

2/656

a719769

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION QUIMICAS
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

VIAS DE DEGRADACION DE LOS FOSFATOS
DE ADENOSINA EN ERITROCITOS DE SAN-
GRE CONSERVADA.

Reg FC. 8588



Tesis presentada para optar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

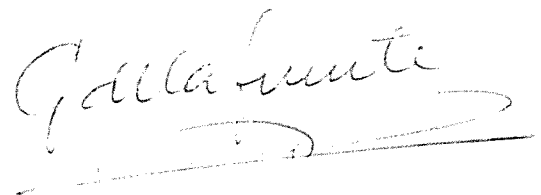
por la Licenciada

PAZ GARCIA MONTES

realizada en el Instituto de Enzimolo-
gía y Patología Molecular del C.S.I.C.
y dirigida por la Dra. Gertrudis de la
Fuente.

La Dra Dña Gertrudis de la Fuente Sanchez, Profesor
de Investigación del C.S.I.C.

— CERTIFICA, que esta tesis doctoral ha sido realiza-
da bajo su dirección en el Instituto de Enzimología
y Patología Molecular del C.S.I.C.

A handwritten signature in cursive script, reading "Gertrudis de la Fuente". The signature is written in dark ink and is positioned above a horizontal line that serves as a separator.

Madrid, Febrero 1980

A mis padres

RECONOCIMIENTOS

Quiero agradecer al Profesor Alberto Sols, Catedrático y Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Director Honorífico del Instituto de Enzimología y Patología Molecular del C.S.I.C., su cariñosa acogida y sus críticas, siempre constructivas, a este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Gertrudis de la Fuente, que me permitió quedarme a su lado cuando no sabía lo que era la Bioquímica, y de la que he recibido innumerables enseñanzas y valiosos consejos.

También quiero agradecerle al Prof. José M^a Medina el haber aceptado actuar como Ponente en esta Tesis.

Mi agradecimiento también a mi compañera durante estos años, Teresa Benloch, que siempre me ha ofrecido su amistad y su incondicional ayuda.

Al Dr. Juan Emilio Felú por todo el tiempo que me dedicó en mis primeros pasos por el laboratorio y, en general, por todas sus enseñanzas y consejos.

Gracias también a Trinidad López Bruñet, que desde su puesto en la Secretaría me ha prestado siempre una gran ayuda y una estupenda amistad.

Mi agradecimiento al Dr. Gasalla del Banco de Sangre de la Residencia Sanitaria de la Seguridad Social "La Paz" que tan amablemente me ha proporcionado todas las muestras de sangre necesarias para la realización de este trabajo.

Y, finalmente, quiero agradecerles a mis amigos Piona y Carlos el haber escrito y dibujado con tanto cariño y esmero las páginas que siguen.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL

	<u>Pág.</u>
I INTRODUCCION.....	1
II MATERIALES Y METODOS....	23
2.1. <u>MATERIALES</u>	24
2.1.1. CASAS COMERCIALES Y PRODUCTOS.....	24
2.1.2. APARATOS.....	26
2.1.3. MATERIAL BIOLÓGICO.....	27
2.1.4. MEDIOS DE INCUBACION.....	31
2.1.5. FORMA EN QUE SE REALIZARON LAS INCUBACIONES.....	34
2.2. <u>METODOS</u>	37
2.2.1. OBTENCION DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO	37
2.2.2. VALORACION DE GLUCOSA.....	37
2.2.3. VALORACION DE LACTATO.....	38
2.2.4. VALORACION DE FOSFORO INORGANICO.....	38
2.2.5. VALORACION DE AMP.....	39
2.2.6. VALORACION DE ADP.....	39
2.2.7. VALORACION DE ATP.....	40
2.2.8. VALORACION DE IMP.....	40
2.2.9. VALORACION DE AMONIO.....	40
2.2.10. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE DEAE- Celulosa.....	41
2.2.11. VALORACION DE HEMOGLOBINA.....	45
III RESULTADOS.....	46
3.1. <u>GLICOLISIS</u>	
3.1.1. CAPACIDAD GLICOLITICA DE LOS ERITROCITOS CONSERVADOS Y SUS HEMOLIZADOS	47
3.1.2. EFECTO DE CIERTAS ADICIONES SOBRE LA GLICOLISIS POR HEMOLIZADOS.....	48
3.1.3. CAPACIDAD FOSFORILANTE DE LA HEXOKINÁSA EN LOS HEMOLIZADOS.....	51
3.2. <u>METABOLISMO DE ADENOSINFOSFATOS</u>	54
3.2.1. EVOLUCION EN EL TIEMPO DE LOS NIVELES DE ADENOSINFOSFATOS TRAS LA ADI	

	CION DE AMP A HEMOLIZADOS DE ERI TROCITOS RECIEN EXTRAIDOS Y PRO- CEDENTES DE SANGRE CONSERVADA....	54
3.2.2.	TRANSFORMACION DEL AMP EN IMP....	59
3.2.3.	EFECTO DE LA INOSINA SOBRE LA DES- APARICION DE AMP AÑADIDO A HEMOLI- ZADOS DE CELULAS CON 21 DIAS DE - CONSERVACION.....	64
3.2.4.	EFECTO DE LA INOSINA SOBRE LA RE- GENERACION DEL ATP A PARTIR DEL - AMP.....	66
3.2.5.	FORMACION DE LACTATO Y ATP EN CE- LULAS ENTERAS Y HEMOLIZADOS INCU- BADOS CON INOSINA Y ADENINA.....	71
3.2.6.	PAPEL DE LA INOSINA EN LA SINTE-- SIS DE ATP DESDE ADENINA.....	76
3.3.	<u>ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ADA EN HEMOLI- ZADOS.....</u>	79
3.3.1.	IMPORTANCIA RELATIVA DE LA VIA -- DESAMINATIVA EN LA DESAPARICION - DE AMP AÑADIDO A LOS HEMOLIZADOS.	79
3.3.2.	CURVA DE SATURACION DE LA ADA....	83
3.3.3.	EFECTO DEL ATP SOBRE LA CURVA DE SATURACION.....	84
3.3.4.	EFECTO DEL 2,3-DPG SOBRE LA CURVA DE SATURACION DE LA ADA.....	87
3.3.5.	EFECTO DEL ATP MAS 2,3-DPG SOBRE LA CURVA DE SATURACION.....	90
3.3.6.	EFECTO DEL GTP SOBRE LA TRANSFOR- MACION DE AMP.....	90
3.4.	<u>ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES FOSFOHIDRO- LASAS SOBRE AMP E IMP EN LOS HEMOLIZA- DOS.....</u>	94
3.4.1.	COMPARACION DE CELULAS DE 1 Y 21 DIAS EN CUANTO A ACTIVIDAD FOSFO- HIDROLASA.....	94

3.4.2. ACTIVIDAD FOSFATASA SOLUBLE....	98
3.4.3. INFLUENCIA DEL pH EN LA ACTIVIDAD 5'NUCLEOTIDASA.....	104
IV. DISCUSION GENERAL.....	109
1. <u>CONSIDERACIONES METODOLOGICAS</u>	110
2. <u>GLICOLISIS E INTERCONVERSION DE FOSFATOS DE ADENOSINA</u>	112
3. <u>LAS VIAS DE PERDIDA IRRECUPERABLE DEL AMP</u>	113
4. <u>DEGRADACION DEL AMP</u>	115
V. CONCLUSIONES.....	123
VI. BIBLIOGRAFIA.....	127

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Los eritrocitos adultos o glóbulos rojos que se encuentran en la sangre periférica, son el resultado de un complicado proceso de desarrollo, a través del cual van cambiando de forma y reduciendo su metabolismo hasta quedar reducido a unas pocas vías, que son estrictamente necesarias para el cumplimiento de su función como transportadores de oxígeno.

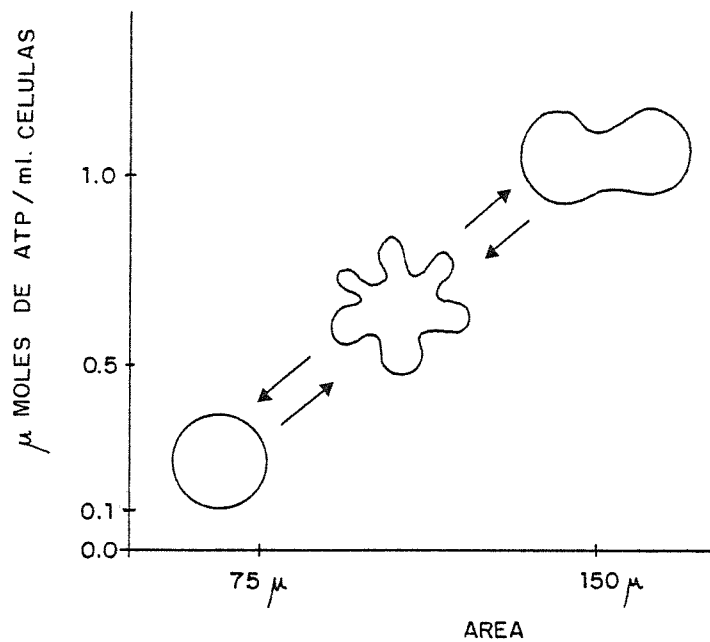
Estos eritrocitos maduros tienen forma bicóncava, con un diámetro externo de 2,4 μ m. Están compuestos por un 71% de agua, 28% de hemoglobina, 7% de lípidos y un 3% de azúcares, sales proteínicas enzimáticas, etc. Clásicamente se considera al eritrocito formado por dos partes: una membrana y una solución concentrada de hemoglobina.

El metabolismo de esta célula no nucleada se reduce a : - glicólisis, vía de pentosas fosfato, alguna vía del metabolismo de purinas y fragmentos incompletos de otras vías, así como actividades enzimáticas aisladas, sin función específica, supervivientes del proceso autolítico poco conocido que ocurre en la fase final de la maduración.

En cuanto a la glicólisis como principal vía metabólica, - se sabe que un 80% de la glucosa consumida se transforma en ácido láctico y un 20% sigue la vía de las pentosas fosfato. En condiciones nor

males, el flujo glicolítico es de $0,02 \mu\text{moles/min} \times \text{ml}$ de células. De esta glicolisis los eritrocitos obtienen fundamentalmente tres cosas:

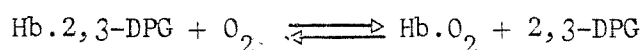
- 1) Energía en forma de ATP, relacionado con el mantenimiento de la peculiar conformación de su membrana, como se puede ver en el esquema siguiente (1,2)



- 2) Poder reductor en forma de NADPH y NADH, empleados en mantener el Fe de la hemoglobina en estado reducido Fe^{2+} , en

el cual actua como transportadora de oxígeno. Los diferentes mecanismos con que cuenta la célula para ésto se representan en la figura nº 1 (3).

- 3) Un metabolito muy importante, el 2,3-DPG, cuya concentración intracelulas es alrededor de 5 mM y que afecta a la capacidad ligante de la hemoglobina para el oxígeno.



Su importancia como efector enzimático de múltiples tipos de acciones se discutirá más adelante.

La regulación de la glicolisis ha sido ampliamente estudiada por dos grupos importantes: I. A. Rose (4, 5, 6, 7, 8) y S. Rapoport (9). De los resultados obtenidos por estos grupos se pueden sacar en resumen, los siguientes puntos relevantes en relación con el presente estudio:

- 1) Todos los enzimas de la glicolisis presentan actividades máximas, en condiciones óptimas, "in vitro", superiores al flujo glicolítico. El exceso va desde aproximadamente 8 para la HK hasta varios miles (1).
- 2) La glicolisis, que con sus vias relacionadas se representan

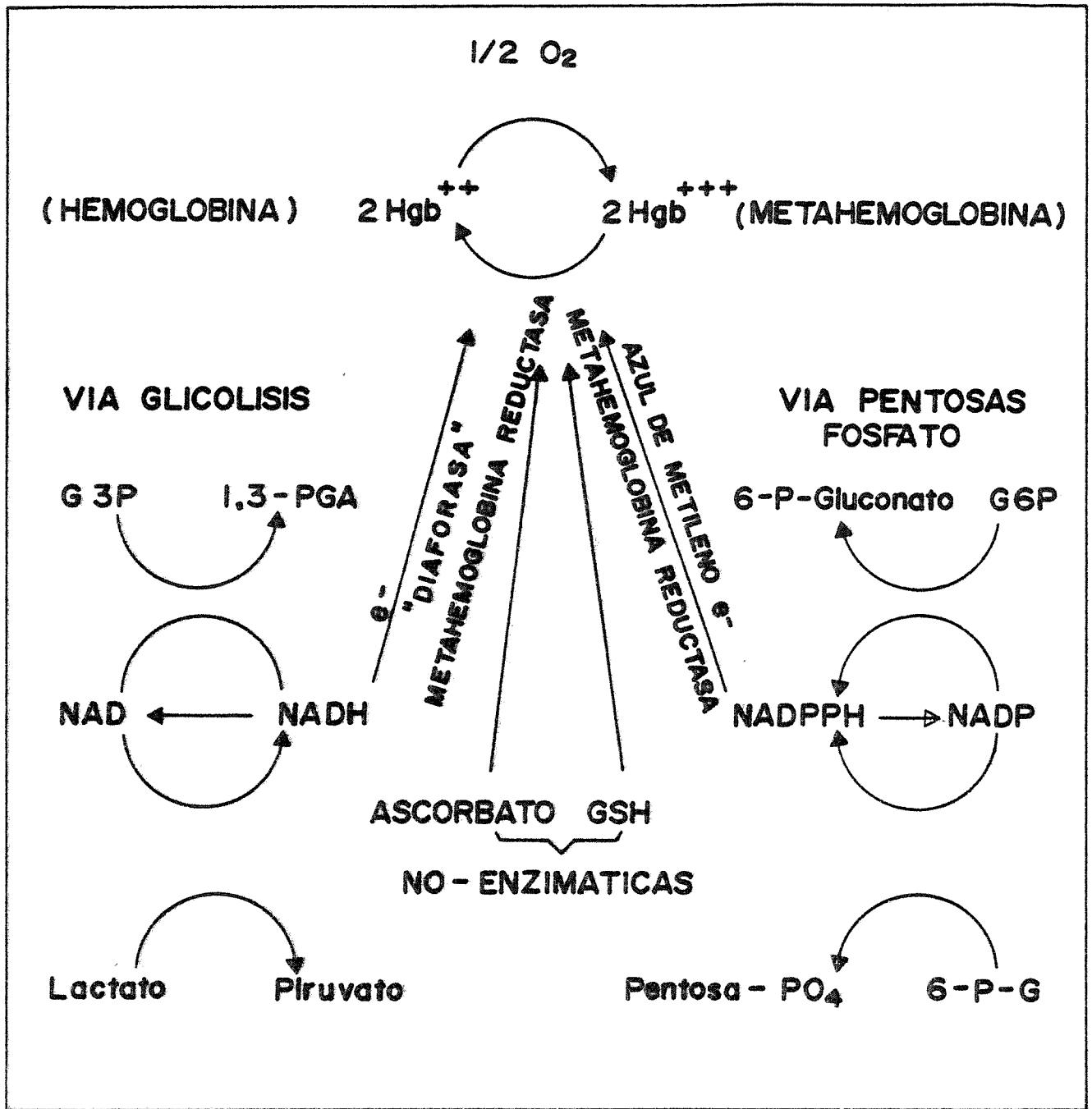


FIGURA Nº 1.- Mecanismos de que dispone el eritrocito para mantener la hemoglobina en estado reducido.

ta en la figura nº2, está regulada por un complejo mecanismo en el que la HK, PFK y PK son los puntos de control, -- aunque el flujo glicolítico en régimen estacionario depende exclusivamente del par HK-PFK. Ambas enzimas tienen propiedades alostéricas y su actividad depende de múltiples efectores. La HK es inhibida por el G6P (10), producto de la reacción, G-1,6-DP y por el 2,3-DPG, competitivamente con ATP.Mg. En condiciones normales su actividad se regula por la relación ATP.Mg/G6P. La PFK a su vez es fuertemente inhibida por ATP, siendo esta inhibición dependiente del pH.

En condiciones fisiológicas y teniendo en cuenta la concentración intracelular de ATP, el enzima sólo funcionaría a un 0,01% de su capacidad; sin embargo esta actividad se ve aumentada al estar presentes ciertos activadores como ADP, G 1,6-DP, F-1,6-DP, G6P y P_i . Entre ellos son particularmente importantes AMP, ADP y P_i en condiciones dentro del rango fisiológico (niveles de concentración, pH...).

Considerando en conjunto el funcionamiento de estas dos enzimas se ve que cuando la glicolisis produce ATP a unas -- concentraciones superiores a su demanda, el ATP se acumula y por un claro efecto "feed-back" tiende a frenarla.

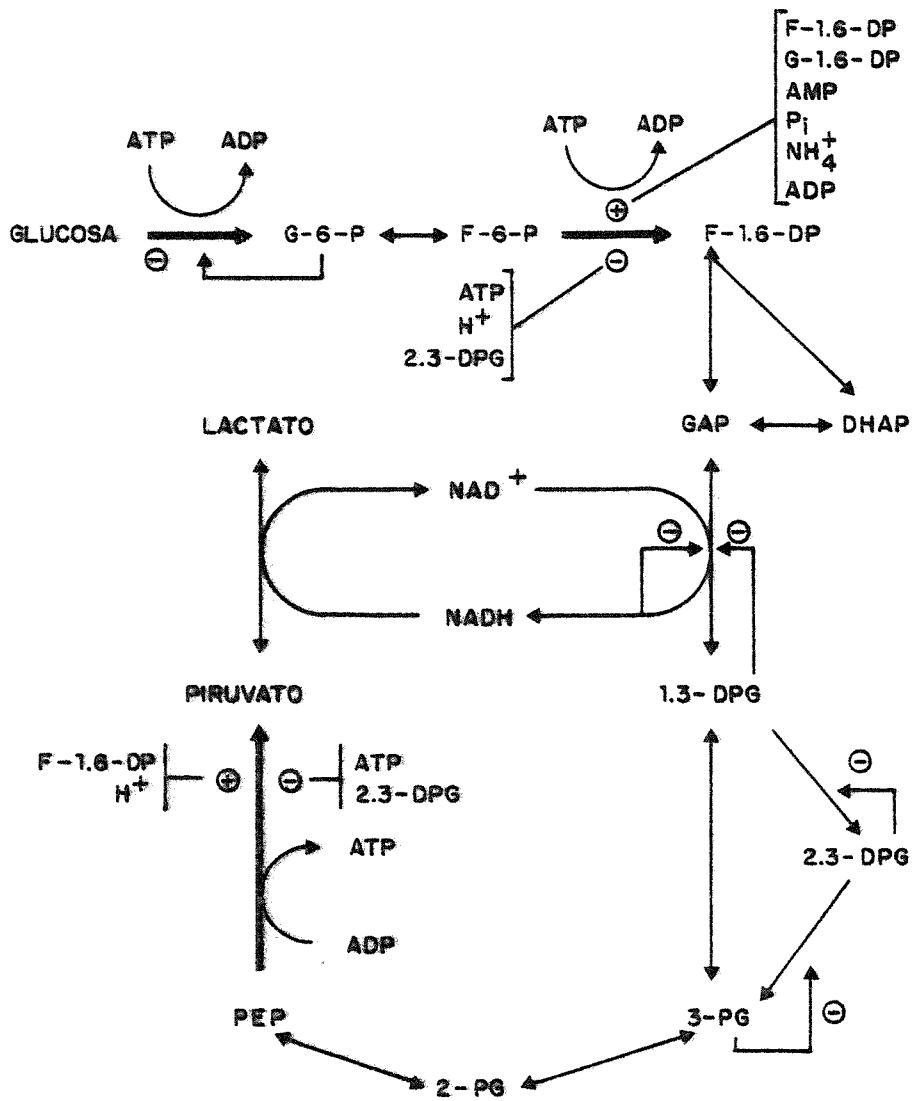


FIGURA Nº 2.- Esquema de la glicolisis en eritrocitos. Influencia de activadores ⊕ é inhibidores ⊖

Cuando el gasto de ATP procude una disminuci3n en las concentraciones intracelulares, con el consiguiente aumento de AMP y P_i , se contrarresta la inhibici3n de la PFK y se restablece la activa glicolisis. Cuando la actividad de la PFK se reduce se acumula F6P y por tanto G6P, traslad3ndose de esta manera el punto de control a la 1ª etapa de la secuencia, como corresponde a una v3a metab3lica -- controlada por su producto final.

- 3) El flujo de G6P hacia la v3a de las pentosas fosfato est3 regulado por la relaci3n $NADP/NADPH$, ajust3ndose al gasto de este 3ltimo, una de cuyas principales funciones es mantener reducido el hierro del grupo hemo de la hemoglobina.
- 4) Los niveles de tri3sa fosfato y fosfoglicerato (ciclo de Rapoport) se ajustan al flujo glicol3tico, teniendo un papel importante la PK que es un enzima alost3rico de regulaci3n compleja y sometido a varios efectores (11).

El cuadro descrito permite explicar la observaci3n de que los niveles de metabolitos son bastante constantes en los eritrocitos circulantes (Tabla 1).

En relaci3n con el mantenimiento de los niveles de nucle3tidos de adenina en el eritrocito circulante, se ha comprobado que estas c3-

Glucosa	5 mM
G6P	38,5 μ M
F6P	15,7 μ M
F-1,6-DP	7 μ M
DHAP	17 μ M
GAP	5,7 μ M
1,3-DPG.....	0,4 μ M
2,3-DPG	5,7 μ M
3-PG	68,5 μ M
2-PG	10 μ M
PEP	17 μ M
Piruvato	85 μ M
Lactato	1,43 mM
ATP	1-2 mM
ADP	0,1-0,2 mM
AMP	0,05-0,1 mM
P _i	1 mM
NAD ⁺ / NADH.....	985

TABLA 1.- Concentraciones de metabolitos intermediarios de la glicolisis en eritrocitos humanos.

lulas poseen una abundante AK que regula el equilibrio $ATP+AMP \rightleftharpoons 2ADP$ con gran eficacia; se ha postulado que la relación de masas de estos tres compuestos se mantiene en valores próximos a la constante de equilibrio que es aproximadamente 1 (12).

En estrecha relación con los niveles expuestos de adenosín fosfatos, merece mención el concepto de carga energética, propuesto y desarrollado por Atkinson (13), quien en hígado y músculo ha demostrado ampliamente la existencia de un mecanismo de regulación integrada, por el cual las células tienden a mantener el valor de este parámetro, cuya expresión es $\frac{ATP + \frac{1}{2} ADP}{ATP + ADP + AMP}$, en el intervalo de 0,7 - 0,9.

En el caso del hígado el valor de la carga energética aumenta cuando la concentración de AMP disminuye; en este caso el AMP se transforma en IMP vía AMP-deaminasa. Este enzima presenta una actividad en hígado relacionada directamente con la carga energética; su actividad decrece cuando la suma de adenín nucleótidos está por debajo del rango fisiológico.

La situación de los eritrocitos es peculiar por la irreversibilidad de la transformación $AMP \rightarrow IMP$, en contraposición con los tejidos estudiados por Atkinson. Por ello, si la actividad que transforma el AMP en IMP fuese suficientemente alta, no se podría mantener la carga energética y la abundancia de AK tendería a ser un inconve-

niente al favorecer la pérdida irreversible de AMP.

Entre las causas de deterioro de la sangre conservada en los bancos de sangre, la que afecta a la función de los eritrocitos como transportadora de oxígeno, es de la mayor importancia. Por esta razón, ha sido objeto de preocupación entre hematólogos y bioquímicos.

La paradójica situación de una demanda creciente de sangre en los centros hospitalarios, mientras es frecuente desechar por inservible una cantidad nada despreciable de ella, justifica el elevado número de publicaciones que aparecen cada año, conteniendo estudios sobre alguna faceta del complejo problema de la conservación de la capacidad transportadora de los eritrocitos almacenados en banco de sangre.

A medida que el progreso de la Bioquímica ha permitido - clarificar, a nivel molecular, el transporte de oxígeno por la hemoglobina y los factores que influyen sobre él, se ha ido dibujando con creciente claridad la red de acontecimientos que ocurren en los eritrocitos a lo largo del tiempo de almacenamiento de la sangre, y se han podido definir unos puntos clave de cuyo conocimiento detallado, parece depender la esperanza de mejorar la situación, bien frenando - las causas del deterioro, bien intentando contrarrestarlo restaurando las condiciones que prevalecen en los eritrocitos circulantes.

A continuación exponemos, en forma muy sucinta, los principales descubrimientos que, progresivamente, han llevado el conocimiento al punto en que se encontraba en el momento de empezar este trabajo, así como de las lagunas y aparentes incongruencias que lo motivaron.

Prescindiendo de informaciones anteriores al periodo de los últimos veinte años, por evidente falta de base bioquímica adecuada al planteamiento del problema actual, encontramos que entre los años 1955 - 1965 había quedado bastante inequívocamente sentado el papel del 2,3-DPG en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y la dependencia de dicho compuesto de la glicolisis. También se había acumulado un cuerpo de evidencia que, pese a considerables lagunas y contradicciones, apuntaba a que los eritrocitos de sangre conservada pierden gradualmente su capacidad glicolítica (14); la desaparición del 2,3-DPG, así como de otros metabolitos fosforilados, es imputable a la acción de las fosfatasas; dada la ubicuidad y multiplicidad de actividades fosfatasas en todas las células, se tiende a admitir sin discusión que todo compuesto fosforilado, sobre todo si alcanza concentraciones considerables dentro de la célula, será hidrolizado y sólo mantendrá tales concentraciones gracias a una resíntesis igualmente activa. En particular, el 2,3-DPG es sustrato de una fosfatasa, al parecer específica, del orden de 1mU/ml de células empaquetadas (15).

Si las varias actividades fosforilantes cesan o actúan por debajo de los mínimos necesarios, puede ser por una de estas dos razones: a) Inactivación de las correspondientes fosfotransferasas (ó kinasas); b) Ausencia de donadores de grupo fosforilo, básicamente ATP.

Hay evidencias de que la mayoría de las actividades fosfo-transferasas están presentes en los eritrocitos circulantes en gran exceso sobre las necesidades de la célula (Tabla 2), y de que estas actividades se mantienen esencialmente inalteradas en la sangre conservada varias semanas en las condiciones del banco de sangre (16, 17). La conclusión de la que también hay evidencia experimental (18), es que falta el ATP necesario para la fosforilación.

Relacionando esta observación con las apuntadas anteriormente sobre una activa AK y una adelinato deamiasa (ADA), se podría avanzar la hipótesis de que ante una situación de baja actividad glicolítica por la causa que fuere, los niveles de ATP bajarían sin que pueda acumularse AMP (a causa de la ADA) ni ADP (a causa de la AK). En consecuencia bajaría la suma total de adenosin fosfatos sin posibilidad de recuperación a menos que se incorporen a las células precursores válidos de cualquiera de los adenosin fosfatos, ya que éstos no atraviesan la membrana celular. La Figura 3 resume las vías de transformación de los adenin nucleótidos en eritrocitos.

La evidencia de que ésto es precisamente lo que ocurre, -

	<u>U/ml. células</u>
HK	0,16-0,4
PGI.....	6,6-11
PFK.....	0,8
Aldolasa.....	0,4 -0,6
TPI.....	116-300
GaPOH.....	10-13
PGK.....	27
PGM	5
Enolasa.....	1,5-2,4
PK.....	3,6-4,1
2,3-DPGM.....	3,5-4,3
2,3-DPGPasa.....	$1 \cdot 10^{-3}$
LDH.....	17-20
G6PDH.....	0,6-1,6
AK	30-120
PNPasa.....	16-26
PPRTasa.....	0,2
ATPasa.....	2,5-3,7
TA.....	233
TK	0,03-0,6
Fosforibosa mutasa.....	1

TABLA 2.- Actividades enzimáticas en eritrocitos humanos (34)

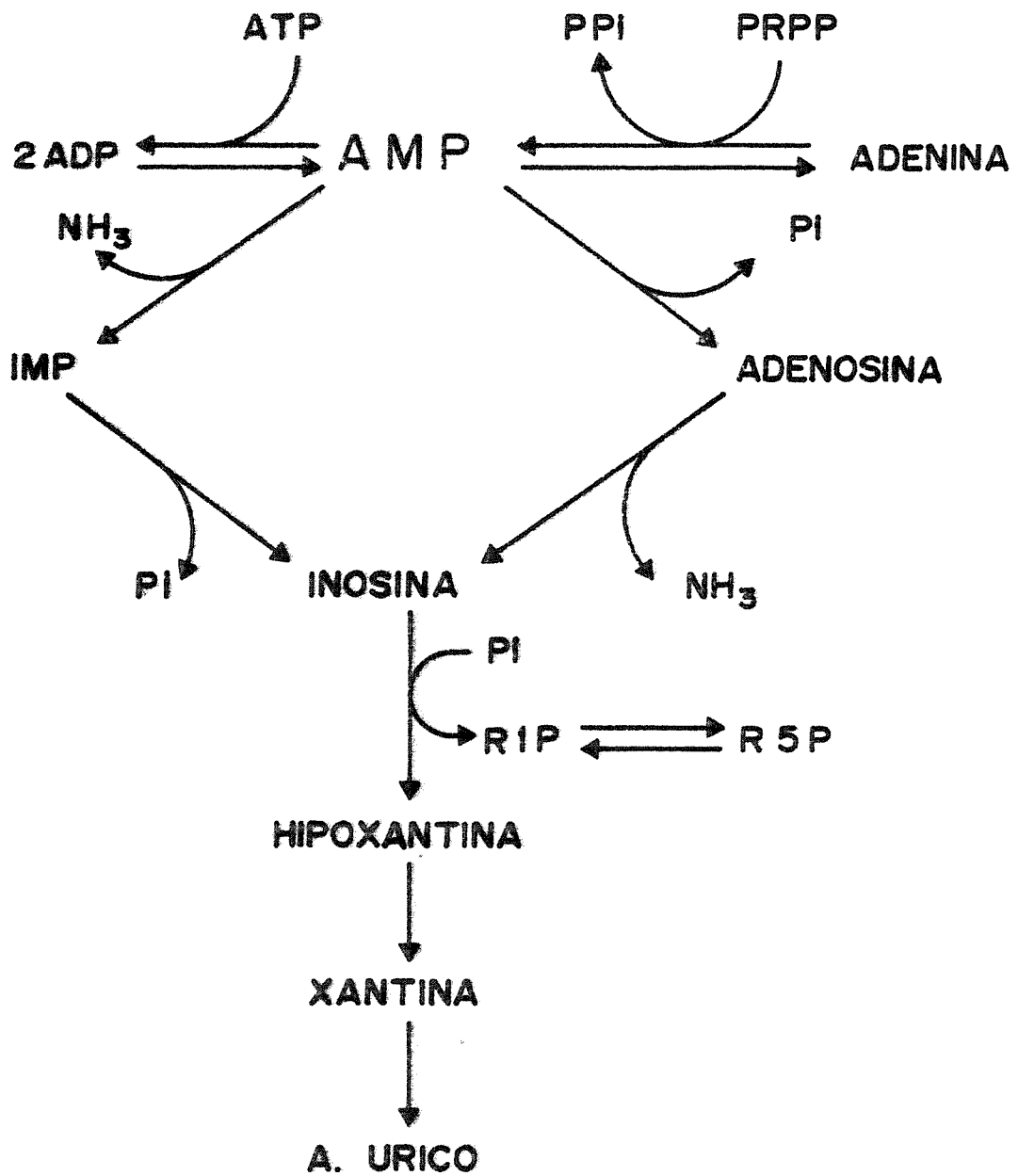
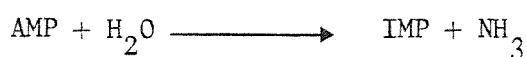


FIGURA Nº 3.- Vías de interconversión del AMP en eritrocitos humanos.

si no concluyente, es lo bastante fuerte para justificar una indagación en busca de los mecanismos responsables. Sin embargo se plantean serias objeciones cuando se intenta evaluar hasta qué punto la actividad ADA y sus mecanismos reguladores dan cuenta de que los eritrocitos conservados pierden sus reservas de adenosinfosfatos en pocos días mientras los circulantes la conservan prácticamente la casi totalidad de su vida (unos 4 meses).

