

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Difosfogliceratomutasa y Fosfogliceratoquinasa en células de la serie eritrocitaria : aplicación a este estudio del principio de distribución en sistemas bifásicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Concepción Tejero Ortego**

DIRECTOR:

**José Luque Cabrera**

Madrid, 2015

Concepción Tejero Ortego

TP  
1981  
-----  
154



\* 5 3 0 9 8 5 6 3 7 2 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-012124-6

**DIFOSFOGLICERATOMUTASA Y FOSFOGLICERATOQUINASA EN CELULAS  
DE LA SERIE ERITROCITARIA. APLICACION A ESTE ESTUDIO  
DEL PRINCIPIO DE DISTRIBUCION EN SISTEMAS BIFASICOS**

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1981



BIBLIOTECA

© Concepción Tejero Ortego  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1981  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-18910-1981

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIPOSGLICERATONUTASA Y FOSFOGLICERATOQUINASA EN CELULAS  
DE LA SERIE ERITROCITARIA. APLICACION A ESTE ESTUDIO DEL  
PRINCIPIO DE DISTRIBUCION EN SISTEMAS BIFASICOS.

Memoria presentada por la licenciada CONCEPCION TEJERO ORTIZO para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, Abril de 1979.



**Este trabajo ha sido realizado bajo  
la dirección del Prof. Dr. José Luque  
Cabrera, en el Departamento de Bio-  
química de la Facultad de Veterinaria  
de la Universidad Complutense de Madrid.**



**Deseo expresar mi agradecimiento**

- Al Profesor Martín Municio, por haber revisado este trabajo, y aceptado ser Ponente del mismo.
- Al Profesor Luque Cabrera, director de esta Tesis, que confió en mi iniciándome en la tarea investigadora, y que con su labor constante y ejemplo humano ha hecho posible mi plena dedicación a la realización de este trabajo.
- Al Profesor Ruiz Amil, que me acogió en su Departamento poniendo a mi disposición los medios materiales necesarios, así como sus enseñanzas teóricas y consejos que han servido para mi formación en la ciencia de la Bioquímica.
- Al Dr. Pedro Roncalés, que colaboró activamente en esta Tesis y cuyo espíritu crítico ha sido para mi un constante estímulo en la realización de la misma.
- Al Departamento de Fisiología y a la Cátedra de Química de la Facultad de Veterinaria de Madrid. Al Dr. Alfonso Blanco y M<sup>a</sup> Jesús Payá del Departamento de Microscopía Electrónica de la Facultad de Veterinaria de Madrid.
- A Valeriano Cerdón, y al resto de mis compañeros de laboratorio que me han ayudado a lo largo de estos años.
- A Juan Francisco, alumno interno de esta Cátedra, mi especial agradecimiento por la confección desinteresada de este trabajo.



**INDICE.**



## INDICE.

	<u>Página</u>
INTRODUCCION.....	1
1.- PARTE TEORICA.....	4
1.1.- DIFERENCIACION, MADURACION Y ENVEJECIMIENTO DEL ERITROCITO; ASPECTOS MORFOLOGICOS Y BIOQUIMICOS.	5
1.2.- CICLO DEL 2,3-DIFOSFOGLICERATO.....	10
1.2.1.- SIGNIFICADO BIOLOGICO EN LA OXIGENACION.	11
1.2.2.- SINTESIS Y DEGRADACION; CARACTERISTICAS ENZIMATICAS.....	12
1.2.3.- INTERRELACIONES ENTRE DIFOSFOGLICERATO- MUTASA Y FOSFOGLICERATOQUINASA.....	16
1.3.- SEPARACION CELULAR POR DISTRIBUCION EN SISTEMAS BIFASICOS.....	20
1.3.1.- FUNDAMENTOS DE LA PARTICION.....	20
1.3.2.- ASPECTOS TEORICOS.....	21
1.3.3.- PRINCIPIO DE LA DISTRIBUCION EN CONTRA- CORRIENTE.....	24
1.4.- OBJETO DEL TRABAJO.....	31
2.- MATERIAL Y METODOS.....	32
2.1.- MATERIAL.....	33
2.1.1.- APARATOS UTILIZADOS.....	33
2.1.2.- PRODUCTOS UTILIZADOS.....	33
2.2.- MATERIAL BIOLOGICO.....	34
2.2.1.- OBTENCION DE ERITROCITOS.....	34
2.2.2.- OBTENCION DE RETICULOCITOS.....	34
2.2.3.- OBTENCION Y PREPARACION DE CELULAS ERI- TROIDEAS DE LA MEDULA OSEA.....	37
2.2.4.- ADMINISTRACION CON <sup>59</sup> Fe.....	37
2.2.5.- TINCION PARA MICROSCOPIA OPTICA, CONTAJE DE CELULAS.....	37
2.2.6.- PREPARACION PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA	38
2.2.7.- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y ULTRAES- TRUCTURALES DE RETICULOCITOS.....	39

	<u>Página</u>
2.3.- METODOS.....	42
2.3.1.- PREPARACION DE HEMOLIZADOS CELULARES.....	42
2.3.2.- DETERMINACION DE 2,3-DIFOSFOGLICERATO.....	42
2.3.3.- DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS..	43
2.3.3.1.- DIFOSFOGLICERATOMUTASA.....	43
2.3.3.2.- FOSFOGLICERATOQUINASA.....	43
2.3.4.- DETERMINACION DE HEMOGLOBINA.....	44
2.3.5.- DETERMINACION DE PROTEINAS Y ADAPTACION DEL METODO EN MUESTRAS QUE CONTIENEN DEX- TRANO Y POLIETILENGLICOL.....	45
2.3.6.- DESCRIPCION Y FUNCIONAMIENTO DEL APARATO DE DISTRIBUCION EN CONTRACORRIENTE EN CAPA FINA.....	46
2.3.7.- PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE POLIMEROS DEXTRANO Y POLIETILENGLICOL.....	50
2.3.8.- PREPARACION DE LOS SISTEMAS BIFASICOS.....	50
2.3.8.1.- PARA EXPERIMENTOS DE PARTICION: INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE POLIMEROS Y SALES.....	50
2.3.8.2.- PARA LA CALIBRACION DEL APARATO DE DCC.....	54
2.3.8.3.- PARA LA SEPARACION DE CELULAS POR DISTRIBUCION EN CONTRACORRIENTE.	55
2.3.9.- MEDIDA DE LA RADIOACTIVIDAD.....	56
2.3.10.- VALORACION DE DATOS.....	56
2.3.10.1.- CALCULO DE LA SIGNIFICANCIA ESTADISTICA POR LA DISTRIBU- CION DE STUDENT.....	56
2.3.10.2.- AJUSTE DE RECTAS POR MINIMOS CUADRADOS.....	57
3.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	58
3.1.- ACTIVIDADES DIFOSFOGLICERATOMUTASICA Y FOSFOGLI- CERATOQUINASICA EN LAS DIFERENTES POBLACIONES ERITROCITARIAS.....	59

	<u>Página</u>
3.1.1.- DISCUSION DEL METODO DE ENSAYO EMPLEADO PARA LA DIFOSFOGLICERATOMUTASA.....	59
3.1.1.1.- FORMACION DE PRODUCTO (2,3-DPG) RESPECTO AL TIEMPO, Y EFECTO DEL 2,3-DPG PRESENTE SOBRE LA ACTI- VIDAD ENZIMATICA EN ERITROCITOS Y RETICULOCITOS.....	61
3.1.1.2.- VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD DI- FOSFOGLICERATOMUTASICA EN ERI- TROCITOS, RETICULOCITOS Y CELU- LAS ERITROIDEAS.....	66
3.1.1.3.- NIVELES DE 2,3-DPG EN ERITROCI- TOS, RETICULOCITOS Y CELULAS ERITROIDEAS.....	68
3.1.2.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOSFOGLICERATOQUI- NASICA EN ERITROCITOS, RETICULOCITOS Y CELULAS ERITROIDEAS.....	69
3.1.2.1.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL SUSTRATO (3-PG): $K_m$ y $V_{max}$ .....	69
3.1.2.2.- VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD FOS- FOGLICERATOQUINASICA EN ERITROCI- TOS, RETICULOCITOS Y CELULAS ERITROIDEAS.....	71
3.2.- PROCEDIMIENTO Y CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA SEPARACION DE CELULAS POR DISTRIBUCION EN CONTRACO- RRIENTE (DCC).....	77
3.2.1.- DETERMINACION PREVIA DE LAS CONSTANTES DE PARTICION EN ERITROCITOS Y RETICULOCITOS. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE POLIME- ROS, SALES Y TEMPERATURA.....	77
3.2.2.- COMPROBACION DEL METODO SEMIAUTOMATICO DE DCC: CALCULO DE LAS CONSTANTES TEORICAS Y EXPERIMENTALES PARA UNA SUSTANCIA PURA. (VIT. B12).....	82

