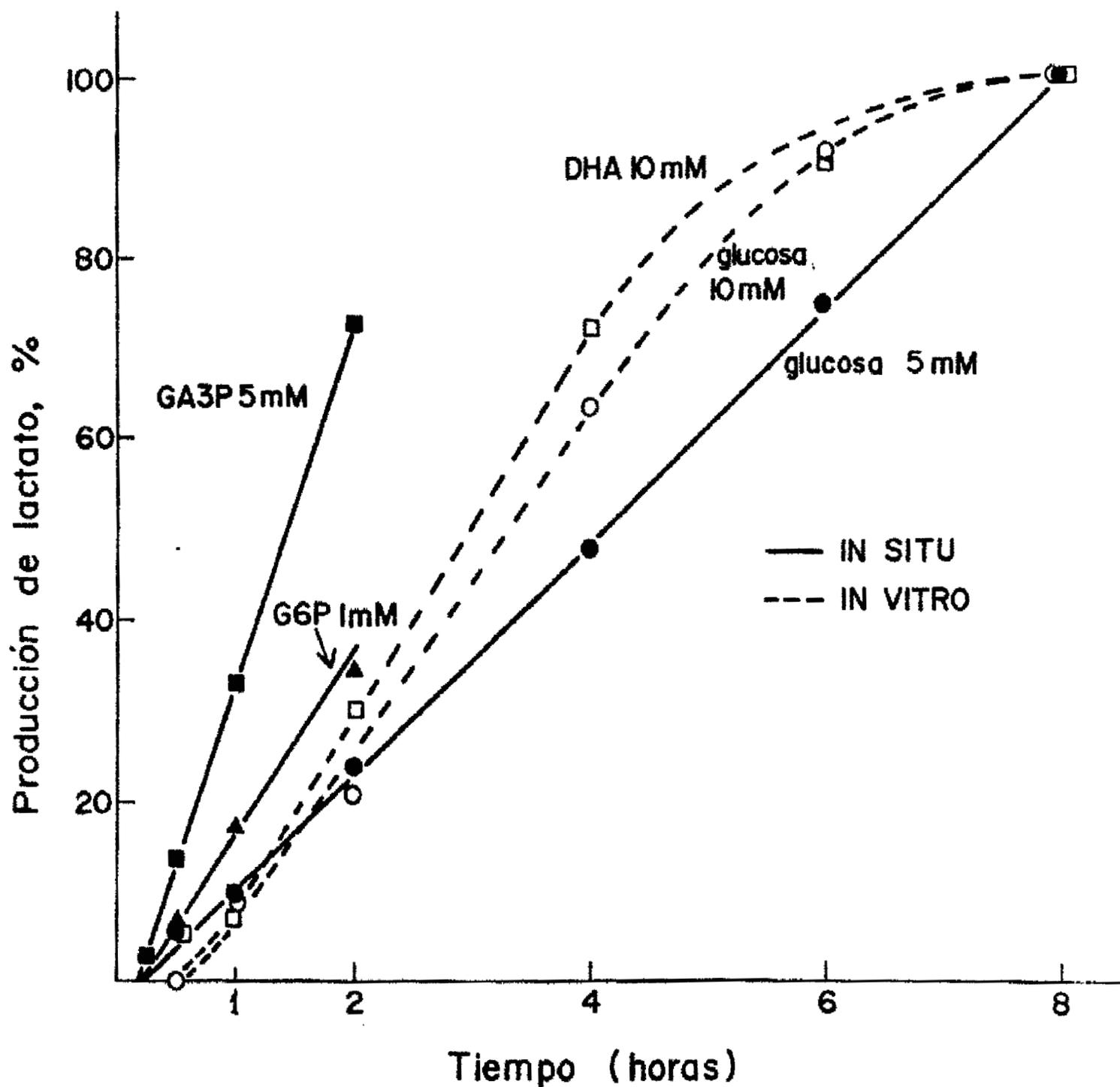


Figura 52. Glicolisis in situ e in vivo a partir de diferentes substratos.

Mezcla de ensayo in situ: ITP-Mg 6 mM, ADP-Mg 5 mM, NAD^+ 0,5 mM, Pi 20 mM, AMP 0,1 mM, NH_4^+ 1 mM, Ap_5A 0,1 mM, DTE 1 mM. Incubación a 37°C.
 Reactivo grapador: DMS

TABLA 10. Producción de lactato in vivo e in situ a partir de diferentes substratos.

Mezcla de ensayo in situ: ITP-Mg 5 mM, ADP-Mg 6 mM, NAD^+ 0,5 mM, Pi 20 mM, AMP 0,1 mM, NH_4^+ 1 mM, Ap_5A 0,1 mM, DTE 1 mM. Reactivo grapador: DMS

In vivo:

glucosa:	0,08	$\mu\text{moles lact./g/min.}$
dihidroxiacetona:	0,1	"

In situ:

glucosa:	0,04	"
gliceraldehido-3-P:	0,12	"
glucosa-6-P:	0,07	"

3.4. APENDICE: la adenilato kinasa.

Se trata de un enzima ampliamente distribuido en los tejidos, particularmente en músculo, por lo que también se le conoce por el nombre de miokinasa. Es un enzima de gran importancia, su papel fundamental se centra en la conservación del equilibrio entre los adenin nucleótidos, ATP, ADP y AMP (90), contribuyendo por tanto a mantener la constancia de la carga energética, cuyas oscilaciones, como fué señalado por Atkinson (4)(5), constituyen las señales fundamentales de control del metabolismo energético.

Como enzima potencialmente muy relacionado con la glicolisis (dada la importancia del AMP como activador alostérico de la fosfofructokinasa), tenía interes para nosotros estudiar su comportamiento in situ en eritrocitos, donde esta ruta constituye la única fuente de producción energética.

Las primeras valoraciones in vitro pusieron de manifiesto que este enzima mostraba una actividad llamativamente escasa en eritrocitos de rata, alrededor de 2 U/g. In situ y empleando el TDI como reactivo grapador, encontramos valores de actividad en el rango del 20% de los hallados in vitro, lo que logicamente hacía difícil la realización de un estudio cinético en nuestras condiciones habituales de ensayo.

Pasamos entonces a estudiar su actividad empleando eritrocitos humanos, en los que están descritos valores de adenilato kinasa superiores a los de rata (52). Estas células presentaron en un principio la dificultad de no resistir el proceso de permeabilización cuando se empleaba el TDI como reactivo grapador. Con DTBP, y aumentando el tiempo de enfrentamiento al reactivo hasta una hora se consiguió permeabilizarlos, obteniéndose un rendimiento del 70 al 80%;

pero en cambio la cantidad de enzima detectado in situ fué menor del 5% de la obtenida in vitro. A la vista de esta acusada sensibilidad del enzima in situ al DTBP, procedimos a permeabilizar de nuevo los eritrocitos humanos empleando ahora el tercero de los reactivos grapadores con que contamos, el DMS. Con este reactivo, la permeabilización de eritrocitos humanos alcanzó un rendimiento de células grapadas similar al obtenido con DTBP, siendo también preciso aumentar a una hora el tiempo de grapamiento; obteniéndose en este caso una buena actividad del enzima in situ. Verificamos un estudio cinético frente a la concentración de ADP-Mg y encontramos valores de K_m de 0,8 mM in situ y 0,7 mM in vitro. La V_{max} fué esencialmente la misma en ambas condiciones, 60 U/g.

Este fué el único caso de los enzimas que hemos estudiado, en que se encontró in situ una actividad máxima practicamente del 100% respecto a in vitro.

La dificultad de conseguir permeabilizar eritrocitos humanos empleando el TDI, y la posterior modificación que fué preciso hacer en la pauta de tratamiento cuando se emplearon los otros reactivos, puede indicar la existencia de una posible diferencia entre la estructura de la membrana de los eritrocitos de rata y los humanos.

4. DISCUSSION

4.1. EL ABORDAJE IN SITU EN CELULAS ANIMALES

El abordaje en sí comprende dos etapas, una primera de "grapamiento", con la que se consigue fijar las proteínas de la membrana mediante la utilización de un reactivo bifuncional y otra de permeabilización con digitonina. Con este método, desarrollado en eritrocitos de rata se mantiene la estabilidad celular, como ha quedado demostrado por la resistencia que estas células una vez tratadas han mostrado a las distintas pruebas hemolíticas a que fueron sometidas, tras las cuales la hemoglobina liberada nunca fué mayor del 5%. No obstante, entre los tres procedimientos empleados para la fijación de las proteínas de la membrana, uno de ellos, el grapamiento con dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato(DTBP), permite una posterior lisis celular completa con relativa inocuidad utilizando ditioeritritol. Los eritrocitos permeabilizados mantienen forma y tamaño normales y su estabilidad (en condiciones de conservación idóneas) permanece a lo largo de meses.

El procedimiento resulta sencillo y relativamente breve, de forma que en menos de una hora pueden procesarse varios gramos de eritrocitos con un rendimiento del 80%, determinado por el empleo de distintos parámetros, entre los cuales cabe entresacar la evaluación de la turbidez propia de las células íntegras, valorada a través de la absorción óptica a 650 nm, criterio de aplicación rápida y fácilmente reproducible.

Los eritrocitos tratados por cualquiera de estos tres procedimientos son libremente permeables a varios tipos de metabolitos, como queda demostrado por el hecho de que los enzimas intracelulares son accesibles a los mismos,

lo que es imposible en las células intactas, que son impermeables a la mayor parte de los substratos y cofactores empleados; por la misma razón ha sido posible el estudio de la glicolisis in situ a partir de niveles intermedios de la ruta. Además esta permeabilización es suficiente, dentro del rango que corresponde a los metabolitos empleados, puesto que las cinéticas in situ son en general similares a las encontradas in vitro.