La adenilato deaminasa (ADA) ó AMP-aminohidrolasa cataliza la reacción



y se encuentra ampliamente distribuida en tejidos animales; existen diferentes isozimas que presentan diferente especificidad de substrato, siendo el de eritrocitos altamente específico para el 5'AMP.

Los escasos estudios existentes sobre las propiedades cinéticas de la ADA de eritrocitos humanos realizados con hemolizados diluidos (19) ó con preparados parcialmente purificados (20,21), indican que se trata de un enzima alostérico, sometido a un sistema regulador bastante complejo. Los rasgos esenciales son: una curva de saturación sigmoide en ausencia de iones K^+ que se aproxima a hiperbólica con KCl 0,1M; en cuanto a efectores, ATP tiende a suprimir la sigmoicidad mientras que el 2,3-DPG y el Pi la acentua (ambos efecto

res a concentraciones del orden de las que hay en los eritrocitos); en cuanto al efecto inhibitor del GTP, los resultados son contradictorios; igualmente confuso es el efecto que el Mg^{2+} pueda tener a través de su formación de complejos con los nucleosidos trifosfatos.

Por otra parte, se ha afirmado (22) que en eritrocitos humanos hay en realidad dos enzimas, uno ligado a la membrana por su cara interna y otro soluble en el citoplasma, con propiedades cinéticas bastante diferentes.

Si las propiedades indicadas prevaleciesen en el enzima de los eritrocitos circulantes la ADA se encontraría en situación próxima a máxima activación y sus propiedades reguladoras prácticamente suprimidas mientras que en los eritrocitos conservados, el balance de dos efectos contrarios (disminución de la concentración del activador ATP y de los inhibidores 2,3-DPG y GTP con incrementos de la concentración de Pi inhibitor) sumado al cambio de pH daría un resultado impredecible, aunque no sería de esperar mayor activación que la de eritrocitos circulantes. Esta situación parece pues contradictoria con el hecho de que los eritrocitos circulantes conservan su AMP y los conservados no.

Otra vía de pérdida de los adenin nucleótidos es la catalizada por el enzima 5'-nucleotidasa. Este enzima es abundantemente distribuido en la naturaleza y ha sido objeto de numerosos estudios

en la década pasada. Los enzimas de diferentes fuentes presentan algunas propiedades comunes pero también numerosas diferentes, sobre todo en cuanto a especificidad de substrato se refiere (23, 24, 25, 26).

La 5'-nucleotidasa de hígado de rata es una de las mejores estudiadas. En este sentido se ha localizado este enzima en tres partes: Una en la membrana celular, otra en el citoplasma y una tercera lisosomal. La 5'-nucleotidasa soluble, parcialmente purificada, presenta cinética hiperbólica (K_m 1,2 mM.) usando IMP como substrato, mientras que con AMP la cinética es sigmoide y su $S_{0,5}$ es 10 mM. siendo la V_{max} similar con ambos substratos. La actividad es estimulada por ATP y GTP e inhibida por P_i . En condiciones fisiológicas de la célula hepática, el AMP no es hidrolizado por este enzima sino que requiere una desaminación previa a IMP (27).

Una incognita de mayor cuantía que podría tener la clave de las aparentes incongruencias que se han señalado es hasta qué punto el comportamiento de los enzimas y sus efectores en el medio intracelular, con su carga de hemoglobina, es similar a la que pueda observarse en las condiciones en que se han valorado los parámetros cinéticos de la ADA, en un medio muy diluido en cuanto a proteína y libre de metabolitos que no sean los objeto de ensayo. Hay evidencia de que la Hb tiene una marcada capacidad de ligar moléculas pequeñas, sobre todo fosforiladas (28, 29) por lo que las concentraciones eficaces de

los metabolitos en los eritrocitos intactos pueden ser muy inferiores a las que se valoran como totales en extractos diluidos y desproteinizados.

Además de las incógnitas señaladas, queda por considerar el capítulo del efecto que la adición al medio de almacenamiento de adenina, inosina y mezcla de ambas pudiera tener sobre el proceso de pérdida global de adenosin-fosfatos, así como el efecto "rejuvenecedor" de la adición de estas bases a eritrocitos conservados unas 3 semanas en el medio habitual de citrato y glucosa.

Una observación empírica en su origen y ampliamente justificada más tarde, por un mayor conocimiento de las secuencias metabólicas implicadas, fué el efecto favorable de la adición de adenina, inosina y una mezcla de ambas, sobre la función transportadora de los -- eritrocitos (30, 31, 32), así como de la posibilidad de restablecer -- la capacidad transportadora y la morfología de los eritrocitos envejecidos mediante una incubación con adenina e inosina; de esta última se decía que de algún modo reemplazaba a la glucólisis perdida en estas células envejecidas en las bolsas del banco de sangre (33).

En este contexto, nuestra situación en la Facultad de Medicina de la U.A.M., nos puso en contacto con el banco de sangre de la R.S. "La Paz", y por otra parte, con un grupo del Instituto de Enzimología preocupado por el estudio de las actividades enzimáticas de con

diciones lo más fisiológicas posible. En este sentido los "ghost" - reconstruidos (34) y los eritrocitos grapados y permeabilizados (35), estaban recibiendo gran atención. En tales circunstancias se nos propuso el estudio de hemolizados, sin dilución apreciable, obtenidos - por congelación y descongelación, a partir de los eritrocitos de sangre de 21 días, fecha en la cual se desecha en el banco como inservible.

Tal sistema se aproxima a la realidad de las células intactas más que ningún otro estudiado hasta ahora. La ausencia de orgánulos y compartimentaciones membranosas internas en los eritrocitos permite esta aproximación que plantea, por otra parte, serias dificultades analíticas y cierto artefacto en cuanto a la inclusión en la masa reaccionante de los enzimas de la membrana que en la célula intacta se sitúan en la cara externa.

Por otra parte, el trabajar en estas condiciones presenta varias ventajas, entre las que cabe destacar:

- 1ª. Se conservan las interacciones a que dé lugar la presencia de la hemoglobina, bien sea con otras proteínas o con metabolitos.
- 2ª. Las concentraciones reales de metabolitos serán virtualmente las mismas que hay "in vivo".

- 3ª. La fragmentación de la membrana permite introducir -- cualquier compuesto incluso los que por su carga -- iónica no atraviesan la membrana celular y por tanto no pueden ser incorporados a las células intactas.
- 4ª. En principio, se minimizan los problemas de disociaciones provocados por la dilución, que introducen -- una gran incertidumbre en los datos experimentales existentes hasta ahora.

Dominadas las dificultades experimentales que plantea el trabajo con hemolizados sin diluir, nuestro objetivo fue estudiar el estado de la glicolisis en estos eritrocitos al término de su conservación en el banco (21 días), investigar las posibles vías responsables de la pérdida irreversible del ATP, así como los recursos por los que los eritrocitos circulantes evitan tal pérdida, para lo cual se utilizaron como referencia eritrocitos recién extraídos. Finalmente, comprobar la regeneración de los niveles de adenosin fosfatos a partir de mezclas de adenina e inosina y establecer las bases enzimáticas de tal regeneración.

El estudio detallado de las posibilidades de acción de la dotación enzimática de los eritrocitos conservados, establecidas mediante sus hemolizados a los que se incorporan los substratos y efectores necesarios para valorar adecuadamente cada uno de los factores

implicados en el deterioro y regeneración de la glicolisis en estas células, puede conducir a clarificar la contribución de los diferentes factores y a una evaluación de las posibilidades de reducirlo o contrarrestarlo.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. CASAS COMERCIALES Y PRODUCTOS

- B.D. H. (Inglaterra)
- Boehringer Mannheim Gmgh (Mannheim-Alemania)
- Carlo Erba (Milan-Italia)
- Fischer Scientific Co. (U.S.A.)
- Macherey Nagel Co. (Alemania Occidental)
- Merck (Darmstadt-Alemania)
- May and Baker Ltd. (Inglaterra)
- Probus (Barcelona-España)
- Riedel de Haën (Hannover-Alemania)
- Sigma Chemical Co. (U.S.A.)
- Whatman W.R. Balston Ltd. (Inglaterra)

- Azúcares y metabolitos relacionados
 - Glucosa anhidra,(M&B)
 - Ribosa-5-fosfato,(Sigma)
 - α -ceto glutarato,(Sigma)
 - 2,3-DPG,(Sigma)

- Enzimas auxiliares y nucleotidos
 - HK, G6PDH, LDH, PK, AK, GO, POD, (Boehringer)
 - GDH, (Sigma)

NAD, NADH, (Boehringer)

NADP, (Sigma)

ATP, GTP, IMP (Sigma)

ADP, AMP, (Boehringer)

- Productos para cromatografía

Acido clorhídrico, (Merck)

Acetato sódico, (Merck)

Alcohol isopropílico, (M & B)

Carbón activo, (Carlo Erba)

Celulosa pura (Whatman)

DEAE-Celulosa 300-MN (Macherey Nagel)

Etanol (Merck)

Hidróxido sódico, (Scharlau)

Sulfato amónico (Riedel de Haën)

Trietil amina, (Fischer)

- Otros productos

- . Acido 1-amino, 2-naftol, 4-sulfónico, ácido sulfúrico, cloruro magnésico y potásico, EDTA, glicocola, molibdato amónico, sulfato de hidracina, (Merck).
- . Adenina sulfato, hemoglobina, inosina, orto-dianisidina, imidazol, (Sigma).
- . DTE, tritón X-100, (BDH)
- . Bisulfito sódico, (Fisher)

- . Bicarbonato sódico, Cloruro sódico, (Probus)
- . Cianuro y ferrocianuro potásico

2.1.2. APARATOS

- CENTRIFUGAS

.Sorval SS-3 automatic, con rotor SS-34, situada en la cá
mara fria a 4°C. Fue utilizada para la separación y l
ava
do de los hematies.

.Wifug Labor, usada en la separación de precipitados de -
desproteínización.

- CICLOMEZCLADOR

.Mixo-Tub, para la agitación de las muestras de incubación.

- BAÑOS METABOLICOS

.Grant, con movimiento de vaiven, para la incubación de
las células enteras.

.Hemmert, termostatzado, para las incubaciones de los hemoliza
lizados.

- POTENCIOMETRO

. Metrohm E510 con expansión de escala para las medidas de
pH.

- ESPECTROFOTOMETROS

.Spectronic 700 de Bausch and Lomb cubetas de 3 ml.

. Gilford 2400, cubetas de 1 ml

- MICROSCOPIO

- . Nikon equipado con dispositivo de contraste de fases y cámara cuentaglóbulos Brand.

- UTENSILIOS DE CROMATOGRAFIA

- . Para la realización de las placas se utilizó un "cromatoplas" Shandon Unoplan y placas de vidrio de 20x20 cms. El desarrollo de la cromatografía se hizo en cámara de vidrio Shandon y para el secado de las mismas se utilizó una estufa Electro Helios termostaticada.

- CAMARAS FOTOGRAFICAS

- . Nikon F-2 con objetivo de 35 mm. para la fotografía de la placa cromatográfica.
- . Nikon acoplada al microscopio para hacer las fotografías de los hematies.

- DESTILADOR

- . Hucoa Erlöss (Fisons) usado para obtener agua sin amoniac poniendo 2 gm. de permanganato potásico en el depósito de destilación. El agua así obtenida se utilizó en todos los experimentos que requerían valoración de amonio.

2.1.3. MATERIAL BIOLÓGICO

En todos los experimentos se utilizaron hematies procedentes de bolsas de sangre conservadas 21 días en medio CPD;

del banco de sangre de la Residencia Sanitaria La Paz. El medio CPD, contiene para un volumen final de 100 ml.: 327 mg. - de ácido cítrico monohidrato, 2,63 g. de citrato sódico dihidrato, 222 mg. de fosfato monosódico y 2'32 g. de dextrosa.

En alguna ocasión se utilizarón hematies de bolsas de sangre con sólo 1 día de conservación.

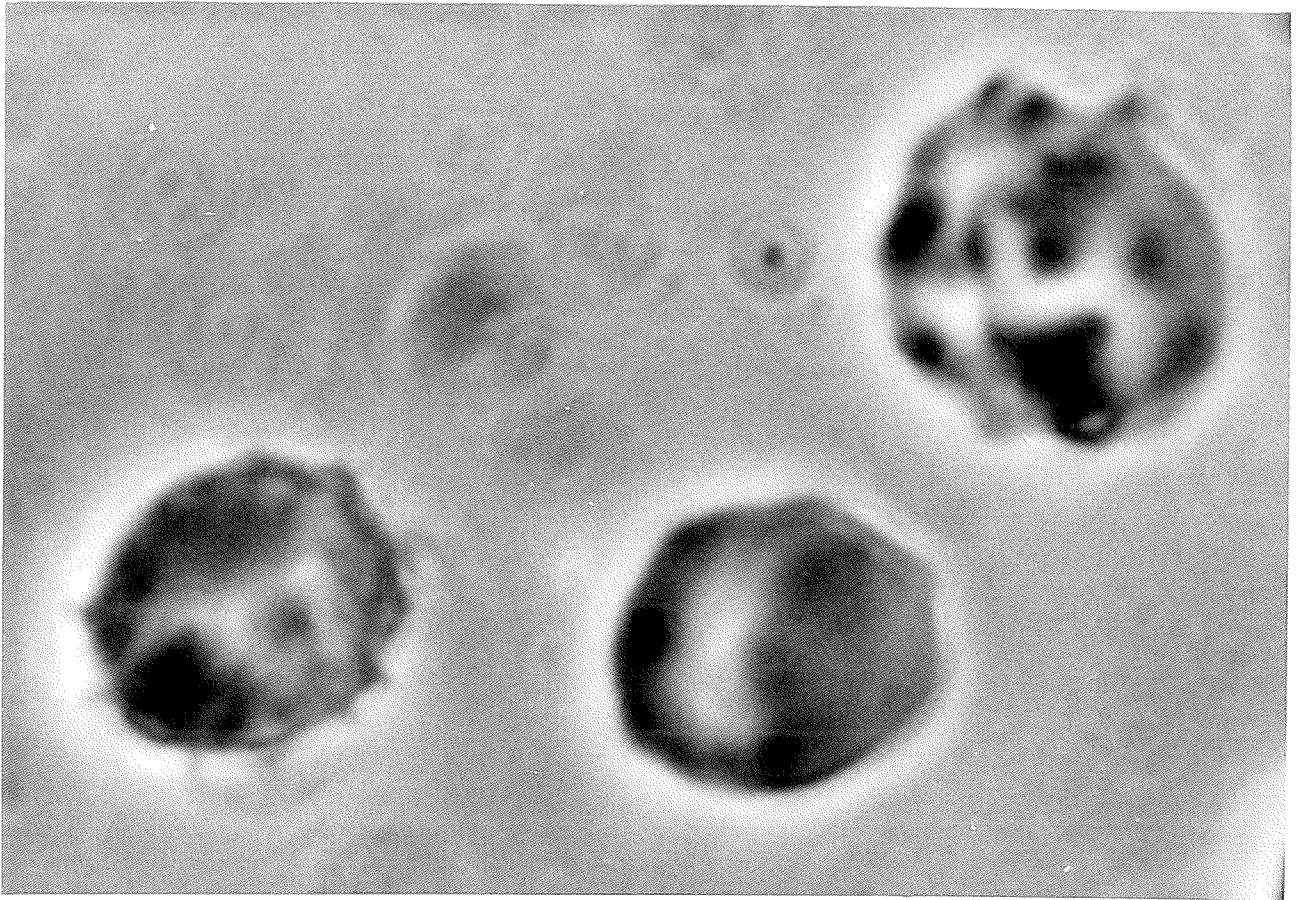
A) Obtención de hematies

La sangre total se centrifuga en la cámara fría a 4°C, a 3.500 r.p.m. durante 5 min.; se elimina el sobrenadante con una pipeta Pasteur; al igual que la capa superior del sedimento que presenta un aspecto blanquecino y que es tá constituida por los leucocitos.

El sedimento celular se lavó tres veces con 10 -- vol. de un medio que contenía: ClNa 0'9 %, imidazol 25 mM. pH 7'2, GSH 0'25 mM. y glucosa 5 mM.

Las centrifugaciones intermedias se hicieron en - las mismas condiciones que la inicial.

Como control, se hicieron recuentos de leucocitos en el sedimento celular ya lavado; en todos los casos resul tó negativo.



FOTOGRAFIA Nº 1.- Eritrocitos obtenidos de sangre de banco conservada en medio CPD durante 21 días. Dilución 1/1000 aumentos en microscopio NIKON.

Contaje de leucocitos.- Se hizo suspendiendo 0'1 ml. de sedimento celular en 0'9 ml. de líquido para conta-
je de leucocitos, y colocando una alicuota de esta suspensión en la cámara cuentaglóbulos. Un litro de líquido para contaje de leucocitos contiene 40 ml. de ácido acético y unas gotas de solución acuosa al 2% de azul de metileno.

Observación de los hematies.- Se tomó una alicuota del sedi-
mento de hematies y se suspendió en solución salina (ClNa 0'9%). 10 l. de esta suspensión se colocaron en un portaobjetos y se observaron al mi-
croscopio entre 1000 y 1500 aumentos; ver fotogra-
fía nº 1, obtenida de estas células.

B) Preparación de los hemolizados

- Hemolizados sin dilución.- Porciones de aproximadamente 3 ml. del sedimento celular se pusieron en tubos de nitrato de celulosa y se congelaron a -70°C , y posteriormente se descongelaron a $+37^{\circ}\text{C}$; este ciclo se repitió tres veces consecutivas por periodos de 3 min. Una alicuota de este hemolizado se suspendió en el medio de lavado y se miró al microscopio como control de eficacia de

esta operación.

Un esquema de la preparación se representa en la figura nº 4.

- Hemolizados diluidos 1/5.- Un volumen del sedimento celular se hemolizó con 4 vol. de agua destilada y se centrifugo a 13.000 r.p.m., durante 40 min. a 4°C. El sobrenadante así obtenido, libre de restos de membranas. fue dializado 20 horas frente a 40 vol. de agua destilada, en cámara a 4°C, y seguidamente utilizado.

Un esquema de esta preparación se representa en la figura nº 5.

2.1.4. MEDIOS DE INCUBACION

Fueron utilizados diferentes medios según el tipo de material biológico usado.

- CELULAS ENTERAS.- Medio de incubación Krebs-Ringer-Fosfato (KRF), que contenía: Glucosa 10 mM. Cl_2Mg 5 mM.; - Clk , 4 mM.; $ClNa$, 115 mM. y tampón fosfato 20 mM pH 7.2 .
- HEMOLIZADOS ENTEROS.- Medio de incubación imidazol-bicarbonato (MIB), que contenía: bicarbonato potásico para llevar el pH del hemolizado de aproximadamente 6'7 hasta

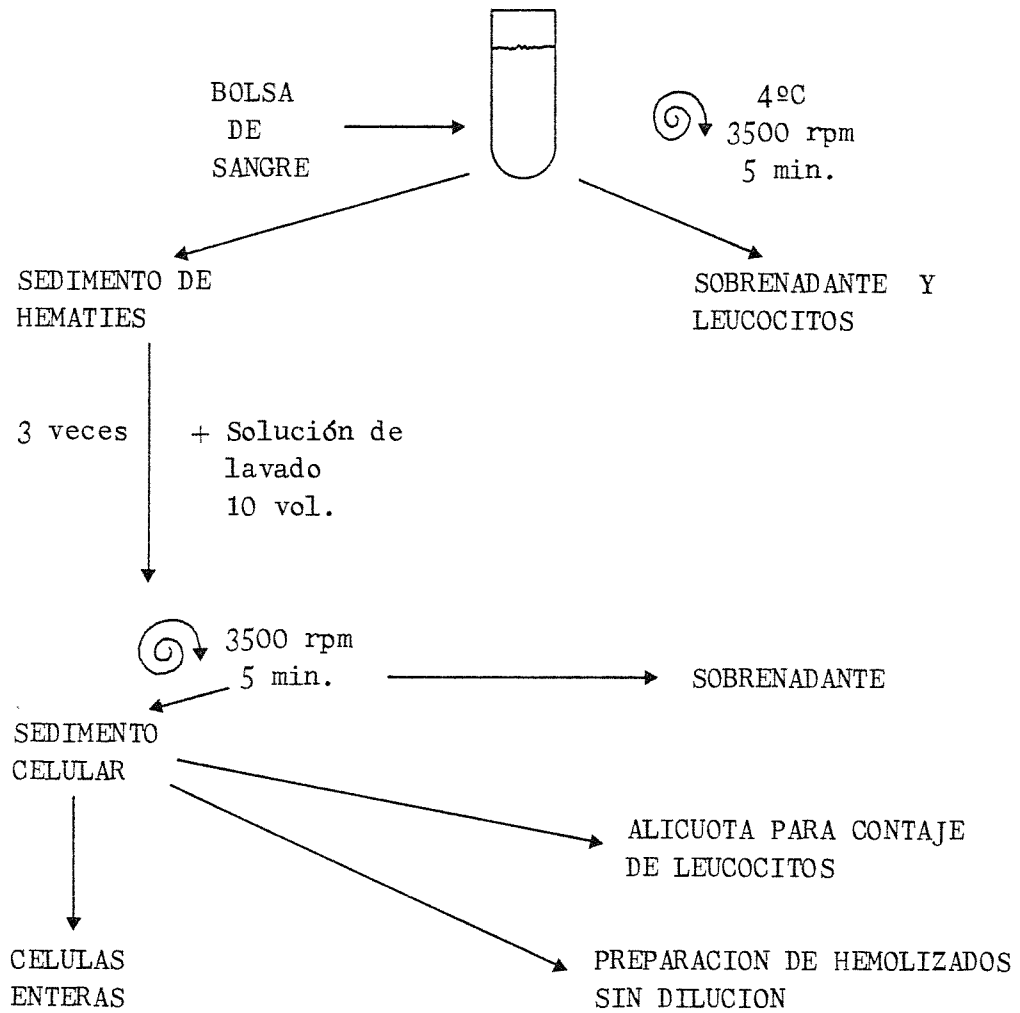


FIGURA Nº 4.- Esquema de la preparación de hemolizados sin diluir.

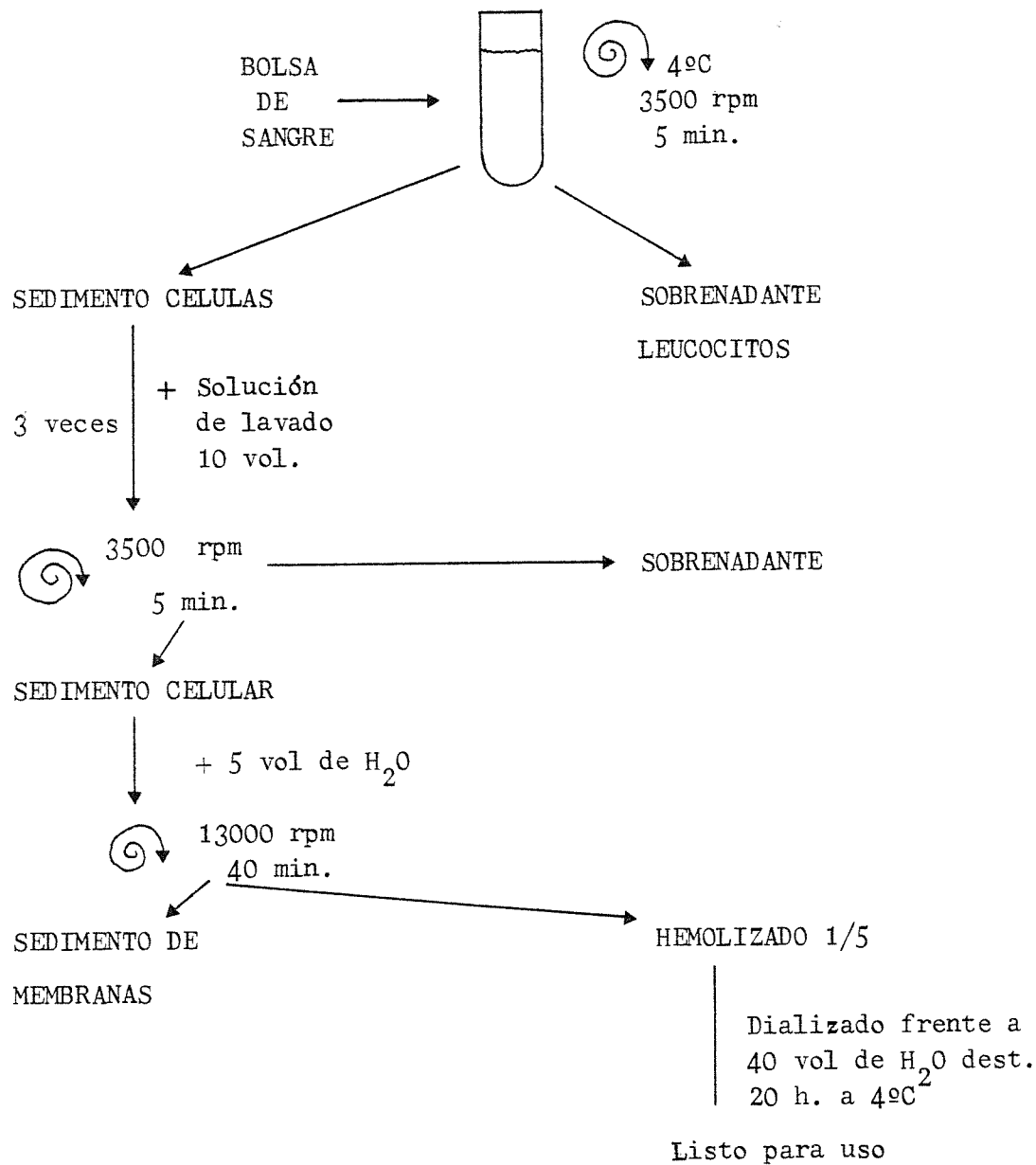


FIGURA Nº 5.- Esquema de la preparación de hemolizados diluidos.

7,2, y tampón imidazol pH 7'2, 50 mM. (fue ampliamente - comprobada la capacidad tampón de este medio).

- HEMOLIZADOS DILUIDOS.- Según el pH: tampón imidazol 50 mM pH 7'4 ó tampón tris-maleato 50 mM. pH 6'3 con NaOH, más CLK, 30 mM.; Cl_2Ca . 4 mM. y Cl_2Mg . 5 mM.

2.1.5. FORMA EN QUE SE REALIZARON LAS INCUBACIONES

A) Incubación de los hemolizados

Un volumen determinado de muestra (variable según el número de determinaciones que se requerían para el experimento), que oscila entre 5 y 25 ml., se incubó en un baño de agua Hemmert termostatzado a 37°C. Al hemolizado, ya a esa temperatura, se le añadió en 1^{er} lugar el medio MIB pH 7'2 y después las adiciones propias de cada experimento agitando la mezcla final. Los tiempos de adición y mezclado son despreciables frente a los tiempos de incubación.

De esta mezcla de incubación se fueron sacando - alicuotas de 0'5 ml., generalmente, y se desproteinizaron con 1 ml. de ácido perclórico al 0'9 % frío; se agitaron y se dejaron en hielo unos 30 min.. El precipitado formado se separó por centrifugación a 4500 r.p.m.

10 min.. El sobrenadante se neutralizó con KOH y se llevaron a un volumen final igual para todas las muestras con agua destilada. Después de 10 min. en hielo se retiró el precipitado de perclorato potásico formado, por centrifugación en las mismas condiciones.

Los sobrenadantes son usados para las valoraciones propias de cada experimento.

Las incubaciones de hemolizados con adición de bases (inosina, adenina, ...) se hicieron en baño termostático con agitación, para poder establecer comparaciones con las células enteras.

En el caso de los hemolizados diluidos el procedimiento seguido para su incubación y toma de muestras fue el mismo que para los hemolizados totales pero usando el medio de incubación que se ha detallado en el apartado anterior.

B) Incubación de las células enteras

Las células enteras lavadas 3 veces con KRF, se preincubaron en el mismo medio (5 ml. de células y 10 ml. de medio) a 37°C con adición de adenina 2mg/ml.

más inosina 8 mg./ml. en baño termostático durante 2 horas. Después se lavaron con KRF frío 3 veces.

Un mililitro de células empaquetadas en 3 ml. de KRF se incubaron a 37°C en el mismo baño durante 1 hora. A tiempos diferentes se sacaron muestras de 100 μ l. y se desproteinizaron por el método descrito anteriormente.

En los sobrenadantes así obtenidos se hacen -- las diferentes valoraciones.

Los resultados son media de al menos 3 experimentos con sangre de diferentes bolsas. Las muestras de los diferentes tiempos de incubación fueron hechas por triplicado.

2.2. METODOS

2.2.1. OBTENCION DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO

A partir de la mezcla total de incubación y a diferentes tiempos, se extrajeron 0,5 ml. de mezcla y se desproteinizaron con 1 ml. de ácido perclórico al 0,9% frío; se agitaron y se dejaron en hielo unos 30 min., se centrifugaron a 4500 r.p.m. - 10 min. para separar el precipitado formado. El sobrenadante se neutralizó con potasa y el precipitado de perclorato potásico se retiró por centrifugación en las mismas condiciones. El sobrenadante así obtenido fue utilizado para diversas valoraciones.

2.2.2. VALORACION DE GLUCOSA

Se utilizó el reactivo de Glucosa oxidasa siendo el intervalo de valoración de 0,05 a 0,1 mM. y la longitud de onda de 425 nm.

Reactivo de glucosa oxidasa.

- Tampon fosfato 50 mM pH 6'5
- Triton X-100 al 0,4%
- Orto-dianisidina 0,1 mg/ml (etanol)
- Glucosa oxidasa 4 U/ml.
- Peroxidasa 1 U/ml
- EDTA 2 mM.

2.2.3. VALORACION DE LACTATO

Según la reacción:



Mezcla de ensayo: Tampón glicocola-hidracina pH 9'5 --
 NAD^+ 2'5 mM y LDH 20 U/ml. leyendo el incremento de absorban-
 cia a 340 nm pasados 10 min.

Tampón glicocola-hidracina: Para 10 ml. finales contie-
 ne 0,75 g. de glicocola, 0,52 g. de sulfato de hidracina y 0'02
 g. de EDTA ajustando el pH final a 9'5 con NaOH 2 N (36).