	<u>Página</u>
3.2.3.- CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA DISTRIBUCION DE ERITROCITOS Y RETICULOCITOS.....	87
3.2.3.1.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CONSERVACION DE LAS CELULAS A 4°C, EN SOLUCION SALINA FISIOLÓGICA.....	87
3.2.3.2.- INFLUENCIA DEL NUMERO DE CAVIDADES CONTENIENDO MUESTRA Y CONCENTRACION DE LA MISMA SOBRE LA SEPARACION POR DCC DE ERITROCITOS Y RETICULOCITOS.....	89
3.2.3.3.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION SALINA DEL SISTEMA BIFASICO.....	93
3.3.- APLICACION DE LA DCC A LA SEPARACION DE POBLACIONES CELULARES.....	96
3.3.1.- PERFIL DE LA DCC PARA ERITROCITOS Y RETICULOCITOS.....	96
3.3.2.- CONFIRMACION POR MARCAJE ISOTOPICO CON <sup>59</sup> Fe DE LA PRESENCIA DE CELULAS DE DISTINTA EDAD EN LA DCC DE ERITROCITOS.....	99
3.3.3.- SEPARACION POR DCC DE POBLACIONES CELULARES HETEROGENEAS.....	104
3.3.3.1.- SEPARACION DE POBLACIONES CELULARES ARTIFICIALMENTE HETEROGENEAS..	104
3.3.3.2.- SANGRE CIRCULANTE QUE CONTIENE UN 36% DE RETICULOCITOS.....	105
3.3.3.3.- SEPARACION PRELIMINAR DE PRECURSORES ERITROIDEOS DE MEDULA OSEA.....	108
3.3.4.- ACTIVIDAD FOSFOGLICERATOQUINASICA EN CELULAS ERITROCITARIAS DE DISTINTA EDAD Y RETICULOCITARIAS.....	110
4.- CONCLUSIONES.....	114
5.- BIBLIOGRAFIA.....	118

**INTRODUCCION.**

## INTRODUCCION

El 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) es un componente intracelular habitual en los eritrocitos de mamíferos, donde desempeña un importante papel en la regulación de la oxigenación de la hemoglobina. Asimismo, se ha sugerido que actúa controlando la velocidad glicolítica del eritrocito ya que ejerce un efecto inhibitorio sobre algunas enzimas claves en la regulación de la glicolisis.

Dada la experiencia previa de nuestro grupo en el campo del metabolismo y función del 2,3-DPG en eritrocitos de mamíferos, se planteó, y se inició con esta Tesis, el estudio de este fosfato orgánico y de las enzimas implicadas en su metabolismo y regulación, a lo largo de los procesos de diferenciación, maduración y envejecimiento del eritrocito. La eritropoyesis parece ser un modelo válido para dicho estudio, puesto que la célula resultante del proceso, el eritrocito maduro, está altamente diferenciado en la formación de dicho compuesto. Para ello se emplean eritrocitos maduros de distinta edad y diferentes tipos celulares (reticulocitos y diversos precursores eritroideos) de la línea eritropoyética en ratas adultas.

En primer lugar, se aborda el estudio de la actividad de la difosfogliceratomutasa, enzima sintetizadora del 2,3-DPG, en poblaciones globales de eritrocitos, reticulocitos y precursores eritroideos de médula ósea. Para ello, y como fase previa se discute el método, utilizado para la determinación de la enzima, que ha sido propuesto inicialmente en nuestro laboratorio (RONCALES, 1978), para el caso de los eritrocitos humanos. Como consecuencia del proceso de diferenciación y maduración del eritrocito, la difosfogliceratomutasa sufre, posiblemente, cambios importantes en su actividad o cantidad que pueden explicar la aparición del 2,3-DPG durante el proceso eritropoyético.

Por otro lado, se estudia la actividad de la fosfogliceratoquinasa, enzima implicada tanto en el ciclo del 2,3-DPG como en la vía glicolítica, en los tres procesos mencionados. Sus valores de ac-

tividad pueden ser utilizados como parámetros de la diferenciación.

Con objeto de estudiar el metabolismo de dicho fosfato orgánico en aquellos procesos es necesario contar con un método que permita separar las células de distinta edad integrantes de poblaciones de eritrocitos y reticulocitos, así como los distintos tipos de células componentes del conjunto "células eritroideas". Con este fin, se emplea una técnica de distribución en contracorriente, propuesta por ALBERTSSON (1971) para una gran variedad de células, partículas subcelulares y macromoléculas, y utilizada posteriormente en la separación de las distintas células sanguíneas por WALTER y col. (1975).

Previamente a la utilización de esta técnica se establecen las condiciones experimentales óptimas (en cuanto a temperatura, concentración de sales y polímeros), mediante la realización de experimentos de partición en tubos individuales.

Por otro lado, y puesto que se ha utilizado una versión semi automática fabricada en España del aparato de distribución en contracorriente original de ALBERTSSON, se realizan experimentos encaminados a comprobar el correcto funcionamiento de dicho aparato, así como la influencia que, sobre la separación celular tienen una serie de parámetros tales como concentración salina, concentración de la muestra, etc. Al mismo tiempo, se analizan las posibilidades de aplicación del método a la separación de mezclas celulares con distintos coeficientes de partición. (K).

Dato muy importante en todo este estudio es la confirmación, por experimentos con  $^{59}\text{Fe}$ , de la posición que ocupan las células eritrocitarias (en el colector de fracciones = nº de cavidad), según su edad, una vez realizada la distribución en contracorriente. Es entonces cuando se determina, tanto en la población de eritrocitos como de reticulocitos, separados por este procedimiento, la actividad enzimática de la fosfogliceratoquinasa. También se ha iniciado la adaptación del método de determinación de la difosfogliceratomutasa en las fracciones obtenidas en la distribución en contracorriente, así como la identificación y estudio bioquímico de los distintos tipos de células que constituyen las "células eritroideas" de médula ósea. Sin embargo estos resultados no se incluyen en esta Tesis, puesto que parecen requerir un desarrollo posterior.

**1.- PARTE TEORICA.**

**1.1.- DIFERENCIACION, MADURACION Y ENVEJECIMIENTO DEL ERITROCITO:**  
**ASPECTOS MORFOLOGICOS Y BIOQUIMICOS.**

El proceso conocido como eritropoyesis tiene como misión la formación de células especializadas en la síntesis, protección y función de la hemoglobina (HARRIS y KELLERMEYER, 1970), proteína necesaria para el transporte de los gases respiratorios.

Esta producción de los eritrocitos circulantes lleva consigo una serie de cambios citológicos y bioquímicos importantes, la célula hematopoyética precursora es inducida a iniciar la síntesis de hemoglobina y componentes específicos de las células eritroides, así como a realizar un número definitivo de divisiones celulares y sufrir una serie de transformaciones morfológicas y bioquímicas características.

La eritropoyesis viene favorecida por una hormona, la eritropoyetina, producida, liberada o activada en respuesta al nivel de oxigenación de los tejidos (REISSMANN, 1950; GORDON y ZANJANI, 1970).

La célula resultante del desarrollo eritropoyético, el eritrocito maduro, consiste así en una solución de hemoglobina encerrada en una membrana plasmática con los sistemas enzimáticos requeridos para la obtención y mantenimiento de las propiedades osmóticas adecuadas (RIFKIND, 1974).

Toda esta secuencia de transformaciones celulares se considera hoy como un proceso real de diferenciación ya que cumple todos los términos de la definición propuesta por WEISS (1973): "la diferenciación celular es todo proceso de transformación unidireccional e irreversible que genera diferencias constitucionales verdaderas en las generaciones de células hijas".