El proceso de incremento de la permeabilidad en los eritrocitos tratados está fundamentalmente relacionado con la liberación de lípidos de la membrana por parte de la digitonina (Tablas 1 y 2), aunque también contribuye a ella el mismo proceso de grapamiento y la posterior desestructuración que la membrana fijada sufre cuando es sometida a choque hipotónico (Tablas 1 y 3).

Las actividades enzimáticas determinadas en los eritrocitos permeabilizados están efectivamente ligadas a las células, ya que cuando se separaron por centrifugación no se detectó actividad alguna en la fracción sobrenadante, en la que además se puso de manifiesto la ausencia de hemoglobina, lo que por otro lado evidenció la falta de salida del contenido proteico fuera de las células permeabilizadas. Por otro lado, los eritrocitos tratados conservan al menos 24 horas la generalidad de los enzimas estudiados y en el caso de algunos de ellos (Tabla 4), durante meses.

Respecto al proceso de grapamiento no hemos precisado con extensión el nivel de estructura celular a que tiene lugar la actuación de los reactivos bifuncionales; a la vista de las pruebas de estabilidad que hemos aportado es evidente que con ellos se consigue la fijación de la membrana celular, manteniéndose íntegro el armazón proteico de la misma, de manera que los reactivos actúan a este nivel

a modo de grapas que mantienen unidos los componentes de la membrana. No obstante, estos compuestos en función de su solubilidad, su tamaño y la lógica desestructuración que presumiblemente provocan en la membrana, deben penetrar en las células o por lo menos establecer también entrecruzamientos o grapas entre las proteínas de la membrana y las moléculas vecinas de hemoglobina, concretamente este hecho fué descrito por Wang y Richards en 1975 (148) tratando eritrocitos humanos con DTBP. Por estas razones, la visión del proceso de grapamiento que exponemos en la Figura 2 (pag.21) es solamente un esquema empírico de lo que pensamos que puede ser la actuación de los reactivos a nivel de la membrana y que nos ayuda a comprender los fenómenos de estabilidad y permeabilización que se dan en los eritrocitos tratados de esta manera.

4.2. ESTUDIOS CINÉTICOS IN SITU E IN VITRO DE LOS ENZIMAS DE LA GLICOLISIS

Los valores de K_m encontrados in situ son en general esencialmente iguales a los obtenidos in vitro, y en la mayor parte de los casos se han mostrado coincidentes con los descritos en la literatura (58)(137), datos que por otro lado suelen proceder de eritrocitos humanos y determinados en muchas ocasiones en condiciones bastante alejadas de las fisiológicas.

La mayoría de los enzimas fueron estudiados empleando sucesivamente los diferentes tipos de reactivos grapadores (Tabla 9). Las propiedades cinéticas se mantuvieron idénticas, sucediendo lo mismo en los casos de enzimas que muestran características especiales, cuales son

los enzimas alostéricos, que serán discutidos en el apartado siguiente.

Las velocidades máximas de los enzimas glicolíticos estudiados in situ se mostraron inferiores a las obtenidas in vitro, generalmente alrededor del 50%, aunque como puede verse en la Tabla 9 se encontraron en algunos casos valores mas bajos, dependiendo del reactivo grapador que se emplease, como sucedió con la fosfoglicerato kinasa, la fosfoglicerato mutasa y la piruvato kinasa que mostraron con el TDI actividades máximas relativas muy bajas y en cambio con DTBP o DMS subieron al rango general del 40 al 60%. Puede verse como de los tres reactivos, el DMS fué con el que se detectaron mayores actividades in situ, mientras que el TDI fué con el que en ciertos casos se mostraron mas reducidas. Estas diferencias de V_{max} encontradas con los diferentes reactivos son expresión de una inactivación parcial provocada por el reactivo en cuestión. Ahora bien, curiosamente puede apreciarse (en la misma Tabla 9) como generalmente estas diferencias no corren paralelas a la sensibilidad que los enzimas muestran a los tres tipos de reactivos: hay casos sobresalientes como es el de la piruvato kinasa, en que las actividades máximas in situ respecto a in vitro fueron del 5%, 33% y 58% empleando TDI, DTBP y DMS respectivamente, y en cambio la sensibilidad que este enzima mostró a los mismos fué del 20 al 25% en los tres casos.

Por tanto no coincide generalmente la reducción de V_{max} encontrada in situ para cada enzima con la sensibilidad que ofrece al reactivo. Incluso pueden apreciarse casos en los cuales dicha sensibilidad es mucho menor que la reducción de la V_{max} in situ, como sucede con la hexokinasa que presenta un 33% de actividad in situ y un 75%

en un hemolizado tratado con TDI; o bien la PGK, PGM y PK, que en los eritrocitos tratados con TDI apenas muestran actividad y en cambio en un hemolizado tratado con el mismo reactivo se valoran en porcentajes mas elevados.

En relación con esta reducción de la actividad máxima de los enzimas in situ se encuentra por un lado el hecho observado de que cuando estudiamos la hexokinasa en un hemolizado concentrado (apartado 3.2.1.4., pag.78) la V_{max} fué del orden del 50% respecto a la que mostró en uno diluido (in vitro), lo que se acerca a lo descrito por otros autores trabajando con células intactas (19)(34). Por otro lado, el flujo glicolítico in situ también está reducido al 50% respecto a in vivo y a su vez este último valor es inferior (en el mismo porcentaje) a la actividad de la hexokinasa, el enzima limitante de la ruta.

Por último cabe señalar en este sentido, la existencia de deficiencias descritas en la mayor parte de los enzimas glicolíticos, los cuales entre otras manifestaciones patológicas se acompañan de cuadros de anemia hemolítica, y sin embargo la actividad residual del enzima deficiente está muy por encima de la capacidad del flujo glicolítico. El caso mas extremo lo constituye el déficit de triosafosfato isomerasa, que aún en los casos mas severos de los descritos (118) coexiste con una actividad del enzima de mas de cien veces por encima de la hexokinasa. Estas deficiencias se acompañan en algunas ocasiones de una disminución en la afinidad por el substrato, pero en otras este parámetro es normal y no obstante el flujo glicolítico suele mostrarse disminuido, a la vez que se aprecia un acúmulo del substrato; lo que resulta en todo caso difícil de explicar. Aun la reducción de la actividad máxima de los enzimas glicolíticos encontrada in situ, no es suficiente

para dar cuenta de estos fenómenos, aunque si puede estar en lógica relación con los mismos.

La reunión de todos estos datos nos inclina a pensar que la referida disminución de actividad puede estar en parte motivada por una inactivación parcial provocada por el reactivo grapador empleado en el proceso de permeabilización, pero esto no explica por si solo el hecho. Los datos aportados sugieren también la posibilidad de que se trate de un fenómeno general, o al menos muy frecuente, de manera que la actividad de los enzimas glicolíticos en el eritrocito in situ e in vivo tienda a ser inferior a la medible en extractos diluidos. Esto mismo apoyaría también la hipótesis, frecuentemente sugerida en la literatura, de que los enzimas de la vía glicolítica posean un funcionamiento concertado mediado a través de la interacción entre los mismos, que a su vez estaría facilitada por el acercamiento entre las diferentes proteínas (25)(54). No queda pues totalmente eliminada la posibilidad de una asociación entre los diversos enzimas de la ruta, en formas o menos de superestructura intracelular - el llamado "glicosoma" -, o simplemente como complejo multienzimático, hasta ahora nunca evidenciado ni tampoco descartado de manera inequívoca (33)(84).

Las actividades máximas encontradas in vitro muestran un espectro muy variado que oscila desde la hexikinasa, que presenta la mas baja capacidad de la ruta, 0,08 U/g, hasta la triosafosfato isomerasa, el enzima de actividad más elevada, 200 U/g, (Tabla 9). En general los niveles de enzimas pueden agruparse en tres categorías: 1) Los de muy baja actividad (≤ 1 U/g) representados por hexokinasa, aldolasa y fosfoglicerato mutasa; 2) los de actividad intermedia (de 1 a 20 U/g) que son la mayoría, representados por

glucosafosfato isomerasa, fosfofructokinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato kinasa, enolasa y piruvato kinasa; y 3) los de actividad mas elevada, cuales son triosafosfato isomerasa y lactato deshidrogenasa. Estos valores entran dentro del rango de los que se describen en la literatura, aunque no resultan fáciles de comparar a la vista de la escasez de datos descritos en eritrocito de rata y la diferencia en las condiciones de ensayo utilizadas.

4.3. CASOS PARTICULARES

Discutimos aquí los resultados obtenidos con enzimas que por poseer características especiales (los alostéricos entre ellos) han merecido especial interés para su estudio in situ, habiendo mostrado en estas condiciones la mayor parte de ellos distinciones particulares en su comportamiento.

4.3.1. HEXOKINASA

La conducta cinética que mostró este enzima frente a la glucosa fué idéntica in situ que in vitro. Electroforéticamente se ha descrito que se comporta como el isozioma I de eritrocitos humanos (58), pero el valor de K_m encontrado en los de rata, 0,2 mM (Fig. 13), supera en un orden de magnitud al que presenta ese tipo de isozioma (109) (137), lo que está a favor de que ambos patrones no sean totalmente equivalentes. Frente al ATP en cambio, el comportamiento cinético in situ ha sido diferente, exhibiendo en estas condiciones una doble K_m , con valores de 0,15 y 1,5 mM (Fig. 14), mientras que in vitro fué única y con

un valor de 0,3 mM.

