

# OXIDACION DE LA GLUCOSA 2-C<sup>14</sup> EN ERITROCITOS.

Estudio realizado en niños aparentemente normales y en niños en estado de hiponutrición

ALFONSO MONTESINOS BELON

## INTRODUCCION

Como fue demostrado por Warburg en 1930, el eritrocito, además de utilizar la vía de Embden Meyerhorf o glicolítica para el metabolismo de la glucosa, emplea la vía de la pentosa fosfato, vía de Warburg-Dickens-Lipmann o de la hexosa monofosfato. El ciclo del ácido cítrico es en este caso inoperante e incompleto. (1, 2).

El único mecanismo para la producción de CO<sub>2</sub> procedente de la glucosa, es, pues, su metabolización a través de la vía del ciclo oxidativo de la pentosa fosfato. El funcionamiento de esta vía se demuestra, en condiciones apropiadas, por la recuperación de C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> cuando se utiliza como substrato glucosa marcada con C<sup>14</sup>. El rendimiento de C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> por el eritrocito a partir de la glucosa marcada puede ser modificado por factores físicos y químicos como son pH, temperatura, tensión de oxígeno y adición de sustancias catalíticas.

En el eritrocito normal, el consumo de la glucosa se efectúa por la vía de la pentosa fosfato, en una proporción menor que por la vía de Embden Meyerhof (3). Informes de Murphy (3) indican porcentajes que fluctúan entre 7.3 y 16.5% y Lamar Crevasse (4) de 6 y 10%, con promedios de 11.1 y 8% respectivamente.

La oxidación de la glucosa-6-fosfato y la subsecuente decarboxilación del 6-fosfogluconato produce dióxido de carbono proveniente del primer carbono de la hexosa. El residuo es una pentosa cuyo primer carbono fue el segundo de la glucosa original (Fig. N° 1A). Posteriormente la pentosa formada o ribulosa-5-fosfato se convierte en xilulosa-fosfato y ribosa 5-fosfato con el auxilio de enzimas (isomerasa, epime-

rasa). La pentosa fosfato puede participar en la reacción de transce-tolación, actuando la tiamina pirofosfato y  $Mg^{+2}$  como cofactores esen-ciales (21, 10). El glicocaldehído activo de la xilulosa 5-fosfato al con-densarse con la ribosa 5-fosfato forma la sedoheptulosa 7-fosfato y triosa fosfato. El segundo carbono de la molécula de la glucosa original se-ría, pues, el primer carbono de la sedoheptulosa. (Fig. 1B) La siguien-te etapa es la reacción de la transaldolasa en que los tres primeros átomos de carbono se condensan con la triosa fosfato, residuo de la anterior reacción, regenerándose así la hexosa fosfato. El primer átomo de carbono de la nueva hexosa que corresponde al segundo car-bono de la glucosa original se oxida a  $CO_2$  con la reentrada al ciclo de las pentosas. (Fig. 1C).

La producción de  $C^{14}O_2$  procedente de la glucosa 1- $C^{14}$ , por el eri-trocito, sólo indica que el ciclo es operante, mas no indica el fenómeno de la reentrada de la hexosa que se ha resintetizado. La producción de  $C^{14}O_2$  a partir de la glucosa 2- $C^{14}$  implica que glucosa resintetizada en el ciclo de las pentosas es reoxidada en esta vía, hecho que requie-re un adecuado funcionamiento de la reacción de la transcetolasa en que la tiamina pirofosfato es requerida como cofactor.

En el presente trabajo se han realizado incubaciones de glucosa 2- $C^{14}$  con eritrocitos obtenidos de niños aparentemente normales y eri-trocitos de niños en estado de hiponutrición. En algunos casos, de es-tos últimos, se practicaron, además, incubaciones después de un trata-miento con tiamina. Se determinó el rendimiento de  $C^{14}O_2$ . Los resul-tados obtenidos revelan que en los eritrocitos de los niños en estado de hiponutrición, el rendimiento de  $C^{14}O_2$  es menor que en los aparen-temente normales y que el tratamiento con tiamina tiende a normalizar este rendimiento.