De acuerdo con los estudios más recientes las células de la serie eritroidea pueden ser agrupadas en tres compartimentos bien caracterizados: 1) Diferenciación, que comprende a la célula precursora y hasta que la célula eritroidea ya no presenta mitosis y por tanto deja de dividirse. 2) Maduración, desde este momento hasta su transformación en eritrocito circulante. 3) Envejecimiento, o pro-

ceso por el que el eritrocito circulante pierde la capacidad de realizar su función y se destruye. (STEPHENSON y col., 1971; TILL y McCULLOCH, 1971; TRUMAN, 1974). Describamos brevemente estos tres procesos.

#### Diferenciación.

La diferenciación propiamente dicha puede subdividirse a su vez en tres etapas consecutivas, íntimamente relacionadas entre sí.

a) Parece que hay claras evidencias (McCULLOCH, 1970; MOORE y METCALF, 1970), de la existencia en médula ósea de una célula (cuya identidad y morfología están en discusión) "capaz de formar colonias" (CFC) y que sería la precursora de las tres líneas hematopoyéticas principales: eritrocítica, granulocítica y megacariocítica; se trata por tanto de una célula pluripotencial, a partir de la cual se diferencian las células unipotenciales precursoras de cada serie. Los mecanismos por los que se lleva a cabo dicha transformación no son bien conocidos (CURRY y TRENTIN, 1967; GOLWASSER, 1975; TILL y col., 1975), si bien implican un cambio en la expresión génica de dicha célula. Este cambio supone la adquisición de una capacidad de respuesta a agentes reguladores específicos en cada tipo de diferenciación. En el caso de la eritropoyesis el agente regulador es la eritropoyetina. La célula resultante de esta primera etapa es, por tanto, la "célula sensible a la eritropoyetina" (CSE), cuya morfología tampoco se conoce con exactitud. Hay autores como DICKERMAN y col. (1976), para los que el concepto de diferenciación estaría reservado únicamente a esta transformación.

b) Durante la segunda etapa, la célula sensible a la eritropoyetina (CSE), destinada irreversiblemente a expresar el material genético correspondiente a la síntesis de hemoglobina, se convierte en la primera célula eritroidea identificable como tal. Según GOLWASSER (1975) en esta etapa se pueden distinguir dos procesos: sensibilización, por el que la célula ya es capaz de responder a la eritropoyetina (es

decir se sensibiliza a la eritropoyetina); e inducción, donde se producen realmente los primeros cambios bioquímicos en respuesta a la interacción de la hormona.

c) La tercera etapa se conoce como diferenciación terminal o especialización. En ella, la célula ya diferenciada genéticamente, se especializa en el mantenimiento de la capacidad de síntesis de proteínas específicas como la hemoglobina, en la supresión de determinadas actividades celulares, como son la división celular y en la desaparición de algunas rutas metabólicas. La célula resultante o proeritroblasto aparece morfológicamente como una célula normal, si bien, bioquímicamente puede llevar a cabo transformaciones que la delimitan como una célula eritroidea, tales como: síntesis de DNA (TRUMAN, 1974), gran aumento de la síntesis de RNA (KRANTZ y GOLWASSER, 1965) y absorción de hierro (KATZ, 1965; ERSLEV y GABUZDA, 1975). Se discute si en el proeritroblasto hay o no síntesis de hemoglobina (HODGSON, 1970; TERADA y col., 1972; DENTON y col., 1975). Para RAPOPORT y col. (1974), el proceso diferenciativo tendría su límite en esta célula precursora. El proeritroblasto lleva a cabo entonces de dos a cuatro divisiones mitóticas (TARBUTT, 1969), dando lugar al eritroblasto basófilo. Ello supone la reducción del tamaño del núcleo, debido a una progresiva condensación de la proteína nuclear (ERLEV y GABUZDA, 1975). La basófilia que presenta es debida al gran acúmulo de mitocondrias y ribosomas en el citoplasma, ribosomas donde se sintetiza la globina, que unida al hemo formaría la molécula de hemoglobina.

El siguiente estadio en la diferenciación es el eritroblasto policromatófilo, última célula que presenta división mitótica, con la consiguiente disminución de tamaño nuclear, síntesis de rRNA, y desaparición de la síntesis de DNA (RIFKIND, 1974). En este estadio de la eritropoyesis, se ha sintetizado ya alrededor de 1/3 de la hemoglobina total (DENTON y col., 1975), lo que provoca la policromatofilia del citoplasma.

#### Maduración.

Una vez alcanzado este estado de diferenciación la célula deja de dividirse. Se ha llegado al eritroblasto ortocromático o normoblasto, a partir del cual se formará por maduración un solo eritrocito. En este periodo se producen cambios bioquímicos importantes que afectan, por ejemplo, al control de la síntesis de hemoglobina. Como consecuencia, aumenta la concentración de hemoglobina, hasta hacerse casi igual a la del eritrocito (DENTON y col., 1975). Al mismo tiempo disminuye la cantidad de ribosomas y mitocondrias (RIFKIND, 1974), y el núcleo decrece hasta hacerse totalmente picnótico y ser expulsado de la célula (BANK y col., 1970; SKUTELSKY y DANON, 1970; TAVASSOLI y CROSBY, 1973).

La primera célula anucleada se designa reticulocito. Por el aspecto que presentan los pocos ribosomas y mitocondrias, todavía presentes, RAPOPORT y col. (1974) proponen agrupar bajo el nombre de reticulocitos a los estadios comprendidos entre normoblasto y reticulocito. Aunque los reticulocitos no son capaces de sintetizar RNA, continúan sintetizando hemoglobina debido al contenido residual de mRNA y ribosomas (MARKS y col., 1963; RIFKIND y col., 1964). Al mismo tiempo que decrece el número de mitocondrias disminuye todo el metabolismo celular. La transición de reticulocitos a eritrocitos queda definida por el cese de la síntesis de hemoglobina, la desaparición de ribosomas y mitocondrias y el descenso de la actividad en algunos enzimas claves en la glicolisis (RAPOPORT y col., 1974). De esta manera el eritrocito ha de obtener toda la energía necesaria para cumplir su función a partir de la glicolisis anaerobia.

#### Envejecimiento.

Si bien una cierta proporción de reticulocitos jóvenes se encuentran en la sangre circulante, la mayor parte espera en la médula ósea hasta que se completa su maduración (SKARBERG, 1974), y salen al torrente circulatorio como eritrocitos maduros con una vida media de 55 días.

Durante el proceso de envejecimiento se produce una pérdida gradual de actividades enzimáticas y de funcionalidad de las membranas (CHAPMAN y SCHAUMBURG, 1967; DENTON y col., 1975). Aunque estos últimos cambios, han sido explicados en función del descenso en el metabolismo energético que tiene lugar durante el envejecimiento del eritrocito (GANZONI y col., 1976), pudieran ser una consecuencia directa de las alteraciones bioquímicas y biofísicas de los constituyentes proteicos y lipídicos de la membrana (COHEN y col., 1976; BIENZLE y PJURA, 1977). Estos argumentos justifican que las células eritrocitarias de distinta edad puedan ser separadas por procedimientos que detectan las alteraciones sufridas por la membrana a medida que la célula envejece. Igualmente, estas alteraciones servirán de base para la separación de los distintos componentes celulares de la eritropoyesis o cualquier otra línea de diferenciación.