Este enzima es alostéricamente inhibido por glucosa-6-P, pero con menor intensidad que in vitro (Figuras 15 y 16 y Tabla 5), lo que ofrece particular interés ya que una disminución similar se presentó también cuando se estudió este fenómeno en un hemolizado concentrado (Figura 16 y Tabla 6), en el que se conserva la elevada concentración proteica que prevalece in situ, lo que indica que esta diferencia depende del ambiente macromolecular mantenido in situ. Esta sensibilidad mas reducida in situ al glucosa-6-P explicaría también el hecho de que cuando en un principio estudiamos la actividad de la hexokinasa, la linealidad de la reacción se mantuviese in situ por un periodo de tiempo mas extenso que in vitro (Fig. 12), ya que como se explicó en RESULTADOS (apartado 3.2.1.1. pag.65) esta disminución progresiva de la velocidad estaba relacionada con la aparición de glucosa-6-P.

Respecto al comportamiento de la hexokinasa frente al 2,3-DPG y como se aprecia en la Tabla 7, en nuestras condiciones de ensayo y empleando concentraciones de hasta 2,5 mM, no hemos encontrado inhibición significativa in situ ni in vitro. Todos los trabajos que conocemos sobre la inhibición del enzima de eritrocito por parte del 2,3-DPG, aún la misma publicación de Dische en 1941 (35) en que se describió por primera vez este fenómeno, se realizaron empleando concentraciones de 2,3-DPG superiores a 2 mM (19)(58)(99)(111), y los valores de k_i que se han obtenido se encuentran alrededor de 5 mM (99)(111), que es precisamente el nivel que alcanza dicho metabolito en los eritrocitos. De aquí que se haya pretendido dar al 2,3-DPG el papel de un auténtico inhibidor alostérico de la hexokinasa en las células rojas, por esta razón el trabajo de Dische se ha presentado como el

primer caso encontrado de inhibición feed-back (36). Pero habrá que considerar en que forma se encuentra el 2,3-DPG en el eritrocito, ya que solo en estado libre podrá actuar como efector. En el apartado 3.2.1.5. (pag.80) de RESULTADOS), explicamos que este metabolito se halla fuertemente unido a la hemoglobina, con una constante de afinidad de 6×10^{-6} M, como fué descrito por Benesch et al. (11), por esta razón la concentración de 2,3-DPG libre en condiciones de un cociente Hb/2,3-DPG igual a la unidad no es superior a 0,2 mM, como Benesch et al. mostraron en 1971 (10). No obstante, el grado de combinación con la hemoglobina varía con las condiciones de oxigenación, de forma que la proporción de 2,3-DPG libre aumenta con el grado de oxigenación de la misma (72). El grupo de Rapoport (45) por un lado y Hamasaki y Rose (50) por otro, han estudiado el ligamiento del 2,3-DPG a la hemoglobina en estados de oxigenación y desoxigenación completas teniendo en cuenta la presencia de Mg^{2+} y otros fosfatos orgánicos, como el ATP, que también se une a esta proteína; según estos autores, considerando el caso extremo de que la molécula de hemoglobina esté totalmente oxigenada, la concentración de 2,3-DPG libre sería del 35% del total, o sea 1,7 mM, reduciéndose al 5% en la situación opuesta. In vivo, pues, la concentración de 2,3-DPG libre debe oscilar alrededor de 1 mM o incluso por debajo, y este es el nivel en el cual este metabolito podría actuar como un efector. Los valores de K_i que se han presentado en la literatura (99)(111) y los resultados que nosotros hemos obtenido evidencian lo contrario. Podemos considerar entonces que la inhibición descrita de la hexokinasa de eritrocitos por parte del 2,3-DPG carece de significado fisiológico. Sin embargo, hay que reseñar que el mismo Dische, en su trabajo publicado en 1941 describiendo este fenómeno (35), se refiere

a la necesidad de tener en cuenta la concentración del difosfoglicerato en estado libre, mostrando su sorpresa por el hecho de que la fosforilación de la glucosa tenga lugar en los eritrocitos intactos a pesar del nivel tan elevado de 2,3-DPG que poseen, y resume diciendo: "Nous pensons que l'état combiné de l'acide diphosphoglycerique empêché son action inhibitrice sur la phosphorylation du glucose,...".

4.3.2. FOSFOFRUCTOKINASA

La fosfofructokinasa responde in situ a los efectores alostéricos positivos y negativos aunque con sensibilidad a los mismos menor que in vitro.

La actividad in situ en ausencia de efectores positivos: AMP, Pi y NH_4^+ (Fig. 18), es drásticamente más elevada in situ, con un aumento considerable en la afinidad por el fructosa-6-P, frente al cual la cinética en estas condiciones es prácticamente hiperbólica, mientras que in vitro muestra forma sigmoideal, como lo confirman los valores de n_H que se presentan en la Figura 19. Esta peculiaridad es la más sobresaliente de las encontradas in situ. Hemos tratado de investigar posibilidades artefactuales que pudieran dar cuenta de ella. De esta manera y en primer lugar no parece estar relacionada con la probable presencia intracelular del reactivo grapador, dado que no se reproduce en hemolizados tratados con el mismo o bien en eritrocitos lisados una vez que fueron grapados con DTBP (Figuras 21 y 22); la posibilidad de acúmulo o producción de activadores in situ también fue eliminada, al menos dentro de los límites de nuestro sistema de estudio. Esta diferencia de comportamiento de la fosfofructokinasa, observada en las condiciones de niveles fisiológicos del

enzima como son las que prevalecen in situ, confirman por tanto los resultados obtenidos por Ramaiah y Teswani (101) y los grupos de Kurganov y Hofmann (149), los cuales trabajando con enzima purificado de hígado de conejo y eritrocito respectivamente, encontraron como la afinidad por el fructosa-6-P aumenta progresivamente a medida que incrementaban la concentración de enzima. Una conducta similar encontramos al estudiar la cinética frente al ITP-Mg (Fig. 23).

En el caso de los efectores negativos también ha mostrado el enzima in situ una sensibilidad menor que in vitro, como se aprecia en la Figura 25, en que se expone la inhibición por ATP estudiada a diferentes valores de pH. Respecto al citrato (Fig. 26), no hemos encontrado inhibición a pH 7,4, pero si apareció cuando se ensayó a valores de pH algo mas bajos; lo que puede explicar los resultados de otros autores como Staal et al. (131), que no han encontrado inhibición del enzima de eritrocitos por parte del citrato estudiandola a pH 8,1, el cual resulta óptimo para determinar la actividad máxima pero al que como hemos visto no se observa la referida inhibición. Esta conducta corresponde al enzima en general, independientemente del hecho de que en los eritrocitos maduros no hay producción de citrato.

4.3.3. GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA

En nuestras condiciones y con el método de valoración que hemos desarrollado para estudiar la actividad de este enzima (el ensayo lineal), el comportamiento cinético frente al NAD^+ no mostró cooperatividad negativa sino positiva (Fig. 31), tanto in situ como in vitro, en contra de lo que observaron Conway y Koshland (26) con enzima de mús-

culo de conejo. Si bien in situ presentó cooperatividad mas elevada (n_H de 2,6 frente a 1,6 in vitro).

4.3.4. PIRUVATO KINASA

Este enzima presentó in situ cooperatividad positiva para el PEP menor que in vitro (Figuras 37 y 38). Las propiedades alostéricas típicas del isozima L se han confirmado in situ, si bien cabe señalar que la activación provocada por el fructosa difosfato se manifiesta in situ aún en condiciones de V_{max} , lo que no tiene lugar in vitro en que la actividad máxima no se afecta por la presencia del efector. Este fenómeno parece estar relacionado con alguna modificación provocada por el reactivo grapador, puesto que se encontró también cuando se estudió el efecto del fructosa difosfato en un hemolizado tratado con el mismo reactivo. No obstante, a pesar de la aplicación de este criterio de control, no es posible simular la situación de enfrentamiento del reactivo a las proteínas intracelulares, dado que las condiciones de empaquetamiento e interacción entre las mismas son radicalmente distintas in situ a en un hemolizado. En conjunto parece que puede haber diferencias reales entre in situ e in vitro, pero menores de las aparentes por un componente artefactual.

4.3.5. LACTATO DESHIDROGENASA

La constatación in situ de la inhibición por exceso de piruvato (Fig. 42), descrita in vitro por Kaplan y colaboradores (21)(38), confirma de forma inequívoca y en contra de la pretensión de Wuntch (155)(156)(157), que este fenómeno puede darse a las concentraciones fisiológicas del enzima. Otra cuestión es ya la significación fisiológica que

esto pudiera tener, en lo que mas bien permanecemos escépticos, pues las concentraciones inhibitoras de piruvato rebasan ampliamente el rango fisiológico.

4.4. GLICOLISIS IN SITU E IN VIVO

El flujo glicolítico medido tanto in situ como in vivo, es inferior a la capacidad del enzima limitante de la ruta, la hexokinasa, concordando ésto con el proceso de inhibición feed-back a que está sometida la actividad de este enzima.

El estudio in situ sorteando la hexokinasa evidencia el caracter de etapa limitante que tiene la reacción catalizada por este enzima (Figuras 48, 49, 50 y 51).