## MATERIAL Y METODOS

### *Obtención de la muestra de sangre*

De acuerdo con estudios de nutrición (7) se seleccionó un grupo de veinte niños en estado de hiponutrición, todos ellos procedentes de barriadas del Callao e internados en Salas de Medicina por diversos procesos patológicos; catorce por proceso específico tuberculoso, cua-tro por infección salmonelósica y dos sin diagnóstico. La mayor par-te de los casos presentaban cifras de proteínas totales y hemoglobina por debajo del nivel considerado normal en nuestro medio (8). El

Fig. 1A

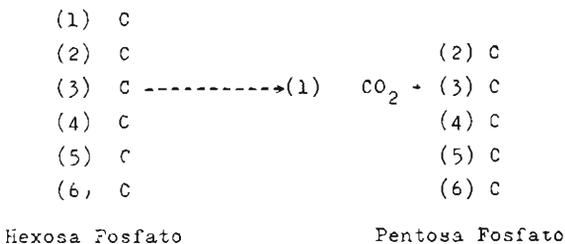


Fig. 1B

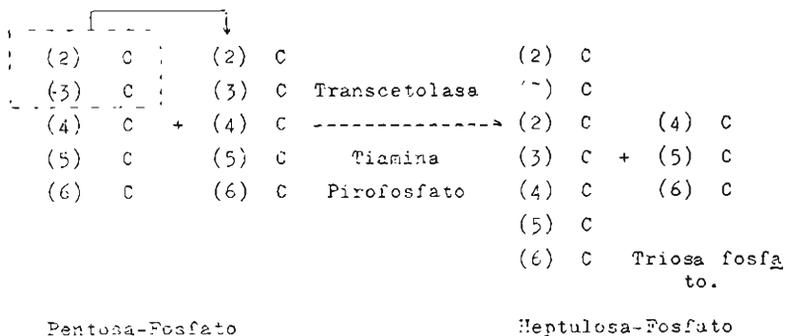
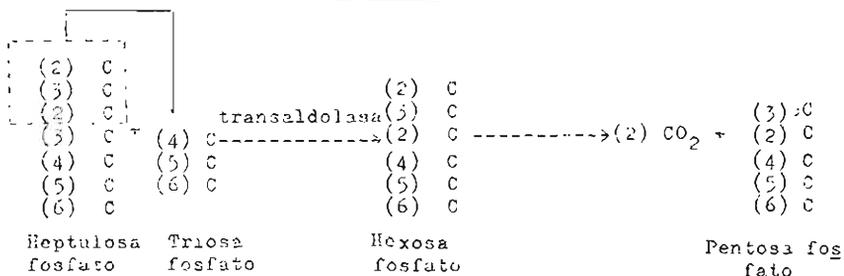


Fig. 1C



tiempo de hospitalización no fue en ningún caso mayor de dos meses. Para excluir posibles alteraciones en relación con la edad, se prefirieron varones de 11 a 14 años.

La selección de los niños aparentemente normales se realizó en unos casos en Salas de Cirugía; se trataba de pacientes exclusivamente hospitalizados para atención traumatológica. En otros casos se seleccionaron niños que acudían a sus centros escolares.

Se extrajo sangre de la vena antecubital, recibiendo en un tubo con heparina. Se conservó en refrigeración a 4°C.

### *Preparación de los Eritrocitos*

Para obtener los eritrocitos libres de plasma y de glóbulos blancos, la sangre heparinizada se centrifugó a 2,000 r.p.m. durante 10 minutos en centrífuga refrigerada a 4°C. El plasma sobrenadante y los leucocitos fueron eliminados por medio de una pipeta Pasteur. Los eritrocitos se lavaron 3 veces con la solución Ringer fosfato. Después de cada lavada se centrifugó a 2,000 r.p.m. durante 10 minutos. Luego de centrifugada la tercera vez, los hematíes fueron suspendidos en cuatro volúmenes de Ringer fosfato. *Procedimiento usado para estudiar el metabolismo de la glucosa 2-C<sup>14</sup> en incubaciones con eritrocitos obtenidos de niños aparentemente normales y niños en estado de hiponutrición.*