### 1.2.- CICLO DEL 2,3-DIFOSFOGLICERATO.

El 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) componente intracelular habitual de los eritrocitos humanos y de muchos otros mamíferos (RAPOPORT y GUEST, 1939; BARTLETT, 1959), debido a su elevada concentración (5 mM) representa alrededor del 70% del total de los fosfatos orgánicos contenidos en esta célula. Forma parte de un ciclo metabólico secundario conocido como ciclo de RAPOPORT-LUEBERING (1950-1952), que tiene su origen a nivel del 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG), en la ruta glicolítica. Una vez formado el 2,3-DPG, este revierte al 3-fosfoglicerato (3-PG), para continuar su degradación hasta lactato. La función como cofactor en la reacción catalizada por la monofosfogliceratomutasa ( $3\text{-PG} \xrightarrow{2,3\text{-DPG}} 2\text{-PG}$ ) no justifica las altas concentraciones intracelulares de este fosfato (PIZER, 1962; RAY y PECK, 1972). Estas concentraciones solo adquirieron sentido al establecerse definitivamente su papel como regulador alostérico de la oxigenación de la hemoglobina (CHANUTIN y CURNISH, 1967; BENESCH y BENESCH, 1974; DUHM y GERLACH, 1974). Aparentemente juega un papel clave en el metabolismo general del eritrocito (BREWER, 1970; RAPOPORT y col., 1974); así, se ha propuesto que influencia la velocidad de la glicolisis eritrocitaria por su efecto inhibitorio sobre enzimas glicolíticas claves (BREWER, 1969; BEUTLER, 1971; PONCE y col., 1971; STRIVASTAVA y BEUTLER, 1972; YIP y BALIS, 1975; ROSE y DUBE, 1976; CHIVA y SASAKI, 1978). Se ha sugerido igualmente que es un agente energético de reserva, ya que previene la pérdida excesiva de adenilnucleótidos por el eritrocito al poder proporcionar ATP (a nivel de la PK), durante el periodo de tiempo en que se encuentra inhibida la degradación de la glucosa, ya sea por su carencia, o, como en el caso de la sangre conservada, por inhibición de la PFK debida al aumento de pH que conlleva la conservación. (ASKARI y RAO, 1968; BUNN y col., 1969; OSKI y col., 1971; LUQUE y col., 1973; RAPOPORT y col., 1976). El 2,3-DPG también participa en el establecimiento del equilibrio Donnan entre eritrocitos y plasma y, como consecuencia de este efecto, los cambios aparecidos en el pH intracelular pueden influir sobre la afinidad de la hemoglobina

por oxígeno, así como sobre la afinidad de enzimas glicolíticas (BENESCH y col., 1969; DUHM, 1971-1975). Se ha especulado igualmente sobre el papel del 2,3-DPG en relación con la agregación plaquetaria.

Todas estas funciones han despertado un gran interés en el conocimiento de su metabolismo y regulación en los pasados años. El hecho de ser un fosfato orgánico exclusivo del eritrocito, con una función específica en la oxigenación, justifica que se pretenda establecer su aparición en relación con el proceso de la eritropoyesis.

#### 1.2.1.- SIGNIFICADO BIOLÓGICO EN LA OXIGENACION.

No hay duda alguna de que la función esencial de este fosfato orgánico está relacionada con el proceso de regulación de la oxigenación de la hemoglobina. Hoy día se encuentra bien establecida su influencia sobre la afinidad de la hemoglobina por oxígeno, es decir, en relación con la capacidad de esta para unir de forma cooperativa, una, dos, tres o cuatro moléculas de oxígeno (BUNN y GANDL, 1970; RIGGS, 1972; BENESCH y BENESCH, 1974; BALDWIN, 1976; KILMARTIN, 1976). En consecuencia, es transcendental su intervención en el proceso fisiológico del transporte de oxígeno desde los pulmones a los tejidos y viceversa. Puesto que en esta Tesis no se aborda experimentalmente ningún punto relacionado con la función del 2,3-DPG en la regulación de la oxigenación, solo se esbozan en esta introducción teórica algunos de los aspectos básicos del tema. Existen revisiones muy recientes sobre la oxigenación de la hemoglobina y papel de los fosfatos orgánicos en la misma que recogen todos estos aspectos (BAGGOTT, 1978; PERUTZ, 1979; KILMARTIN, 1977; BANSIL y col., 1974).

Condiciona, además de forma indirecta el transporte de  $\text{CO}_2$  (BRENNAN y col., 1972; KILMARTIN, 1976) a partir de la definición dada por BOHR en 1903 sobre la característica curva sigmoidea de saturación de la hemoglobina, el objetivo primordial de la experimentación fué obtener un modelo que explicase las interrelaciones entre los grupos hemo de las que en definitiva depende la curva sigmoidea (WEISSBLUTH, 1974;

PERUTZ, 1976). Se sabe que cuando la molécula de  $O_2$  se desprende, los dos extremos N-terminales de las cadenas  $\beta$  se separan unos 7 Å, dejando un hueco entre ambas (cavidad  $\beta$ ), que se reduce cuando la molécula de Hb se une al  $O_2$ .

BENESCH y BENESCH (1967) y CHANUTIN y CURNISH (1977) fueron los primeros en establecer que la presencia de fosfatos orgánicos hace disminuir la afinidad Hb- $O_2$ . Estos y otros autores demostraron también pocos años después (CHANUTIN y HERMANN, 1979; BUNN y JANDL, 1970; BENESCH y col., 1968-1971; BUNN, 1971) que dichos fosfatos interaccionan bajo condiciones fisiológicas con la desoxihemoglobina en la proporción de 1 mol de 2,3-DPG por mol de hemoglobina tetramero. La unión del 2,3-DPG en la cavidad  $\beta$  de la Hb se debe a la existencia de grupos positivamente cargados de aminoácidos como valina-1, histidina-143 y lisina-82 los cuales se unen a los grupos fosfatos de la molécula de 2,3-DPG (PERUTZ, 1976). Aunque en la forma oxi-Hb también parece existir una cierta afinidad por el difosfato se considera hoy que esta interrelación tiene menor significado fisiológico en el proceso oxigenador (CHANUTIN y HERMANN, 1969; DIEDERISCH y col., 1969; LUQUE y col., 1969).

Al producirse la desoxigenación en las células tisulares la presencia de niveles normales de 2,3-DPG ( $\approx 5$  mM) en el eritrocito contribuyen a estabilizar la molécula de desoxi-Hb. Previamente esta había resultado desestabilizada como consecuencia de la ruptura de varios enlaces salinos entre sus subunidades al unirse el  $O_2$  al Fe.

#### 1.2.2.- SINTESIS Y DEGRADACION: CARACTERISTICAS ENZIMATICAS.

Desde los trabajos de RAPOPORT y LUEBERING (1950-1952) se acepta que los niveles intracelulares de 2,3-DPG dependen de dos actividades enzimáticas específicas.

a) La difosfogliceratomutasa (EC 2.7.5.4.), que verifica la síntesis a partir de 1,3-DPG utilizando 3-PG como coenzima. La reacción consiste en la transferencia de un grupo fosforilo desde el 1,3-DPG al 3-PG con producción de 2,3-DPG y 3-PG.



b) La difosfogliceratofosfatasa (EC 3.1.3.13.) que cataliza la degradación de 2,3-DPG en 3-PG y Pi.



Las propiedades cinéticas de la difosfogliceratomutasa fueron estudiadas inicialmente por ROSE en 1968. Posteriormente, se describieron las propiedades de la difosfogliceratofosfatasa (HARKNESS y ROTH, 1969; ROSE y LIEBOWITZ, 1970), y se demostró el efecto de un gran número de metabolitos e iones sobre estas dos enzimas y su relación con la regulación del metabolismo del 2,3-DPG.

De estas dos enzimas, solo la primera ha sido purificada hasta homogeneidad a partir de eritrocitos humanos (KAPPEL y col., 1975; SASAKI y col., 1975).

Hasta 1970 no se había planteado la posibilidad de que ambas actividades enzimáticas, junto con la de la monofosfogliceratomutasa (EC 2.7.5.3.), podían formar parte de una misma proteína enzimática multifuncional. Inicialmente se observó que las preparaciones altamente purificadas de difosfogliceratomutasa y de monofosfogliceratomutasa de diversas fuentes, manifestaban una actividad "intrínseca" difosfogliceratofosfatásica (HARKNESS y PONCE, 1969; DIEDERICH y col., 1970; HAMES y col., 1971; ROSE y WHALEN, 1973; KAPPEL y col., 1975). Según HASS y MILLER (1975), las actividades fosfatásicas "intrínsecas", encontradas en preparaciones homogéneas de estas dos enzimas ( $9 \times 10^{-4}$  UI/ml. eritrocitos, para difosfogliceratomutasa, y  $1,5 \times 10^{-4}$  UI/ml. eritrocitos para monofosfogliceratomutasa), muestran que la actividad fosfatásica radica en ambas enzimas. Ello explica que las preparaciones parciales de difosfogliceratofosfatasa presenten ciertas características cinéticas semejantes a las que se observan en la monofosfogliceratomutasa y/o difosfogliceratomutasa (HARKNES y col., 1970; ROSE y LIEBOWITZ, 1970; DE VERDIER y GROTH, 1973; ROSA y col., 1973).