La producción de lactato in situ a partir de glucosa se mostró en el rango del 50% respecto a in vivo (Tabla 10). En las dos situaciones se apreció un periodo de latencia inicial, mas acusado in vivo (Figuras 44, 50 y 52). Este intervalo se alargó in situ cuando la mezcla de ensayo fué deficitaria en algun cofactor (Fig. 48), poniéndose de manifiesto entonces la escasez durante ese periodo de tiempo de un nivel suficiente de metabolitos intermedios previos a la etapa que en esas condiciones limitaba el flujo (Figuras 48, 49, 50 y 51); lo que apunta á que la mayor extensión de la fase de latencia observada in vivo corresponda al periodo de tiempo que en esas condiciones es necesario para rellenar la via de niveles de intermedios suficientes como para que la producción de lactato comience a ser lineal. También han sido estudiados diversos sectores de la ruta. De esta forma cuando se estudió la producción de lactato a partir de la etapa de triosas empleando dihidroxiacetona in vivo y gliceraldehido-3-P in situ (Figuras 44, 45 y 52), en el primer

caso la producción de lactato fué ligeramente inferior al segundo, lo que está de acuerdo con la capacidad mas reducida del enzima que limita el flujo in vivo, la triokinasa; in situ, la producción de lactato estuvo por debajo de la actividad del enzima mas escaso, la fosfoglicerato mutasa (puesto que el substrato en este caso ya estaba fosforilado). El flujo glicolítico en las dos situaciones fué superior al de la glicolisis entera, lo que está de acuerdo con la menor capacidad de la hexokinasa.

Cuando se estudió in situ la producción de lactato a partir de glucosa-6-P (Figuras 46, 47 y 52), el flujo fué inferior que desde gliceraldehido-3-P, lo que concuerdá con la limitación que supone la aldolasa, de menor actividad específica que la fosfoglicerato mutasa.

4.5. PERSPECTIVAS

El estudio de los enzimas in situ en células animales que hemos desarrollado, nos ha proporcionado, como ya se mencionó en la INTRODUCCION, la posibilidad de reducir la distancia que los resultados obtenidos in vitro sobre el comportamiento de los enzimas suponen respecto de la situación que tiene lugar in vivo, acercándonos por tanto a la realidad fisiológica.

No obstante, el abordaje que hemos expuesto, y como hemos indicado en varias ocasiones a lo largo de esta tesis, no está exento de limitaciones. En este sentido, estamos investigando a propósito de la búsqueda de reactivos atrapadores que no pasen la membrana celular; en repetidas ocasiones hemos intentado el uso de compuestos polifuncionales, del tipo de los dextranos activados, que por su elevado peso

molecular estuvieran incapacitados para transpasar la membrana, pero no se han mostrado aptos para los fines que perseguimos. En la actualidad estamos empeñados en la síntesis de un nuevo reactivo bifuncional que contenga en su molécula determinados grupos que le impiden penetrar en la célula, con el cual podrá ser posible la continuación del estudio de los enzimas in situ en células animales en condiciones aún mas próximas a las que prevalecen in vivo.

5. CONCLUSIONES

- 1 - El abordaje desarrollado para el estudio de enzimas in situ en células animales conduce a preparaciones muy estables de eritrocitos libremente permeables, a la generalidad de los metabolitos intermedios.
- 2 - Hemos puesto a punto un nuevo método de ensayo para el estudio de la actividad de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, sin acumulación de ninguno de los productos de la reacción.
- 3 - Se ha estudiado el comportamiento in situ de todos los enzimas de la glicolisis, habiéndose encontrado que los enzimas en general presentan una conducta cinética in situ similar a in vitro, si bien las velocidades máximas son menores in situ. La inhibición in situ de la LDH por exceso de piruvato, confirma inequívocamente que este fenómeno se presenta a las concentraciones fisiológicas del enzima.
- 4 - Las propiedades alostéricas observadas in vitro tienen en general una contrapartida cualitativa in situ, aunque frecuentemente con diferencias cuantitativas importantes. Cabe señalar, como mas destacado, el caso de la fosfofructokinasa, cuya actividad en ausencia de efectores alostéricos positivos es drásticamente mas elevada que in vitro en condiciones similares.
- 5 - Con el abordaje in situ hemos estudiado también la glicolisis a partir de diferentes niveles de la vía. El flujo glicolítico in situ está reducido respecto a in vivo, manteniéndose inferior a la actividad in vitro del enzima limitante de la vía, la hexokinasa. Existe una correspondencia entre la disminución de dicho flujo in situ y la observada en las velocidades máximas de los enzimas individuales estudiados en esas mismas condiciones.

6. BIBLIOGRAFIA

1. ADACHI, k., GHORY, P.K., ASAKURA, T. & SCHWARTZ, E. (1977) "A monomeric form of pyruvate kinase in human pyruvate kinase deficiency". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 501-504.
2. ARNONE, A. (1972) "X-ray diffraction study of binding of 2,3-difosfoglycerate to human deoxyhaemoglobin". Nature, 237, 146-149.
3. ASAKURA, T., HERRIDGE, P.L., GHORY, P.K. & ADACHI, K. (1977) "Stability of glycolytic enzymes of human erythrocytes". J. Biol. Chem., 252, 1829-1830.
4. ATKINSON, D.E. (1968) "The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers". Biochemistry, 7, 4030-4034.
5. ATKINSON, D.E. (1969) "Regulation of enzyme function". Ann. Rev. Microbiol., 23, 47-68.
6. BADWEY, J.A. & WESTHEAD, E.W. (1976) "Hysteretic response of human erythrocyte pyruvate kinase to phosphoenolpyruvate". J. Biol. Chem., 251, 5600-5606.
7. BARKER, R. (1971) "Organic chemistry of biological compounds". pgs. 59-61. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
8. BARTLETT, G.R. (1959) "Human red cell glycolytic intermediates". J. Biol. Chem., 234, 449-458.
9. BENESCH, R. & BENESCH, R.E. (1967) "The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin". Biochem. Biophys. Res. Commun., 26, 162-167.
10. BENESCH, R., BENESCH, R.E., RENTHAL, R. & GRATZER, W.B. (1971) "Cofactor binding and oxygen equilibrium in hemoglobin". Nature, 234, 174-176.
11. BENESCH, R., BENESCH, R.E. & YU, C.I. (1968) "Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 59, 526-532.
12. BERGMAYER, H.U., BERNT, E., SCHMIDT, F. & STORK, H. (1974) "D-glucose. Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase". In Methods of Enzymatic Analysis (Bergmayer, H.U., ed.) vol 3, pgs. 1196-1201. Verlag Chemie Weinheim Academic Press, New York.
13. BEUTLER, E. & GUINTO, E. (1973) "Dihydroxyacetone metabolism by human erythrocytes: demonstration of triokinase activity and its characterization". Blood, 41, 559-568.

14. BIGLEY, R.H., STENZEL, R., JONES, R.T., CAMPOS, J.O. & KOLER, R.D. (1968) "Tissue distribution of human pyruvate kinase isozymes". Enzymol. Biol. Clinica, 9, 10-20.
15. BILLEN, D. & OLSON, A.C. (1976) "DNA replication in chinese hamster ovary cells made permeable to nucleotides by Tween-80 treatment". J. Cell. Biol., 69, 732-736.
16. BLOXHAM, D.P. & LARDY, H.A. (1973) "Phosphofructokinase". En The Enzymes (Boyer, P.D. ed.) vol VIII, pgs. 239-278. Academic Press, New York.
17. BLUME, K.G. & BEUTLER, E. (1975) "Galactokinase from human erythrocytes". En Methods in Enzymology (Wood, W.A.ed.) vol XLII, pgs. 47-53. Academic Press. New York.
18. BRETSCHER, M.S. (1973) "Membrane Structure: some general principles". Science, 181, 622-629.
19. BREWER, G.J. (1969) "Erythrocyte metabolism and function: hexokinase inhibition by 2,3-diphosphoglycerate and interaction with ATP and Mg^{2+} ". Biochim. Biophys. Acta, 192, 157-161.
20. BRITTON, H.G., CARRERAS, J. & GRISOLIA, S. (1972) "Formation of an active phosphoenzyme by diphosphoglycerate-dependent phosphoglyceromutases from muscle, kidney and yeast". Biochim. Biophys. Acta, 289, 311-322.
21. CAHA, R.D., KAPLAN, N.O., LEVINE, L. & ZWILLING, E. (1962) "Nature and development of lactic dehydrogenases". Scientia, 136, 962-969.
22. CAPALDI, R.A. (1974) "A dynamic model of cell membranes". Scient. Amer., 230, n.3, 27-33.
23. CARBONELL, J., FELIU, J.E., MARCO, R. & SOLS, A. (1973) "Pyruvate kinase classes of regulatory isoenzymes in mammalian tissues". Eur. J. Biochem., 37, 148-156.
24. CASS, A. & DALMARK, M. (1973) "Equilibrium dialysis of ions in nystatin-treated red cells". Nature New Biology, 244, 47-49.
25. CLARKE, F.M. & MASTERS, C.J. (1976) "Interactions between muscle proteins and glycolytic enzymes". Int. J. Biochem., 7, 359-365.
26. CONWAY, A. & KOSHLAND, D.E. (1968) "Negative cooperativity in enzyme action. The binding of diphosphopyridine nucleotide to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase". Biochemistry, 7, 4011-4023.