Este metabolismo fue estudiado en frascos de Warburg con dos ramas laterales. En una de ellas, se introdujo 0.3 ml. de la solución de glucosa 2-C<sup>14</sup> (30, uM) conteniendo 73,620 cuentas por minuto, y en la otra 0.25 ml. de SO<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 5N. En el compartimiento principal se puso 1 ml. de los hematíes suspendidos en Ringer fosfato, 0.5 de solución de azul de metileno al 0.4% completándose el volumen a 2 ml. con Ringer fosfato. En la copa central 0.15 ml. de NaOH al 20%. Luego se procedió a incubar a 38°C por dos horas, utilizando aire como fase gaseosa. Al término del periodo de incubación se detuvo la reacción mediante la adición del SO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, el cual además desprendía todo el CO<sub>2</sub> disuelto en el medio. Se continuó la agitación durante media hora para la absorción total del CO<sub>2</sub> desprendido. En seguida, se agregó CO<sub>2</sub>Na<sub>2</sub> al 20% libre de CO<sub>2</sub> a la copa central para diluir el C<sup>14</sup>C<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>, transfiriéndose luego el contenido a un tubo de centrifuga tarado para transformarlo en carbonato de bario mediante la adición de una solución conteniendo Ba(OH)<sub>2</sub> y BaCl<sub>2</sub> (16). El precipitado formado se separó por centrifugación lavándose tres veces con agua destilada libre de CO<sub>2</sub> y dos veces con alcohol metílico, luego se secó en estufa a 110°C. por 12 horas. Se procedió a pesar para luego transferirse a planchetas que permitieron la cuenta de radioactividad.

*Métodos Analíticos*

La glucosa radioactiva fue degradada a  $C^{14}O_2$  por el método de la combustión húmeda de Van Slyke y Folch (18).

La radioactividad del  $C^{14}O_2$  se determinó en un detector con flujo de gas y las cuentas por minuto fueron corregidas a grosor cero mediante una curva de absorción preparada en el Instituto de Bioquímica y Nutrición (17). Se calcularon las cuentas totales producidas y en seguida se calculó el porcentaje que esta cantidad representa con relación a las cuentas por minuto de la glucosa presente en el frasco de incubación.

*Reactivo Especial*

La glucosa 2- $C^{14}$  fue obtenida del Nuclear Instrument and Chemical Co.

## RESULTADOS OBTENIDOS

Los valores indicados expresan el porcentaje de cuentas por minuto de la glucosa 2- $C^{14}$  inicialmente presente en el frasco de incubación, que se ha incorporado al  $C^{14}O_2$  por 100 mg. de peso seco de eritrocitos. (Tabla I).

Los valores indicados expresan el porcentaje de cuentas por minuto de la glucosa 2- $C^{14}$  inicialmente presente en el frasco de incubación, que se ha incorporado al  $C^{14}O_2$  por 100 mg. de peso seco de eritrocitos. (Tabla II).

A los casos seleccionados se administró por vía oral 600 mg. diarios durante siete días. Al término de este período se obtuvo muestra de sangre para nuevas incubaciones en condiciones similares a las anteriormente practicadas. Las cifras indican porcentaje de la radioactividad inicialmente presente incorporada por 100 mg. de peso seco de eritrocitos. (Tabla III).

En las Tablas I y II se presentan los resultados individuales de la incorporación de  $C^{14}$  de la glucosa al  $C^{14}O_2$  referidas en porcentaje de las cuentas inicialmente puestas en el medio de incubación y por 100 mg. de peso seco de eritrocitos. Se puede ver que el valor medio en los niños aparentemente normales es de 2.45 y en los niños en estado de hiponutrición 1.25. Es decir, que hay una menor oxidación de la glucosa 2- $C^{14}$ . Como se puede ver en la Tabla IV el valor de P en la comparación de los dos grupos es  $<0.001$  y por ello la diferencia es estadísticamente significativa.

En los casos de niños en estado de hiponutrición tratados con tiamina, —Tabla III— se puede ver que los valores medios de los dos grupos, antes y después del tratamiento son de 1.06 y 1.73 respectivamente. Esta diferencia analizada estadísticamente en la Tabla IV muestra un valor de  $P < 0.01$ , lo cual, indica una diferencia significativa.

**Tabla I. Resultados Obtenidos en niños aparentemente normales**

CASO N°	EDAD	VALORES OBTENIDOS
1	14	2.07
2	11	1.98
3	14	2.95
4	12	3.04
5	12	3.00
6	12	2.25
7	14	2.71
8	11	2.03
9	13	2.11
10	14	2.51
11	14	1.97
12	11	2.22
13	12	3.11
14	12	3.34
15	13	1.93
16	13	1.99
17	11	2.62
18	11	2.39
19	13	2.48
20	11	2.23

Análisis estadístico

N° de casos	Media $\pm$ Error Standard	Desv. Stand. $\pm$ Error Stand. de Desv. Stand.	Coef. Variación	Valores Extremos
20	2.45 $\pm$ 0.099105	0.443 $\pm$ 0.07005	18.08 %	1.93-3.34

DISCUSION

Como demostraron Guzmán Barrón y Harrop en 1928 (9), la adición de azul de metileno al sistema buffer experimental incrementa notablemente el consumo de oxígeno, que es considerado bajo, si se compara con otros tejidos. La ausencia de flavoproteínas y citocromos en

las incubaciones de eritrocitos es suphda, con ventaja por la adición del colorante. Los citocromos, al igual que muchas flavoproteínas están contenidos en el complejo lipoproteico de la fracción mitocondrial que está ausente en el eritrocito maduro. Como se sabe, ambas sustancias están ligadas a la oxidación del TPNH.