Todavía más interesante son las observaciones en relación con el papel de ciertos iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{PO}_4\text{H}^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ) como activadores moderados de la baja actividad fosfatásica de aquellas enzimas, y, en particular, la de un metabolito el 2-P-glicolato, que la estimula en

varios órdenes de magnitud (ROSE y LIEBOVITZ, 1970). Aunque pendiente de demostración definitiva es importante resaltar la existencia de 2-Pglicolato, a una concentración 100  $\mu$ M, como constituyente normal del eritrocito (ÖRSTRÖM, 1951; BARTLETT, 1959) y, por tanto, el posible significado fisiológico de esta activación. ROSE (1970) sugiere, incluso, un importante papel de esta activación en la célula en envejecimiento.

Este efecto activador del 2-Pglicolato hace que tanto la difosfogliceratomutasa como la monofosfogliceratomutasa altamente purificadas se comporten como fosfatasa específica para el 2,3-DPG (ROSE y LIEBOVITZ, 1970; ROSE y WHALEN, 1973; KAPPEL y col., 1975). Sin embargo ambas enzimas siguen manteniendo su capacidad "intrínseca" fosfatásica en ausencia de 2-Pglicolato (KAPPEL y col., 1975). Es decir, la presencia de 2-Pglicolato hace que la actividad fosfatásica total del eritrocito se encuentre aumentada. En estos trabajos (ROSA y col., 1973; HASS y MILLER, 1975; SASAKI y col., 1975) no solo se ha confirmado dicho efecto activador de la fosfatasa en ambas mutasas sino que según HASS y MILLER (1975) es del orden de 340 veces, en el caso de la difosfogliceratomutasa y de 9 veces en el de la monofosfogliceratomutasa. Ello lleva a la conclusión de que prácticamente, toda la actividad difosfogliceratofosfatásica del eritrocito pudiera estar asociada al enzima difosfogliceratomutasa. Todos estos resultados llevaron a sugerir que la difosfogliceratofosfatasa no existe como actividad enzimática individual. De hecho, no ha sido posible obtener preparaciones específicas de la misma carentes de aquellas dos actividades mutásicas. Efectivamente, fué en 1973 (ROSA y col., 1973) cuando se obtuvo evidencia de que ambas actividades enzimáticas radicaban en una misma proteína. Además si se tiene en cuenta que los niveles fisiológicos de la difosfogliceratomutasa ( $\sim 133 \mu$ g/ml. de células) son superiores en un orden de magnitud a los de la monofosfogliceratomutasa ( $\sim 13,9 \mu$ g/ml de células), puede concluirse, efectivamente, que toda la actividad fosfatásica del eritrocito se encuentra asociada a la molécula de difosfogliceratomutasa. Posteriormente, el grupo de SASAKI (SASAKI y col., 1975; CHIVA y SASAKI, 1978) ha presentado evidencia de que en eritrocitos, el 2,3-DPG es metabolizado por una

enzima multifuncional capaz de catalizar las reacciones de la difosfogliceratomutasa, difosfogliceratofosfatasa y monofosfogliceratomutasa.

Las tres actividades enzimáticas fueron purificadas simultáneamente a partir de eritrocitos de hombre, cerdo y conejo, a lo largo de todas las etapas de purificación. Las fracciones (picos I, II y III) separadas por cromatografía contenían las tres actividades enzimáticas aunque en diferente proporción. De ellas, la fracción III era la que contenía la mayor proporción de actividad difosfogliceratomutásica respecto a la actividad difosfogliceratofosfatásica y monofosfogliceratomutásica y se consideró, por tanto, que era la responsable del metabolismo del 2,3-DPG. Por el contrario, la fracción I contenía la mayor proporción de monofosfogliceratomutasa y era en consecuencia la que actuaría en la glicolisis. La homogeneidad del pico III fué demostrada por electroforesis y por ultracentrifugación. Las tres actividades desaparecieron a la misma velocidad tanto por inactivación térmica como por inactivación por modificación química; y el antisero correspondiente al pico III inhibía a las tres actividades enzimáticas. Incluso recientemente ROSA y col. (1977) han encontrado un individuo que probablemente es homocigoto para la deficiencia en difosfogliceratomutasa y en el que no se detecta actividad 2,3-DPG fosfatásica. Todas estas observaciones junto con las mencionadas anteriormente (HASS y MILLER, 1975; KAPPEL y HASS, 1976; ROSE y DUBE, 1976) confirman que el 2,3-DPG se metaboliza en eritrocitos mediante la actuación de una enzima capaz de catalizar, al menos, las dos reacciones irreversibles del ciclo.

Se planteó así el problema de tratar de explicar el mecanismo por el que una sola enzima puede catalizar tres clases diferentes de reacciones. Han sido fundamentalmente el grupo de SASAKI junto con FOTHERGILL y HODGSON (1976) los que han llevado a concluir que la enzima de eritrocitos humanos tiene un centro activo común para las dos actividades enzimáticas en el que se localiza un grupo amino esencial para la unión del 2,3-DPG. Basándose en las propiedades multifuncionales de esta enzima se ha sugerido un mecanismo regulador de la biosíntesis y degradación del 2,3-DPG, que debe ser considerado a la luz

de los datos cinéticos existentes, debidos sobre todo a ROSE y col. (ROSE, 1968; ROSE y LIEBOVITZ, 1970; ROSE y DUBE, 1976) y sobre los que se ha construido hasta ahora, de forma esencial, todo el mecanismo regulador del ciclo del 2,3-DPG. En cualquier caso, y dado que entre los objetivos de esta Tesis no entra la dilucidación de los mecanismos reguladores del ciclo, y teniendo en cuenta que los datos existentes sobre multifuncionalidad de la enzima están siendo sometidos actualmente a revisión (HASS y MILLER, 1978; HASS y col., 1978) es por lo que consideramos que no debemos alargar esta introducción en la consideración detallada de dichos mecanismos. Una excelente revisión de los mismos ha sido publicada recientemente (CHIVA y SASAKI, 1978).

Mas importante, por el contrario, será a nuestros efectos, hacer consideraciones sobre la regulación al hablar a continuación de las interrelaciones entre difosfogliceratomutasa y fosfogliceratoquinasa.

### 1.2.3.- INTERRELACIONES ENTRE DIFOSFOGLICERATOMUTASA Y FOSFOGLICERATOQUINASA.

A nivel del 1,3-DPG, sustrato común para ambas enzimas, existe evidentemente una competencia entre su utilización por vía glicolítica (fosfogliceratoquinasa) y su utilización por el ciclo del 2,3-DPG (difosfogliceratomutasa). Si consideramos que los eritrocitos humanos consumen unos 2-3  $\mu$ moles de glucosa por hora y por ml. de células a 37°C y pH = 7,4 (SASAKI y col., 1975) y tenemos en cuenta que la desviación del metabolismo glucídico hacia el ciclo del 2,3-DPG ha sido cuantificado en un 15-25% del total de glucosa degradada por el eritrocito (HAMASAKI y MINAKAMI, 1972; RAPOPORT y col., 1977), se puede calcular que, aproximadamente, la velocidad de recambio del 2,3-DPG es del orden de 0,3-0,75  $\mu$ moles x hora x ml. de célula (CHIVA y SASAKI, 1978). Si consideramos, además, que la actividad difosfogliceratomutásica del eritrocito permite sintetizar como máximo unos 200

$\mu$ moles de 2,3-DPG x hora x ml. de células a 37°C (SASAKI y col., 1975) se llega a la conclusión de que la actividad difosfogliceratomutásica está actuando in vivo a un nivel latente, casi mínimo.

Esta competencia depende, fundamentalmente, de la concentración de 1,3-DPG presente en el eritrocito y de la afinidad de ambas enzimas sobre el sustrato. También depende de la concentración 3-PG que actúa como cosustrato y producto de la reacción difosfogliceratomutásica y, a su vez, como producto de la reacción fosfogliceratoquinásica.