2.2.4. VALORACION DE FOSFORO INORGANICO.

Siguiendo una adaptación del método de Fiske & Subbarow
 (37):

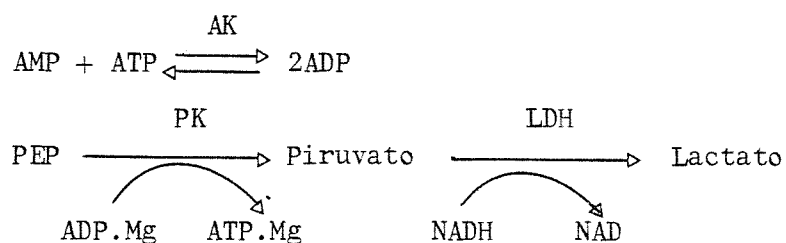
Mezcla de ensayo: Molibdato ácido 0'2 ml. EICO 2'5 --
 mg/ml. en un volumen final de 2 ml. Leer absorbancia a 660 nm.

Molibdato ácido: 2'5 g. de molibdato amónico en 100 ml.
 de ácido sulfúrico 5 N.

EICO: Acido 1-amino, 2-naftol, 4-sufónico, 0.2 g. bi-
 sulfito sódico 1,2 g., sulfito sódico 1,2 g. mezcla-
 dos y machacados en mortero. En el momento de usar-
 lo se disuelven 2'5 mg/ml.

2.2.5. VALORACION DE AMP

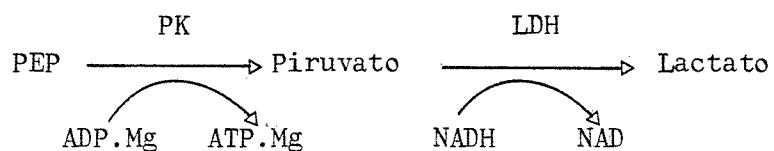
Usando el sistema acoplado de PK, LDH y AK (38), según la reacción:



Mezcla de ensayo: Tris-ClH 50 mM. pH 7.5. ClK 100 mM.
 Cl_2Mg 10 mM., PEP 5 mM, NADH 0.15 mM
 ATP 3 mM., PK 0.1 U/ml., LDH 1 U/ml.
 AK 2 U/ml. Leer disminución de absor**ba**
 bancia a 340 nm.

2.2.6. VALORACION DE ADP

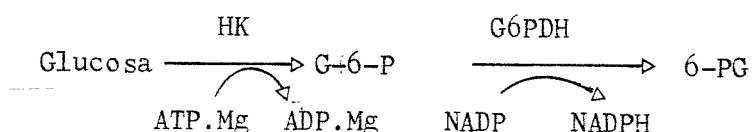
Usando el sistema acoplado de PK y LDH, (38), según la reacción



Mezcla de ensayo: Tris-ClH 50 mM, pH 7'5, ClK 100 mM, Cl₂Mg 10 mM, PEP 5 mM, NADH 0,15 mM, PK 0,05 U/ml. y LDH 1 U/ml. Leer disminución de absorbancia a 340 nm.

2.2.7. VALORACION DE ATP

Usando el sistema acoplado de HK y G6PDH, según la reacción (39):



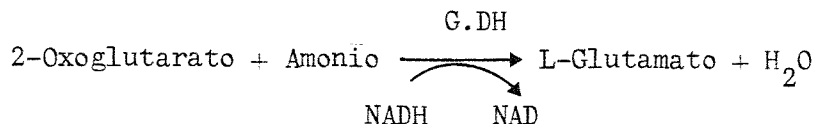
Mezcla de ensayo: Tris ClH, 40 mM. pH 7'5; NADP. 0'5 mM.; ClMg. 5 mM, Glucosa. 2 mM; G6PDH. 0'2 U/ml y HK 0'1 U/ml. Leer incremento de absorbancia a 340nm.

2.2.8. VALORACION DE IMP

Se valoró espectrofotométricamente tomando como coeficiente de extinción molar a 265 nm. igual a 6×10^3 en medio ClH 0'2 N.

2.2.9. VALORACION DE AMONIO

Usando el sistema (40):



Mezcla de ensayo: Imidazol 50 mM pH 7; 2-oxoglutarato 10 mM; DTE, 0,5mM; NADH 0,15 mM; glutámico de hidrogenasa (GDH) 25 U/ml. Leer disminución de absorbancia a 340 nm.

2.2.10. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE DEAE- Celulosa

Se utilizó para la separación de IMP y AMP y sin - inosina presente (41).

- A). - Preparación de la pasta : 16 g. de DEAE-Celulosa fueron suspendidos en 0,5 L. de NaOH 0,5 N agitados durante 30 minutos y filtrados a vacío. La pasta obtenida se lavó hasta neutralización con agua destilada, resuspendiéndose en ClH⁺1N, agitando 30 min. y nuevamente lavada y filtrada hasta neutralidad. Después de este proceso de purificación de la celulosa pura en un volumen final de 200 ml. de agua agitando nuevamente 30 min. La pasta así obtenida se dejó en nevera durante la noche. Previa su utilización se desgasificó a vacío (42).
- B). - Preparación de las placas: Se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cms, previamente desengrasadas con acetona. -

La extensión de la pasta se efectuó con ayuda de un extensor "cromatoplacas". Posteriormente se secaron a temperatura ambiente guardándose en lugar seco. Fue necesario activarlas 40 min. a 50°C previo a su utilización.

C).- Desarrollo de la cromatografía y solventes utilizados : La cromatografía se desarrolló a temperatura ambiente (aprox. 22°C), variando el tiempo según el grado de saturación de la cámara y de la temperatura, en dos direcciones perpendiculares. Las muestras (0.02 μ moles) se colocaron en sucesivas adiciones, secando cada vez con aire caliente.

Los solventes utilizados fueron tres:

Solvente 1: Agua destilada (200 ml.) para separar la interferencia de la inosina en las muestras que llevaban dicho producto en la incubación. El proceso a seguir consistió en correr la mancha hasta el borde de la placa, secar a 50°C, delimitar la mancha bajo luz ultravioleta (265 nm) y rasparla con una cuchilla.

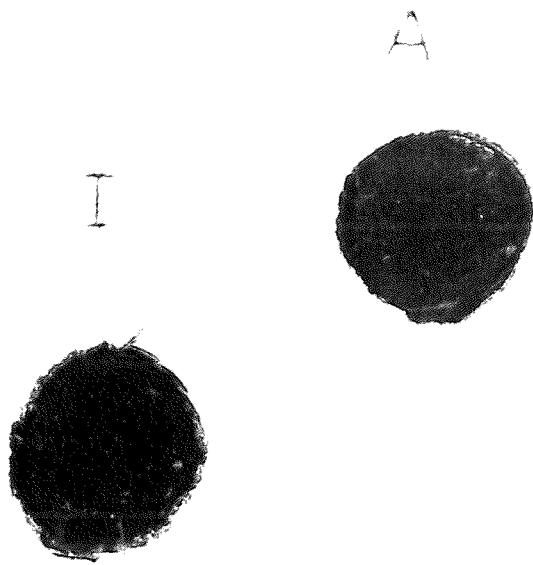
Solvente 2: ClH 0.08N (200 ml.). Se corre el frente aproximadamente 13 cm. en la misma dirección que con el solvente anterior (si se utilizó). Posteriormente la placa se lava una vez con mezcla de --

trietilamina a 8 volúmenes % en acetona y -- tres veces con acetona pura secada con aire caliente y puesta en el solvente 3 para correrla en dirección perpendicular a la anterior.

Solvente 3 : 200 ml. de una solución que contiene 160 ml. de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a saturación, 36 ml. de acetato sódico 1 M y 4 ml. de alcohol isopropílico. - Se corrió el frente aproximadamente 10 cms., secando la placa a continuación a 50°C, marcándose las manchas con lápiz bajo luz ultravioleta a 265 nm.

El resultado de la separación de AMP é IMP se puede ver en la fotografía nº 2. -

D).- Preparación de las muestras: Los sobrenadantes de desproteínezación que se utilizaron como muestras en la cromatografía, se purificaron previamente haciéndolos pasar por carbón activo ^{con} objeto de separar nucleótidos y bases. Se -- procedió de la siguiente manera: en 1 ml. de sobrenadante se suspendieron 20 mg. de carbón activo agitándose la mezcla 10 min. a temperatura ambiente. Seguidamente se filtró en un Millipore (XX1002500) y el carbón se resuspendió en 2 ml. de hidróxido amónico 0,2 N en etanol al 30% agitándose de nuevo durante 15 min. con posterior filtración.



FOTOGRAFIA Nº 2.- Separación de AMP e IMP por cromatografía en capa fina de DEAE-celulosa.

La disolución así obtenida, que contenía los nucleótidos con un rendimiento de aproximadamente 95% a 100% se concentró hasta un volumen de 0.1 ml. por evaporación en estufa a 100°C.

E).- Extracción de los nucleótidos: Una vez delimitadas las manchas bajo luz ultravioleta a 265 nm, se rasparon y -- suspendieron en 2 ml. de ClH 0.2N. La suspensión se agitó 10 min. y se filtró por Millipore. El filtrado obtenido se utilizó para valorar IMP.

2.2.11. VALORACION DE HEMOGLOBINA

La determinación cuantitativa de hemoglobina se realizó usando el reactivo de Drabkins (43), que contiene para 1 litro de agua: 1 g. de bicarbonato sódico, 50 mg. de cianuro potásico, y 200 mg. de ferrocianuro potásico. La solución es estable varias semanas en frasco tapado. La mezcla de reacción lleva 4.5 ml. de reactivo y hemoglobina de 0,05-0,5 mg/ml. - Se mezcla bien y pasados 5 min. se lee la absorbancia a 540 nm. Se utilizó como patrón hemoglobina comercial.

III. RESULTADOS

3.1. GLICOLISIS

3.1.1. CAPACIDAD GLICOLITICA DE LOS ERITROCITOS CONSERVADOS Y SUS HEMOLIZADOS.

El conocimiento de la capacidad glicolítica de las células conservadas 21 días en las condiciones del banco de sangre que nos suministra el material, pareció un punto de partida necesario. Aunque, en términos generales vino a confirmar los hechos ya conocidos y que se han comentado en la introducción general, permitió resolver algunos problemas previos de lavado de las células. preparación de los hemolizados, valores iniciales de concentración de ácido láctico etc.; sobre todo -- sirvieron de punto de referencia para operar con los hemolizados sin dilución, material que se ha utilizado por primera vez en este estudio y del que, por consiguiente, no existía información previa.

La glicólisis, medida por la desaparición de glucosa y por la aparición de lactato, en la forma en que se detalla en M.M., resultó ser inapreciable; dado el límite de detectabilidad de nuestras condiciones de ensayo, podemos afirmar que la glicolisis, si alguna, sería inferior al 5% del flujo glicolítico normal en eritrocitos circulantes.

3.1.2. EFECTO DE CIERTAS ADICIONES SOBRE LA GLICOLISIS POR HE_MOLIZADOS.

La utilización de hemolizados proporciona la posibilidad de añadir coenzimas, metabolitos ó cualquier compuesto que no atraviesa la membrana de los eritrocitos. Por ello se emplearon para comprobar si la adición de cofactores era capaz de restablecer el flujo glicolítico.

A hemolizados sin diluir, incubados a 37°C en MIB pH 7.2 se le hicieron las siguientes adiciones separadamente: NAD^+ 0.2 mM, NADP^+ 0.2 mM, Cl_2Mg 5mM, P_i 5 mM, AMP 1 mM, ADP 1 mM y ATP a varias concentraciones (1, 1.5, 2 mM). La obtención de las muestras y su procesamiento según se ha descrito en MM.

Los resultados se muestran en las figuras nº 6 y 7. En la nº6 se representan los resultados de la adición de ADP 1 mM; en este caso el flujo glicolítico inicial, en cuanto a consumo de glucosa, es de 0.1 $\mu\text{mol}/\text{min. x ml. hemol.}$, el cual va disminuyendo a partir de los primeros 5 min. hasta hacerse nulo aproximadamente a los 20 min. La producción de lactato se corresponde con el consumo de glucosa, dando una velocidad inicial de 0.2 $\mu\text{ mol}/\text{min. x ml hemol.}$

En la figura nº 7 se representa el efecto de la adición

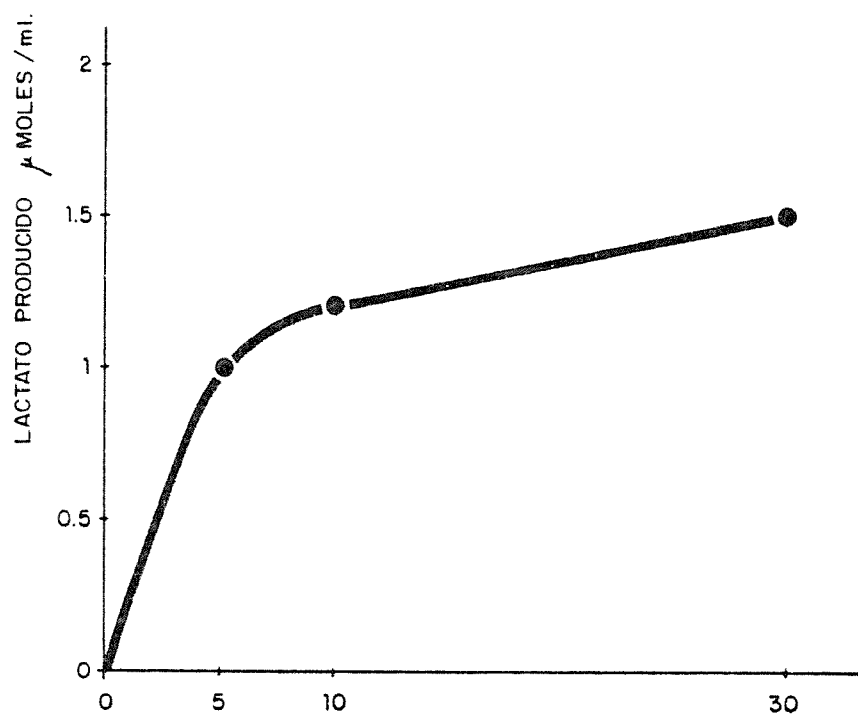
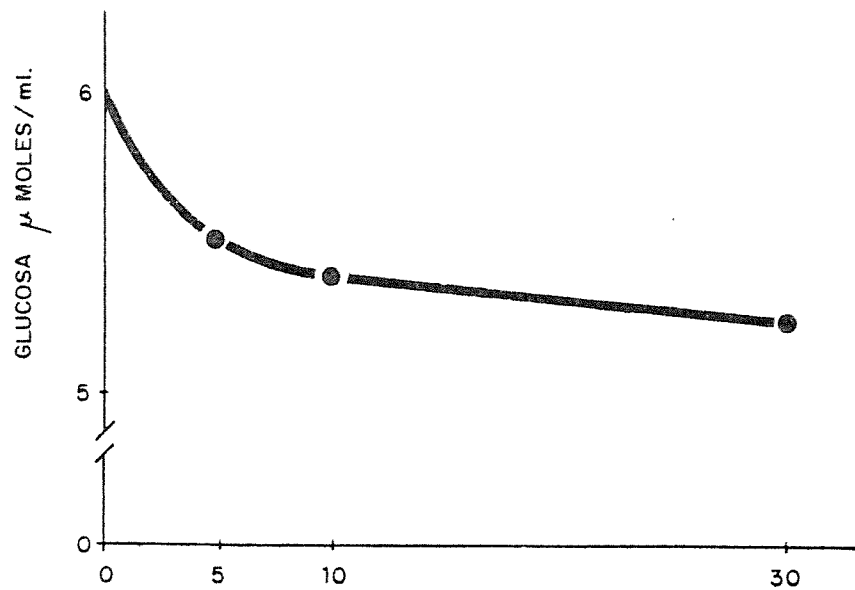


FIGURA Nº 6.- Consumo de glucosa y producción de lactato en hemolizados incubados en MIB pH 7'2 y ADP 1 mM.

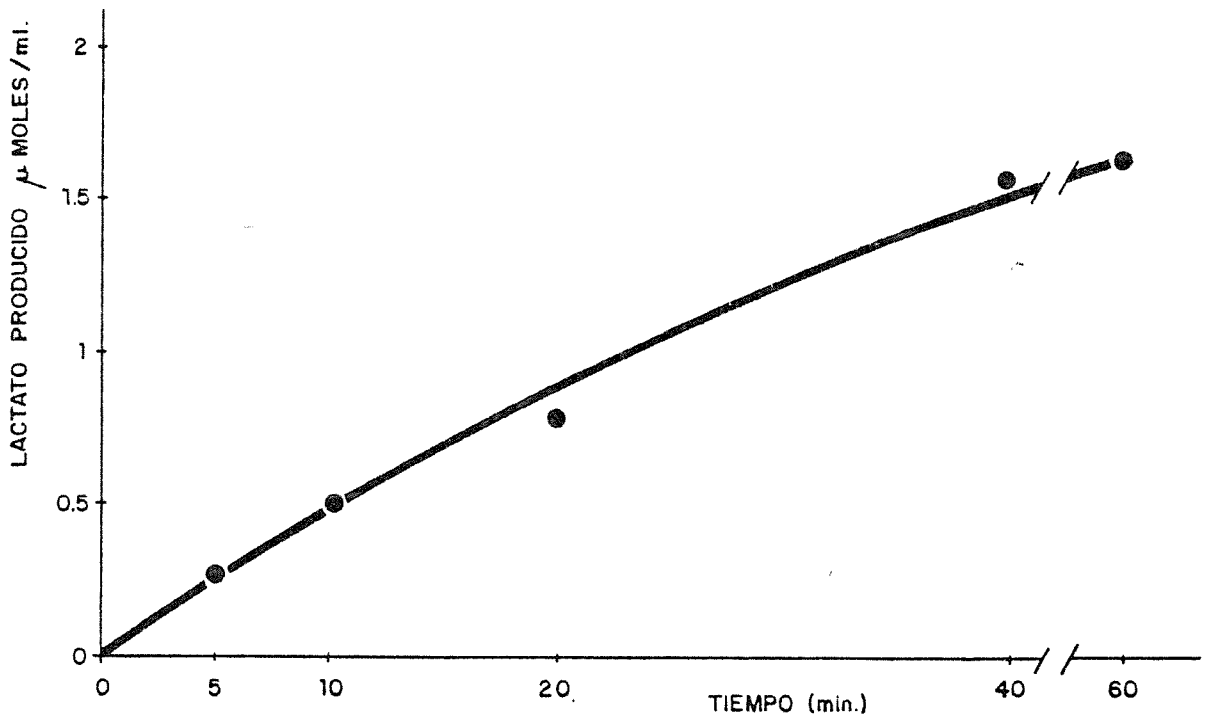
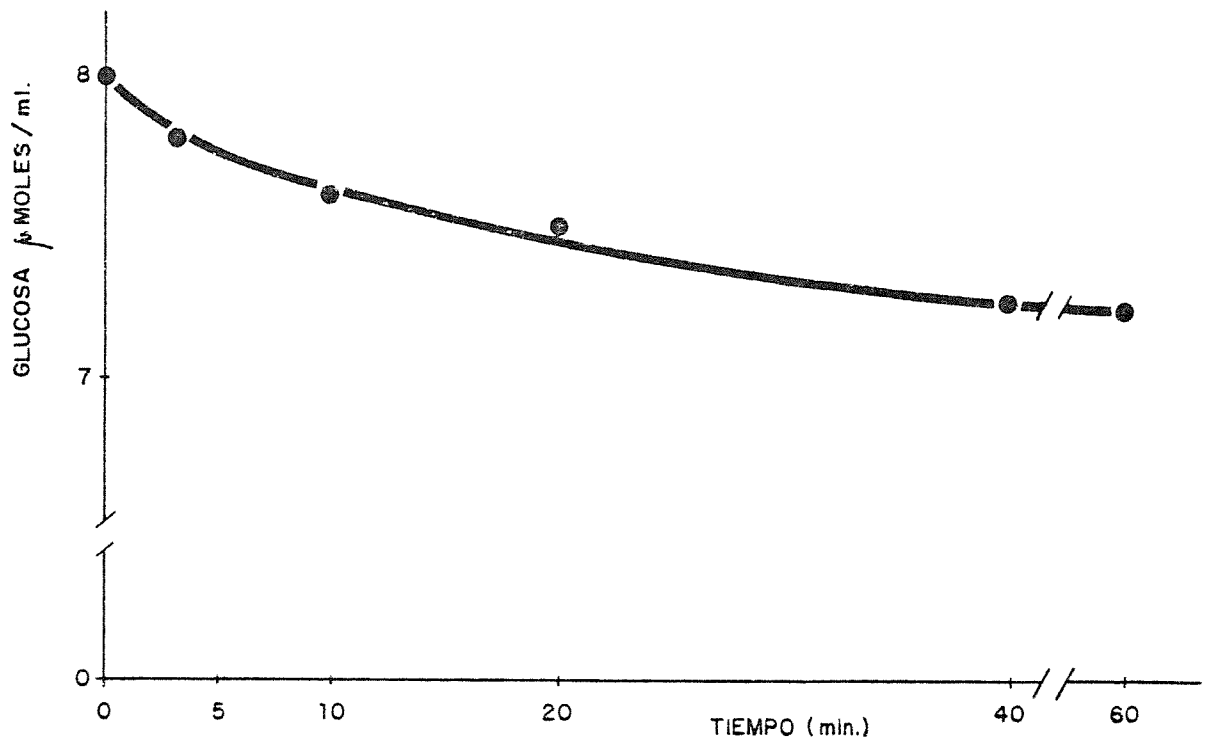


FIGURA Nº 7.- Consumo de glucosa en hemolizados incubados en MIB pH 7'2 con adición de ATP 1,5 mM, NADP 0,2 mM y Glucosa 5 mM.

de ATP y NADP^+ . La velocidad de consumo de glucosa y aparición de lactato en los primeros 5 min. es prácticamente el doble que en el caso anterior, aunque el flujo global es aproximadamente el mismo.

El resto de los compuestos adicionados (que se especificaban anteriormente), no tuvieron efecto medible sobre el flujo glicolítico.

3.1.3. CAPACIDAD FOSFORILANTE DE LA HEXOKINASA EN LOS HEMOLIZADOS.

Puesto que, como se ha indicado en la Introducción, la hexokinasa es con bastante diferencia el enzima de menor actividad máxima en la cadena glicolítica, pareció oportuno comprobar si la manipulación a que se habían sometido las células habría deteriorado sustancialmente la función de este enzima.

Para ello se utilizaron hemolizados dializados 24 horas frente a EDTA 1 mM. 50 volúmenes, a 4°C y cambiando 4 veces el medio externo. La diálisis se hizo con objeto de eliminar los posibles metabolitos inhibidores de la HK, que se pudieran haber acumulado durante los 21 días de conservación.

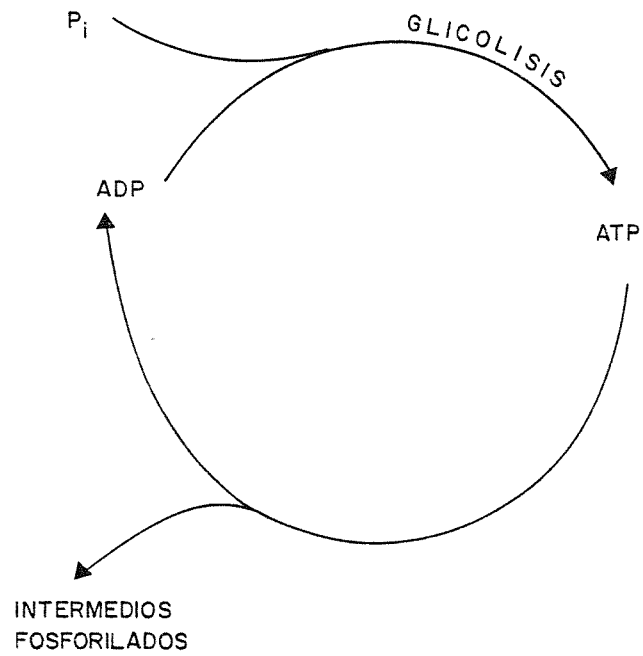
El hemolizado fue incubado en MIB pH7'2 cpm glucosa - 5 mM; ATP, 2mM y NAD, 0'5 mM.. Se tomaron muestras a tiempos - 0 y 5 min., valorando el consumo de glucosa, que resulto ser

(similar al encontrado para hemolizados de sangre reciente) de 0,25 moles/min. x ml. de hemolizado.(5)

Debe notarse que en este ensayo se mide la capacidad global de utilizar glucosa en ausencia de cualquier efecto modulador sobre la primera etapa, limitante, de la glicolisis; - por ello la medida de velocidad inicial de desaparición de glucosa se puede tomar como capacidad máxima fosforilante de la HK en las condiciones ambientales estimadas como cercanas a - las que prevalecen en la célula intacta.

Combinando estos resultados con los del epígrafe anterior, puede notarse que la producción inicial de lactato inducida por 1 mM ADP, en los hemolizados sin dializar, (es decir con todos los metabolitos e iones propios de las células en el momento de la rotura) es consistente con una glicolisis limitada por la HK, como cabe esperar en ausencia del freno impuesto a la PFK.

Sin embargo llama la atención que dicha producción caiga tan rápidamente, de tal modo que a los 5 min. y con un consumo de glucosa inferior a $1 \mu\text{mol}$, prácticamente cesa, cuando en teoría debería continuar de este modo, reciclando el par -- ADP-ATP hasta llenar los niveles normales de intermedios fosforilados; ésto supondría un consumo de glucosa con velocidad



cercana a la máxima, y mantenido por lo menos 20 ó 30 min. con descenso progresivo de los valores estacionarios.

3.2. METABOLISMO DE ADENOSINFOSFATOS

3.2.1. EVOLUCION EN EL TIEMPO DE LOS NIVELES DE ADENOSINFOSFATOS TRAS LA ADICION DE AMP A HEMOLIZADOS DE ERITROCITOS RECIEN EXTRAIDOS Y PROCEDENTES DE SANGRE CONSERVADA.

La interpretación de los resultados anteriores exigió un estudio más detallado de la evolución de los adenin nucleótidos añadidos, tanto en eritrocitos de sangre recién extraída como de sangre conservada, en busca de diferencias que justificasen la baja capacidad de los eritrocitos conservados para mantener el flujo glicolítico.

Los hemolizados se incubaron en MIB pH 7.2 a 37°C -- con adición de AMP 2 mM a tiempo 0 y tomando la primera muestra al cabo de 1 min. Los resultados se representan en las figuras nº 8 y 9.

Merecen comentario los siguientes aspectos: En primer lugar, las curvas de desaparición de AMP; tras una fase inicial muy rápida, similar en ambos hemolizados, y que supone aproximadamente 1/4 del AMP añadido inicialmente, el resto sigue ritmos de desaparición bastante diferentes, con niveles más sostenidos en los hemolizados de células recientes (de 1 día). Esta marcada diferencia tiene mucha repercusión

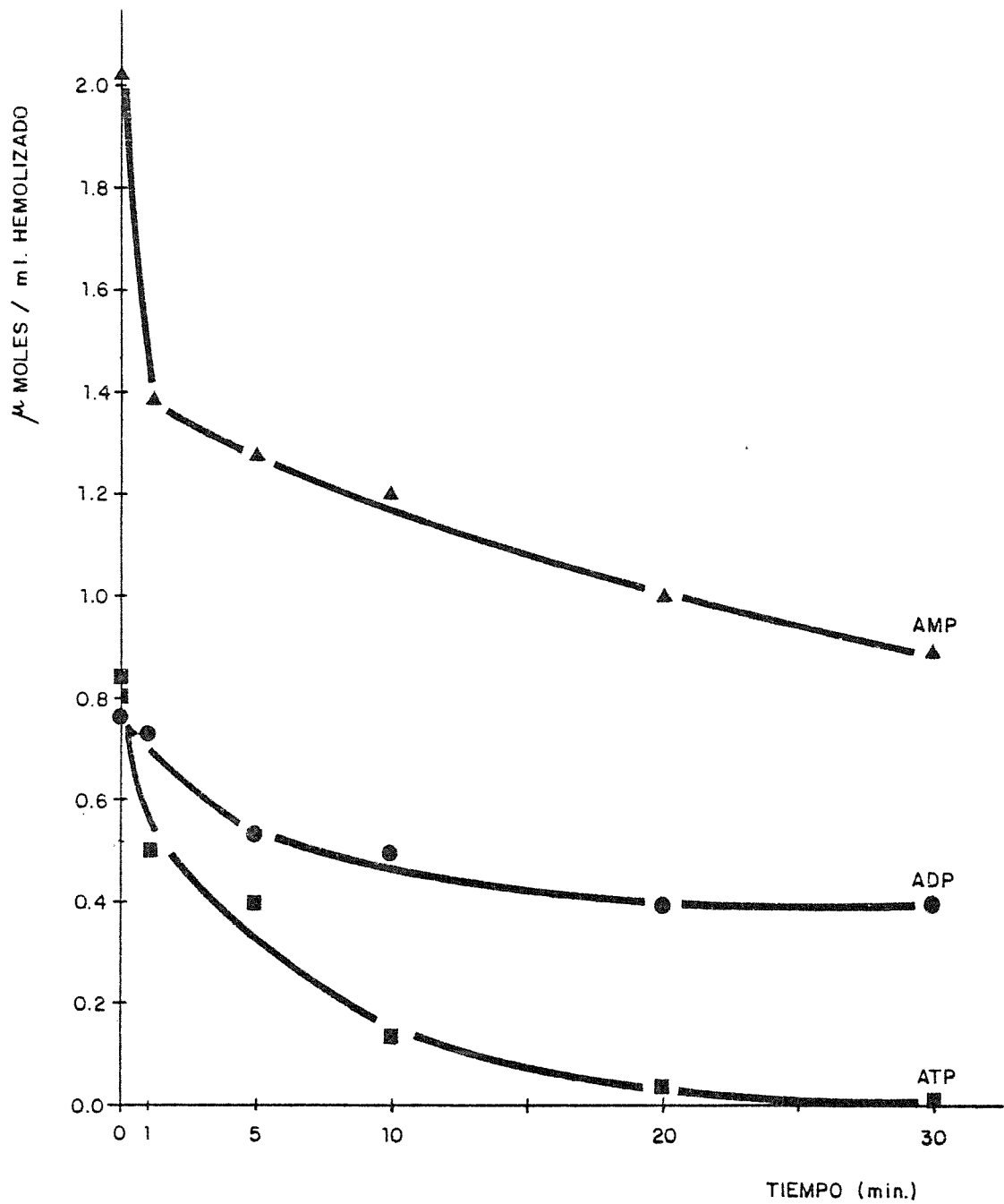


FIGURA Nº 8.- Evolución en el tiempo de las concentraciones de nucleótidos de adenina en hemolizados de células con 1 día de almacenamiento incubados a 37°C en MIB pH 7.2 y AMP 2 mM.