27. CRANE, R.K. & SOLS, A. (1953) "The association of hexokinase with particulate fractions of brain and other tissue homogenates". J. Biol. Chem., 203, 273-292.
28. CRANE, R.K. & SOLS, A. (1954) "The non-competitive inhibition of brain hexokinase by glucose-6-phosphate and related compounds". J. Biol. Chem., 210, 597-606.
29. CHANUTIN, A. & CURNISH, R.R. (1967) "Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes". Arch. Biochem. Biophys., 121, 96-102.
30. CHAPMAN, R.G., HENNESSEY, M.A., WALTERSDORPH, A.M., HUENNEKENS, F.M. & GABRIO, B.W. (1962) "Erythrocyte metabolism. V. Levels of glycolytic enzymes and regulation of glycolysis". J. Clin. Invest., 41, 1249-1256.
31. CHRISTENSEN, W.R., PLIMPTON, C.H. & BALL, E.C. (1949) "The hexokinase of the rat erythrocytes and the influence of hormonal and others factors on its activity". J. Biol. Chem., 180, 791-802.
32. DAVIES, G.E. & STARK, G.R. (1970) "Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 66, 651-656.
33. DE DUVE, C. (1972) "Is there a glycolytic particle?". En Structure and Function of Oxidation Reduction Enzymes (Akenon & Ehrenberg, eds.) pgs. 715-728. Pergamon Press, Oxford.
34. DE VERDIER, C.H. & GARBY, L. (1965) "Glucose metabolism in normal erythrocytes: II. Factors influencing the hexokinase step". Scand. J. Haemat., 2, 305-317.
35. DISCHE, Z. (1941) "Sur l'interdependance des divers enzymes du système glycolytique et sur la régulation automatique de leur activité dans les cellules. 1. Inhibition de la phosphorylation du glucose dans les hématies par les acides mono-et diphosphoglycérique; état de l'acide diphosphoglycérique et phosphorylation du glucose". Bull. Soc. Chem. Biol., 23, 1140-1148.
36. DISCHE, Z. (1976) "The discovery of feedback inhibition". TIBS, december, N269-N270.
37. ENTENMAN, C. (1957) "General procedures for separating lipid components of tissue". En Methods in Enzymology (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. eds.) vol III, pgs. 299-317. Academic Press, New York.

38. EVERSE, J., BERGER, R.L. & KAPLAN, N.O. (1970) "Physiological concentrations of lactate dehydrogenases and substrate inhibition". *Science*, 168, 1236-1238.
39. FRIEDEMANN, H. & RAPOPORT, S.M. (1974) "Enzymes of the red cell; a critical catalogue". En Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes. (Yoshikawa, H. & Rapoport, S.M. eds.) pgs. 181-259. Urban & Schwarzenburg. Munchen-Berlin-Wien.
40. FRIEDEN, C. (1970) "Kinetic aspects of regulation of metabolic processes. The hysteretic enzyme concept". J. Biol. Chem., 245, 5788-5799.
41. FURFINE, C.S. & VELICK, S.F. (1965) "The acyl-enzyme intermediate and the kinetic mechanism of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase reaction". J. Biol. Chem. 240, 844-855.
42. GANCEDO, C. & BAÑUELOS, M. (1976) "The glycolytic pathway in yeast. Study under in situ conditions". En Metabolic Interconversion of Enzymes 1975 (Shaltiel, S. ed.) pgs. 198-202. Springer-Verlag, Berlin.
43. CARBY, L. & DE VERDIER, C.H. (1968). Folia Haematol., 89, 421.
44. GARLAND, P.B., RANDLE, P.J. & NEWSHOLME, E.A. (1963) "Citrate as a intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation". Nature, 200, 169-170.
45. GERBER, G., BERGER, H., JANIG, G.R. & RAPOPORT, S.M. (1973) "Interaction of haemoglobin with ions. Quantitative description of the state of magnesium, adenosine 5'-triphosphate, 2,3-bisphosphoglycerate and human haemoglobin under simulated intracellular conditions". Eur. J. Biochem., 38, 563-571.
46. GREENWALD, I. (1925) "A new type of phosphoric acid compound isolated from blood, with some remarks on the effect of substitution on the rotation of l-glyceric acid". J. Biol. Chem., 63, 339.
47. GRIBOLIA, S. & CLELAND, W.W. (1968) "Influence of salt, substrate, and cofactor concentrations on the kinetic and mechanistic behavior of phosphoglycerate mutase". Biochemistry, 1115-1121.
48. GUMAA, K.A., McLEAN, P. & GREENBAUM, A.L. (1971) "Compartmentation in relation to metabolic control in liver". En Essays in Biochemistry (Campbell, P.N. & Dickens, F., eds.) vol 7, pgs. 39-86. Academic Press, New York.

49. GUTMANN, I. & WAHLEFELD, A.W. (1974) "L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD⁺". En Methods of enzymatic analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) vol 3, pgs. 1464-1472. Verlag Chemie Weinheim Academic Press, New York.
50. HAMASAKI, N. & ROSE, Z.B. (1974) "The binding of phosphorylated red cell metabolites to human hemoglobin A". J. Biol. Chem., 249, 7896-7901.
51. HARVEY, J.W. & KANEKO, J.J. (1976) "Glucose metabolism of mammalian erythrocytes". J. Cell. Physiol., 69, 219-223.
52. HASLAM, R.J. & MILLS, D.C.B. (1967) "The adenylate kinase of human plasma, erythrocytes and platelets in relation to degradation of adenosine diphosphate in plasma". Biochem. J., 103, 773-784.
53. HERS, H.G. (1962) "Triokinase". En Methods in Enzymology (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.) vol V, pgs. 362-364. Academic Press, New York.
54. HESS, B. & BOITEUX, A. (1972) "Heterologous enzyme-enzyme interactions". En Protein-Protein Interactions (Jae-nicke, R. & Helmreich, E., eds.) pgs. 271-296, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
55. HILDERMAN, R.H., GLODBLATT, P.J. & DEUTSCHER, M.P. (1975) "Preparation and characterization of liver cells made permeable to macromolecules by treatment with toluene". J. Biol. Chem., 250, 4796-4801.
56. HOFER, H.W. (1971) "Influence of enzyme concentration on the kinetic behavior of rabbit muscle phosphofructokinase". Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 997-1004.
57. HULME, E.C., & TRIPTON, K.F. (1971) "The dependence of phosphofructokinase kinetics upon protein concentration". FEBS Lett., 12, 197-200.
58. JACOBASCH, G., MINAKAMI, S. & RAPOPORT, S.M. (1974) "Glycolysis of the erythrocyte". En Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes (Yoshikawa, H. & Rapoport, S.M., eds.) pgs. 55-92. Urban & Schwarzenberg, Munchen-Berlin-Wien.
59. JI, T.H. (1974) "Cross-linking of glycolipids in erythrocyte ghost membrane". J. Biol. Chem., 249, 7841-7847.
60. KAHANA, S.E., LOWRY, O.H., SCHULZ, D.W., PASSONNEAU, J.V. & CRAWFORD, E.J. (1960) "The kinetics of phosphoglucosomerase". J. Biol. Chem., 235, 2178-2184.

61. KAPLAN, N.O., CIOTTI, M.M. & STOLZENBACH (1956) "Reaction of pyridine nucleotide analogues with dehydrogenases". J. Biol. Chem., 221, 833-844.
62. KIM, H.D. & LUTHRA, M.G. (1976) "Pig reticulocytes. I. Transitory glucose permeability and metabolism". Am. J. Physiol., 230, 1668-1675.
63. KIM, H.D. & Mc MANUS, T.J. (1971) "Studies on the energy metabolism of pig red cells. I. The limiting role of membrane permeability in glycolysis". Biochim. Biophys. Acta, 230, 1-11.
64. KINOSITA, K. & TSONG, T.Y. (1977) "Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane". Nature, 286, 438-441.
65. KITAJIMA, M., SEKIGUCHI, W. & KONDO, A. (1971) "A modification of red blood cells by isocyanates". Bull. Chem. Soc. Japan, 44, 139-143.
66. KOSHLAND, D.E., NEMETHY, G. & FILMER, D. (1966) "Comparison of experimental binding data and theoretical. Model in proteins containing subunits". Biochemistry, 5, 365-385.
67. KREBS, H.A. (1972) "The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation". In Essays in Biochemistry (Campbell, P.N. & Dickens, F. eds.) vol 8, pgs.1-34, Academic Press, New York.
68. KUHN, B., JACOBASCH, G. & RAPOPORT, S. (1969) "Einige eigenschaften der phosphofruktokinase von rattenerythrozyten". Acta. Biol. Med. Germ., 23, 1-17.
69. LAMPRECHT, W. & TRAUTSCHOLD, I. (1974) "Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase". Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U. ed.) vol 4, pgs. 2101-2110. Verlag Chemie Weinheim Academic Press, New York.
70. LARDY, H.A. & PARKS, R.E. (1956) "Influence of ATP concentration on rates of some phosphorylation reactions". In Enzymes: Units of Biological Structure and Function (Gaebler-O.H. ed.) pgs. 584-587, Academic Press, New York.
71. LAYZER, R.B., ROWLAND, L.P. & BANK, W.J. (1969) "Physical and kinetic properties of human phosphofruktokinase from skeletal muscle and erythrocytes". J. Biol. Chem., 244, 3823-3831.
72. LENFANT, C., TORRANCE, J., ENGLISH, E., FINCH, C.A., RLYNARJE, C., RAMOS, J. & FAURA, J. (1968) "Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobin and on organic phosphate levels". J. Clin. Invest., 47, 2652-2656.