**Tabla II. Resultados Obtenidos en niños en estado de Hipernutrición**

CASO N°	EDAD	VALORES OBTENIDOS
1	11	0.94
2	13	1.11
3	14	1.89
4	12	1.46
5	11	0.46
6	14	0.74
7	12	1.60
8	13	1.00
9	13	0.86
10	14	0.98
11	11	1.83
12	12	1.64
13	12	1.20
14	14	1.72
15	13	1.53
16	11	1.46
17	14	0.71
18	11	1.16
19	13	1.26
20	11	1.41

Análisis estadístico

N° de Casos	Media $\pm$ Error Standard	Desv. Stand. $\pm$ Error Stand. de Desv. Standard	Coef. Variación	Valores Extremos
20	1.25 $\pm$ 0.0897	0.3977 $\pm$ 0.062889	31.81 %	0.46-1.89

Estudios últimos indican que el colorante no sólo incrementa el catabolismo de la glucosa, sino que determina una alteración de la proporcionalidad en el funcionamiento de las vías (4). Se sugiere que probablemente ocurre un cambio del catabolismo de la glucosa, de la vía de Embden Meyerhof hacia la vía de la pentosa fosfato.

Los eritrocitos, no producen  $C^{14}O_2$  a partir de la glucosa  $6-C^{14}$  (21), lo cual demuestra que la activación de la glucosa está confinada a la

**Tabla III. Oxidación de la glucosa 2-C<sup>14</sup> en eritrocitos obtenidos de niños en estado de hiponutrición antes y después de un tratamiento con tiamina**

Experimento	I	II	III	IV	V	VI
Antes de tratamiento	0.86	0.74	1.11	1.20	1.16	1.26
Después de tratamiento	1.90	1.28	2.08	1.99	1.63	1.49

Análisis estadístico

N° de casos	Media $\pm$ Error Standard	Desv. Stand. $\pm$ Error Stand. de Desv. Standard	Coef. de Variación	Valores Extremos
ANTES DE TRATAMIENTO				
6	1.06 $\pm$ 0.0840	0.206 $\pm$ 0.05949	19.51%	0.74-1.26
DESPUES DE TRATAMIENTO				
6	1.73 $\pm$ 0.127	0.311 $\pm$ 0.0899	18.01%	1.28-2.08

**Tabla IV. Análisis de la significación estadística de la comparación de los resultados obtenidos en el grupo de los eritrocitos de niños en estado de hiponutrición y de niños aparentemente normales**

GRADO DE LIBERTAD	VALOR t	VALOR P
38	9.408	<0.001

mitad superior de la molécula. El C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> recuperado en incubaciones con glucosa marcada procede de los carbonos 1 y 2 en un 95% aproximadamente (14). Esto último comparado con estudio del metabolismo de la glucosa U-C<sup>14</sup> ha permitido el estudio del reciclado de intermedios (15).

El mecanismo por el que actúa el azul de metileno favoreciendo estas reacciones sería su autooxidación en el aire y la oxidación del TPNH que se genera en la vía de la pentosa fosfato. Es decir, por su habilidad para el transporte de electrones directamente al oxígeno proporcionaría un eficaz sistema potencial de oxido-reducción (5). Resultaría aquí que un aumento de la oxidación del TPNH determina un incremento de la vía de la pentosa fosfato.

En el presente trabajo se hace un estudio de la oxidación de la glucosa  $2\text{-C}^{14}$  a  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  en eritrocitos de niños aparentemente normales y niños en estado de hiponutrición de edades comprendidas entre los 11 y 14 años.