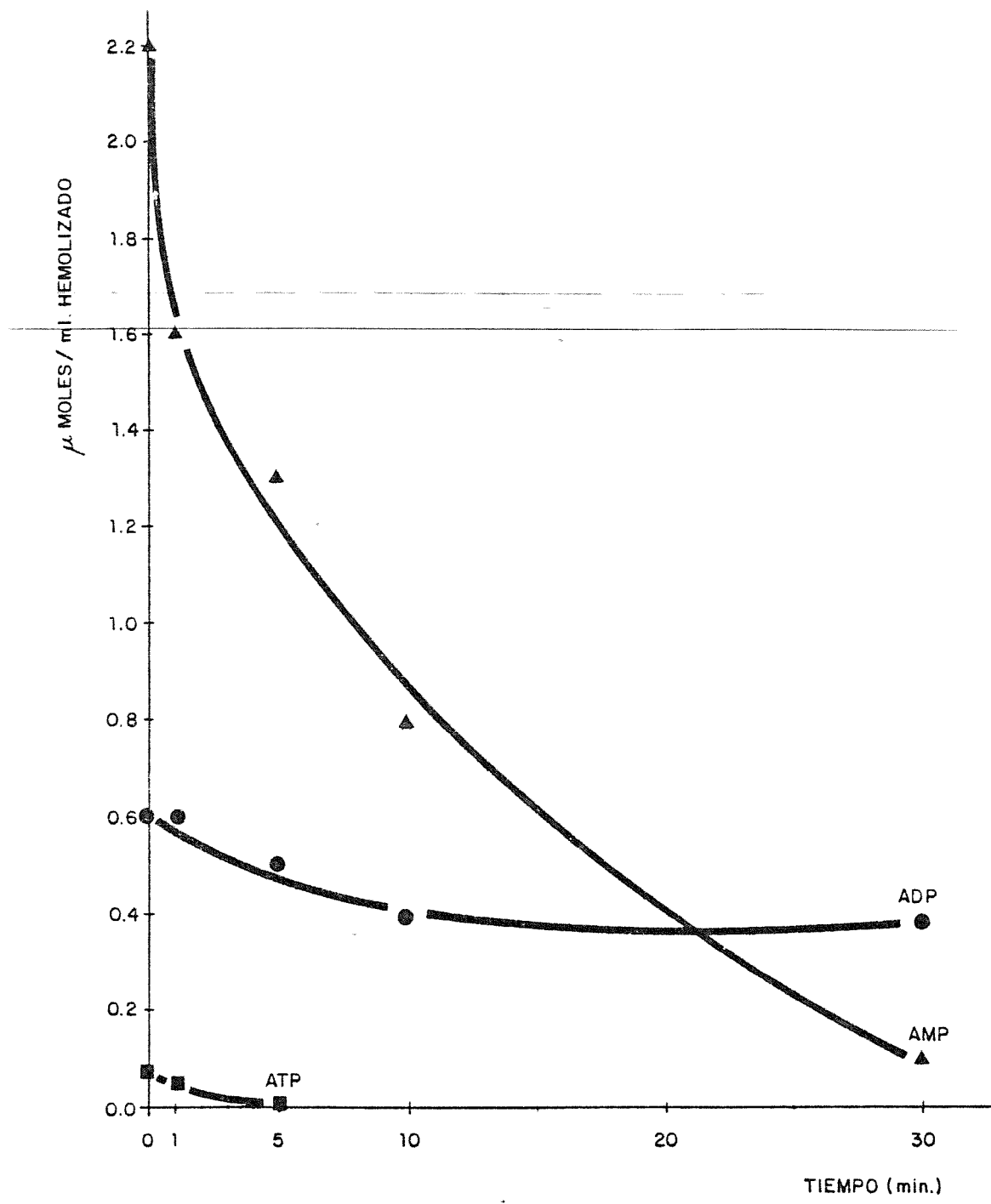


FIGURA Nº 9.- Evolución en el tiempo de las concentraciones de nucleótidos de adenina en hemolizados de células con - 21 días de almacenamiento incubados en MIB pH 7'2 y AMP 2 mM.

sobre la desaparición de la suma total de nucleótidos a lo largo del tiempo.

En segundo lugar en los hemolizados de células de 1 día hay una caída de la concentración inicial de ATP que no se refleja en elevación de ADP, como debería suceder si el ATP hubiera sido utilizado por las diferentes kinasas (la AK predominantemente según se ha venido postulando (12)).

En tercer lugar, se han calculado las relaciones de masas correspondientes a la reacción AK, cuya expresión general es: $\frac{(ATP) \times (AMP)}{(ADP)^2}$ y cuyo valor debería aproximarse a 1 si la AK impusiera su equilibrio. Los resultados recogidos en la Tabla 3, indican que en los hemolizados de células de 1 día parece haber una tendencia al equilibrio a tiempos muy cortos, que no se mantiene. En el caso de los hemolizados de células de 21 días, la relación de masas no puede calcularse porque los valores de ATP, a partir del primer minuto son inmedibles.

Un dato adicional que sugiere que los adenosinfosfatos presentes en los hemolizados sin diluir, no están sujetos a la acción de la AK en la forma que cabría esperar de la actividad de este enzima, presente en los eritrocitos, es la conservación de los niveles de ADP, como se ve en las figu--

CELULAS	T I E M P O (min).						
	1 DIA	BASAL	INICIAL	1	5	10	20
AMP mM	0,06	2,06	1 36	1,27	1,2	1,0	0,9
ADP mM	0,76	0,76	0,73	0,54	0,5	0,4	0,4
ATP mM	0,85	0,85	0,5	0,4	0,15	0,05	0,00
R. MASAS	0,08	3,0	1,2	1,7	0,72	0,31	-
SUMA AD.	1,67	3,67	2,59	1,85	1,85	1,45	1,3

CELULAS	T I E M P O (min)						
	21 DIAS						
AMP mM	0,2	2,2	1,6	1,3	0,8		0,1
ADP mM	0,6	0,6	0,6	0,5	0,4		0,37
ATP mM	0,03	0,03	0,04	0,0	0,0		0 0
R. MASAS	0,17	0,2	1 78	-	-		-
SUMA AD.	0,83	2,83	2,24	1,8	1,2		0,47

TABLA 3.- Concentraciones de nucleótidos de adenina y valores para los parámetros carga energética relación de masas y suma de dichos nucleótidos, obtenidas al incluir a 37°C - durante 30 min. hemolizados (1 y 21 días) en medio imidazol bicarbonato pH .2 con adición de AMP 2 mM.

ras nº 8 y 9, particularmente llamativa en la nº 9, ya que a tan bajas concentraciones de ATP y AMP, el ADP debería haber bajado por efecto de la AK.

Para estos hemolizados se diseñó un experimento similar a los anteriores, salvo que la adición de adenosinfosfatos consistió en una mezcla de : AMP 2mM.; ADP 0,3 mM y ATP 0,5 mM, mezcla que correspondería a una situación en la que la relación de masas de la AK está lejos del equilibrio; se intentaba ver si la AK lograba imponer su equilibrio elevando la concentración de ADP a expensas del AMP, impidiendo ó al menos frenando la desaparición de éste por varias vías. La tabla 4 muestra que no es el caso, ya que a los 20 min. - la mitad del AMP ha desaparecido sin concomitante elevación del ADP, que a su vez también ha bajado.

La conclusión global de este experimento es que la actividad AK, aunque alta, no es el componente mayoritario en las vías de transformación del AMP.

3.2.2. TRANSFORMACION DEL AMP EN IMP

Para evaluar la proporción de AMP desaparecido que se podía encontrar como IMP, se realizaron medidas simultáneas de desaparición de AMP y aparición de IMP a lo largo de 30 min.

CELULAS	T I E M P O (min.)				
	21 DIAS	BASAL	INICAL	20	40
AMP mM	0,3	2,3	1,1	0,8	0,4
ADP mM	0,3	0,6	0,3	0,24	0,17
ATP mM	0,05	0,55	0,25	0,21	0,19
GLUCOSA mM	2,8	7,8	6,4	6,3	6,2
SUMA ADEN.	0,65	3,45	1,65	1,25	0,76
R. MASAS	0,16	3,5	3,0	2,8	2,7

TABLA 4.- Concentraciones de nucleótidos de adenina y valores obtenidos para la relación de masas y suma de nucleótidos en hemolizados de veintiún días de almacenamiento incubados a 37°C en MIB pH 7.2 con adición de AMP 2 mM ADP 0,3 mM y ATP 0,5 mM.

Para ello se utilizaron hemolizados de células de 21 días de conservación obtenidos por el procedimiento usual. Dichos hemolizados fueron dializados a 4°C, para reducir las posibles interferencias en la separación cromatográfica del AMP e IMP frente a 50 volúmenes de EDTA 1 mM, renovando 4 veces el medio externo.

Seguidamente se ajustó su pH a 7.2 con bicarbonato potásico y se incubó a 37°C en un medio que contenía imidazol 50 mM pH 7.2 y AMP 7 mM; volumen final de incubación 5 ml. La obtención de muestras y su procesamiento fue el usual. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y en cada una se valoró AMP por el procedimiento indicado en MM así como el IMP, espectrofotométricamente, después de separarlo del AMP por cromatografía en capa fina de DEAE-celulosa.

La evolución de la reacción se representa en la figura nº 10, considerando como 100% la concentración de AMP inicial.

Los resultados obtenidos indican que, en las condiciones de nuestro hemolizado, tan solo un 30% del AMP transformado se encuentra como IMP, lo cual no es de extrañar si tenemos en cuenta la existencia de otras vías degradativas para el IMP; por una de estas vías se transforma en inosina

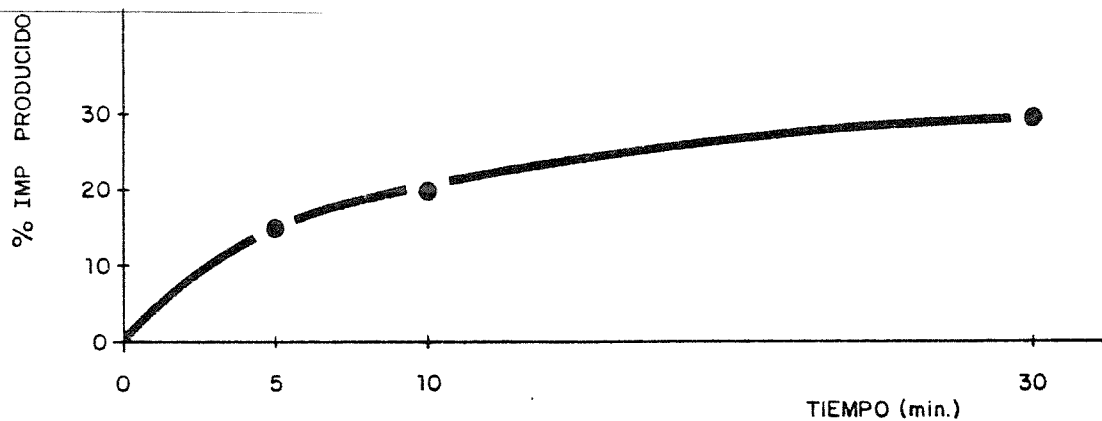
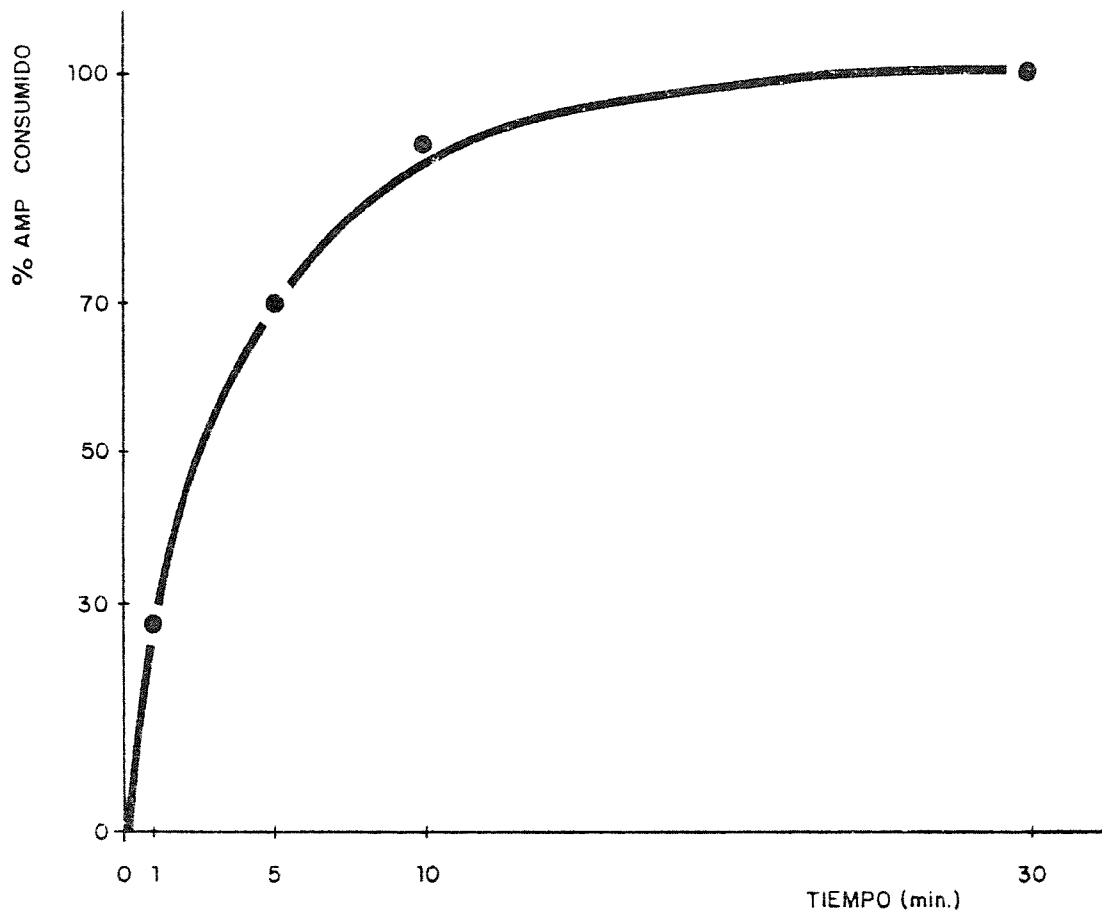


FIGURA Nº 10.- Desaparición de AMP y simultánea aparición de IMP en hemolizados de células con 21 días de almacenamiento incubadas a 37°C en MIB pH 7'2 con adición de AMP -- 7 mM.

hipoxantina y finalmente ácido úrico. Esto justifica que el IMP encontrado no de cuenta de todo el AMP transformado.

En estudios posteriores en que se valoró amonio como producto de la desaminación, se encontró que el AMP transformado via ADA era de un 50% aproximadamente del AMP desaparecido. La diferencia entre la producción de amonio y la de IMP pudiera depender de la posible defosforilación de éste por actividades fosfatasa que se estudiaran más adelante.

Debe observarse que en este experimento se ha utilizado una concentración más alta de AMP que en experimentos anteriores, ya que se buscaba conocer la capacidad máxima de una vía cuyos parámetros cinéticos operativos no se conocían.

Comparando la velocidad inicial de desaparición de AMP con la de la figura nº 9, puede observarse que son prácticamente iguales; esto significaría que en el rango de concentraciones de AMP de nuestro experimento de desaparición de AMP, la(s) vía(s) de transformación se encuentra(n) saturada(s) por el sustrato, es decir, evaluamos una velocidad máxima de transformación global.

3.2.3. EFECTO DE LA INOSINA SOBRE LA DESAPARICION DE AMP AÑADIDO A HEMOLIZADOS DE CELULAS CON 21 DIAS DE CONSERVACION.

Tomando como base la observación empírica, reiterada, de que la adición de inosina a la sangre en conservación -- contribuye a alargar su tiempo de vigencia (30) sin que las bases bioquímicas de este efecto estuvieran claras al tiempo de empezar este estudio, pareció conveniente investigar si la inosina tenía algún efecto que se observase directamente sobre la curva de desaparición de AMP y la concomitante aparición de IMP; ciertamente existían indicaciones de que la inosina no tiene efecto sobre la actividad purificada (20) pero dado que las condiciones de nuestros ensayos eran muy diferentes y que en nuestro sistema se valora por un lado la desaparición global y por otro, el nivel alcanzado por el IMP, existía la posibilidad de algún efecto no descrito hasta ahora.

Se utilizaron hemolizados de células de 21 días. obtenidos por el procedimiento habitual, y dializados según se indicó anteriormente. Posteriormente fueron llevados a pH 7.2 con bicarbonato potásico e incubados a 37°C con imidazol 50 mM. pH 7.2 y AMP 2 mM. Se llevaron paralelamente dos muestras una a la que se añadió inosina 30 mM. y otra control sin adi-

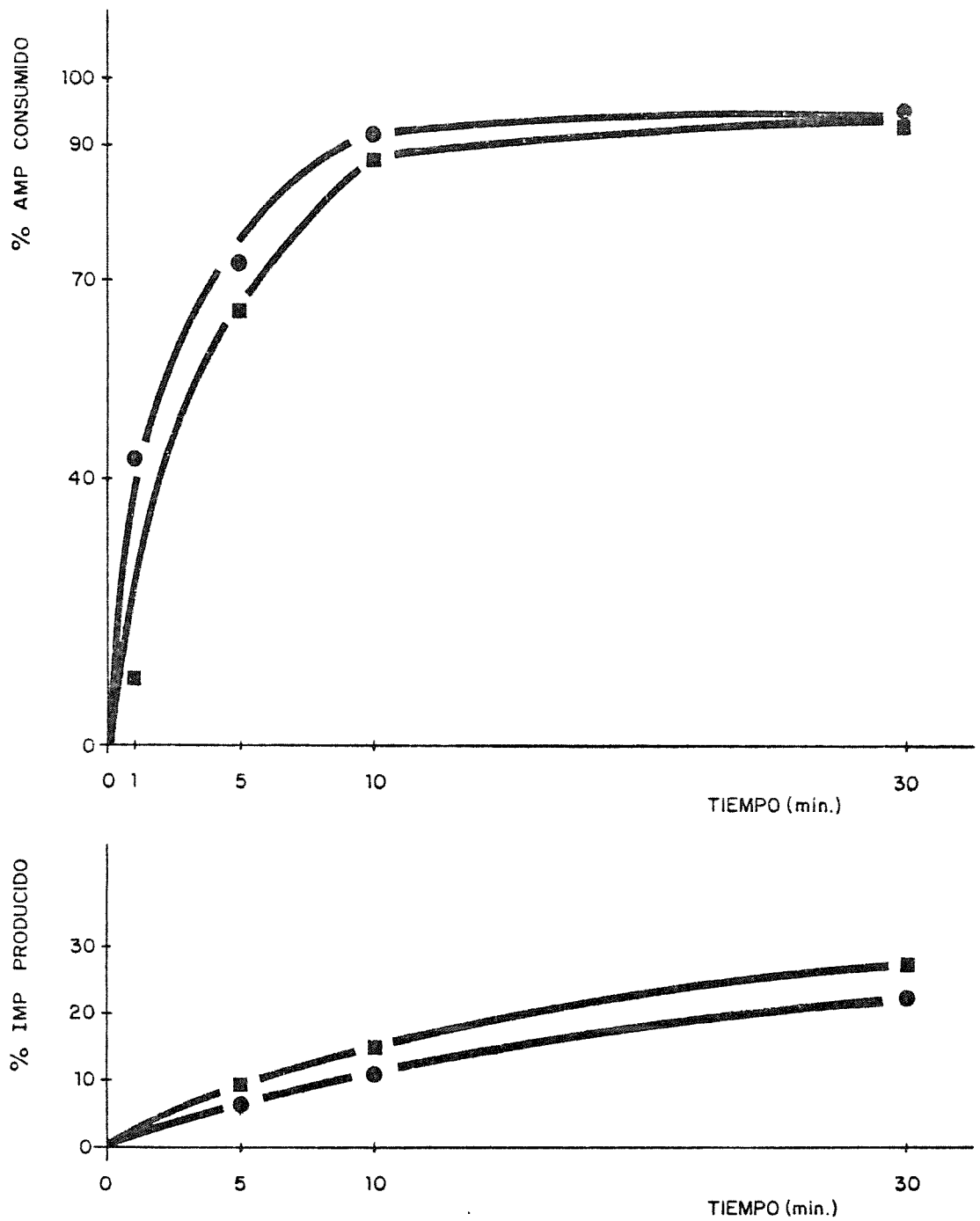


FIGURA Nº 11.- Desaparición de AMP y simultánea aparición de IMP en hemolizados de células con 21 días de almacenamiento incubados a 37°C en MIB pH 7.2 con AMP 2 mM (●) e Inosina 30 mM (■).

ción. La recogida de muestras así como las valoraciones posteriores se hicieron de la forma usual.

Los resultados se muestran en la figura nº 11. La concentración de IMP al final de la incubación da cuenta del 30% aproximadamente del AMP transformado en ambos casos. La concentración de AMP se ha dejado en 2 mM. para no enmascarar los posibles efectos de tipo competitivo. Por la misma razón la concentración de inosina empleada en este experimento es marcadamente superior a la utilizada en los intentos de mejorar la conservación antes mencionados; la razón es que se buscaba un posible efecto competitivo y convenía forzar su aparición para luego estudiar el efecto de la concentración.

En estos experimentos se llevó un control donde se estudió el posible efecto de la diálisis sobre la desaparición de AMP, no encontrándose un efecto apreciable sobre las curvas de desaparición total del mismo.

3.2.4. EFECTO DE LA INOSINA SOBRE LA REGENERACION DEL ATP A PARTIR DEL AMP.

Como se ha visto en los experimentos de las figuras nº 8 y 9, la adición de AMP a hemolizados de células tanto

de 1 como de 21 días de almacenamiento no conduce a la formación de ATP, a causa de la rápida desaparición del primero.

La expectación de poder fosforilar el AMP a ATP. obviamente se basa en la existencia de una concentración no despreciable de ADP, suficiente para que, mediante la acción combinada de la glicolisis ($\text{ADP} \longrightarrow \text{ATP}$) y la AK ($\text{ATP} + \text{AMP} \longrightarrow 2\text{ADP}$), se forme ATP hasta un nivel estacionario sostenido, -- precedido de un periodo de transición en el que se fueran ajustando las concentraciones de los intermediarios. A su vez, -- la reanudación de la glicolisis supone cierta concentración de ATP para iniciarla, puesto que la glicolisis produce ATP en su segunda mitad pero ha de gastarlo en las dos etapas de HK y PFK de la primera mitad.

La presencia de ADP implica algo de ATP aunque analíticamente sea más o menos detectable dependiendo del método. Cabría, por tanto, la posibilidad de que la inosina favoreciese esa recuperación ganando la carrera, al menos en parte, a la degradación irreversible del AMP.

Para explorar esta posibilidad se diseñó un experimento similar al de las figuras nº 8 y 9, con adición de AMP 1 mM e inosina 30 mM.

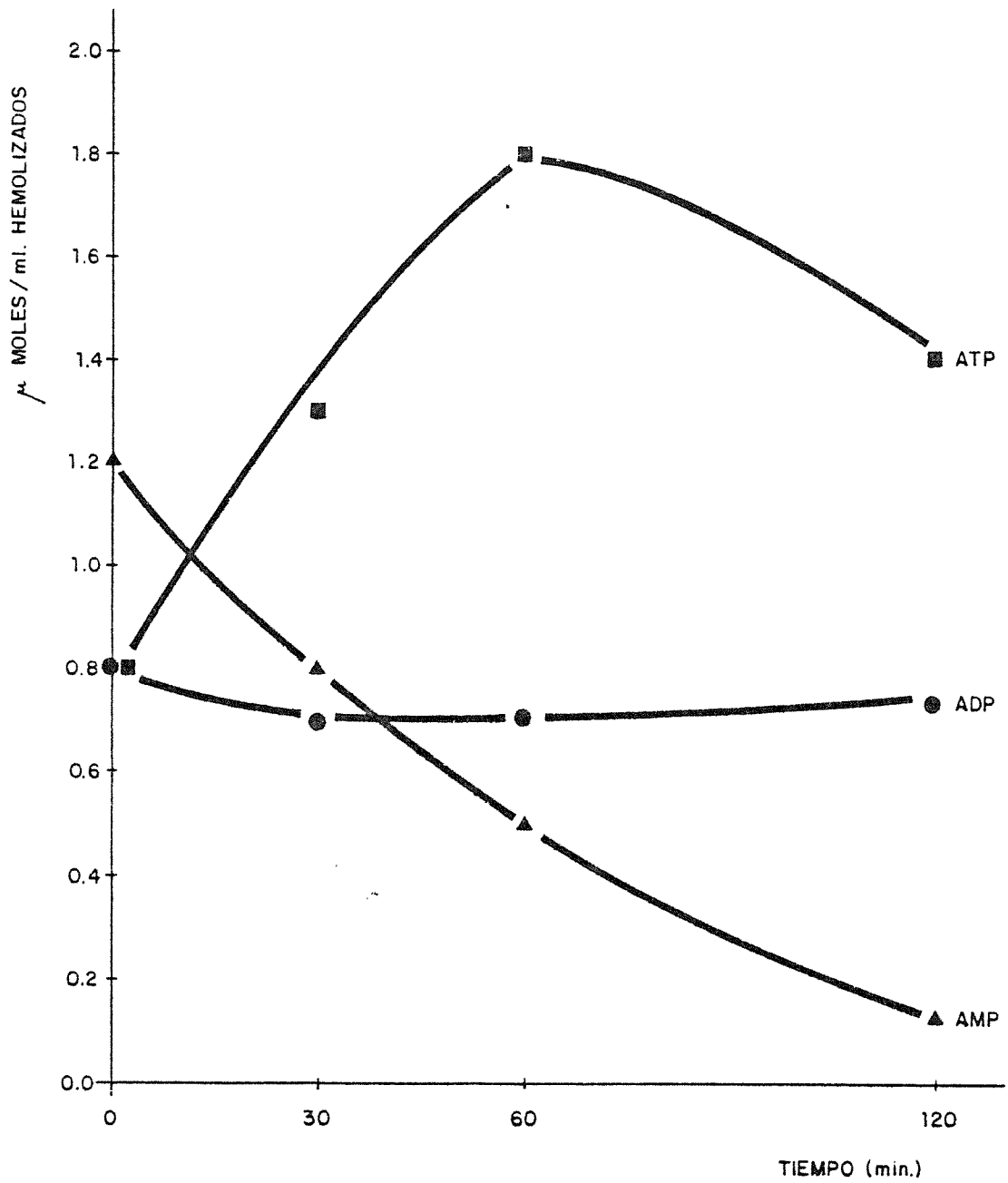


FIGURA Nº 12.- Efecto de la Inosina sobre la formación de ATP en hemolizados de células con 1 día de almacenamiento, incubados a 37°C en MIB pH 7.2 con AMP 1 mM e Inosina 30 mM.

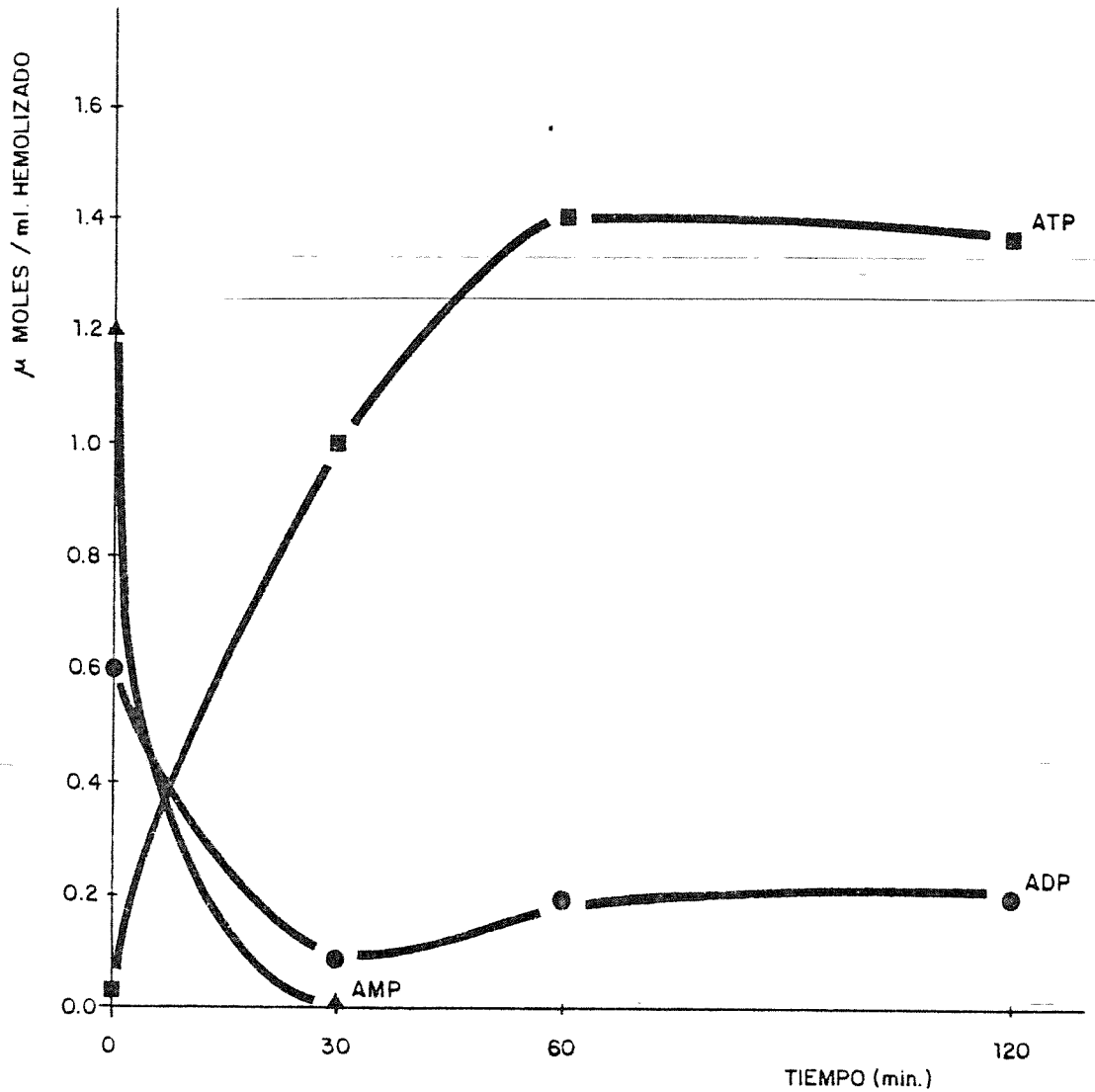


FIGURA Nº 13.- Efecto de la Inosina sobre la formación de ATP en hemolizados de células con 21 días de almacenamiento - incubados a 37°C en MIB pH 7.2 con AMP 1 mM e Inosina 30 mM.