73. LIENHARD, G.E. & SECEMSKI, I. (1973) " P^1, P^5 -Di(adenosine-5') pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase". J. Biol. Chem., 248, 1121-1123.
74. LOWRY, O.H., PASSONNEAU, J.V., HASSELBERGER, F.X. & SCHULZ, D.W. (1964) "Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain". J. Biol. Chem., 239, 18-30.
75. LOWRY, O.H., PASSONNEAU, J.V. & ROCK, M.K. (1961) "The stability of pyridine nucleotides". J. Biol. Chem., 236, 2756-2759.
76. MALMSTROM, B.G. (1961) "Enolase". En The Enzymes (Boyer, P. P., LARDY, H. & Myrback, K. eds.) vol V, pgs.471-494, Academic Press, New York.
77. MANSOUR, T.E. (1972) "Phosphofructokinase". En Current Topics in Cellular Regulation (Horecker, B.L. & Stadtman, E. R. eds.) vol 5, pgs. 1-46, Academic Press, New York.
78. MANSOUR, T.E. & SETLOW, B. (1972) "Molecular properties of phosphofructokinase and its mechanisms of regulation". En Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Cells (Kun, E. & Grisolia, S. eds.) pgs. 57-84. Willey-Interscience, London-Sydney-Toronto.
79. MARCO, E.J. & MARCO, R. (1974) "The use of 3-acetyl-pyridine adenine dinucleotide in the spectrophotometric assay of Enzymatic activities coupled to dehydrogenases of unfavorable equilibrium". Anal. Biochem., 62, 472-477.
80. MARIE, J., KAHN, A. & BOIVIN, P. (1977) "Human erythrocyte pyruvate kinase. Total purification and evidence for its antigenic identity with L-type enzyme". Biochim. Biophys. Acta, 481, 96-104.
81. MARKERT, C.L. & MÖLLER, F. (1959) "Multiple forms of enzyme: tissue, ontogenic, and species specific patterns". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 45, 753-763.
82. MAVIS, R.D. & STELLWAGEN, E. (1970) "The role of cations in yeast phosphofructokinase catalysis". J. Biol. Chem., 245, 674-680.
83. MEISTER, A. (1950) "Reduction of α, γ -diketo and α -keto acids catalyzed by muscle preparations and by crystalline lactic dehydrogenase". J. Biol. Chem., 184, 117-129.
84. MELNICK, R.L. & HULTIN, H.O. (1973) "On the existence of a complex of glycolytic enzymes" J. Bioenerg., 5, 107-117.
85. MICHAL, G. (1974) "D-glycerate-2,3-diphosphate". En Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U. ed.) vol 3, pgs. 1433-1438. Verlag Chemie Weinheim, Academic Press, New York.

86. MICHAL, G. & BEUTLER, H.O. (1974) "D-fructose-1,6-diphosphate, dihydroxyacetone phosphate and D-glyceraldehyde-3-phosphate". En Methods of Enzymatic Analysis (Bregmeyer, H.U. ed.) vol 3, pgs. 1314-1319. Verlag Chemie Weinheim Academic Press, New York.
87. MIWA, S., NAKASHIMA, K. & SHINOHARA, K. (1975) "Physiological and pathological significance of human pyruvate kinase isozymes in normal and inherited variants with hemolytic anemia". En Isozymes II. Physiological Function (Markert, C.L. ed.) pgs. 487-500, Academic Press, New York.
88. MUNTZ, J.A. (1947) "The role of potassium and ammonium ions in alcoholic fermentation". J. Biol. Chem., 171, 653-665.
89. NEWSHOLME, E.A. & RANDLE, P.J. (1961) "Regulation of glucose uptake by muscle". Biochem. J., 80, 655-662.
90. NODA, L. (1973) "Adenylate kinase". En The Enzymes (Boyer, P.D. ed.) vol VIII, pgs. 279-305. Academic Press, New York.
91. OESPER, P. & MEYERHOF, O. (1950) "The determination of triose phosphate isomerase". Arch. Biochem., 27, 223-233.
92. ORSI, B.A. & CLELAND, W.W. (1972) "Inhibition and kinetic mechanism of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase". Biochemistry, 11, 102-109.
93. OZAWA, H. (1967) "Bridging reagent for protein". J. Biochem., Tokyo, 62, 419-423.
94. PASSONNEAU, J.V. & LOWRY, O.H. (1962) "Phosphofructokinase and the Pasteur effect". Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 10-17.
95. PASSONNEAU, J.V. & LOWRY, O.H. (1963) "P-fructokinase and the control of the citric acid cycle". Biochim. Biophys. Res. Commun., 13, 372-379.
96. PAVELICH, M.J. & HAMMES, G.G. (1972) "A study of the aggregation of rabbit muscle phosphofructokinase". Federation Proc., 31, 459.
97. PERUTZ, M.F. (1970) "Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin". Nature, 228, 726-739.
98. PESCARMONA, G.P., BORIA, A. & ARESE, P. (1970) "Improved extraction and determination of some glycolytic enzymes in the human erythrocyte". Experientia, 26, 719-720.
99. PONCE, J., ROTH, S. & HARKNESS, D.R. (1971) "Kinetic studies on the inhibition of glycolytic kinases of human erythrocytes by 2,3-diphosphoglyceric acid". Biochim. Biophys. Acta., 250, 63-74.

100. RACKER, E., (1947) "Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphofructokinase activity". J. Biol. Chem., 167, 843-854.
101. RAMAIAH, A. & TEJWANI, G.A. (1970) "Interconvertible forms of phosphofructokinase of rabbit liver". Biochim. Biophys. Res. Commun., 39, 1149-1156.
102. RANDLE, P.J., DENTON, R.M. & ENGLAND, P.J. (1968) "Citrate as a metabolic regulator in muscle and adipose tissue". En The Metabolic Roles of Citrate (Goodwin, T.W. ed.) Biochemical Society Symposium, 27, pgs. 87-103. Academic Press, New York.
103. RAPOPORT, S. (1968) "The regulation of glycolysis in mammalian erythrocytes". En Essays in Biochemistry (Campbell, P.N. & Greville, G. D. eds.) vol 4, pgs. 69-103. Academic Press., New York.
104. RAPOPORT, S. & GUEST, G.M. (1941) "Distribution of acid-soluble phosphorus in the blood of various vertebrates". J. Biol. Chem., 138, 269-282.
105. RAPOPORT, T.A., HEINREICH, R. & RAPOPORT, S.M. (1976) "The regulatory principles of glycolysis in erythrocytes in vivo and in vitro. A minimal comprehensive model describing steady states, quasi steady states and time-dependent processes". Biochem. J., 154, 449-469.
106. RAPOPORT, S. & LUEBERING, J. (1950) "The formation of 2,3-diphosphoglycerate in rabbit erythrocytes: the existence of a diphosphoglycerate mutase". J. Biol. Chem., 183, 507-516.
107. RAPOPORT, S. & LUEBERING, J. (1951) "Glycerate-2,3-diphosphatase". J. Biol. Chem., 189, 683-694.
108. REEVES, R.E. & SOLS, A. (1973) "Regulation of Escherichia coli phosphofructokinase in situ". Biochem. Biophys. Res. Comm., 50, 459-466.
109. RIJKSEN, G. & STAAL, G.E.J. (1976) "Purification and some properties of human erythrocytes hexokinase". Biochim. Biophys. Acta, 445, 330-341.
110. RIJKSEN, G. & STAAL, G.E.J. (1976) "Kinetics of human erythrocyte hexokinase. Influence of temperature, ATP and magnesium ions". Biochim. Biophys. Acta., 452, 382-391.
111. RIJKSEN, G. & STAAL, G.E.J. (1977) "Regulation of human erythrocyte hexokinase" 11th FEBS Meeting, Copenhagen, A1-8-054.

112. ROSA, J. & SCHAPIRA, F. (1964) "Lactic dehydrogenase isozymes and ageing of erythrocytes", Nature, 204, 883.
113. ROSE, I.A. & O'CONNELL, E.L. (1964) "The role of glucose 6-phosphate in the regulation of glucose metabolism in human erythrocytes". J. Biol. Chem., 239, 12-17.
114. ROSE, I.A. & WARNES, V.B. (1974) "Glucose and mannose-1,6-P₂ activators of phosphofructokinase in red blood cells". Biochem. Biophys. Res. Commun., 59, 1333-1340.
115. SAEZ, M.J. & LAGUNAS, R. (1976) "Determination of intermediary metabolites in yeast. Critical examination of the effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true levels". Mol. Cell. Biochem., 13, 73-78.
116. SALAS, J., SALAS, M., VIÑUELA, E. & SOLS, A. (1965). "Glucokinase of rabbit liver". J. Biol. Chem., 240, 1014-1018.
117. SALAS, M.L., VIÑUELA, E., SALAS, M. & SOLS, A. (1965) "Citrate inhibition of phosphofructokinase and the Pasteur effect". Biochem. Biophys. Res. Commun., 19, 371-376.
118. SCHNEIDER, A.S., DUNN, I., IBSEN, K.H. & WEINSTEIN, I.M. (1967) "Triosephosphate isomerase deficiency. B. Inherited triosephosphate isomerase deficiency. Erythrocyte carbohydrate metabolism and preliminary studies of the erythrocyte enzyme". En Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism (Beutler, E. ed.) pgs. 273-279, Grune & Stratton, New York.
119. SCHOLNICK, P., LANG, D. & RACKER, E. (1973) "Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. IX. Stimulation of aerobic glycolysis by energy-linked ion transport and inhibition by dextran sulfate" J. Biol. Chem., 248, 5175-5182.
120. SEEMAN, P. (1967) "Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponin and lysolecithin". J. Cell. Biol., 32, 55-70.
121. SERRANO, R., GANCEDO, J.M. & GANCEDO, C. (1973) "Assay of yeast enzymes in situ". Eur. J. Biochem., 34, 479-482.
122. SHERMANN, J.R. & ADLER, J. (1963) "Galactokinase from Escherichia coli". J. Biol. Chem., 238, 873-878.
123. SOLS, A. (1968) "Phosphorylation and glycolysis". En Carbohydrate Metabolism and Its Disorders (Dickens, F., Randle, P.J. & Whelan, W.J. eds.) pgs. 53-87. Academic Press, London.