Los datos cinéticos referentes a la actividad difosfogliceratomutásica obtenidos fundamentalmente por los grupos de ROSE (ROSE, 1968; ROSE y LIEBOVITZ, 1970; ROSE y WHALEN, 1973 y ROSE y DUBE, 1976), RAPOPORT (RAPOPORT y col., 1974; RAPOPORT y col., 1975; y RAPOPORT y col., 1976) y SASAKI (SASAKI y col., 1976 y CHIVA y SASAKI, 1978), muestran que la concentración fisiológica de 3-PG (90-110  $\mu$ M) es unas cien veces superior al valor de la  $K_m$  para este compuesto (1  $\mu$ M). Por el contrario el nivel del otro sustrato, el 1,3-DPG (0,5  $\mu$ M- 1  $\mu$ M), es del orden de 1/10 del valor de la  $K_m$  en presencia de ClK 0,1 M. La velocidad de síntesis del 2,3-DPG en eritrocitos humanos depende por tanto de la concentración de 1,3-DPG. El 2,3-DPG es un inhibidor competitivo del 1,3-DPG con una  $K_i$  de 53  $\mu$ M. Las concentraciones intracelulares de 2,3-DPG libre, que varían con la presión de oxígeno, pero que pueden calcularse, como media alrededor de 3 mM, parecen ejercer una gran influencia inhibidora sobre la difosfogliceratomutasa, de modo que la mantengan en un estado casi incapaz de actuar en la síntesis del 2,3-DPG. Como consecuencia, cualquier situación que conduzca a un aumento en los niveles intracelulares de 2,3-DPG siempre producirá un incremento en la concentración de 2,3-DPG (SAITO y MINAKAMI, 1967; DUHM y GERLACH, 1974; TOMODA y col., 1975).

En consecuencia, la velocidad de actuación de la difosfogliceratomutasa y la formación de 2,3-DPG depende de la razón 1,3-DPG/2,3-DPG. El mantenimiento de los niveles estacionarios de 2,3-DPG es así la resultante de un proceso de síntesis a partir del 1,3-DPG y de degradación a 3-PG. En estos dos procesos entra también en juego

el papel inhibitor de la actividad difosfogliceratofosfatásica por su producto 3-PG, así como también, posiblemente el grado de activación de la difosfogliceratomutasa a difosfogliceratofosfatasa por un regulador del tipo del 2-Pglicolato.

En cuanto a la regulación de la actividad fosfogliceratoquinásica viene determinada no sólo por la concentración y afinidad por el 1,3-DPG, sino también por la razón ADP/ATP intracelular.

a) Es bien conocido que a niveles bajos de ADP y altos de ATP (razón ADP/ATP baja), está favorecida la utilización de la degradación de la glucosa hacia el ciclo del 2,3-DPG, la cual ha sido cuantificada en un 15-25% de toda la glucosa metabolizada por el eritrocito (HAMASAKI y MINAKAMI, 1972; RAPOPORT y col., 1977).

Añadamos que cada mol de glucosa desviada a través del ciclo se traduce en una disminución de 1 mol en la producción neta de ATP (OSKI, 1969; GERLACH y col., 1970), y que en este punto radica, esencialmente, la regulación de los niveles de 2,3-DPG durante los procesos de conservación de sangre y el mecanismo de actuación de algunos fármacos como dipiridamol (PINILLA y col., 1973).

b) Por el contrario, a niveles altos de ADP y bajos de ATP (razón ADP/ATP alta), el 1,3-DPG será utilizado por la fosfogliceratoquinasa con la consiguiente reposición del ATP. Entonces, cada mol de glucosa degradada si da lugar a una producción neta de 2 moles de ATP.

A la vista de estas interrelaciones y dado que el 2,3-DPG inhibe la fosfogliceratoquinasa de forma no competitiva respecto al 1,3-DPG y junto con su posible comportamiento cooperativo-negativo a concentraciones fisiológicas (5 mM) de 2,3-DPG (ALI y BROWNSTONE, 1976 b) y otras características confusas de esta enzima respecto a la de otras fuentes (RAO y OESPER, 1967; LARSSON-RAZNIKIEWICZ, 1967) hacen que la fosfogliceratoquinasa sea una enzima de obligado estudio en nuestra línea de investigación.

En cuanto al mecanismo de la difosfogliceratomutasa, debemos decir que de acuerdo con ROSE (1968) esta reacción implicaba un mecanismo ordenado Bi-Bi en eritrocitos humanos según el cual la enzima libre se une primero al 1,3-DPG y a continuación al 3-PG, para formar un complejo ternario. El primer producto que abandona la en-

zima es el 3-PG mientras que el otro producto, el 2,3-DPG, lo hace después. La enzima parecía tener aquí sitios de unión independientes para los dos sustratos. Por el contrario, los datos cinéticos obtenidos para la enzima de eritrocitos de caballo sugieren un mecanismo "ping-pong" (ROSE y DUVE, 1976). La enzima de eritrocitos humanos (ROSE y WHALEN, 1973) y de caballo (ROSE y DUVE, 1976) era fosforilada tanto por el 1,3-DPG como por el 2,3-DPG. Esta enzima fosforilada transfería el grupo fosfato al 3-PG. En el caso de la activación por el 2-Pglicolato la enzima fosforilada cedía el grupo fosfato al agua, con lo que queda justificada la exaltación de la actividad fosfatásica de la difosfogliceratomutasa en presencia de este activador. A pesar del aislamiento de una fosfoenzima (ROSE y WHALEN, 1973) éllo no supone una evidencia absoluta del mecanismo "ping-pong" pues es posible que la reacción siga un mecanismo secuencial en el que participen un complejo ternario y haya fosforilación de la enzima (ROSE y WHALEN, 1973).

### 1.3.- SEPARACION CELULAR POR DISTRIBUCION EN SISTEMAS BIFASICOS.

#### 1.3.1.- FUNDAMENTOS DE LA PARTICION.

La separación de diferentes partículas biológicas (células, orgánulos y macromoléculas) es tema de gran importancia para la investigación en diversos campos de la biología. Pensamos que, en gran medida, el desarrollo futuro de estas ciencias pudiera estar supeditado al desarrollo de métodos eficaces de separación del material celular. La utilización del principio de partición para la separación de una mezcla compleja de partículas biológicas se debe a la aplicación por ALBERTSSON de sistemas bifásicos constituidos por soluciones acuosas de dos polímeros inertes. La distribución de las partículas en estos sistemas presenta ventajas muy importantes desde el punto de vista bioquímico, ya que los polímeros (dextrano y polietilenglicol) y condiciones experimentales (pH, temperatura y fuerza iónica suave) empleados no afectan a la integridad biológica de las mismas (ALBERTSSON y BRAID, 1963; ALBERTSSON, 1965; ALBERTSSON, 1971; WALTER, 1975) resulta ser así uno de los métodos más adecuados para la separación de material biológico. Por ejemplo, partículas que no pueden ser separadas por centrifugación, ya que presentan densidad similar pueden serlo por partición. Análogamente, partículas que por presentar pequeñas diferencias en su carga superficial no pueden ser separadas por electroforesis, lo hacen por partición. La distribución específica de cada partícula biológica en estos sistemas bifásicos depende de las propiedades de superficie de su membrana. En consecuencia, la separación vendrá determinada por la actividad relativa que posean dichas partículas por los dos polímeros y estará influenciada por la concentración iónica y de los polímeros, pH y temperatura. El método presenta, por tanto, gran interés en aquellos casos en los que se producen alteraciones en la superficie de las membranas celulares, como procesos de diferenciación, maduración y envejecimiento.

### 1.3.2.- ASPECTOS TEORICOS.

Desde el punto de vista teórico debemos recordar que la mezcla de soluciones acuosas de dextrano y polietilenglicol solo dará lugar a sistemas bifásicos cuando se alcancen concentraciones de polímeros superiores a ciertos límites. Estos límites vienen determinados por la denominada curva binodial (ALBERTSSON, 1971) (fig. 1). En el caso de concentraciones situadas por encima de la curva binodial disminuye la partición siempre que nos alejemos del punto crítico y se hace difícil la reproductibilidad de las particiones a medida que nos acercamos excesivamente a dicho punto crítico. Si la mezcla de polímeros corresponde a puntos situados por debajo de la curva binodial aparecen sistemas monofásicos.

Si, por ejemplo, introducimos en un sistema bifásico dos sustancias, A y B, y suponemos que A es soluble en la fase superior y B lo es en la inferior o interfase, es evidente que podremos conseguir la separación con una sola partición. Si no son tan marcadas la diferencias entre A y B, únicamente podrá conseguirse la separación mediante un procedimiento de múltiples particiones, como el de distribución en contracorriente (DCC), donde se realicen varias extracciones consecutivas de la mezcla A y B empleando un mismo sistema bifásico. (1.3.3.).