μ l MOLES LACTATO FORMADO / ml HEMOLIZADO

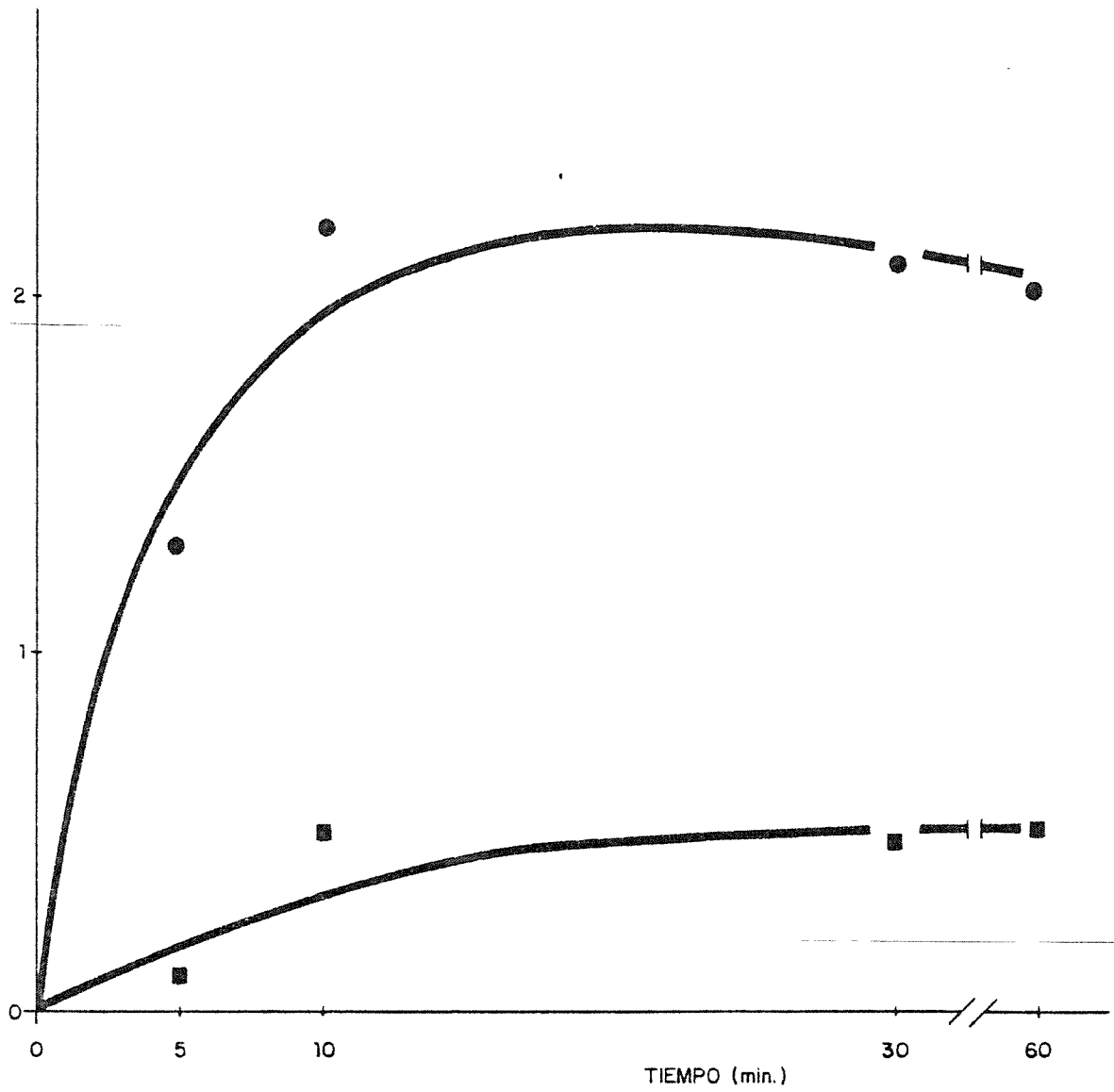


FIGURA Nº 14.- Formación de lactato en hemolizados de células con 21 días de conservación, incubadas en MIB pH 7'2 con adición de AMP 1 mM (■) é Inosina 30 mM (●).

Los resultados se representan en las figuras nº 12 y 13 en las que se puede notar que, en presencia de inosina, la desaparición de AMP va acompañada de la aparición de una cantidad equivalente de ATP, lo cual no ocurre sin la adición de inosina. En cuanto a la diferencia entre la conducta de eritrocitos de 1 y 21 días, se confirma la observación anterior (fig. 8 y 9), según la cual en los eritrocitos conservados la degradación de AMP es mucho más rápida.

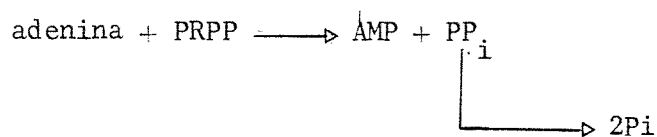
En la figura nº 13 merece comentario el que la caida de ADP sea mayor que en experimentos equivalentes en ausencia de inosina; el rápido incremento de la concentración de ATP explica a dónde ha ido a para el ADP desaparecido, lo cual significa que ha funcionado eficazmente la glicolisis; esta observación fue comprobada valorando el flujo glicolítico como producción de lactato, resultado que se representa en la figura nº 14. En otras palabras, la presencia de inosina ha favorecido la reanudación de la glicolisis pese a la baja concentración de ATP.

3.2.5. FORMACION DE LACTATO Y ATP EN CELULAS ENTERAS Y HEMOLIZADOS INCUBADOS CON INOSINA Y ADENINA

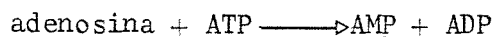
La comprobación directa de que el proceso descrito en el epígrafe anterior ocurre igualmente en las células -

intactas no es posible porque el AMP no entra en las células.

La posibilidad de que, a partir de adenina o adenosina, (que difunden fácilmente como la inosina) se llegase a un resultado similar al obtenido en hemolizados, depende de la transformación de adenina en AMP mediante el proceso:



ó en el caso de la adenosina:



catalizado por una adenosina kinasa. El primer proceso está fuertemente desplazado hacia la formación de 2P_i por la etapa prácticamente irreversible catalizada por la pirofosfatasa. El segundo está también desplazado hacia la derecha por razones termodinámicas.

La producción de adenosinfosfatos a partir de adenina requiere en todo caso un donador de fosforilo; en condiciones en que la reserva de ATP está próxima a agotarse no es razonable esperar que haya reserva de PRPP. Por tanto, una limitación de entrada a la producción directa de AMP a partir

de la base o su ribósido, es la baja concentración de donador de fosforilo.

Partiendo de adenina y favoreciendo la recuperación de la glicolisis con inosina, cabe esperar un efecto combinado que dé lugar a un incremento rápido en los niveles de ATP. En efecto, publicaciones anteriores sugieren que tal proceso ocurre en eritrocitos incubados con inosina y adenina, a juzgar por los incrementos de 2,3-DPG mediante un proceso que se designó como "rejuvenecimiento", sin que se hubiera profundizado en su mecanismo íntimo.

Para comprobar la similitud de los procesos en células enteras y hemolizados, se llevó a cabo un experimento incubando ambos con inosina más adenina y midiendo niveles de ATP y la producción de lactato.

Los resultados se representan en las figuras nº 15 y 16; de ellas se deduce que ambos sistemas poseen todos los mecanismos necesarios para la transformación de adenina en ATP, como se pone de manifiesto cuando se incorpora inosina. La velocidad de formación de ATP se deduce de las figuras nº 15 y 16 es de unos $30 \mu\text{moles}/\text{min.} \times \text{ml.}$ de células; las curvas de evolución de la concentración de ATP en ambos

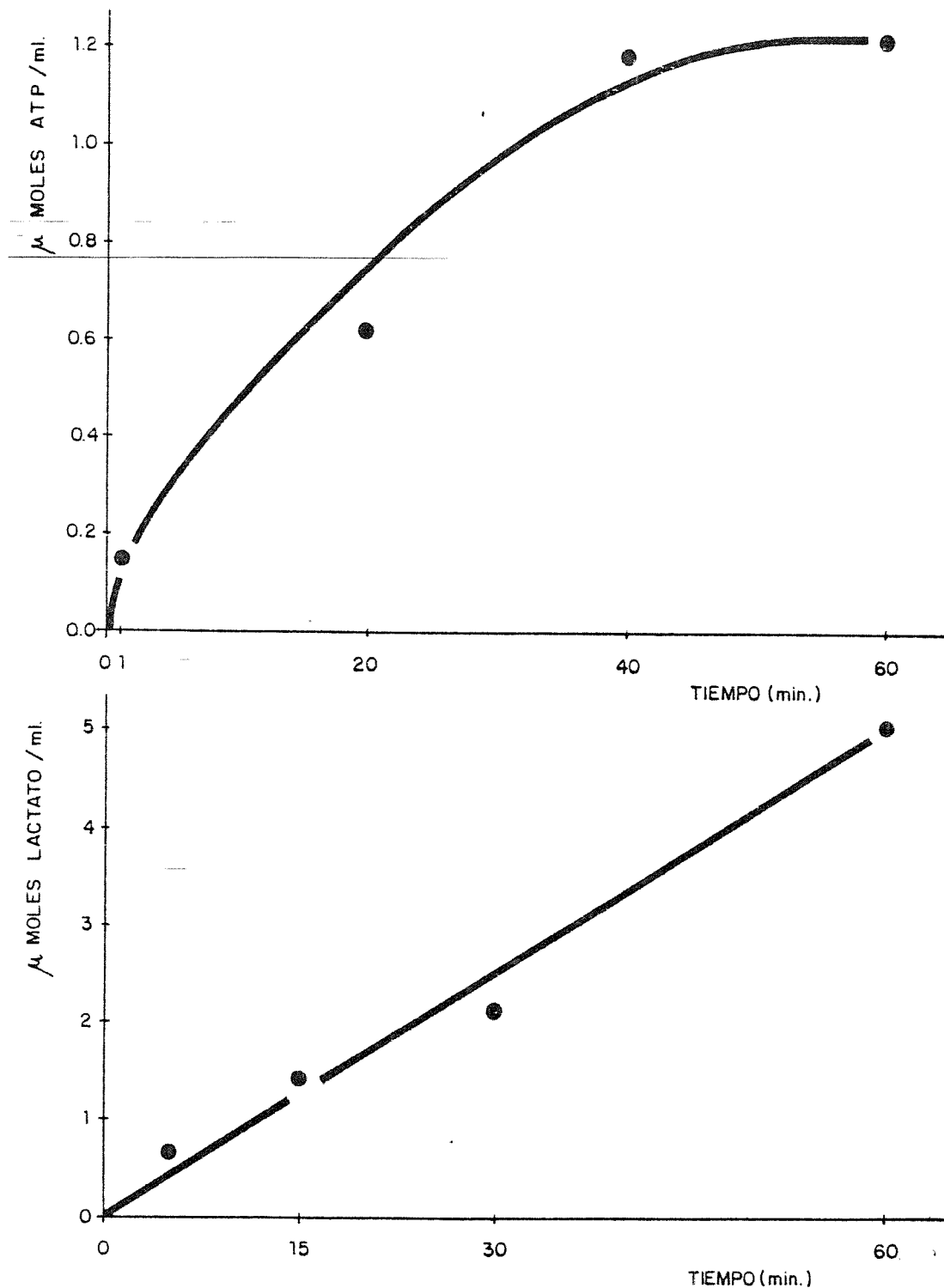


FIGURA Nº 15.- Formación de ATP y producción de lactato en células enteras con 21 días de almacenamiento incubados a 37°C en KRP pH 7.2 con adición de Inosina 5 mM y -- Adenina 3 mM.

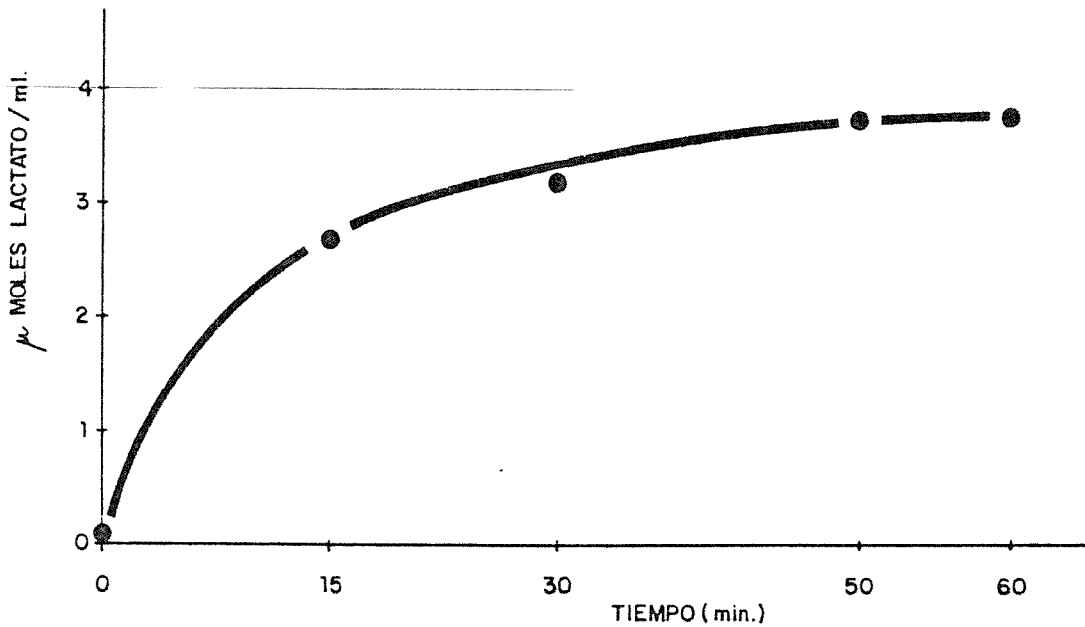
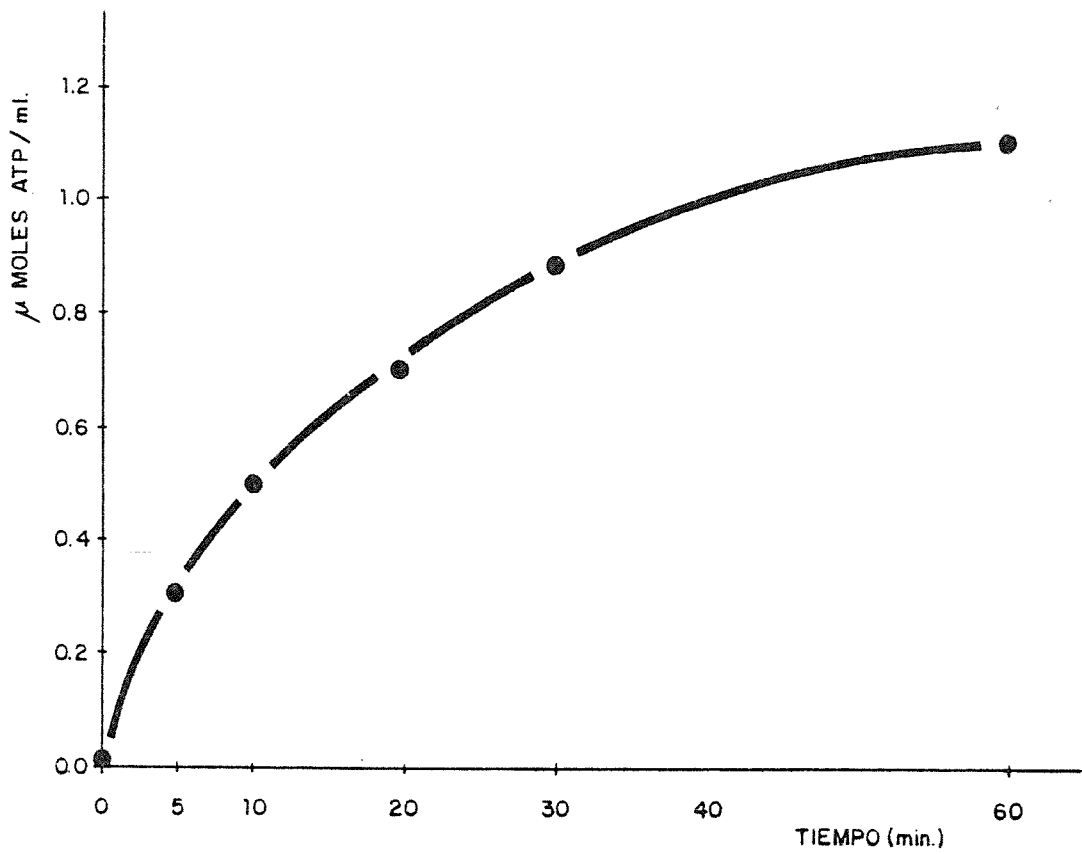


FIGURA Nº 16.- Formación de ATP y producción de lactato en hemolizados de células con 21 días de almacenamiento incubados a -- 37°C en MIB pH 7.2 con adición de inosina 5 mM y adenina 3 mM.

casos son muy similares, lo que una vez más legitima la validez de los resultados obtenidos con hemolizados sin dilución como representativos de eritrocitos intactos.

La diferencia en el curso de la producción de lactato es una clara consecuencia de que en las células el lactato difunde a un medio externo que lo diluye cosa que obviamente no ocurre con los hemolizados; se confirma aquí una observación repetida en nuestros experimentos de que la acumulación de lactato inhibe su propia producción, no por acidificación porque los hemolizados están eficazmente taponados, sino por un efecto directo, probablemente a nivel de la propia LDH.

3.2.6. PAPEL DE LA INOSINA EN LA SINTESIS DE ATP DESDE ADE- NINA.

Información previa sobre la vía de las pentosas fosfato y algunas de sus actividades enzimáticas como TA y TK (44, 45), así como de una elevada actividad nucleosido fosforilasa (46), ha permitido postular que la inosina lo que haría en último término, sería facilitar la formación intracelular de R-5-P, la cual, vía TA y TK llegaría a F-6-P entrando ya en la glicolisis.

Aunque al comienzo del presente trabajo la evidencia indirecta de que tal proceso ocurre en los eritrocitos enteros incubados con inosina era insuficiente, se ha ido consolidando en las numerosas publicaciones aparecidas en los últimos años por el mucho interés que suscita toda cuestión relacionada con la conservación de la sangre.

El uso de hemolizados sin diluir, que como hemos visto se comportan igual que los eritrocitos intactos, ha permitido aportar evidencia directa de que el papel de la inosina consiste en suministrar R-5-P.

Los resultados obtenidos se representan en la figura nº 17, muestran que la R-5-P tiene el mismo comportamiento que la inosina en cuanto a favorecer la transformación de adenina en adenosinfosfatos y últimamente en ATP; por tanto el papel de la inosina es servir de precursor del R-5-P en la vía de las pentosas fosfato.

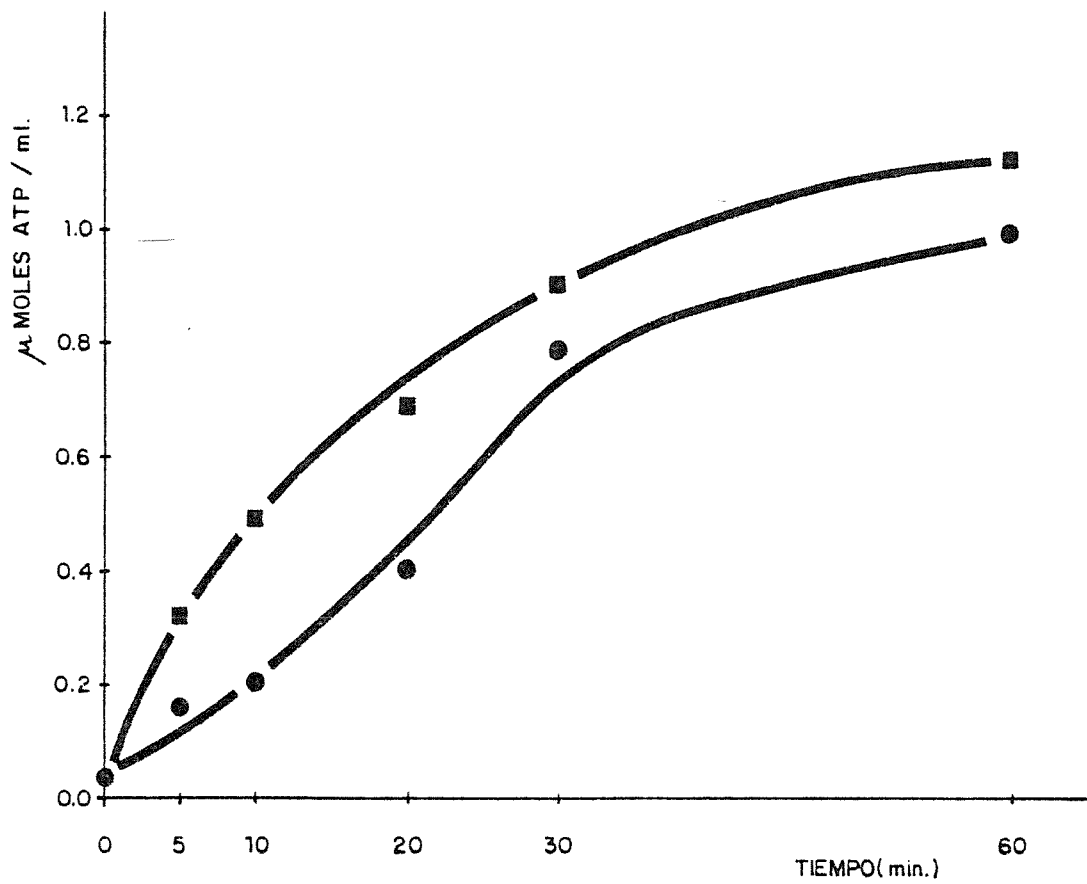


FIGURA Nº 17.- Formación de ATP en hemolizados de células con 21 días de almacenamiento, incubados a 37°C en MIB pH 7.2 con adición de R5P 3 mM y adenina 3 mM (●) ó con inosina 5 mM y adenina 3 mM (■).

3.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ADA EN HEMOLIZADOS

Por las razones apuntadas en la introducción general pareció importante hacer una comparación directa entre los hemolizados de células conservadas y los de células recién extraídas por si se hubiese producido algún cambio en las propiedades reguladoras de la ADA, que ayudase a entender la causa de que en los eritrocitos circulantes sea tan estable el nivel global de adenosínfosfatos que se interconvierten entre sí, pero manteniendo su concentración total; tal comportamiento no parece congruente con la rápida desaparición de AMP añadido, sin concomitante incremento de los otros dos adenosínfosfatos, descrito en páginas anteriores.

3.3.1. IMPORTANCIA RELATIVA DE LA VIA DESAMINATIVA EN LA DESAPARICION DE AMP AÑADIDO A LOS HEMOLIZADOS

Como reiteradamente ha podido observarse en resultados anteriores, la reacción que cataliza la ADA valorada por la aparición de IMP y de amonio no da cuenta más que de una fracción del AMP desaparecido. La aceptación de la validez de estos resultados exige saber a dónde ha ido a parar el AMP que falta. Puesto que la vía adicional de desaparición de AMP más evidente era la hidrólisis via 5'-nucleotidasa, Se planteó un experimento con hemolizados de células de 1 y 21 días, en el que se valoró AMP transformado, NH_4^+ , formado en la vía desaminativa y P_i como producto de la vía hidrolítica. Los resultados se muestran en las -

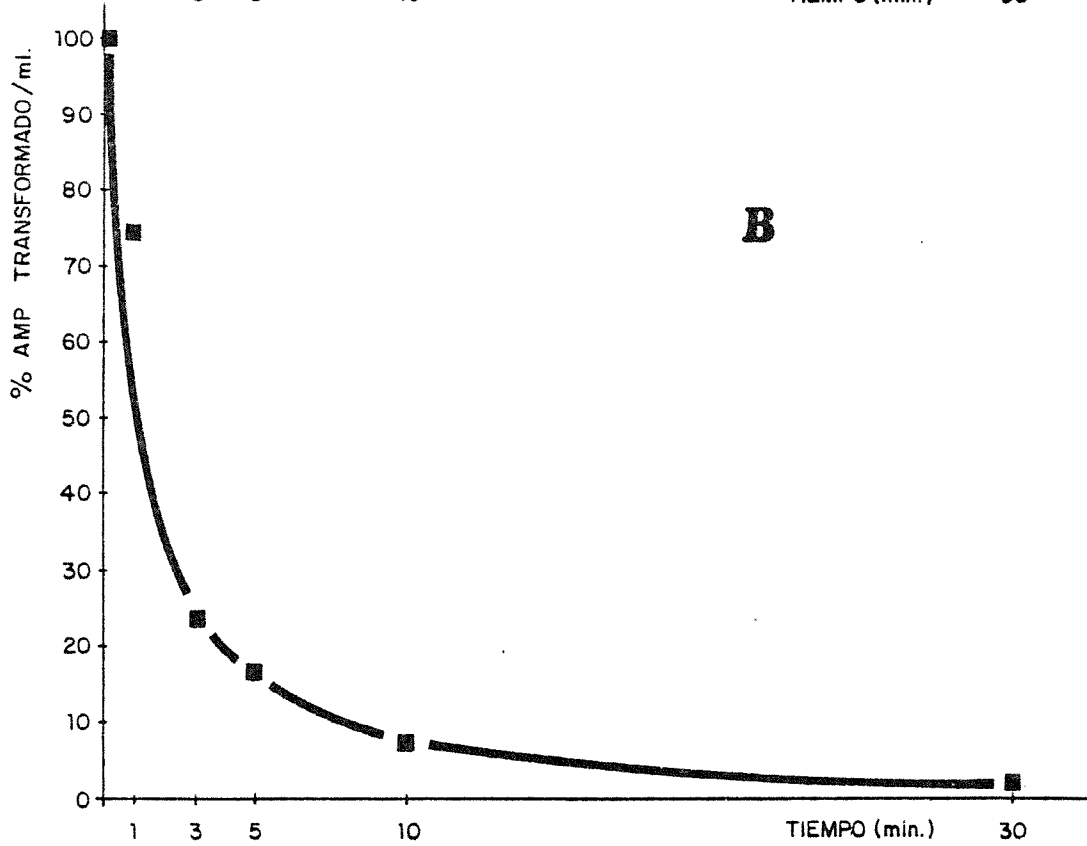
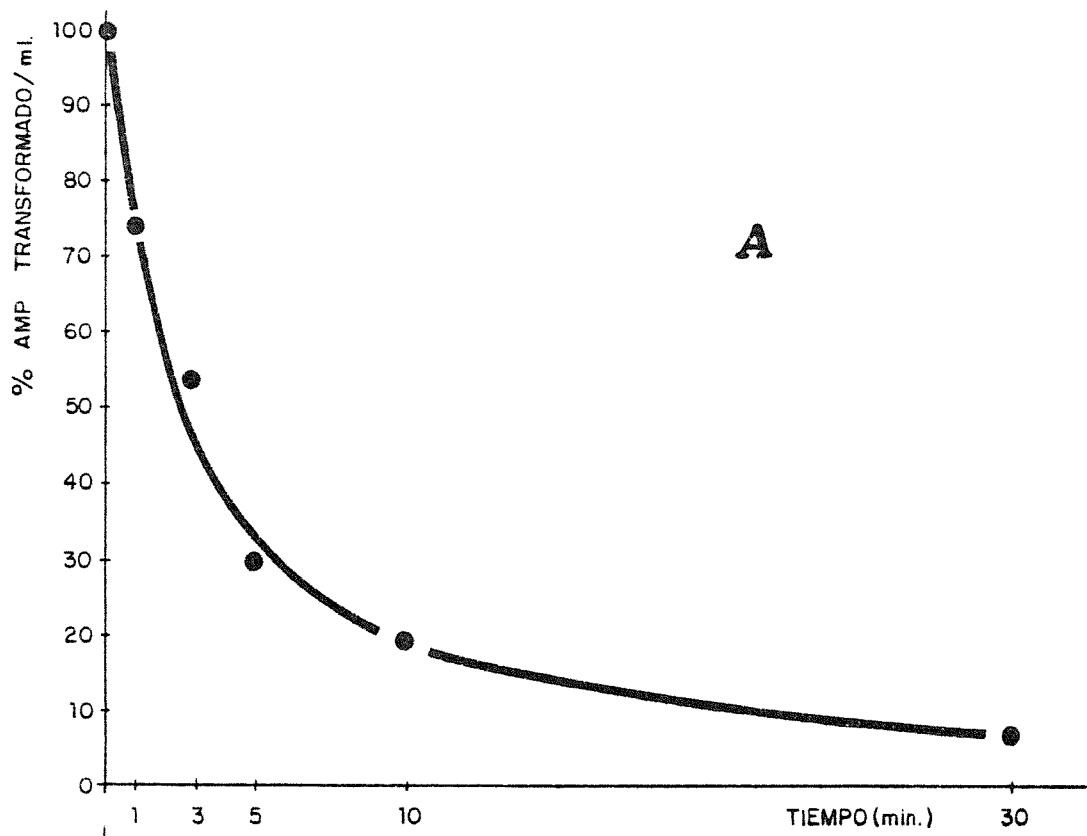


FIGURA Nº 18.- AMP transformado por hemolizados de células con 21 días (A) y 1 día (B) de almacenamiento incubados en MIB pH 7'2 y adición de AMP inicial.

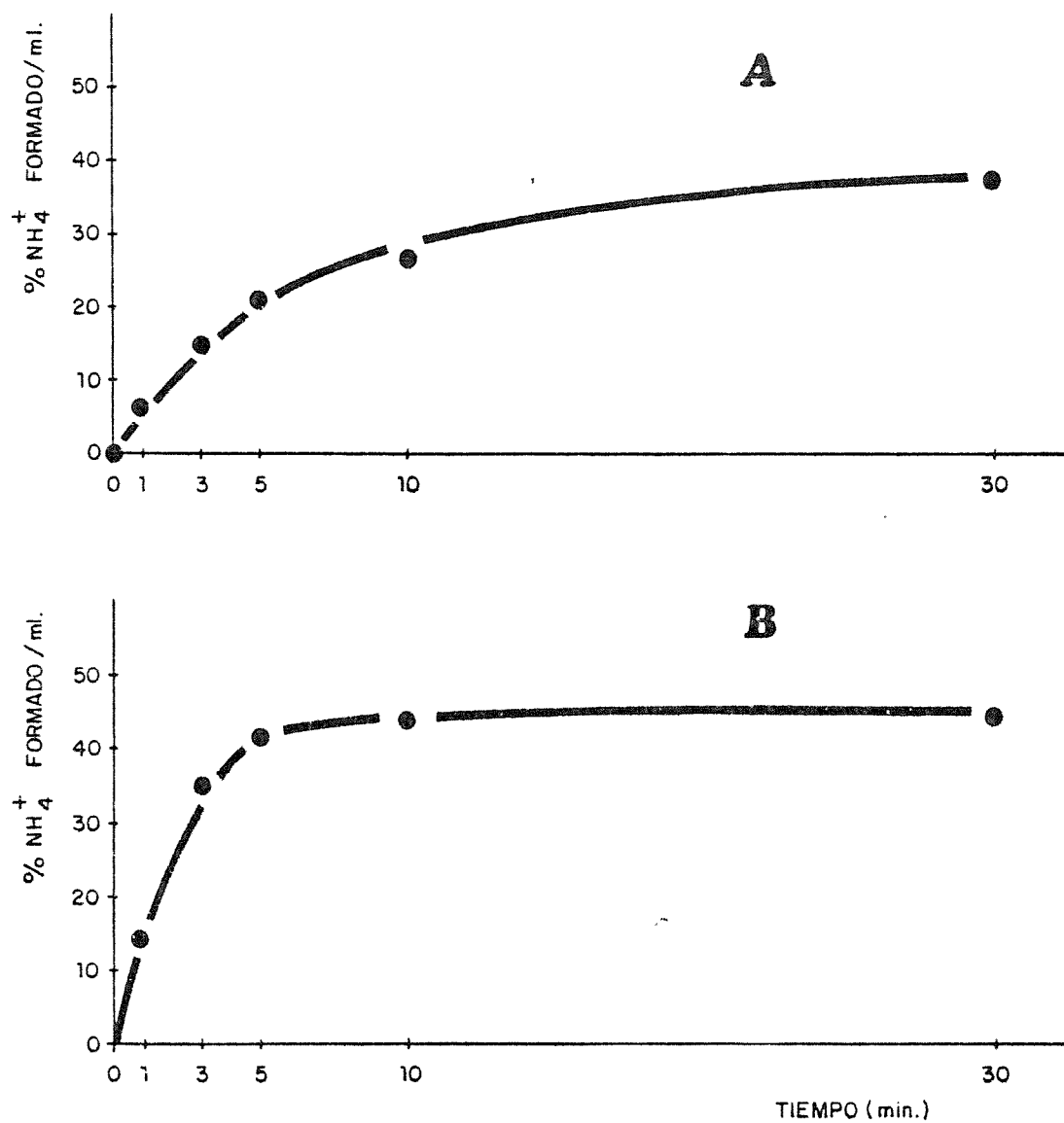


FIGURA Nº 19.- Amonio formado por hemolizados de células con 21 días (A) y 1 día. (B) de almacenamiento incubados a 37°C en MIB - pH 7'2 con adición de AMP inicial.