124. SOLS, A. (1975) "Regulation of enzymes in situ" En Mechanism of Action and Regulation of Enzymes (Keleti, T. ed.) FEBS Symposia , vol 32, pgs. 211-221, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- 124.bis SOLS, A. (1976) "The Pasteur effect in the allosteric era". En Reflections on Biochemistry, (Kornberg, A., Horecker, B.L., Cornudella, L. & Oró, J. eds.) pgs.199-206 Pergamon Press, New York.
125. SOLS, A. & CRANE, R. (1954) "Substrate specificity of brain hexokinase". J. Biol. Chem., 210, 581-595.
126. SOLS, A., GANCEDO, C. & Dela FUENTE, G. (1971) "Energy-yielding metabolism in yeast". En The Yeast (Rose, A. H. & Harrison, J.S.) vol 2. pgs. 271-307. Academic Press, New York.
127. SOLS, A. & MARCO, R. (1970) "Concentrations of metabolites and binding sites. Implications in metabolic regulation". En Current Topics in Cellular Regulation (Horecker, B.L. & Stadtman, E.R., eds.), vol 2, pgs. 227-273, Academic Press, New York.
128. SOLS, A., REEVES, R.E. & GANCEDO, C. (1974) "Regulation of enzymes in situ". En Metabolic Interconversion of Enzymes 1973, 3rd International Symposium (Fischer E. H., Krebs, E.G., Neurath, N. & Stadtman, E.R., eds.) pgs. 393-399, Springer-Verlag, Heidelberg.
129. SOLS, A. & SALAS, M.L. (1966) "Phosphofructokinase. III. Yeast". En Methods in Enzymology (Wood, W.A. ed.), vol IX, pgs. 436-442. Academic Press, New York.
130. SRERE, P.A. (1967) "Enzyme concentrations in tissues". Science, 158, 936-937.
131. STAAL, G.E.J., KOSTER, J.F., BANZIGER, C.J.M. & VAN MILLEGEN-BOERSMA, L. (1972) "Human erythrocyte phosphofructokinase: its purification and some properties". Biochim. Biophys. Acta., 276, 113-126.
132. STADTMAN, E.R. (1966) "Allosteric regulation of enzyme activity". En Advances in Enzymology (Nord, F.F. ed.) vol 28, pgs. 41-154. Interscience Publishers, New York, London, Sydney.
133. STADTMANN, T.C. (1957) "Preparations and assay of cholesterol and ergosterol". En Methods in Enzymology (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. eds.) vol III, pgs. 392-394. Academic Press, New York.

134. TANAKA, K.R. & VALENTINE, W.N. (1968). "Pyruvate kinase deficiency". En Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism (Beutler, E. ed.) pgs. 229-248. Grune & Stratton, New York.
135. TANAKA, T., HARANO, Y., SUE, F. & MORIMURA, H. (1967) "Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinase isolated from rat tissues". J. Biochem., 62, 71-91.
136. TAYLOR, C.B. & BAILEY, E. (1967) "Activation of liver pyruvate kinase by fructose 1,6-diphosphate". Biochem. J. 102, 32c-33c.
137. TEMKINE, H. (1966) "Les enzymes du globule rouge humain. Separation et caractéristiques". Bull. Soc. Chim. Biol., 48, 771-786.
138. TORNHEIM, K. & LOWENSTEIN, J.M. (1976) "Control of phosphofruktokinase from rat skeletal muscle. Effects of fructose diphosphate, AMP, ATP, and citrate". J. Biol. Chem., 251, 7322-7328.
139. TRANIELLO, S., MELLONI, E., PONTREMOLI, S., SIA, C.L. & HÖRECKER, B.L. (1972) "Rabbit liver fructose 1,6-diphosphatase. Properties of the native enzyme and their modification by subtilisin". Archs. Biochem. Biophys., 149, 222-231.
140. TSAI, M.Y., GONZÁLEZ, F. & KEMP, R.G. (1975) "Physiological significance of phosphofruktokinase isozymes". En Isozymes II. Physiological Function (Markert, C.L. ed.) pgs. 819-835. Academic Press, New York.
141. UNDERWOOD, A.H. & NEWSHOLME, E.A. (1965) "Properties of phosphofruktokinase from rat liver and their relation to the control of glycolysis and gluconeogenesis". Biochem. J., 95, 868-875.
142. UYEDA, K. & RACKER, E. (1965) "Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VII. Hexokinase and phosphofruktokinase". J. Biol. Chem., 240, 4682-4688.
143. VELICK, S.F. (1955) "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from muscle". En Methods in Enzymology (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. eds.), vol I, pgs. 401-406. Academic Press, New York.
144. VESELL, E.S. (1975) "Medical uses of isozymes". En Isozymes II. Physiological Function (Markert, C.L. ed.) pgs. 1-28, Academic Press, New York.

145. VESELL, E.S. & BEARM, A.G. (1957) "Localization of lactic dehydrogenase activity in serum fractions". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 94, 96-99.
146. VINUELA, E., SALAS, M.L. & SOLS, A. (1963) "End-product inhibition of yeast phosphofructokinase by ATP". Biochim. Biophys. Res. Commun., 12, 140-145.
147. WANG, C.S. (1977) "Inhibition of human erythrocyte lactate dehydrogenase by high concentrations of pyruvate". Eur. J. Biochem., 78, 569-574.
148. WANG, K. & RICHARDS, F.M. (1975) "Reaction of dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidate with intact human erythrocytes. Crosslinking of membrane proteins and hemoglobin". J. Biol. Chem., 250, 6622-6626.
149. WENZEL, K.W., KURGANOV, B.I., ZIMMERMANN, G., YAKOVLEV, A., SCHELLENBERGER, W. & HOFMANN, E. (1976) "Self-association of human erythrocyte phosphofructokinase. Kinetic Behavior in dependence on enzyme concentration and mode of association" Eur. J. Biochem., 61, 181-190.
150. WILKINSON, J.H. (1970) "Lactate dehydrogenase isoenzymes" en Isoenzymes (Wilkinson, J.H. ed.) pgs. 134-203. Chapman and Hall, London.
151. WINER, A.D. & SCHWERT, G.W. (1958) "Lactic dehydrogenase. IV. The influence of pH on the kinetics of the reaction". J. Biol. Chem., 231, 1065-1083.
152. WINTERHALTER, K.H. (1974) "Hemoglobins. Porphyrins and related compounds". A. Heme proteins. En Clinical Biochemistry (Curtins, H.Ch. & Roth, M. eds.) pgs. 1305-1322, Walter de Gruyter, Berlin-New York.
153. WOLD, F. (1972) "Bifunctional reagents". En Methods in Enzymology (Hirs, C.H.W. & Timasheff, S.N., eds.), vol XXV pgs. 623-651, Academic Press, New York-London.
154. WOLD, F. & BALLOU, C.E. (1957) "Studies on the enzyme enolase" J. Biol. Chem., 227, 301-328.
155. WUNTCH, T., CHEM, R.F. & VESELL, E.S. (1970) "Lactate dehydrogenase isozymes: kinetic properties at high enzyme concentrations". Science, 167, 63-65.
156. WUNTCH, T., CHEM, R.F. & VESELL, E.S. (1970) "Lactate dehydrogenase isozymes: further kinetic studies at high enzyme concentration" Science, 169, 480-481.

157. WUNTCH, T., VESELL, E.S. & CHEM, R.F. (1969) "Studies on rates of abortive ternary complex formation of lactate dehydrogenase isozymes". J. Biol. Chem., 244, 6100-6104.
158. ZIMMERMANN, G., WENZEL, K.W., GAUER, J. & HOFMANN, E. (1973) "Studies on the association behavior of human-erythrocyte phosphofructokinase" Eur. J. Biochem., 40, 501-505.

A N E J O S

REGULATION OF ENZYME ACTIVITY IN ANIMAL CELLS IN SITU

J. JARABÓN, R. FRENKEL, M. MARTINEZ-PARDO, A. GINER and A. SOLS

INSTITUTO DE ENZIMOLOGÍA DEL CSIC, FAC. MED. UNIV. AUTÓNOMA, MADRID-34, SPAIN

DISCUSSION PERIOD:

SUMMARY

ERYTHROCYTES, LEUCOCYTES AND HEPATOCYTES HAVE BEEN PERMEABILIZED AFTER CROSSLINKING WITH BIFUNCTIONAL REAGENTS, SO AS TO PERMIT KINETIC STUDIES OF ENZYMES IN SITU. THE 11 GLYCOLYTIC ENZYMES IN ERYTHROCYTES HAVE BEEN STUDIED. WHILE V_{max} AND K_m TEND TO BE SIMILAR IN VITRO AND IN SITU, ALLOSTERIC PROPERTIES TEND TO BE QUANTITATIVELY DIFFERENT.

INTRODUCTION

THE IN SITU APPROACH FOR THE STUDY OF ENZYME ACTIVITY AND ITS REGULATION HAS BEEN SYSTEMATICALLY APPLIED TO THE STUDY OF THE 11 GLYCOLYTIC ENZYMES IN ERYTHROCYTES AND SOME OTHER ENZYMES AND CELLS.