La partición de una partícula en un sistema bifásico de volúmenes iguales, viene determinada, de forma general, por la "razón de partición",  $G$ ; que se define como el cociente entre la cantidad total de partículas en la fase superior " $p$ " y la inferior o interfase " $q$ ". Es decir  $G = p/q$ . La cantidad de partículas presentes en ambas fases, es decir, añadidas originalmente, será  $p + q$ . Cuando los volúmenes de las dos fases son iguales la razón  $G$ , equivale al "coeficiente de partición",  $K$ , que se define como el cociente de la concentración de partículas entre la fase superior " $C_s$ " e inferior " $C_i$ ", es decir,  $K = C_s/C_i$ .  $K$  puede también ser representada por la expresión:  $K = e^{Ah/RT}$ , donde  $A$  es el área superficial de la partícula,  $R$  es la constante de los gases,  $T$  la temperatura absoluta y  $h$  una cons

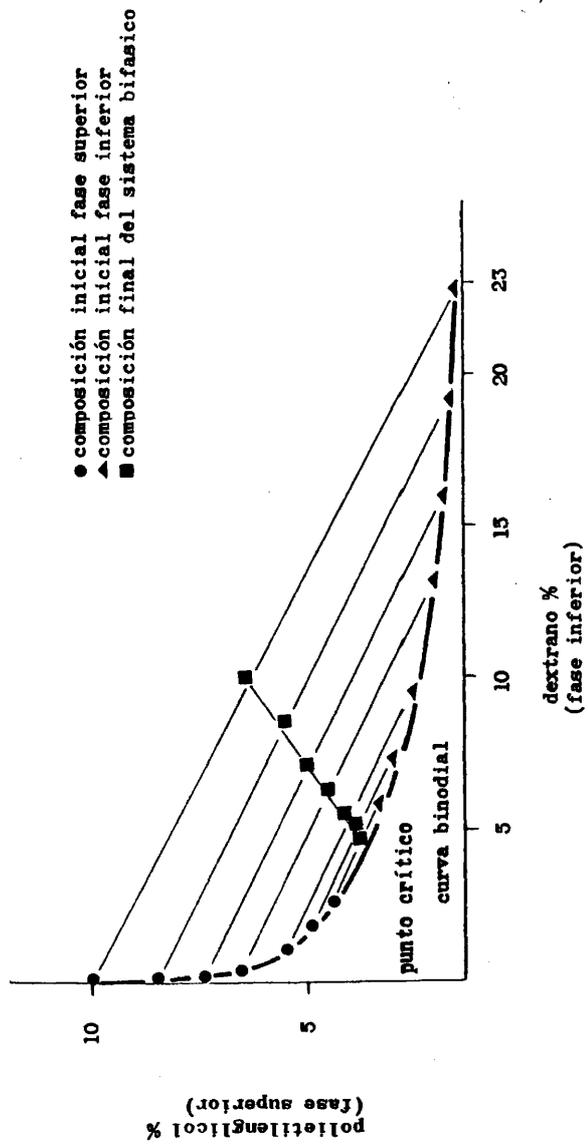


Fig. 1.- DIAGRAMA Y COMPOSICION DE FASES DEL SISTEMA DEXTRANO POLIETILENGLICOL.

tante dependiente de la interacción entre cada partícula y el sistema bifásico. De esta manera cualquier propiedad que condiciones a K (tamaño, temperatura y carga) será un factor determinante de la partición.

La expresión que relaciona G con K es la siguiente:

$$G = \frac{p}{q} = \frac{C_s}{C_l} \times \frac{V_s}{V_l} = K \times \frac{V_s}{V_l}$$

donde  $V_s$  y  $V_l$  son los volúmenes de la fase superior e inferior. Si llamamos L a la relación de volúmenes resultará:  $G = K \times L$ . Obsérvese que, por un lado, K es independiente de los volúmenes relativos de las fases superior e inferior y, por otro, que la partición tiene lugar generalmente entre las fases superior y la interfase y no entre las fases superior y la inferior. En consecuencia, la cantidad de células o partículas en la fase superior es siempre la constante que define una partición. Por ello, a efectos prácticos, se expresa la partición como la cantidad (en tanto por ciento) de partículas en la fase superior, respecto al total (100%) de partículas originalmente añadidas. Se considera que una partición es adecuada cuando se acerca al 50% de partículas en la fase superior.

El establecimiento de las condiciones óptimas para la obtención de un grado idóneo de partición, es cuestión previa al procedimiento experimental correspondiente. Hemos de tener en consideración que la partición se ha de realizar en un medio salino, isotónico y que se puede variar el grado idóneo de la partición por elección adecuada de la composición y concentración iónica del sistema bifásico (ALBERTSSON, 1971). También ha de tenerse en cuenta que el rendimiento de la partición depende de la temperatura, de tal forma que cuando ésta se eleva, aumenta la partición y viceversa; la mayor variación en cuanto a concentración de las fases, con los cambios de temperatura, tiene lugar en las proximidades del punto crítico. (fig. 1).

Estas posibilidades de manipulación en cuanto a concentración y composición de sales, concentración de polímeros, temperatu-

ra etc. permite obtener diferentes rendimientos en la partición. Así, si la partición es baja en el sistema seleccionado, se puede aumentar el pH, cambiar el ión del tampón y reducir la concentración salina manteniendo la isotonicidad por incorporación de sacarosa, también es posible incluir en el sistema pequeñas cantidades de un polímero cargado (WALTER y SELBY, 1967). Por el contrario, si la partición es alta, se puede reducir el pH, cambiar el fosfato sódico por fosfato potásico, reducir la concentración de fosfato manteniendo la isotonicidad por incorporación de  $K^+$ ,  $Na^+$  o cloruro de litio, o bien cambiar la concentración de polímeros con la finalidad de mantenerse lejos del punto crítico (WALTER, 1975).

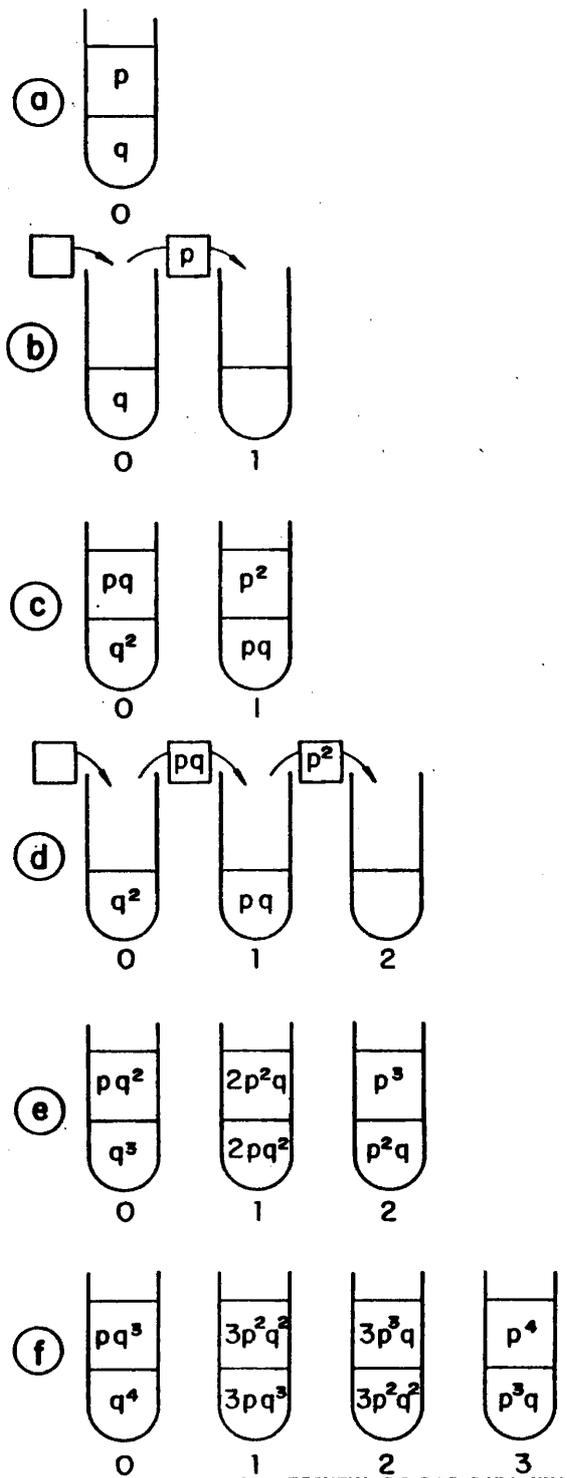
### 1.3.3.- PRINCIPIO DE LA DISTRIBUCION EN CONTRACORRIENTE.