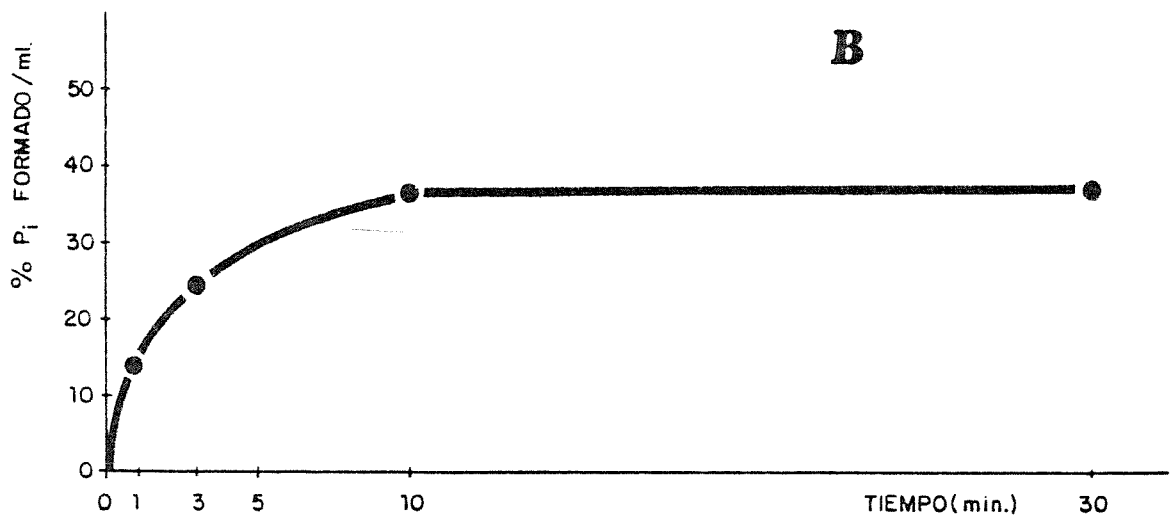
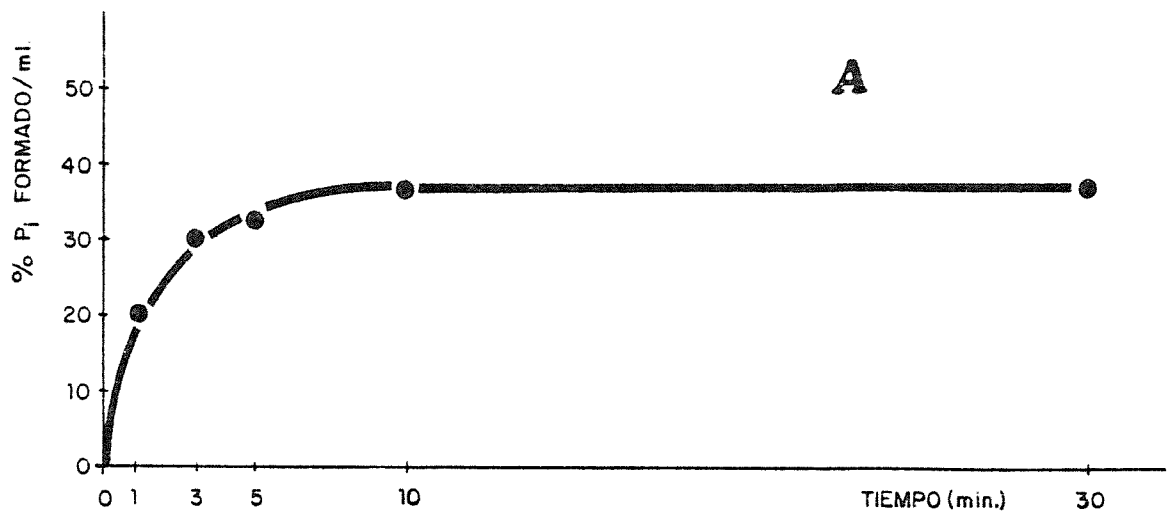


FIGURA N^o 20.- Fosfato inorgánico formado por hemolizados de células con 21 días de almacenamiento (A) y 1 día (B), incubados a 37°C en MIB pH 7.2 con adición de AMP inicial.

figuras 18, 19 y 20, y sugieren que hay diferencias cuantitativas apreciables entre ambos tipos de hemolizados, si bien, cualitativamente puede admitirse que básicamente el proceso transcurre en ambos casos con los mismos rasgos.

Las características experimentales de esta serie de medidas aconsejaron utilizar concentraciones relativamente altas de AMP; puesto que las fosfatasas tienen generalmente constantes de Michaelis altas para la mayoría de los substratos, es importante a la hora de trasladar los resultados a las condiciones estacionarias de los eritrocitos circulantes, contar con la posibilidad de que las fosfatasas inespecíficas actúen en cinética de primer orden respecto al AMP y el IMP. Evidentemente de estos resultados no es posible deducir cuánto P_i procede del AMP y cuánto del IMP formado por desaminación de aquel pero sí la importancia relativa de las dos vías mayoritarias de pérdida -- irreversible.

3.3.2. CURVA DE SATURACION DE LA ADA

Estudios anteriores describen dos tipos de enzimas: una ADA unida a membrana que presenta cinética hiperbólica con AMP como substrato y en ausencia de ATP, con una K_m de 1 mM (22). El enzima está situado en la cara interna de la membrana y es-

trechamente unido a ella. El enzima soluble, por el contrario, presenta cinética sigmoide en las mismas condiciones y una compleja regulación alostérica que se ha descrito en la Introducción.

Con hemolizados concentrados, obviamente no es posible utilizar métodos espectrofotométricos directos, por lo que para los experimentos de cinética fué necesario hacer un estudio previo de linealidad en la formación de amonio, que resultó ser lineal en los 3 primeros minutos; por ello se tomó como tiempo de incubación de rutina 2 minutos para todas las concentraciones de AMP utilizadas. Los hemolizados se incubaron a 37°C en MIB pH 7.2 y con diferentes concentraciones de AMP y en presencia de K^+ 0.1 M.

Los resultados se representan en la figura nº 21, que muestra una sigmoide con un valor de $S_{0.5} \simeq 6.5$ mM para las condiciones de ensayo.

3.3.3. EFECTO DEL ATP SOBRE LA CURVA DE SATURACION

Ya se había descrito un efecto del ATP sobre la cinética del enzima en preparaciones más o menos purificadas. Aquí se pretende evaluar el efecto en este sistema de hemolizados sin diluir en los que se conservan unas condiciones ambientales básicas

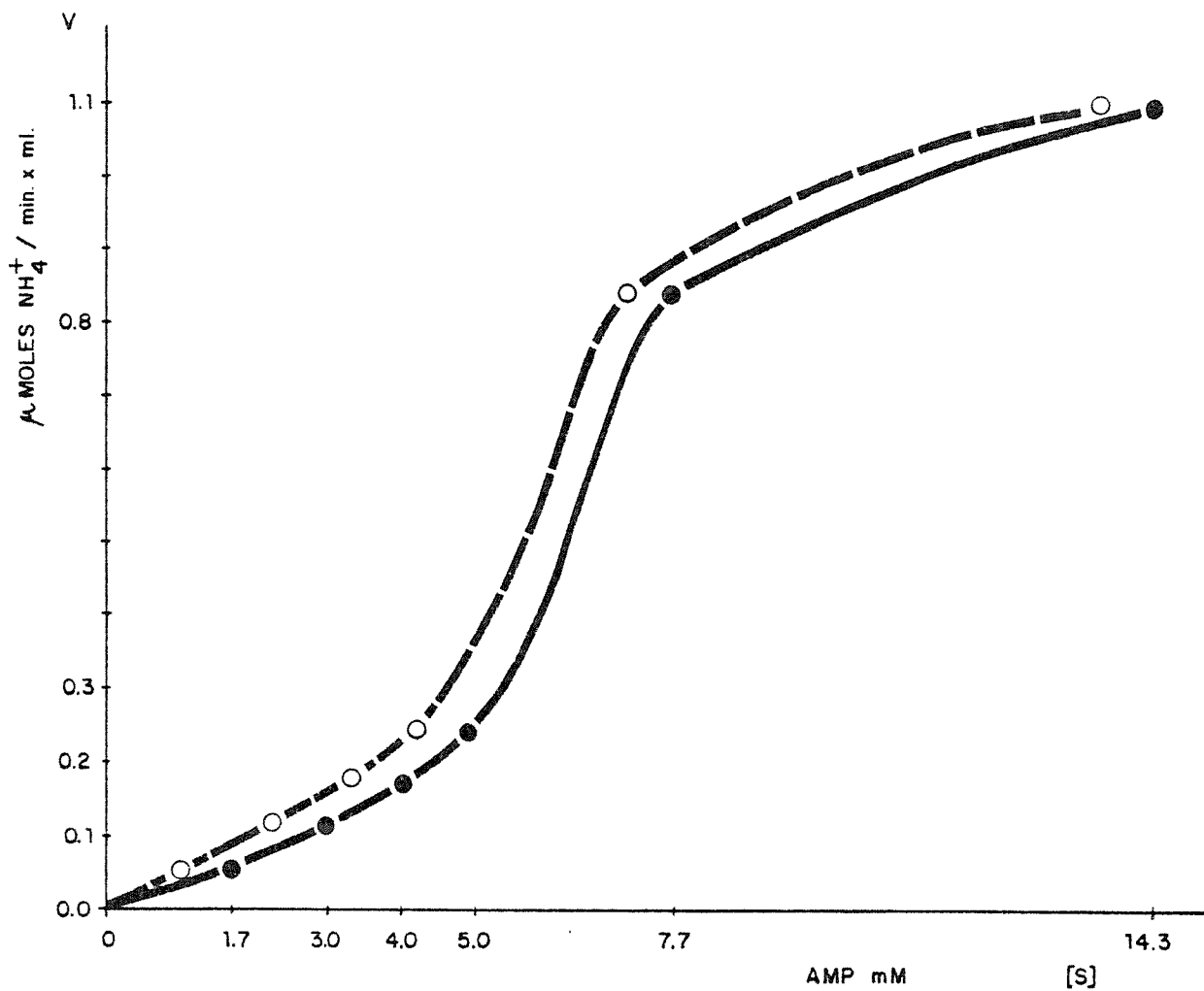


FIGURA Nº 21.- Curva de saturación de la AMP deaminasa con hemolizados de células con 21 días de almacenamiento, incubados a - 37°C en MIB pH 7.2 y AMP como sustrato. La línea de -- trazos se ha confeccionado corrigiendo las concentraciones de sustrato por el consumo del mismo en el tiempo del ensayo.

mente similares a las fisiológicas.

Los hemolizados se incubaron de la forma usual y se estudió el efecto de varias concentraciones de ATP, superiores al valor intracelular (1 mM).

Hay que tener en cuenta que en este sistema se conservan actividades ATPasa y AK, y que está presente la hemoglobina que atrapa, en mayor o menor grado, los esteres fosfóricos. Hay datos que indican que aproximadamente un 20% de ATP está unido a la hemoglobina (29).

Haciendo estudios de recuperación de ATP añadido inicialmente se vió que se recuperaba al menos un 50%. Las concentraciones de ATP iniciales que se usaron fueron 2 y 5 mM, obteniéndose el mismo efecto con ambas. Los resultados se representan en la figura nº22, donde se ve un cambio en la cinética del enzima que pasa a ser hiperbólica. La Km para esta cinética se deduce de la representación de inversos, figura nº 23, y resulta ser de 1,8 mM, si no se hace corrección alguna por el AMP desaparecido en los 2 min. de la medida; en realidad algo menor si se representasen las concentraciones medias reales dentro del intervalo de 2 min. Precisamente se han empleado tiempos de incubación tan cortos para minimizar el efecto de desaparición del substrato. En cualquier caso se ha repre-

sentado también la figura con las correcciones por consumo de substrato.

3.3.4. EFECTO DEL 2,3-DPG SOBRE LA CURVA DE SATURACION DE LA ADA.

Se ensayó a concentración fisiológica de 2,3-DPG (5 mM) en presencia de una concentración residual de ATP inferior a 0,03 mM que es la que tienen las células después de 21 días de conservación.

Los resultados se representan en la figura nº 24. Hay que señalar la limitada validez de los datos cuantitativos respecto a concentraciones reales de 2,3-DPG que dan lugar al efecto, aunque sí son válidos en cuanto reproducir la situación del enzima de los eritrocitos conservados a efectos de su comparación con los recién extraídos. La limitación, como se ha indicado reiteradamente, nace de la incertidumbre acerca de la verdadera concentración de 2,3-DPG libre (no ligado a la hemoglobina) y a la conocida pérdida por el efecto de las fosfatasas.

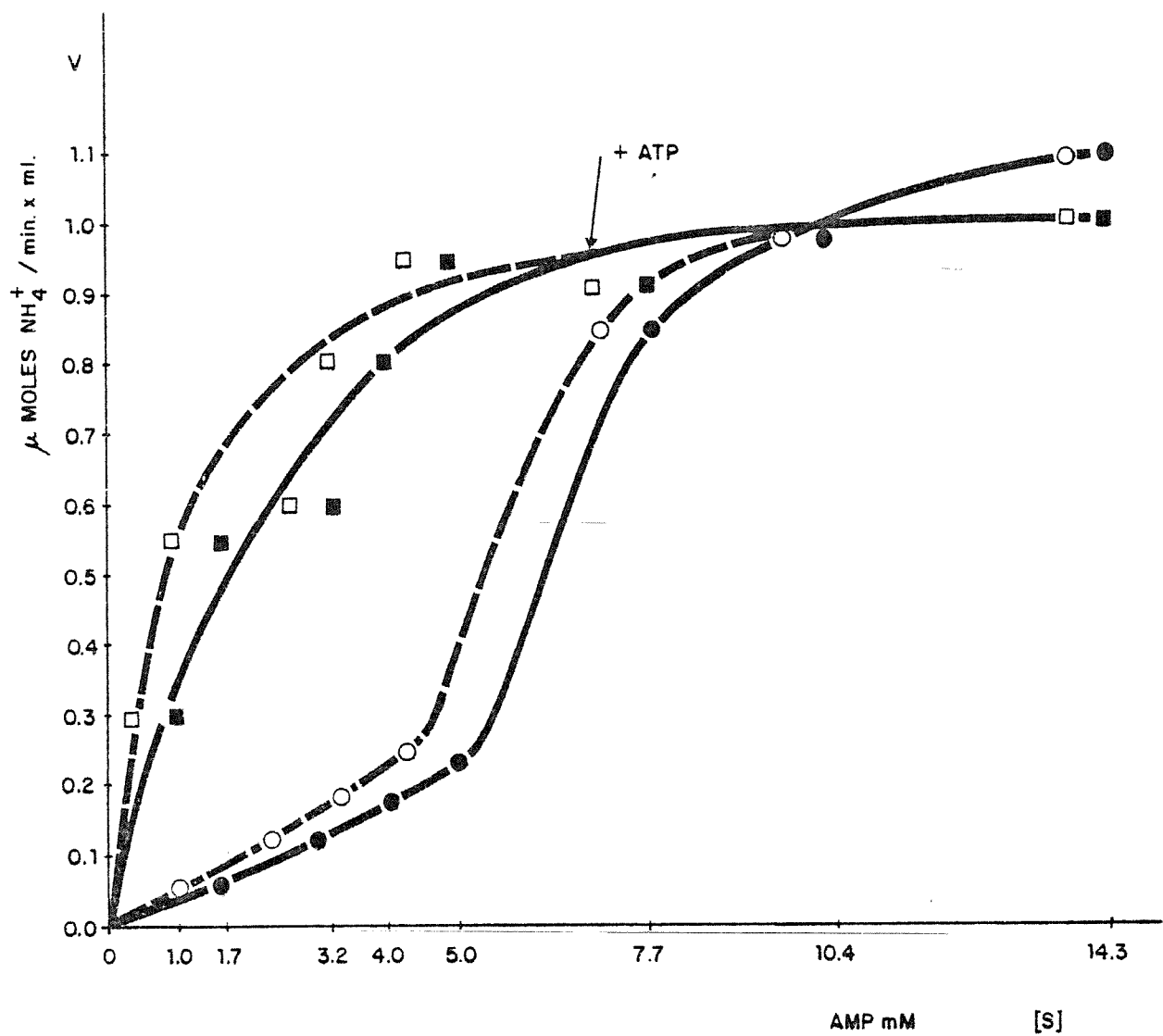


FIGURA Nº 22.- Efecto del ATP sobre la curva de saturación de la AMP deaminasa en hemolizados de células de 21 días de almacenamiento incubados a 37°C en MIB pH 7.2 con AMP (●,○) y con adición de ATP (■,□) 2 y 5 mM. Los signos en blanco corresponden a concentraciones de sustrato corregidas.

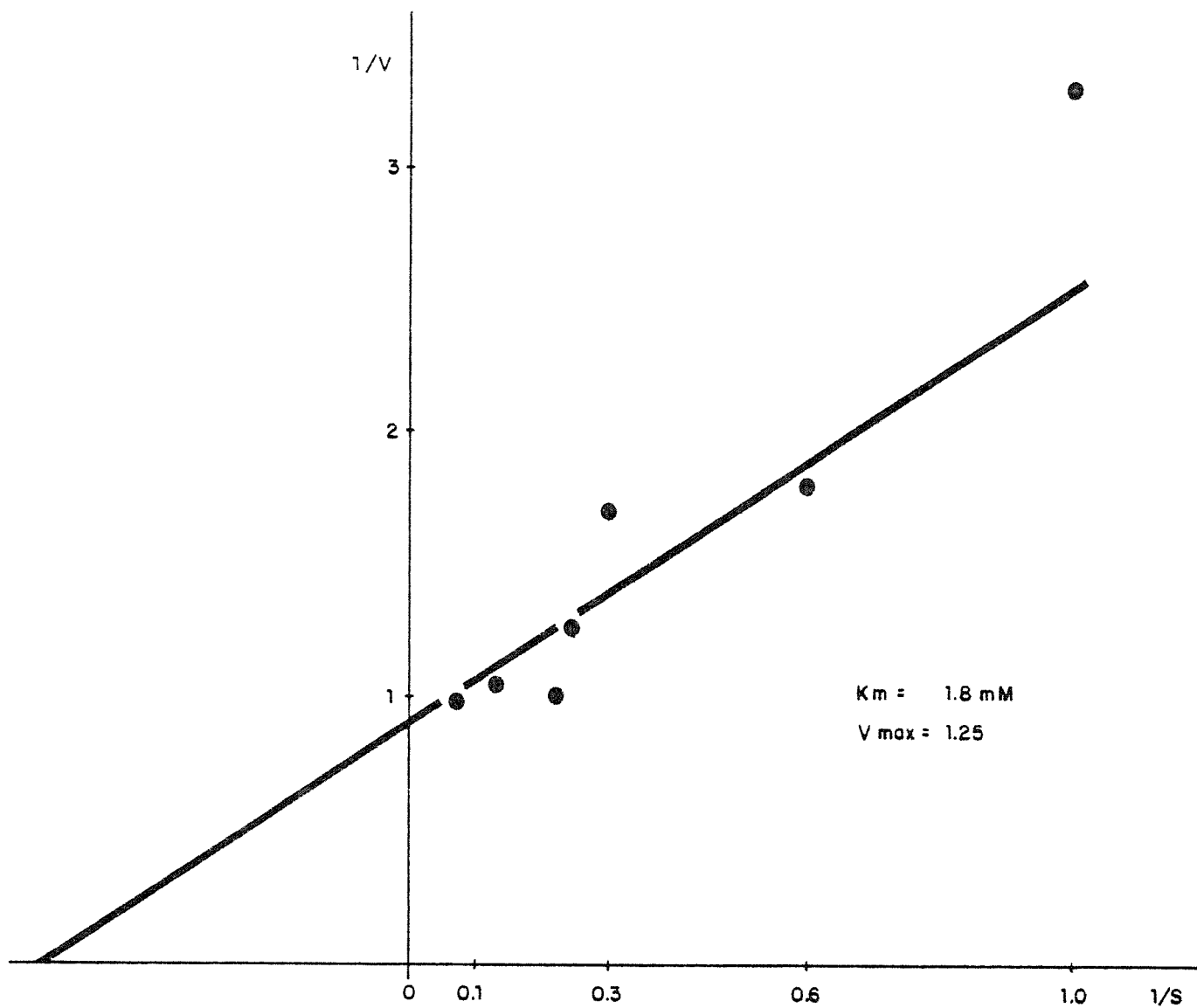


FIGURA Nº 23.- Representación de Lineweaver-Burk correspondiente a la Figura nº 22 (■).

3.3.5. EFECTO DEL ATP MAS 2,3-DPG SOBRE LA CURVA DE SATURACION

En un intento más de estudiar este enzima en unas condiciones lo más similares posibles a las del eritrocito circulante, se realizó este experimento usando los dos efectores, ATP y 2,3-DPG, en concentraciones que están dentro del intervalo de valores fisiológicos, y que son 2 y 5 mM, respectivamente.

El resultado se representa en la figura nº 25 y de él se deduce que el efecto inhibitorio del 2,3-DPG no se manifiesta - en presencia de concentraciones fisiológicas de ATP. Este resultado obliga a reconsiderar conclusiones previas sobre la importancia del 2,3-DPG en la protección del contenido intracelular de adenosinfosfatos contra la degradación via ADA.

3.3.6. EFECTO DEL GTP SOBRE LA TRANSFORMACION DE AMP

Recientemente se ha descrito que el GTP a concentraciones del orden de $50\mu\text{M}$ es inhibidor de la ADA parcialmente purificada de eritrocitos (20), efecto que se contrarresta en presencia de ATP 1 mM.

En nuestro sistema, estudiando la desaparición de AMP, no hemos encontrado ningún efecto a la adición de GTP 1 mM. Si el GTP se acompaña de ATP, la caída de AMP es aún más rápida.

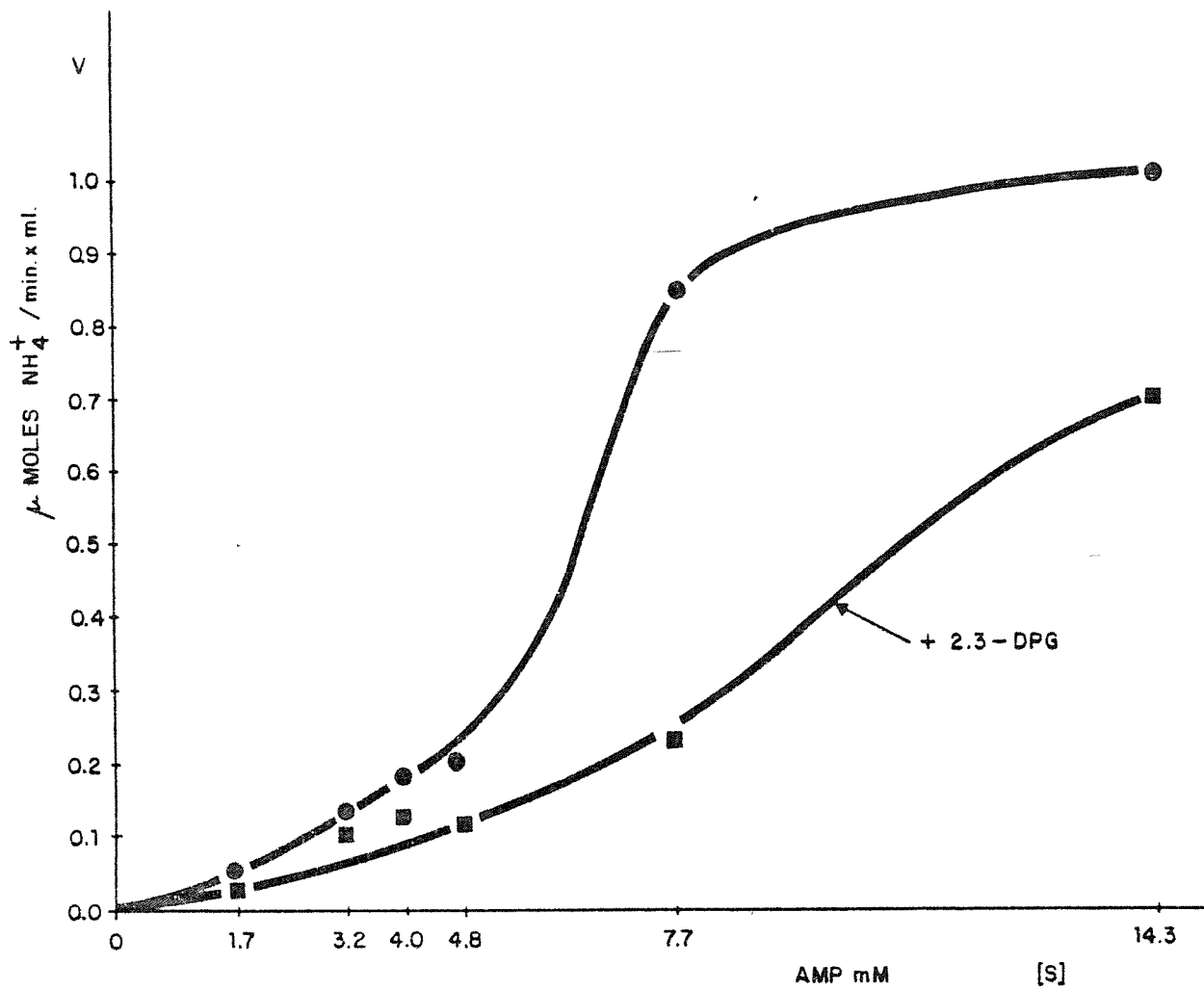


FIGURA Nº 24.- Efecto del 2,3-DPG sobre la curva de saturación de la AMP-deaminasa, en hemolizados de células de 21 días - de almacenamiento incubados a 37°C en MIB pH 7'2 con AMP (●) y con adición de 2,3-DPG (■) 5 mM. No se - ha hecho corrección por consumo del sustrato.

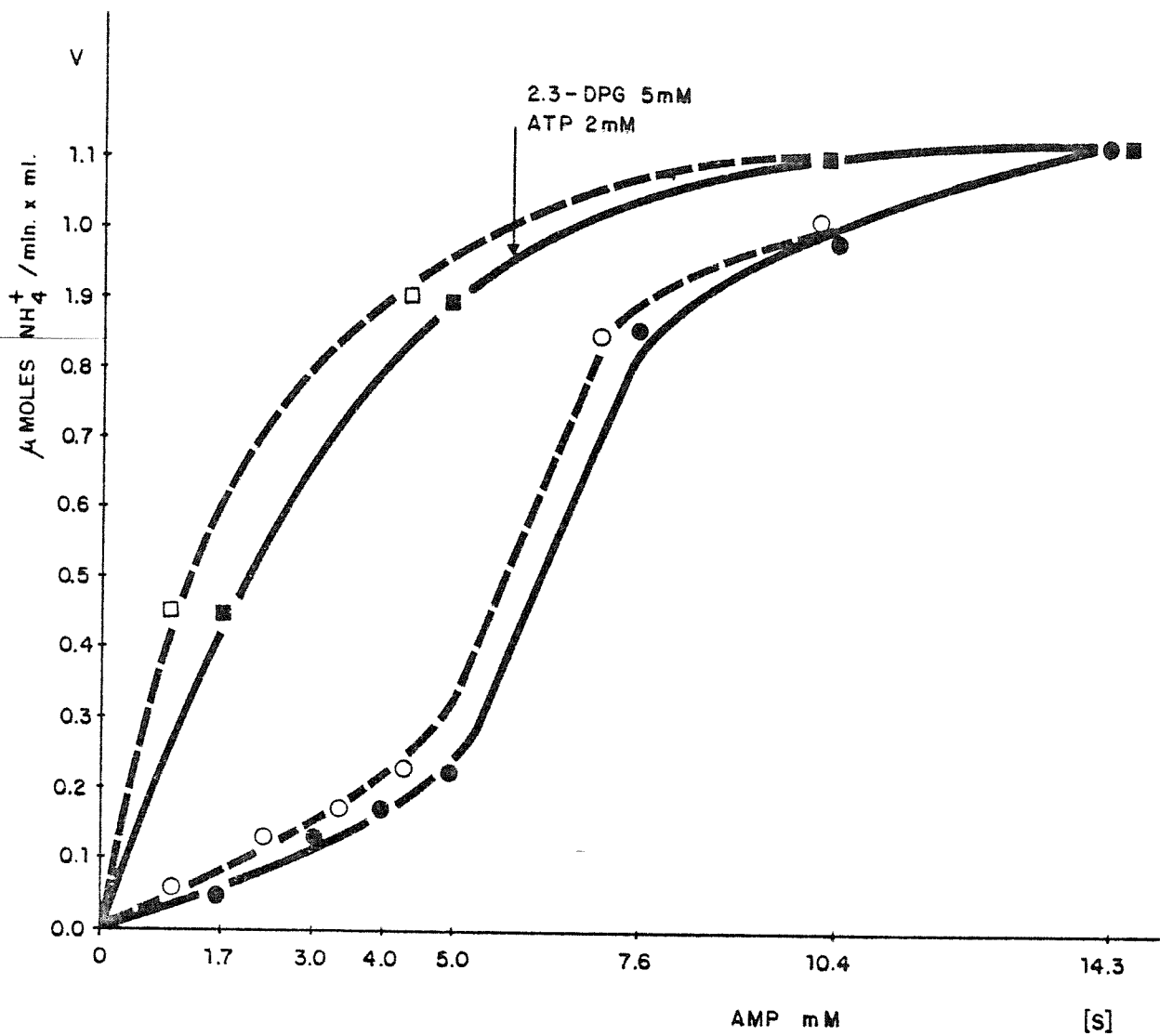


FIGURA Nº 25.- Efecto de ATP y 2 3-DPG sobre la curva de saturación la AMP deaminasa, en hemolizados de células de 21 -- días de almacenamiento, incubados a 37°C en MIB pH - 7'2, con AMP (●,○) y adición de ATP 2 mM y 2 3-DPG 5 mM (■,□). Las líneas de trazos corresponden a concentraciones de sustrato corregidas por consumo durante el tiempo de medida.

Estos resultados obligan a poner en tela de juicio la - hipótesis de que el GTP podría ser la clave de la situación in- hibida de la ADA en los eritrocitos circulantes, ya que se esti ma que la concentración de GTP en éstos es de 0'3 mM. Este pue- de ser un caso típico de efecto real sobre un enzima purificado y separado de su entorno fisiológico, que no parece ocurrir en paralelo en la célula intacta.