**Análisis de la significación estadística de la comparación de los resultados obtenidos antes y después de tratamiento con tiamina**

GRADO DE LIBERTAD	VALOR $t$	VALOR P
5	5.2597	$<0.01$

En los resultados obtenidos de los dos grupos estudiados que se aprecian en la Tabla I y II, se puede advertir, que el porcentaje de radioactividad incorporada por 100 mg. de peso seco de eritrocitos obtenidos en el grupo de los niños normales es mayor que el obtenido en el grupo de los niños en estado de hiponutrición. La diferencia encontrada es estadísticamente significativa. Esta comprobación hace notar que en los eritrocitos obtenidos de niños en estado de hiponutrición hay un factor limitante del metabolismo de la glucosa  $2\text{-C}^{14}$ .

Mediante la incubación de eritrocitos de mamíferos alimentados con dieta exenta de tiamina ha sido posible determinar una alteración de la reacción de la transcetolasa (11). Cuando esto sucede, la pentosa puede acumularse puesto que su conversión está impedida. En consecuencia, el carbono 1 de la pentosa (carbono 2 de la glucosa original) puede no revertir a la hexosa fosfato y por ello no ser oxidado a  $\text{CO}_2$ . El consumo de oxígeno varía en relación directa con la cuantía de la decarboxilación de la glucosa (15, 19).

Estudios bien documentados muestran que una deficiencia de tiamina, determina una apreciable acumulación de la pentosa, disminu-

ción de la 7-sedoheptulosa y consecuentemente menor producción de  $C^{14}O_2$  procedente de la oxidación de la glucosa 2- $C^{14}$  (11, 12). Es por esta razón que para evaluar variaciones en la producción de  $C^{14}O_2$  procedentes del carbono 2 de la molécula de glucosa original, se utilizó en nuestras incubaciones como sustrato la glucosa 2- $C^{14}$ .

De acuerdo con Brin (11) y Wolfe (12) la causa de una disminución de la reacción de la transcetolasa y la subsecuente disminución de la hexosa reformada es una deficiencia del cofactor tiamina pirofosfato. Esto se pone en evidencia en nuestro caso, por la disminución de la recuperación de  $C^{14}O_2$  a partir de la glucosa 2- $C^{14}$ .

Para evaluar la especificidad del rol de la tiamina en relación con este defecto metabólico observado en los eritrocitos carentes de tiamina se han hecho experiencias "in vitro" (11) e "in vivo" (12). La adición "in vitro" de clorhidrato de tiamina a eritrocitos humanos deficientes de este elemento no modifica substancialmente la oxidación del carbono 2 de la glucosa como sí ocurre en los eritrocitos de ratas deficientes. Para explicar esto se ha postulado que la capacidad de los eritrocitos humanos para la fosforilación de la tiamina es limitada (13) y podría deberse a una particularidad de la especie. Además y, aunque el azul de metileno estimula la oxidación de la glucosa, no estimula la producción de tiamina fosforilada e incluso se afirma que podría inhibir esta conversión (13), hecho que posiblemente acontece cuando no se obtiene recuperación "ad integrum" en los eritrocitos de ratas deficientes, al adicionarles tiamina "in vitro".

El mayor rendimiento de  $C^{14}O_2$  obtenido en las incubaciones practicadas con los eritrocitos de niños aparentemente normales indican, pues, un adecuado funcionamiento del ciclo de la pentosa fosfato.

Como parte complementaria de este trabajo y para fundamentación del mismo, se seleccionaron niños que habían acusado deficiente oxidación de la glucosa 2- $C^{14}$  para someterlos posteriormente a una dieta suplementaria de tiamina. No hay experiencias anteriores que den una pauta sobre la duración y las dosis más adecuadas de un tratamiento con tiamina con el objeto de obtener mayor recuperación de  $C^{14}O_2$ . Como se puede ver en la Tabla III en el 100% de las incubaciones de eritrocitos de niños tratados con tiamina se obtuvo incremento de la radioactividad incorporada al  $CO_2$ , observándose en algunos casos cifras comparables a las obtenidas en las incubaciones de eritrocitos de niños normales. Este incremento es estadísticamente significativo y demuestra evidentemente la acción de la tiamina.

## CONCLUSIONES

Se ha estudiado la oxidación de la glucosa  $2\text{-C}^{14}$  a  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  en eritrocitos de niños aparentemente normales y niños en estado de hiponutrición. Los resultados obtenidos nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1) El rendimiento de  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  en los eritrocitos de niños en estado de hiponutrición es menor que el obtenido en los eritrocitos de niños aparentemente normales.