RESULTS

METHOD

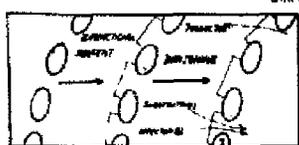
- 1- 'STAPLE' CELLS SUSPENDED IN ISOTONIC MEDIUM WITH A CROSSLINKING REAGENT (ca. 0.1 mmoles/g cells), AT APPROPRIATE pH, TEMPERATURE AND TIME
- 2- WASH ON THE CENTRIFUGE (1000g x 5 min)
- 3- PERMEABILIZE WITH DIGITONIN (10 mg/g cells) IN HYPOTONIC MEDIUM
- 4- WASH TWICE WITH A K^+-Mg^{2+} SALINE SOLUTION
- 5- CHECK PREPARATION FOR REFERENCE ENZYME
- 6- STUDY OF ENZYME(S) UNDER CONSIDERATION, SPECTROPHOTOMETRICALLY (AT A CELL CONCENTRATION ≤ 1 mg/ml IN 7% FICOLL) OR OTHERWISE, IN COMPARISON WITH AN EXTRACT ASSAYED IN IDENTICAL CONDITIONS.

GLYCOLYTIC ENZYMES OF RAT ERYTHROCYTES IN SITU

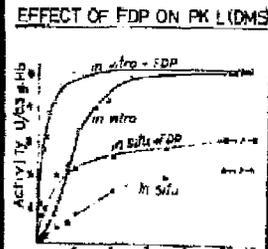
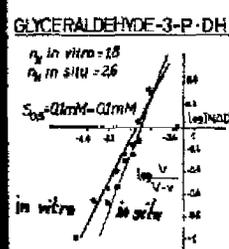
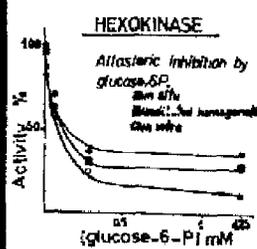
Enzyme	V_{max} IN VITRO U/g	CROSSLINKING REAGENT	V_{max} IN SITU %	REAGENT TREATED IN VITRO %	K_m (mM) IN SITU IN VITRO	OTHER PROPERTIES
HK	0.07	TDI	33		[GLU $\leftarrow 0.2 \rightarrow$ ATP 0.15 0.3 F6P $\leftarrow 0.1 \rightarrow$]	[G6P INHIBITS IN SITU BUT LESS THAN IN VITRO]
PGI	16	TDI DTBP	45 5.0	15		
PFK	8	DMS	7.0	36	[F6P $\leftarrow 0.1 \rightarrow$ ITP $\leftarrow 0.1 \rightarrow$]	UNDER INVESTIGATION
ALD	0.5	TDI	4.0		FDP $\leftarrow 0.02 \rightarrow$	
TPI	200	TDI	4.0	57	G3P $\leftarrow 0.4 \rightarrow$	
G6PDH	9	TDI	17			[COOPERATIVITY NAD ⁺ IN SITU = 26 IN VITRO]
PGK	9	TDI	1.5	37		
		DTBP	6.0	48		
PGM	2	TDI	4.5	15		
		DTBP	4.0	4.0		
ENO	8	TDI	57		2PGA $\leftarrow 0.03 \rightarrow$	
PK	9	TDI	4.5	25		ALLOSTERIC BUT IN SITU
		DTBP	3.3	2.0		
		DMS	5.8	2.2		
LDH	44	TDI	5.2	3.0	[PYR $\leftarrow 0.2 \rightarrow$ NADH $\leftarrow 0.03 \rightarrow$]	[INHIBITION BY HIGH PYRUVATE IN SITU]
		DTBP	5.2	3.0		
		DMS	5.1	4.5		

* TDI : TOLUENE-2,4-DISOCYANATE
DTBP : DIMETHYL-3,3'-DITHIOBISPROPIONIMDATE DIHYDROCHLORIDE
DMS : DIMETHYL SULFIDE DIHYDROCHLORIDE

STAPLING and PERMEABILIZATION



SELECTIVE PERMEABILIZATION OF ENZYME IN CELLS



ERYTHROCYTES. x 22,000



DISCUSSION

PK, G6PDH AND 6PDH HAVE BEEN STUDIED IN SITU IN LEUCOCYTES STAPLED WITH DMS. EXTENSION TO HEPATOCYTES SEEMS ALSO FEASIBLE. THE IN SITU APPROACH SEEMS TO HAVE GENERAL APPLICATION FOR THE STUDY OF A VARIETY OF ENZYMES IN A VARIETY OF ANIMAL CELLS WITH APPROPRIATE SELECTION OF CROSSLINKING REAGENT AND CONDITIONS. RESULTS WITH 15 ENZYMES INDICATE THAT MANY PROPERTIES OF POTENTIAL PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE CAN AND SHOULD BE STUDIED IN SITU.

CODE NUMBER:
A1-8-053-5/6/7

DISC. PERIOD:

BEHAVIOR IN SITU OF THE ALLOSTERIC ENZYMES OF GLYCOLYSIS IN ERYTHROCYTES

J. J. ARAGÓN and A. SOLS
INSTITUTO DE ENZIMOLOGÍA DEL CSIC, FAC. MED. UNIV. AUTONOMA, MADRID-34, SPAIN

INTRODUCTION

THE ALLOSTERIC PROPERTIES OF HEXOKINASE, PHOSPHOFRUCTOKINASE AND PYRUVATE KINASE L HAVE BEEN STUDIED BY THE IN SITU APPROACH¹ IN RAT ERYTHROCYTES

METHODS

- ERYTHROCYTES HAVE BEEN STABILIZED BY CROSSLINKING WITH A BIFUNCTIONAL REAGENT (DMS, DTBP, TDI) AND PERMEABILIZED WITH DIGITONIN²
- ENZYME KINETICS WAS STUDIED EITHER SPECTROPHOTOMETRICALLY OR WITH AN ISOTOPIC METHOD³

HEXOKINASE

- HEXOKINASE IN SITU IS ALLOSTERICALLY INHIBITED BY GLUCOSE-6-P BUT LESS STRONGLY THAN IN VITRO (Fig. 1)
- 3,5-DPG DOES NOT INHIBIT AT PHYSIOLOGICAL CONCENTRATIONS (<5% UP TO 3mM)

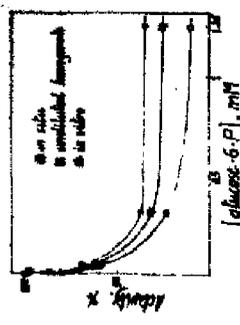


Fig. 1

PYRUVATE KINASE

- PK SHOWS POSITIVE COOPERATIVITY FOR P-ENOLPYRUVATE SMALLER IN SITU THAN IN VITRO (K_{0.5} 2.1 AND 0.6 RESPECTIVELY) (Fig. 4)

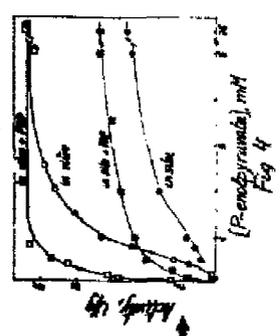


Fig. 4

RESULTS

PHOSPHOFRUCTOKINASE

- PFK IN SITU IS SENSITIVE TO ALLOSTERIC EFFECTORS, BOTH POSITIVE (P, AMP, Ni²⁺, O₂, SA, G6P) AND NEGATIVE (ATP, H⁺) (Fig. 4C) AND CITRATE (Fig. 4D), BUT LESS STRONGLY THAN IN VITRO

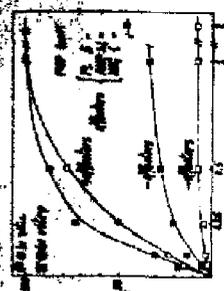


Fig. 4B

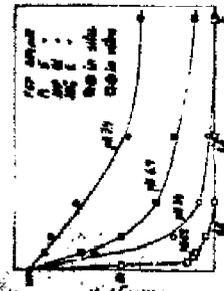


Fig. 4C

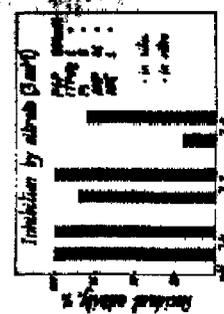


Fig. 4D

GLYCERALDEHYDE-3-P-DH

- KINETIC CONSTANTS OF GAPDH AT PHYSIOLOGICAL CONCENTRATIONS OF SUBSTRATES HAVE BEEN STUDIED IN SITU WITH A 'LINEAR' METHOD IN WHICH NONE OF THE PRODUCTS ACCUMULATES (Fig. 5)

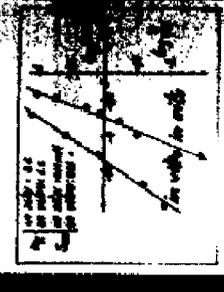


Fig. 5

GLYCOLYSIS IN SITU AND IN VITRO

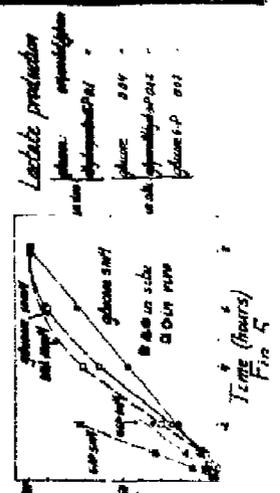


Fig. 6

CONCLUSIONS

- ALLOSTERIC PROPERTIES OBSERVED IN VITRO IN GENERAL HAVE QUALITATIVE CORRELATIONS IN SITU, ALTHOUGH FREQUENTLY WITH QUANTITATIVE DIFFERENCES.