3.4. ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES FOSFOHIDROLASAS SOBRE AMP E IMP EN LOS HEMOLIZADOS

En los resultados anteriores se ha visto que sólo una parte del AMP desaparecido, del añadido a homogenados totales, sigue la vía de la aminohidrolasa a juzgar por el IMP y el amonio aparecidos. En este sentido cabe considerar las velocidades iniciales - de ambos procesos, desaparición de AMP y aparición de amonio, o las cantidades totales tras la desaparición de más del 90% del AMP añadido.

En consecuencia se estimó necesario buscar las vías que, además de la desaminación y la fosforilación por AK, pudieran dar cuenta de la mayor parte de la desaparición de AMP. Obviamente, la vía más inmediata a evaluar era la fosfohidrolasa que convertiría el AMP en adenosina y P_i . Esta actividad cabe atribuirle, por una parte, a la 5' nucleotidasa más o menos específica y por otra a acciones inespecíficas o marginales de otras fosfomonoesterasas.

3.4.1. COMPARACION DE CELULAS DE 1 Y 21 DIAS EN CUANTO A ACTIVIDAD FOSFOHIDROLASA.

Puesto que en las curvas de desaparición de AMP se han visto diferencias cuantitativas apreciables entre células recién

temente extraídas (1 día) y en avanzado deterioro en cuanto a niveles de metabolitos fosforilados (21 días) se hizo una comparación directa de la actividad fosfohidrolasa, utilizando hemolizados totales, incubados a 37°C en MIB pH 7.2, usando como sustratos AMP, IMP y α -glicerofosfato, en un intento de ver la especificidad de sustrato de las actividades fosfohidrolasas responsables del P_i aparecido.

Los resultados indican que a concentración 4 mM tanto el AMP como el α -glicerofosfato son usados como sustrato mientras que el IMP no lo es (fig. nº 26). Según estos resultados parece correcto pensar que en estos hemolizados incubados con AMP, aproximadamente el 40% del mismo se hidroliza apareciendo como P_i .

En los hemolizados de células con 1 día de almacenamiento (fig. 27), los resultados son en parte diferentes, ya que se observa actividad fosfatasa usando IMP como sustratos; incluso mayor que con AMP, aunque en total la actividad fosfohidrolasa es aproximadamente 1/3 de la presentada por los hemolizados de células con 21 días de almacenamiento.

Estos resultados sugieren que hay una actividad específica sobre IMP que discrimina entre éste y AMP y que desaparece por almacenamiento, y en cambio, actividades fosfatasa

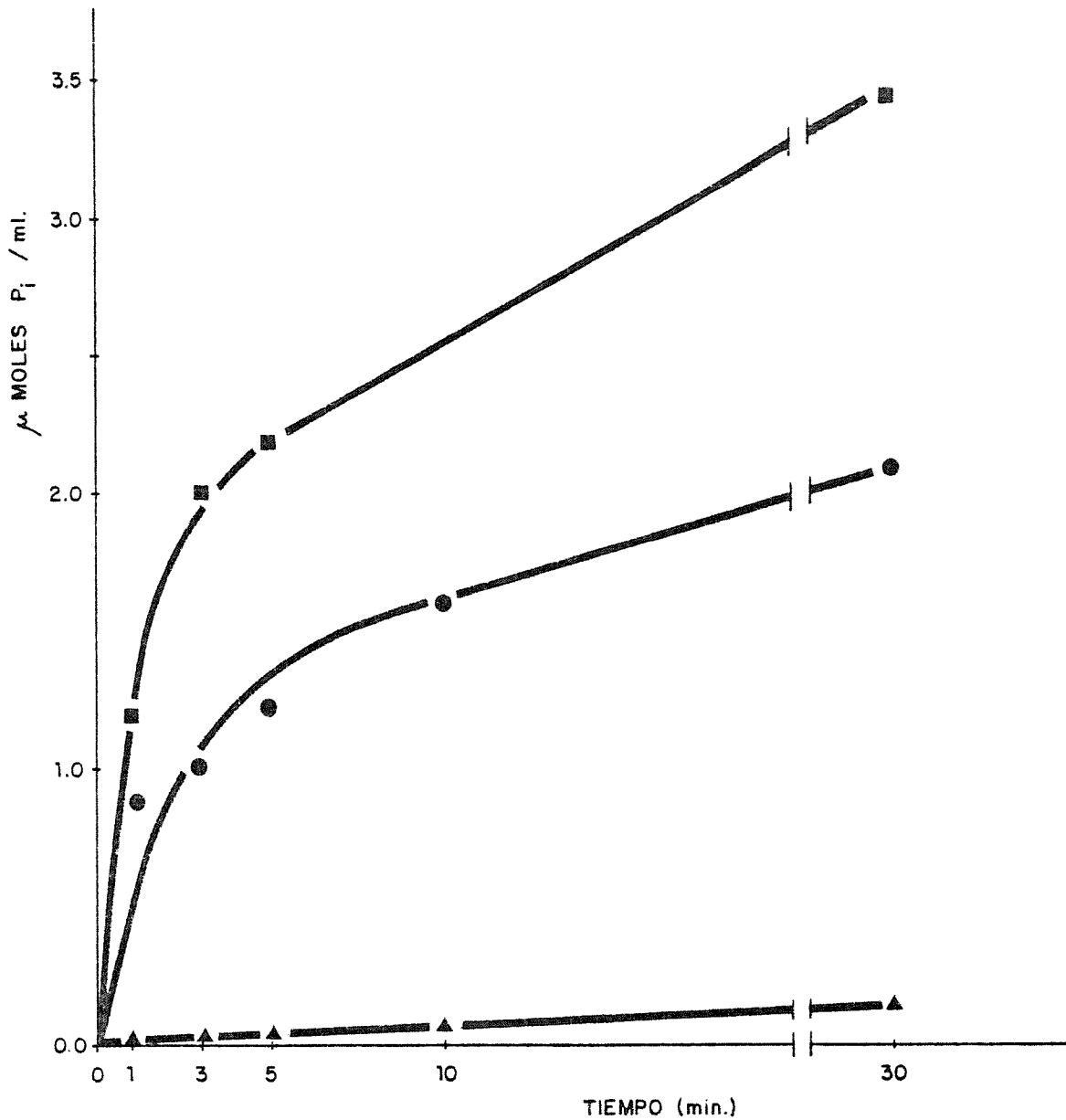


FIGURA N^o 26.- Producción de P_i por hemolizados totales de células con 21 días de almacenamiento, incubados a 37°C en MIB pH - 7.2 con AMP 4mM (●), β -Glicerofosfato 4 mM (■) é IMP 4 mM (▲).

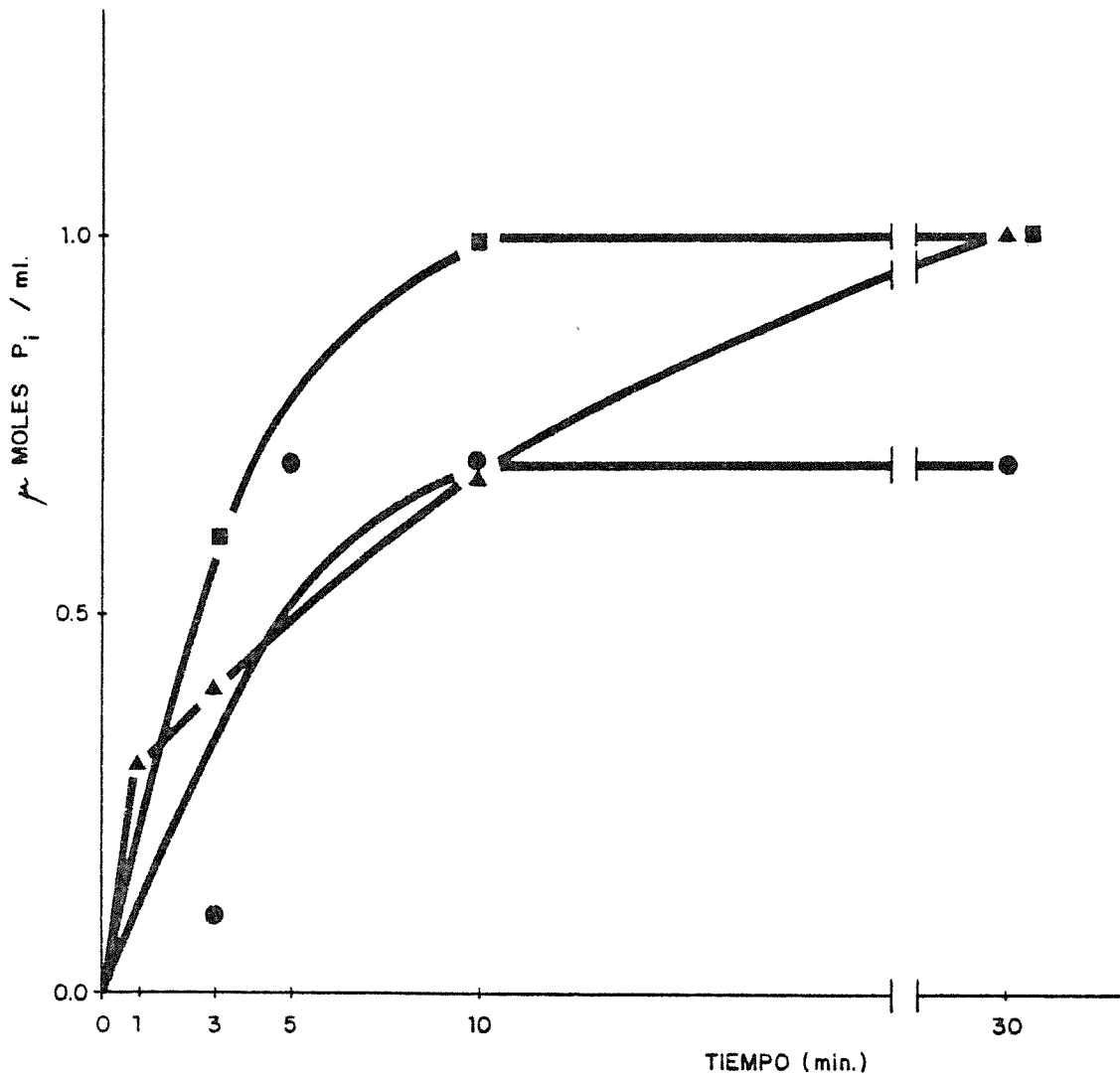


FIGURA Nº 27.- Producción de P_i por hemolizados totales de células con 1 día de almacenamiento incubados a 37°C en MIB pH 7.2 con AMP 4 mM (●), β -Glicerofosfato 4 mM (■) é IMP - 4 mM (▲).

que actúan sobre AMP y β -glicerofosfato pero no sobre IMP, se incrementan durante el almacenamiento. Esto podría deberse a varias causas, tales como desaparición de alguna forma de latencia por envejecimiento, desaparición de un metabolito inhibidor ó conversión de una forma inactiva en otra activa. En cualquier caso y a los efectos que interesan en el presente trabajo, lo importante es la evaluación de la vía fosfohidrolítica que pudiera dar cuenta sustancialmente de la desaparición de AMP observada en los homogenados totales.

3.4.2. ACTIVIDAD FOSFATASA SOLUBLE

Existe evidencia (47) de que ciertas actividades fosfohidrolasa presentes en eritrocitos humanos se encuentran ligadas a la membrana citoplasmática, única que conserva su integridad en estas células. De ellas una UTPasa (48) y una 5'AMP fosfohidrolasa (49) han sido descritas como enzimas integradas en la membrana y con su centro activo orientado hacia el exterior. En cuanto a las múltiples actividades ATPasas detectadas (47) en eritrocitos humanos, no hay evidencia acerca de su orientación aunque sí parecen asociadas a material membranoso. Otro grupo de fosfatasas, que incluye una fosfatasa ácida y una fosfatasa específica para el 2,3-DPG, se han descrito como parte asociada a membranas y parte solubles en el citosol, incluso con marcadas diferencias en las proporciones según el

método seguido para romper las membranas, lo cual arroja fuerte incertidumbre sobre cuanto hay de artefacto en tales asociaciones.

El interés que esta cuestión tiene en el contexto del presente trabajo reside en que se han utilizado homogenados totales en los que la cara externa de la membrana celular se mezcla con los demás componentes del sistema a diferencia de la célula intacta en donde los "ectoenzimas" no tienen contacto directo con los compuestos intracelulares.

En consecuencia, se estimó necesario discernir cuánto de esa actividad fosfatasa total estaba unida a membrana y cuanto soluble en el citosol. Para esto utilizamos hemolizados diluidos preparados e incubados según se explica en MM. En este hemolizado se ensayó la actividad fosfatasa, usando AMP como sustrato, por aparición de P_i . En estas condiciones los hemolizados diluidos 1/5, libres de fragmentos membranosos y dializados 20 h., no exhiben actividad fosfohidrolasa a menos que se complementen con K^+ , Mg^{2+} , y Ca^{2+} (se empleó 0.1 K^+ , 5 mM Mg^{2+} y 4 mM Ca^{2+}); este dato es concordante con estudios de dependencia de cationes de este enzima en otros tejidos (27).

Puesto que un dato clave para interpretar las actividades sobre AMP en los diferentes experimentos anteriores es

el grado de saturación de los enzimas por sus substratos. se estudiaron las curvas de saturación utilizando 2 nucleótidos como substratos AMP e IMP, y un ester fosfórico 2,3-DPG que está presente a concentraciones altas en el hematie (5 mM) -- como índice de una actividad fosfatasa más general, ya que -- reuniría la específica y la posible fosfomonoesterasa inespecífica. Los resultados se muestran en las figuras nº 28, 29 y 30.

Puede observarse que la actividad sobre AMP presenta una curva de saturación aparentemente bifásica, como si hubiera dos entidades enzimáticas, una con cinética hiperbólica de Km del orden de 3 mM y otra sigmoide de $S_{0,5}$ alrededor de 40 mM. En el caso del IMP se observa solamente el componente sigmoide con $S_{0,5}$ aproximadamente de 20 mM y velocidad máxima -- del orden de la mitad de la correspondiente a AMP. También sobre 2,3-DPG se observa una curva sigmoide, con $S_{0,5}$ igualmente alto (próximo a 30 mM).

No ha sido propósito del presente estudio caracterizar las diversas entidades posiblemente responsables de estas curvas de saturación. A efectos del objetivo que aquí se persigue se tomará la curva del AMP como indicativa de una superposición de una actividad específica (la del tramo hiperbólico) y otra que comparte con difentes esteres fosfóricos y que en --

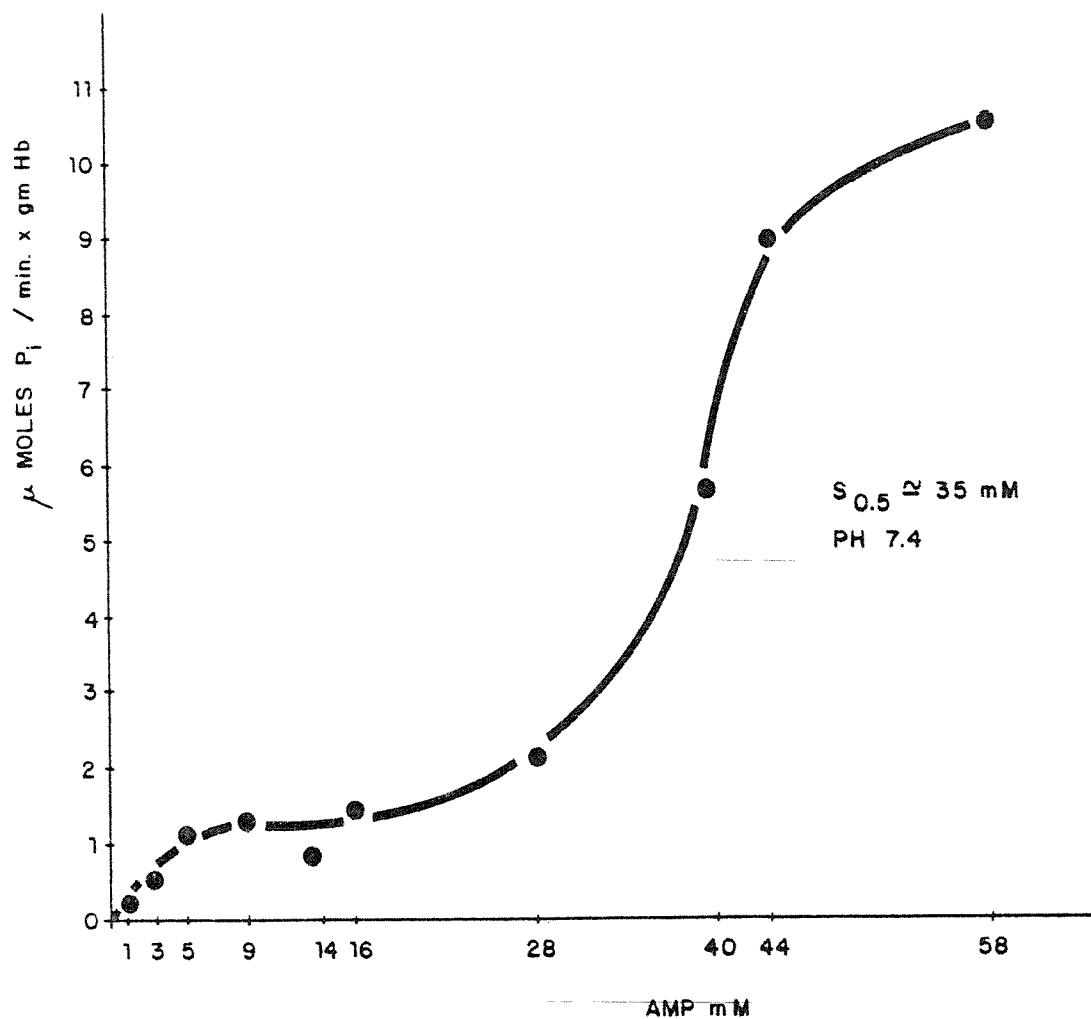


FIGURA Nº 28.- Curva de saturación de la 5' -Nucleotidasa utilizando AMP como substrato.

Hemolizados 1/5 incubados a 37°C en Imidazol 50 mM pH 7'4, CLK 100 mM, Cl₂Ca 4 mM y Cl₂Mg 5 mM.

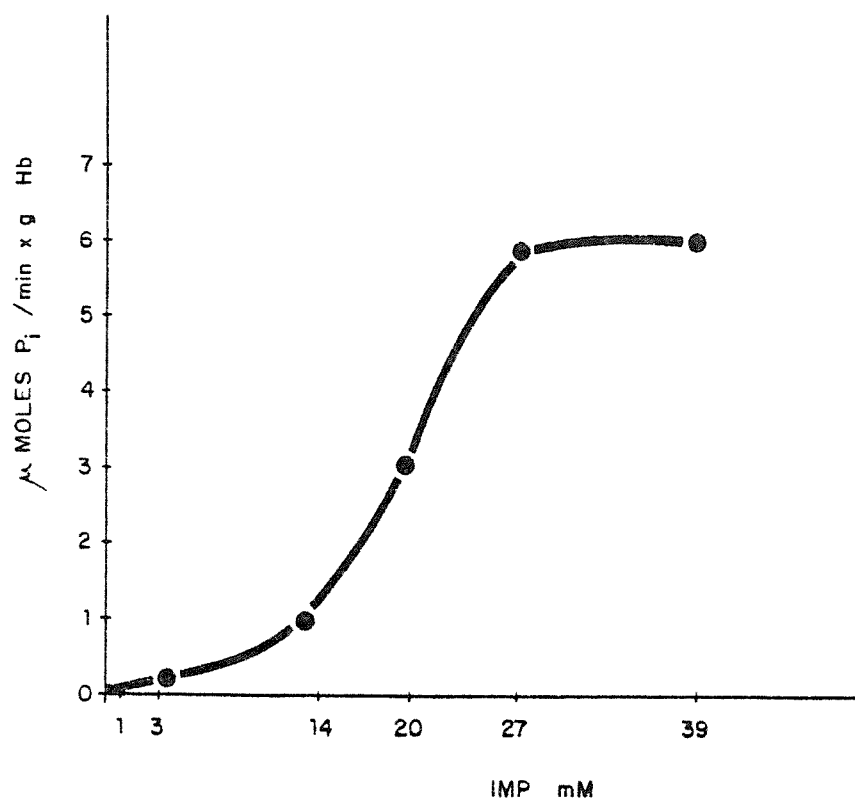


FIGURA Nº 29.- Curva de saturación de la 5'-Nucleotidasa utilizando IMP como sustrato.
 Hemolizados 1/5 incubados a 37°C en Imidazol 50 mM pH 7.4, ClK 100 mM, Cl₂Ca 4 mM y Cl₂Mg 5 mM.

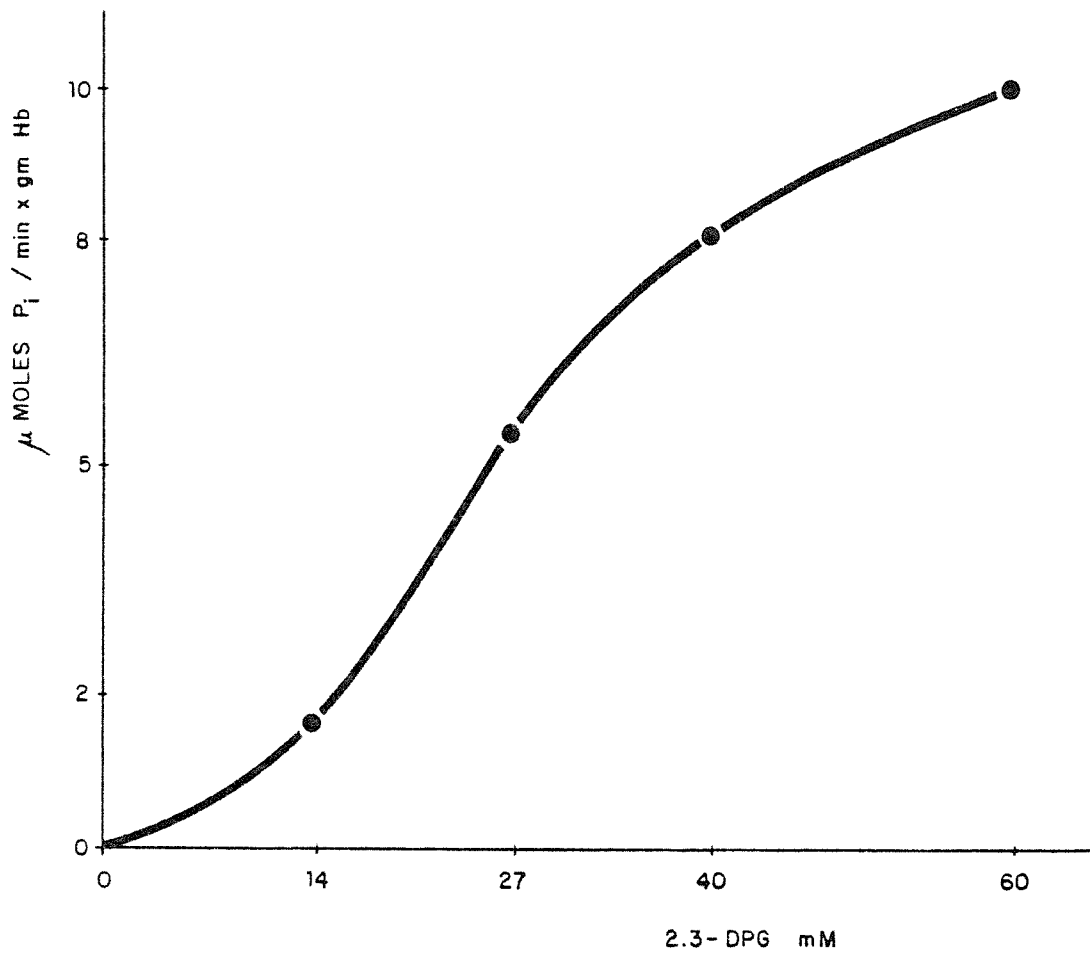


FIGURA N^o 30.- Curva de saturación de la fosfatasa utilizando 2,3-DPG como sustrato.
 Hemolizados 1/5 incubados a 37°C en Imidazol 50 mM pH 7.4
 CLK 100 mM, Cl₂Ca 4 mM y Cl₂Mg 5 mM.

los rangos de concentración utilizados en los experimentos de desaparición de AMP, se estima despreciable.

Dado que la actividad del tramo hiperbólico medible en el rango de concentraciones de substrato inferiores a 10 mM parece específica para AMP, se puede aceptar que se trata de la 5'AMP fosfatasa descrita por Parker (49), que según este autor se orienta al exterior y que en consecuencia no actuaría "in vivo". Es pues una actividad introducida por la hemólisis a deducir de la que en condiciones similares ocurriría en los eritrocitos intactos. Más adelante se integrará este dato en una discusión general de las vías de agotamiento de adenosinfosfatos en eritrocitos conservados en banco de sangre.

3.4.3. INFLUENCIA DEL pH EN LA ACTIVIDAD 5'NUCLEOTIDASA

Un factor de variabilidad en el curso de las transformaciones que sufren los eritrocitos durante el almacenamiento es una ligera caída de pH por acumulación de ácido láctico. Por ello se estimó necesario comprobar hasta qué punto este cambio de pH pudiera tener un papel decisivo en el comportamiento de la actividad fosfatasa capaz de hidrolizar el AMP.

Para ello se realizó un experimento en el que se uti-

lizaron hemolizados diluidos 1/5, libres de fragmentos membranosos y dializados según se indicó en MM; estos hemolizados se incubaron a 37° con imidazol 50 mM pH 7'4, Tris-maleato 50 mM pH 6'3, ó Tris-ClH 50mM pH 6'9, Cloruro potásico 0,1 M, Cloruro cálcico 4 mM, Cloruro magnésico 5 mM y AMP ó IMP a concentraciones de saturación (50 mM) ya que inicialmente se buscaba un efecto sobre V_{max} . de hidrolasas de K_m presumiblemente alta.

Los resultados se representan en la fig. nº 31, donde se puede ver que las diferencias en velocidad máxima observadas entre AMP e IMP comentadas anteriormente, son dependientes del pH, lo cual no es sorprendente ya que ambos substratos tienen grupos ionizables opuestos en la base y por tanto responden en forma diferente a cambios en la protonación del centro activo del enzima.

Se completó este estudio con las curvas de saturación del AMP a los diferentes pHs por si además del efecto sobre V_{max} , observado en la figura 31, se produjesen marcadas diferencias en los parametros más relacionados con la afinidad. - La fig. nº 32 indica que los tramos correspondientes a cinética hiperbólica, no presentan cambios dramáticos en el intervalo de pH estudiado, y en el tramo sigmoide el cambio de los valores del $S_{0.5}$ presenta diferencias modestas. Tampoco hay -

cambio apreciable en el hábito general de las curvas.

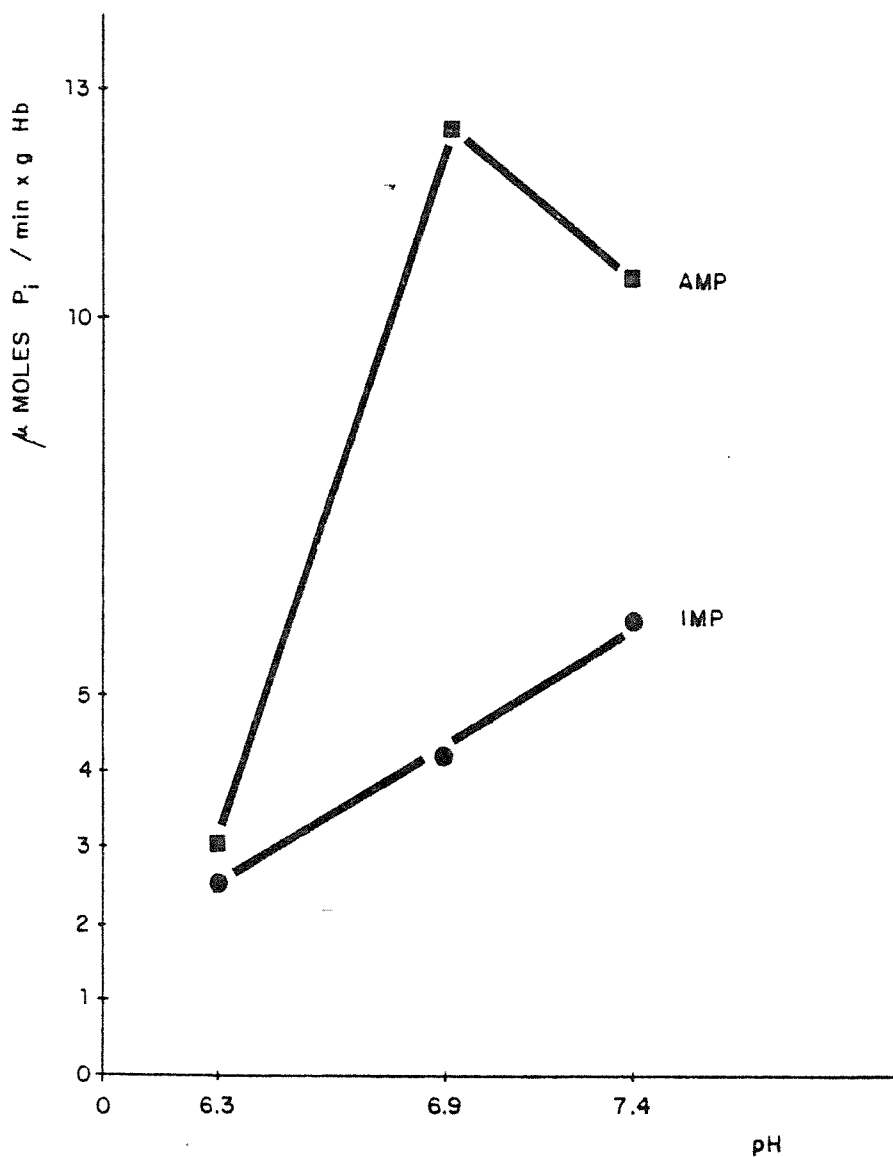


FIGURA nº 31.- Influencia del pH en la actividad 5'nucleotidasa.
 Hemolizados 1/5 incubados a 37°C en imidazol 50 mM pH 7'4,
 Tris-ClH 50 mM pH 6'9 ó Tris-maleato 50 mM pH 6'3, CLK -
 0,1 mM, Cl₂Ca 4 mM, Cl₂Mg 5mM y AMP ó IMP 50 mM.