2) En los niños en estado de hiponutrición un tratamiento con tiamina aumenta el rendimiento de  $\text{C}^{14}\text{O}_2$ .

## BIBLIOGRAFIA

1. Dajaniau M. Rashid and James Orten. A study of the citric acid cycle in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 231: 913-924 (1958).
2. Rubinstein David and Orville F. Denstedt. The metabolism of the erythrocyte (III the tricarboxylic acid cycle in the avian erythrocyte) *J. Biol. Chem.* 204: 623-637 (1953).
3. Murphy R. John. Erythrocyte metabolism (II Glucose metabolism and pathways. *J. Lab. & Clin. Med.* 55: 286-302 (1960).
4. Crevasse Lamar, W. H. Hewson, G. G. Hazouri, and J. C. Shipp. Glucose metabolism of red blood cells: A study of triiodothyronine on red cell metabolism. *J. Lab. & Clin. Med.* 65: 539-545 (1965).
5. Bartlett R. Grant, Arthur A. Marlow. Erythrocyte carbohydrate metabolism (I The flow of  $\text{C}^{14}$  glucose carbon into Lactic acid, carbon dioxide, cell polymers, and carbohydrate intermediate pool) *J. Lab. & Clin. Med.* 42: 178-187 (1953).
6. Huenekens F. M., L. Liu, H. A. P. Myers, and Beverly W. Gabrio. Erythrocyte metabolism (III Oxidation of glucose) *J. Biol. Chem.* 227: 253-260 (1957).
7. Guzmán Barrón Alberto. Plan general para estudios de nutrición. Actas y trabajos del Segundo Congreso Peruano de Química. II Tomo. Lima. Perú 1943 pág. 262-268.
8. Hurtado Alberto, J. Pons y C. Merino. Estudios hematológicos y valores normales. *An. Fac. Med.* 19: 9-48 (1938).
9. Guzmán Barrón E. S., Geo. A. Harrop. Studies on blood cell metabolism. The effect of methylene blue and other dyes upon the oxygen consumption of mammalian and avian erythrocytes. *J. of Exp. Med.* 48: 207-223 (1928).
10. Horecker B. L., Smyrniotis P. Z. The coenzyme function of thiamine pyrophosphate in pentose phosphate metabolism. *J. Am. Chem. Soc.* 75: 1009-1010. (1953).

11. Brin Myron, Stephen S. Shohet and Charles Davidson. The effect of thiamine deficiency on the glucose oxidative pathway of rat erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 230; 319-326 (1958).
12. Wolfe J. Stanley, Myron Brin and Charles S. Davidson. The effect of thiamine deficiency on human erythrocyte metabolism. *J. Clin. Invest.* 37: 1476-1484 (1958).
13. Smits, G., and Florijn E. The conversion of aneurin into aneurinpyrophosphate by blood corpuscles. *Biochim biophys. Acta* 1950, 5: 535-542.
14. Brin Myron and Robert H. Yonemoto. Stimulation of the glucose oxidative pathway in human erythrocytes by methylene blue. *J. Biol. Chem.* 230: 307-317 (1958).
15. Wood G. Harland and Joseph Katz. The distribution of C<sup>14</sup> in the hexose phosphates and the effect of recycling in the pentose cycle. *J. Biol. Chem.* 233: 1279-1282 (1958).
16. Van Slyke D. Donald, Robert Steele and John Plazin. Determination of total carbon and its radioactivity. *J. Biol. Chem.* 192: 769-805 (1951).
17. Villavicencio M., Rosales, F., Olivera A., Melgar E. & Guerra R. M. Pathways of glucose metabolism in rabbit cerebral cortex. *Acta Physiol. Latinoam.*, 8, 219-229 (1958).
18. Van Slyke Donald D., and Folch. Manometric carbon determination. *J. Biol. Chem.* 136: 509-514 (1940).
19. Katz J. and Harland G. Wood. The use of glucose C<sup>14</sup> for the evaluation of the pathways of glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 235: 2165-2177 (1960).
20. Racker E., G. de la Haba, I. G. Leder. Thiamine pyrophosphate, A coenzyme of transketolase. *J. Am. Chem. Soc.* 75: 1010-1011 (1953).
21. Bartlett R. Grant, Arthur A. Marlow. Erythrocyte carbohydrate metabolism (II Chromatographic isolation of monophosphoglycerate, diphosphoglycerate, and adenosine triphosphate and their) *J. Lab. and Clin. Med.* 42: 188-192 (1953).