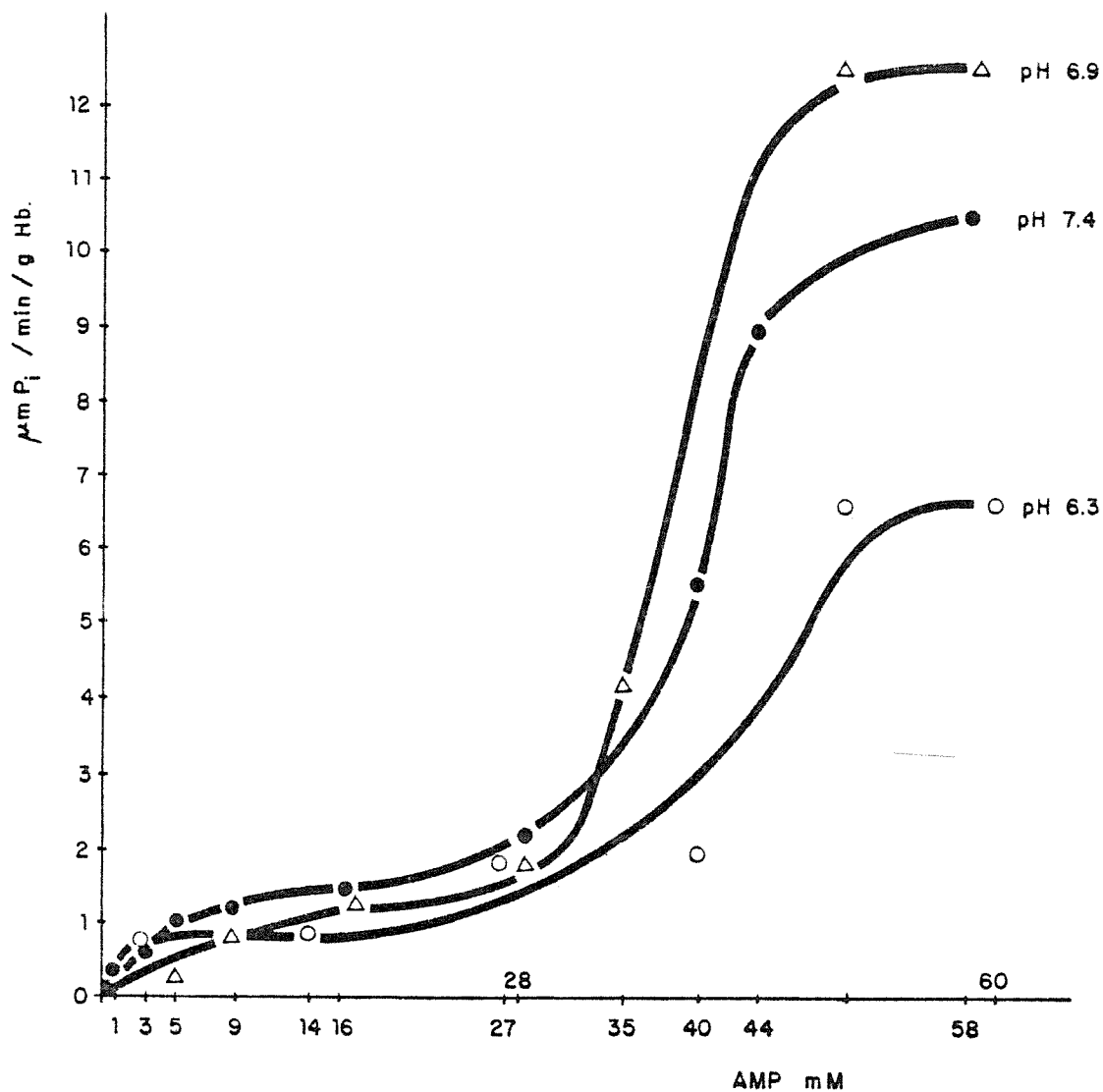


FIGURA 32.- Influencia del pH sobre la curva de saturación de la 5' nucleotidasa.

Hemolizados 1/5 incubados a 37°C con:

- Imidazol 50 mM pH 7'4
- Tris-maleato 50 mM pH 6'3
- Tris-ClH 50 mM pH 6'9, según los casos, más CLK 0.1 mM, Cl₂Mg 5 mM, Cl₂Ca 4 mM y AMP.

IV. DISCUSSION GENERAL

1.- CONSIDERACIONES METODOLOGICAS

Una cuestión previa que afecta a la totalidad de los resultados se refiere a la metodología. La evaluación precisa de velocidades de reacción enzimáticas en una suspensión espesa, cargada de hemoglobina y en la que coexisten e interaccionan todas las actividades enzimáticas presentes en los eritrocitos, plantea de entrada una serie de problemas que ha sido preciso ir resolviendo antes de dar por buenos los resultados. No siempre ha sido posible una solución óptima, - sino más bien una solución de compromiso entre las diferentes maneras de paliar errores y artefactos.

En particular se han considerado las siguientes opciones:

- Separar o no los fragmentos membranosos por centrifugación. Puesto que hay evidencia de que numerosos enzimas se adhieren a la membrana por su cara interna, se optó por utilizar los homogenados totales, aún sabiendo que se introducen actividades fosfohidrolasa presentes en la cara externa y por tanto, ajenas a las actividades internas en la célula intacta.

- Utilizar o no detergentes; tales como Triton X-100, para facilitar la desintegración de fragmentos membranosos y aglomerados artefactuales, principalmente a partir de dichos fragmentos. Se estimó que las disociaciones artificiales de lípidos y proteínas y de éstas en-

tre sí en relación sobre todo con sus zonas hidrofóbicas, provocadas - por el detergente, constituirían mayor alteración de las interacciones naturales existentes que la aglomeración espontánea.

- Dializar o no los homogenados antes de operar con ellos restaurando después la composición iónica fisiológica. Se optó por no dializar los homogenados estimando menos perjudicial arrastrar la composición iónica y de metabolitos de las células lavadas al momento de su rotura, debido a las numerosas incógnitas en relación con metabolitos y sus interacciones con la hemoglobina.

- Sistema de desproteínizado y recuperación de metabolitos totales. El descrito en Materiales y Métodos se adoptó tras pruebas de recuperación de diferentes compuestos y reproducibilidad de resultados.

- Criterios sobre concentraciones de sustratos y efectores y su conservación durante el tiempo de ensayo. Obviamente, hay que contar con que los compuestos añadidos, sean sustratos o efectores, van a quedar sometidos a la acción transformadora de cualquier enzima del que sean sustratos; así por ejemplo el ATP puede ser hidrolizado por diferentes fosfotransferasas y utilizado por fosfotransferasas si hay sustrato aceptor presente.

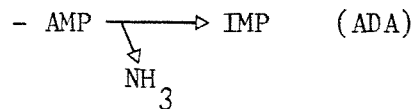
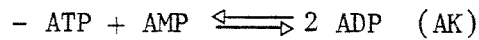
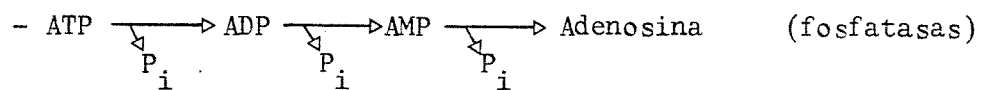
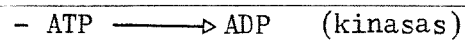
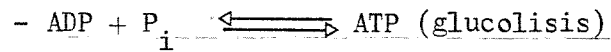
En consecuencia, se han determinado las curvas de desaparición en el tiempo en todos los casos en que existía el riesgo indica-

do; se han adoptado tiempos de incubación suficientemente cortos para que la desaparición fuera inferior al 10% e incluso, cuando ha sido necesario, se han introducido las correcciones oportunas para establecer una concentración media en el periodo de reacción. En todo caso se ha operado sobre concentraciones totales, únicas controlables experimentalmente y único dato objetivo que podemos manejar.

2.- GLICOLISIS E INTERCONVERSION DE FOSFATOS DE ADENOSINA

Aunque se tenían suficientes indicios de que la glucolisis estuviera limitada por el bajo nivel de adenosinfosfatos, de los que nos ocuparemos más adelante, cabría la posibilidad de que además, se hubiesen perdido los coenzimas NAD^+ (NADH), necesarios para la continuidad de la glicolisis a nivel de la gliceraldehido fosfato deshidrogenasa, o el NADP^+ (NADPH) menos importante pero cuya falta contribuiría a la acumulación de G6P y consecuentemente, a la inhibición de la HK.

No era este el caso. El conjunto de resultados sugiere que la evolución de los niveles de cada uno de los fosfatos de adenosina se ha de interpretar considerando en forma integrada las 5 grandes --
vias:



Las tres primeras (excluyendo la hidrólisis del AMP), con sideradas en conjunto, constituyen en esencia el proceso reversible

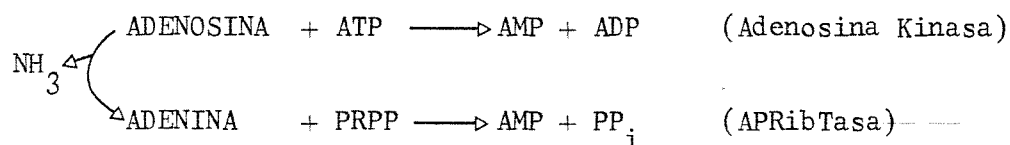


La última, junto con la hidrólisis del AMP constituye la - via de pérdida irre recuperable y la 4ª conecta ambos grupos, con lo que se abre la posibilidad de pérdida de la totalidad de los adenosinfosfato.

3.- LAS VIAS DE PERDIDA IRRECUPERABLE DEL AMP

Es preciso aclarar que la hidrólisis del AMP dando adenosini

na más P_i no es en rigor irrecuperable puesto que existen, al menos -
teóricamente, 2 vías de recuperación:



Parece que ambas existen en eritrocitos maduros e incluso hay estudios que indican un papel predominante para la primera (50, 51). La razón de que en la práctica no se puede contar con ellas es que en la situación que nos ocupa no hay cantidad apreciable de donadores del grupo fosforilo.

Si, como se ha indicado en la Introducción, se conocen -- los niveles del flujo glicolítico tanto operacionales como máximos posibles, (es decir, en ausencia teórica de freno que la regule), y si, por otra parte, se ha postulado (9) que la AK está en exceso tal que la relación de masas de los tres fosfatos de adenosina coinciden con la constante de equilibrio del enzima en eritrocitos circulantes en estado estacionario, quedaban las incógnitas de qué papel juegan cuantitativamente las vías de pérdida irreversible: fosfohidrolasa y aminohidrolasa, y hasta qué punto las relaciones entre estas vías y las no consuntivas indicadas anteriormente son en los eritrocitos - conservados diferentes a las que se dan en los eritrocitos circulantes. En otras palabras, hasta qué punto los hemolizados de ambos ti-

pos de eritrocitos presentan diferencias cuantitativas en sus actividades enzimáticas que puedan explicar el hecho indiscutible de que los eritrocitos circulantes conservan su dotación de adenosinfosfatos durante unos cuatro meses, mientras los conservados en el banco de sangre la pierden en pocos días.

Consideremos en primer lugar el papel de la adenilato kinasa. La tabla 3 indica que en los eritrocitos de 1 día, la relación de masas $(ATP) \times (AMP) / (ADP^2)$, que en condiciones basales está bastante cercana a la unidad, y que se altera momentáneamente al añadirle el AMP, retorna en 1 min, o menos al valor de equilibrio, como corresponde a un sistema en que este enzima es el predominante entre las vías de transformación del AMP. En los de 21 días sucede algo similar (salvo para los valores basales) aunque los bajísimos niveles de ATP hacen que las medidas tengan mayor margen de incertidumbre. Es decir la adenilato kinasa sigue siendo una vía predominante en la utilización de AMP a tiempos muy cortos. Lo que sucede es que una vez llevados a equilibrio los nucleosido-fosfatos libres, deja de notarse su acción.

4.- DEGRADACION DEL AMP

Consideremos a continuación las vías de degradación irreversible del AMP: desaminación y desfosforilación.

Las curvas de desaparición de AMP combinadas con los resull

dos sobre aparición de IMP , NH_3 y P_i , permiten sacar algunas conclusiones. La rápida caída dentro del primer minuto puede corresponder mayoritariamente a la AK. Una observación a la que no hemos podido encontrar explicación es el relativamente alto nivel basal de ADP en los eritrocitos conservados que desplaza la relación de masas a valores exageradamente bajos. Esto quiere decir que hay un depósito pequeño de ADP, que no está sometido a la acción de la AK, en forma específica, y eficazmente operativo en el medio ácido que prevalece en los eritrocitos conservados. Podría ser una interacción con una proteína. Como este depósito parece bastante constante y no parece afectar al destino del AMP añadido, no hemos hecho más indagación sobre este punto.

El reparto de la degradación del AMP entre las dos vías mencionadas, está condicionado a las propiedades cinéticas que exhiba la ADA, precisamente en las condiciones de los ensayos los cuales reproducen en buena medida las condiciones intracelulares de eritrocitos recién extraídos y a término de almacenamiento.

Esto no quiere decir que esta vía sea cuantitativamente la dominante, sino que las probabilidades de encontrar diferencias dependientes de la conservación, se estimó que recaerían sobre un enzima sometido a regulación, más bien que sobre fosfatasas inespecíficas y sin regulación establecida.

Sin embargo, como puede verse en los resultados mostrados -

no hay diferencias significativas entre los hemolizados de 1 día y los de 21, en cuanto a la transformación de AMP en IMP se refiere.

En cuanto a la actividad fosfohidrolasa sea dependiente de una 5 nucleotidasa específica sea por fosfomonoesterasas menos específicas, los resultados indican que es algo mayor en los eritrocitos conservados que en los recientes y que, como era de esperar presentan curvas de saturación que indican la acción de más de una entidad enzimática; a las concentraciones fisiológicas de AMP y teniendo en cuenta que la 5 nucleotidasa, dominante en este caso, se sitúa en la superficie externa de la membrana celular se puede concluir que tal acción fosfohidrolasa es despreciable, tanto sobre AMP como sobre IMP. Puesto que la observada en los hemolizados con AMP añadido, a concentraciones iniciales relativamente altas, es básicamente artefactual, su conocimiento sirve precisamente para introducir las oportunas correcciones en las concentraciones de AMP en cada momento y en cada caso, con lo que se interpretan más correctamente las curvas de acción de la actividad aminohidrolasa.

Si la actividad ADA es prácticamente igual en ambos tipos de hemolizados (1 día y 21 días) para unas condiciones de ensayo algo artificiales en cuanto a la concentración de sustrato, cabría que existieran marcadas diferencias en la regulación.

Por ello se ha realizado un estudio detallado incluyendo -

los principales factores descritos para el enzima purificado, a fin de establecer hasta qué punto las propiedades reguladoras de éste son extrapolables a la situación intracelular.

Las curvas de saturación y sus efectores que se han comentado una por una en "Resultados", tomadas en conjunto, indican que prevalece el efecto del ATP sobre cualquier otro, y que el efecto de la desaparición de éste debería frenar la actividad ADA por pasar de una K_m relativamente baja a un $S_{0.5}$ bastante alta.

A concentraciones de AMP del orden de 0.1 mM (rango de -- concentraciones del eritrocito circulante) la actividad ADA puede ser del orden de unas 20 mU/ml. de células. Al descargarse energéticamente las células por cese de la glicolisis, el AMP sube al rango de 1 mM y la curva de saturación de la ADA se desplaza hacia sigmoide, por lo que la actividad actual sigue siendo del mismo orden, al menos inicialmente, para ir decreciendo a medida que el AMP se agota.

Así pues, la hipótesis inicial de que los eritrocitos -- circulantes dispondrían de algún truco para mantener inhibida la ADA, no parece sostenible. Lo único que mantiene relativamente baja la actividad ADA (y también las fosfatasas) es la baja concentración estacionaria de AMP; la mayor temperatura en los eritrocitos circulantes respecto a los conservados se contrarresta con la acidificación y la desaparición del 2,3-DPG en éstos (que a ATP bajo ten

derían a frenar la acción de la ADA). La conclusión global es que el balance de factores hace que tanto en circulantes como en conservados, sea razonable asumir una velocidad de degradación media dentro del orden de 1 a 10 nmoles/min., que en los conservados bajaría gradualmente al agotarse el sustrato. En 24 horas los eritrocitos conservados deberían pues haber perdido ya una fracción sustancial y en 3-4 días deberá haberse perdido la mayoría que es justamente lo que ocurre.

Queda en pie el hecho de que los eritrocitos circulantes, de alguna manera conservan o reponen su dotación de fosfatos de adenosina. Para discutir la posibilidad de que repongan el AMP, revise mos los experimentos relativos al efecto de inosina, adenina y mezcla de ambos.

En primer lugar, el efecto de la inosina sobre la recuperación de ATP (y por tanto de la glicolisis) cuando todavía queda AMP, está claro a partir de nuestros experimentos (con la salvedad que se expuso sobre los niveles de ADP). Lo que parece ocurrir es que cuando la concentración de ATP es muy baja, la glicolisis no se inicia porque su primera etapa (limitante) que es la catalizada por la HK tiene precisamente en eritrocitos una Km anormalmente alta, del orden de 2 mM. La adición de inosina, que se transforma parcialmente en F6P, soslaya esta etapa. A nivel de PFK no hay obstáculo porque su Km para el ATP es muy baja. Así se regenera la glicolisis

(y los metabolitos fosforilados entre ellos el 2,3-DPG) con inosina. Nuestros experimentos de adición de R5P en lugar de adenina aclaran este mecanismo. Claro está que si la inosina se incorpora a las células cuando ya han perdido no sólo los adenosínfosfatos sino incluso la base (ésta y el ribósido atraviesan fácilmente la membrana) no es posible recuperar ATP aunque se amontonen los hexosa fosfatos. Pero si se añade adenina, ésta se transforma en AMP mediante los mecanismos anteriormente comentados y el resto ya no tiene dificultades.

Visto así el conjunto, cabe preguntarse si los eritrocitos circulantes pueden tener un suministro constante de adenina que les permita reponer la que pierden por la vía desaminativa. La adenina plasmática tiene una concentración del orden de $6\mu\text{M}$, ciertamente baja pero un eficiente sistema de transporte activo la utilizaría convenientemente. No hay evidencia, que sepamos, ni en favor ni en contra, sobre tal sistema de transporte. Incluso cabe aventurar que a su paso por el hígado pudieran los eritrocitos estar algún tiempo en espacios donde la adenina tuviera concentraciones locales relativamente altas, ya que se sintetiza activamente en este órgano.

A la vista de todo ello se puede aventurar que la adición de adenina a las bolsas de conservación, cuando todavía tienen los eritrocitos capacidad para fosforilarla, resuelve temporalmente el problema de la pérdida de adenin nucleótidos, pero sólo temporalmen

te, posponiéndose en unos días el desastre. Forzar la dosis de adenina conduce a acumulación de ácido úrico (o sus precursores) en las bolsas, con el consiguiente daño en transfusiones masivas.

El rejuvenecimiento de los eritrocitos en las bolsas horas antes de su empleo, mediante adiciones de adenina e inosina, es perfectamente posible pero requiere una manipulación cuyos riesgos de infección son muy dignos de tenerse en cuenta.

Creemos pues haber clarificado la situación en cuanto a los factores enzimáticos que concurren en el deterioro de la capacidad de los eritrocitos para llevar a cabo su función, así como las posibilidades de manipulación del sistema y los riesgos que entrañan.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La medida de actividades enzimáticas en eritrocitos hemolizados por congelación y descongelación repetida, sin dilución apreciable, puede llevarse a cabo con precisión y reproducibilidad muy aceptables siempre que se observen precauciones en la manipulación.
- 2.- Tales sistemas constituyen la mejor aproximación conseguida hasta la fecha a las condiciones que prevalecen en la célula intacta. La contribución artefactual de la actividad 5'nucleotidasa de la superficie externa no constituye mayor inconveniente porque se han evaluado sus efectos y se han introducido los oportunos factores de corrección.
- 3.- Se han estudiado con este sistema las vías de degradación del AMP, en donde parece residir la causa fundamental de la pérdida irreversible de adenosinfosfatos y consecuentemente, otros ésteres fosfóricos que necesitan regeneración constante, en particular el 2,3-DPG.
- 4.- Se ha estudiado la desaparición de AMP añadido en diferentes condiciones y, en eritrocitos conservados a término y recién extraídos, a lo largo del tiempo, la transformación en IMP y NH_4^+ , así como los niveles de ADP y ATP. También se ha estudiado la hidro-

lisis de AMP e IMP a fin de evaluar la importancia relativa de las diferentes vias degradativas. La mayor importancia corresponde a una acción combinada de la adenilato kinasa y la adenilato aminohidrolasa que conducen a que la reserva de adenosinofosfatos totales se transforme irreversiblemente en IMP.

- 5.- Se han estudiado los parámetros cinéticos de los enzimas degradativos que en las condiciones "in situ" utilizadas son bastante diferentes a las descritas para los enzimas purificados. Las propiedades de los mencionados enzimas degradativos, en condiciones próximas a las que prevalecen en las células intactas, dan cuenta básicamente del proceso de deterioro de los eritrocitos conservados en el banco de sangre en cuanto a su capacidad de transporte de oxígeno a los tejidos.
- 6.- Las diferencias encontradas entre eritrocitos conservados a término y recién extraídos no explican el hecho de que los eritrocitos circulantes conservan un nivel estacionario de adenosinofosfatos. Se postula que estas células tienen pérdidas apreciables de adenina que reponen a expensas de la producción hepática de esta base.
- 7.- A la vista de nuestros resultados se estima que la adición de adenina al medio de conservación contribuye a prolongar en unos pocos días el periodo de validez de la función transpor-

tadora pero es insuficiente para las 3 semanas que se vienen - tomando como tiempo de conservación; por otra parte, no parece útil ninguna manipulación de los enzimas degradativos, ni ciclos de "rejuvenecimiento". Lo aconsejable es acortar los tiempos de almacenamiento.

VI. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1).- H. YOSHIKAWA AND PAPOPORT. "Cellular and molecular Biology of Erythrocytes". Urban & Schwarzenberg. München-Berlin-Wien - (1974).
- 2).- M. NAKAO, T. NAKAO, T. NAGANO, T. ODAKA, K. ADACHI AND MISUGI. "Proceedings of the 1st." International Symposium for cellular Chemistry 521 (1965).
- 3).- JOHN W. HARRIS AND ROBERT W. KELLERMEYER. "The red cell". Published for the Commonwealth Fund by Harvard University Press Cambridge, Massachusetts (1972).
- 4).- IRWIN A. ROSE, JESSIE V. B. WARMS AND EDWARD L. O'CONNELL. - "Role of Inorganic Phosphate in stimulating the glucose utilization of human red blood cells". Biochem. Biophys. Res. -- Commun. vol. 15. nº 1 (1964).
- 5).- IRWIN A. ROSE AND EDWARD L. O'CONNELL. "The role of G6P in the regulation of glucose metabolism in human erythrocytes". J. Biol. Chem. vol 239, nº 1 (1964).
- 6).- IRWIN A. ROSE AND JESSIE V. B. WARMS. "Control of glycolysis in the human red blood cell." J. Biol. Chem. vol. 241. nº 21 (1966).
- 7).- IRWIN. A. ROSE AND JESSIE V. B. WARMS. "Control of red cell glycolysis". J. Biol. Chem. vol 245 nº 16 (1970).
- 8).- IRWIN A. ROSE. "Regulation of human red cell glycolysis: a review". Exp. Eye. Res. 11, 264-272. (1971).
- 9).- R. HEINRICH AND T. A. RAPOPORT. Eur. J. Biochem, 42, 89-95 and 97-105 (1974).
B. KUHN, G. JACOBASCH, C. GERTH AND S. RAPOPORT. Eur. J. - Biochem. 43, 437-442 and 443-450 (1974).

- G. GERBER, H. PREISLAER, R. HEINRICH AND S. RAPOPORT. Eur. - J. Biochem. 45, 39-52 (1975).
- 10).- CRANE R. K. AND SOLS A. "The non-competitive inhibition of brain hexokinase by G6P and related compounds". J Biol. Chem. 210, 597-606. (1954).
- 11).- G. E. J. STAAL, J. F. KOSTER, H. KAMP, L. VAN MILLINGEN-BOERSMA AND C. VEEGER. "Human erythrocyte PK its purification and some properties". Biochim. Biophys. Acta 227, 86-97 (1971).
- 12).- L. NODA. "Adenylate kinase". The enzymes. vol 8 (1974).
- 13).- DANIEL E. ATKINSON. "Stabilization of Adenylate Energy Charge". J. Biol. Chem. vol. 248, nº 23 (1973).
- 14).- P. ARTIER ET J. P. LEROUX. "Glycolyse du globule rouge". Exposé Annuels de Biochimie Médicales. Paris (1969).
- 15).- Z. B. ROSE, J. LIEBOWITA. "2,3-DPG Phosphatase from human erythrocytes". J. Biol. Chem. 245, nº 2. (1970).
- 16).- N. MOURAD. "Effect of prolonged storage on erythrocyte enzymes". Transfusion vol. 9, nº 3, (1969).
- 17).- R. GASALLA CHACON, C. ROMERO GARCIA, J. MARTIN VILLAR, M^a C. SANCHEZ GONZALEZ. "Energética del eritrocito conservado a 4º con ACD, ACD-Adenina y CPD. Sangre vol 19, nº 1 (1974).
- 18).- M. NAKAO, T. NAKAO, M. TATIBANA AND H. YOSHIKAWA. "Phosphorus metabolism in human erythrocyte". J. Biochem. vol 47, nº 5 (1960).
- 19).- A. ASKARI AND S. N. RAO. "Regulation of AMP deaminase by 2,3-DPG: a possible mechanism for the control of adenine nucleotide metabolism in human erythrocytes". Biochim. Biophys. Acta. 151, 198-203, (1968).

- 20).- CHUN-YET LIAN AND B. R. HARKNESS. "The kinetic properties - of ADA from human erythrocytes". *Biochim. Biophys. Acta* 341 27-40, (1974).
- 21).- SHYUN-LONG YUNG AND CLARENCE H. SUELTER. "Human erythrocyte 5'AMP aminohydrolase". *J. Biol. Chem.* vol. 253, nº2 (1978).
- 22).- S. N. RAO, L. HARA AND A. ASKARI. "Alkali cation-activated AMP deaminase of erythrocytes: some properties of the membrane-bound enzyme". *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 651-654 (1968).
- 23).- J. W. DEPIERRE AND M. L. KARNOVSKY. "Ecto-enzymes of the guinea pig polymorphonuclear leucocyte". *J. Biol. Chem.* vol. 249, nº 22 (1974).
- 24).- H. FLEITE, M. CONKLYN, R. D. STEBBINS AND R. SILBER. "Function of 5'-Nucleotidase in the uptake of adenosine from AMP by human Lymphocytes". *J. Biol. Chem.* vol. 250 nº 23 (1975)
- 25).- YIN-TAK WOO AND J. F. MANERY. "5'-Nucleotidase: an ecto-enzyme of frog skeletal muscle". *Biochim. Biophys. Acta*, 397 144-152 (1975).
- 26).- G. I. DRUMMOND AND M. YAMAMOTO. "Nucleotide Phosphomonoesterases". *The enzymes* vol. IV, 3 th. ed. (1971).
- 27).- G. VAN DEN BERGHE, C. VAN POTTELSBERGHE AND H. G. HERS. "A Kinetic study of the soluble 5'-Nucleotidase of rat liver". *Biochem. J.* 162, 611-616 (1977).
- 28).- G. GERBER, H. BERGER, G-R. JANING, AND S. M. RAPOPORT. "Interaction of haemoglobin with ions". *Eur. J. Biochem.* 38, 563-571 (1973).
- 29).- N. HAMASAKI AND ZELDA B. ROSE. "The binding of phosphorylated red cell metabolites to human hemoglobin A" *J. Biol. Chem.* vol. 249, nº 24 (1974).

- 30).- A. WILLIAN SHAFER AND GRANT R. BARTLETT. "Phosphorylated carbohydrate intermediates of the human erythrocytes during storage in acid citrate dextrose". J. Clin. Invest. vol. - 40 nº 7. 1178-1193 (1961).
- 31).- O. AKERBLOM C. H. DE VERDIER, C. HOGMAN. "Restoration of defective oxygen-transport function of stored red blood -- cells by addition of Inosine". Scand. J. Clin. Lab. Invest. vol. 21, nº 3 (1968).
- 32).- C. ROMERO, R. GESALLA, M^a J. FERNANDEZ DE VILLALTA, J.J. - YANGUAS, J. MARTIN-VILLAR. "Estudios de conservación de la sangre en CPD con adición de adenina a debil concentración". Sangre 22(4), 461-467 (1977).
- 33).- D. RUBINSTEIN AND E. WARRENDORF. "An Incubation medium for the elevation of ATP and 2,3-DPG in fresh and long-preserved human erythrocytes". Can. J. Biochem. 53, 671 678 (1975).
- 34).- J. V. STAROS, B. E. HALEY AND F. M. RICHARDS. "Human erythrocytes and resealed ghosts". J. Biol. Chem. vol. 249, nº 15 (1974).
- 35).- J. E. FELIU, J. J. ARAGON Y A. SOLS. "Método para el estudio in situ de enzimas en células animales". VI Congreso de la SEB Sevilla (1975).
- 36).- I. GUTMANN AND A. W. WAHLEFELD. "Methods of Enzymatic Analysis". vol. 3. 1464. Academic Press Inc. New York and London (1974).
- 37).- FISKE & SUBBAROW. "Methods for the estimation of Phosphate" Methods of Enzymology vol. 3, 843 (1957).
- 38).- D. JAWOREK, W. GRUBER AND HANS ULRICH BERGMAYER. "Methods of Enzymatic Analysis". vol. 4, 2127. Academic Press, Inc. New York and London (1974).

- 39).- W. LAMPRECHT AND I. TRAUTSCHOLD. "Methods of Enzymatic Analysis". vol. 4, 2101 Academic Press, Inc. New York and London (1974).
- 40).- E. KUN AND E. B. KEARNEY. "Methods of Enzymatic Analysis". vol. 4, 1802. Academic Press, Inc. New York and London -- (1974).
- 41).- K. JAROSZAWICZ ET M. J. DEGUELDRE-GUILLAUME. "De L'adénosine tetraphosphate IV Chromatographie bidimensionnelle des - nucleotides sur diéthylamino éthyl cellulose". J. Chromatography, vol. 24, 279 (1966).
- 42).- P. GRIPPO, M. IACCARINO, M. ROSSI, E. SCARANO. "Thin layer chromatography of nucleotides, nucleosides and nucleic acid bases". Biochim. Biophys. Acta, vol 95 (1965).
- 43).- CLINICAL BIOCHEMISTRY. Ed. Curtis and Roth de Gryten, New York (1974).
- 44).- SMEETS, MULLER AND WAEL. "NADH-dependent Transketolase -- assay in erythrocytes hemolysates". Clin. Chim. Acta vol - 33, 379 (1971).
- 45).- BRIAN SAVAGE AND NEILL SPENCER. "Rabbit erythrocytes purine nucleoside phosphorylase". Biochem. J. 179, 21-27, 27-34 (1979).
- 46).- B. KYU KIM, S. CHA, AND R. E. PARKS Jr. "Purine Nucleoside Phosphorylase from human erythrocytes". J. Biol. Chem. vol. 243, n° 8, 1763-1776 (1968).
- 47).- STANLEY L. SCHRIER. "Human erythrocytes membrane enzyme: current status and clinical correlates". Blood 50, 2 (1977).
- 48).- BONINSEGNA A. DEANA R. SILIPRANDI D. "The localization of enzymatic activities involved in uridine nucleotides reactions in human erythrocytes". J. Cell Physiol. 83:53-58 (1973).

- 49).- PARKER JC. "Metabolism of external adenine nucleotides by hu
man red blood cell". Am. J. Physiol. 218: 1568-1574 (1970).
- 50).- H. MIYAZAKI, K. NAMBU, Y. MINAKI, M. HASHIMOTO, K. NAKAMURA
"The role of direct phosphorylation in the mechanism od ade-
nosine utilization for nucleotide synthesis in Mouse erythro
cytes". J. Biochem. 76, 409-417 (1974).
- 51).- H. MIYAZAKI, K. NAMBU, M. HASHIMOTO. "Utilization of adenosi
ne for nucleotide synthesis in the erythrocytes of some ani--
mals". J. Biochem. 78, 1075-1078 (1975).