El principio del método de distribución en contracorriente (DCC) ha sido tratado por varios autores (HECKER, 1955; CRAIG y CRAIG, 1956; TAVEL y SIGNER, 1956; CRAIG, 1961). La separación de partículas por DCC consiste en la realización de sucesivas particiones de la mezcla de partículas, en un mismo sistema bifásico. Es particularmente útil el caso de mezcla de partículas que, para un determinado sistema bifásico posean coeficientes de partición diferentes. En este método se emplean gran número de "unidades de contacto" (cavidades o células de separación), produciéndose en cada una de ellas la mezcla, agitación y separación simultáneas de las dos fases inmiscibles. Es en esta última etapa cuando se lleva a cabo la partición de las partículas entre la fase superior y la interfase, atendiendo al coeficiente de reparto que posean dichas partículas para el sistema utilizado. Con ello se consigue en cada cavidad una separación parcial de los componentes de la mezcla. La repetición del proceso un número elevado de veces lleva a la separación total o bastante completa de las mismas. Esto se logra clásicamente mediante un conjunto ordenado de transvases de fase superior, y desde cada "unidad de contacto" que que no sin ella. El esquema clásico de distribución en contra-

corriente es el desarrollado por CRAIG. (1961).

Consideremos gráficamente (fig. 2) el esquema de distribución en contracorriente para el caso de una sustancia homogénea (de coeficiente de reparto,  $K = 1$ ). Se emplea un sistema bifásico cuya relación de volúmenes es  $L = 1$ . Se supone que la cantidad total de sustancia añadida ( $p + q$ ) es igual a la unidad. También se supone que el reparto se realiza entre la fase superior y la inferior; en realidad, se realiza normalmente entre la fase superior y la interfase. El esquema se ha desarrollado por cuatro transferencias y cinco unidades de contacto. Los pasos son los siguientes:

- a) Una vez añadida la sustancia sobre el sistema, y agitada la mezcla para conseguir el equilibrio, aquella queda repartida en ambas fases de acuerdo con su razón de partición,  $G = p/q$ , es decir, queda "p" en la fase superior y "q" en la inferior.
- b) Se realiza la primera transferencia. La fase superior del tubo 0, que contiene una cantidad "p" de sustancia, se añade sobre el tubo 1 que contiene un volumen igual de fase inferior limpia. Al mismo tiempo, la fase inferior del tubo 0 que contiene una cantidad "q" de sustancia, recibe un volumen igual de fase superior limpia.
- c) Durante la agitación de ambos tubos la cantidad total de sustancia en cada uno de ellos que es "q" en el tubo 0 y "p" en el tubo 1 se reparte entre las fases superior e inferior.
- d) Seguidamente se realiza la segunda transferencia. Las fases superiores de cada tubo son añadidas sobre las fases inferiores de los tubos situados inmediatamente a su derecha. De los tres tubos que participan en esta 2ª transferencia, el número 0 es el único que recibe fase superior limpia y el número 2 es el único que aporta fase inferior limpia.
- e) Nuevamente, durante la agitación, la cantidad total de sustancia en cada tubo ( $q^2$  en el tubo 0,  $2pq$  en el 1 y  $p^2$  en el 2), se reparte entre las fases superior e inferior.
- f) En la tercera transferencia, no representada en el esquema, las fases superiores de los tubos 0, 1 y 2 pasan al situado a su derecha, recibiendo fase superior limpia el tubo 0 y aportando fase inferior limpia el 3. Después de agitados los cuatro tubos las cantidades to-



$$p + q = 1$$

tubo nº	contenido
0	$pq + q^2 = (p+q)q = q$
1	$p^2 + pq = (p+q)p = p$

tubo nº	contenido
0	$pq^2 + q^3 = (p+q)q^2 = q^2$
1	$2p^2q + 2pq^2 = (p+q)2pq$
2	$p^3 + p^2q = (p+q)p^2 = p^2$

tubo nº	contenido
0	$q^3$
1	$3pq^2$
2	$3p^2q$
3	$p^3$

Fig. 2.- ESQUEMA DE DCC PARA UNA SUSTANCIA HOMOGENEA CON COEFICIENTE DE REPARTO  $K = 1$ .

tales de sustancia en cada tubo se habrán repartido entre las fases, obteniéndose los valores que aparecen en la fig. 2.

De las consideraciones anteriores se deduce que la distribución de las partículas en los tubos, en cada transferencia, es el resultado del desarrollo del binomio  $p + q$  elevado a una potencia cuyo valor coincide con el número de transferencias efectuadas. En el caso de "n" transferencias, la distribución de las partículas en los  $(n + 1)$  tubos del tren de extracción vendrá dada por la expresión binomial  $(p + q)^n$ . En consecuencia a partir de la representación gráfica de la cantidad total de sustancia en cada tubo, frente al número de éste, se obtienen "n" curvas de DCC, cuyos perfiles serán mas o menos simétricos dependiendo de los valores de p y q. Cuando "p" y "q" son iguales ( $G = 1$ ), la distribución es una curva de Gauss.

El cálculo teórico de los diagramas de distribución se basa en el desarrollo de  $(p + q)^n$ , de tal manera que la fracción de sustancia  $T_{n,i}$  en el tubo "i", después de "n" transferencias y de acuerdo con el teorema binomial, vendrá dado por la siguiente expresión.

$$T_{n,i} = \frac{n!}{i! (n-i)!} p^i q^{n-i} = \binom{n}{i} p^i q^{n-i}$$

O bien en función de G (WALTER, 1969 a-1969 b)

$$T_{n,i} = \binom{n}{i} \times \frac{G^i}{(1+G)^n}$$

Estas ecuaciones son laboriosas cuando el número de transferencias es elevado, en estos casos y con bastante aproximación, la curva de distribución puede aproximarse a una curva de distribución gaussiana. (HECKER, 1955).

$$a) \quad T_{n,i} = \frac{(G+1)^2}{2nG} \times e^{-\frac{(i-1)^2}{2nG}} \times (G+1)^2$$

Con esta ecuación se obtienen dos puntos de la curva simétricos respecto al máximo.

El valor del máximo único, viene dado en consecuencia por:

$$b) \quad T_{n,i \text{ max}} = \frac{nG}{G + 1}$$

#### Distribución de dos o mas particulas

Cuando, en lugar de una sustancia homogénea, se tiene una mezcla de dos o más partículas cada una de ellas con un coeficiente de partición (K) distinto, la separación por DCC se traduce, gráficamente, en curvas convenientemente separadas. Las posiciones de tales curvas en función del número total de tubos, dependen de los valores de las respectivas razones de partición, G. Puesto que G es igual al producto del coeficiente de reparto por la relación de volúmenes ( $G = K \times L$ ) podemos concluir que las posiciones de las curvas en los diagramas de DCC dependerán, por un lado, de los coeficientes de reparto, (K) de cada partícula, y por otro, de la relación de volúmenes (L) del sistema bifásico. A título de ejemplo véase en la fig. 3 una serie de curvas teóricas para la DCC de partículas con distinto coeficiente de partición K, en las que se ha mantenido una relación de volúmenes, L, igual a 1.

La separación por DCC de dos sustancias con coeficientes de partición distintos, se muestran en la fig. 4. En ella se comparan los resultados experimentales de la separación de poblaciones celulares (eritrocitos humanos mantenidos unos 20 días a 40°C en ClNa 0,15 M, y eritrocitos recién obtenidos de rata), cuyos coeficientes de partición son significativamente diferentes: 0,31 y 1,85 respectivamente. (RUIZ-LOPEZ y col., 1979).

En resumen, se observa que la posición de las células en el perfil de la DCC depende, para una misma relación (L) de volúmenes de fases, de los valores de los coeficientes de reparto, K. Se llega así a la importante conclusión práctica de que la separación por DCC de dos o más sustancias será tanto más fácil cuanto mayor sea la diferencia entre sus valores de K. Se denomina factor de separación B, para la DCC de dos sustancias A y B, al cociente  $K_B/K_A$  donde  $K_B$  es mayor que  $K_A$ .

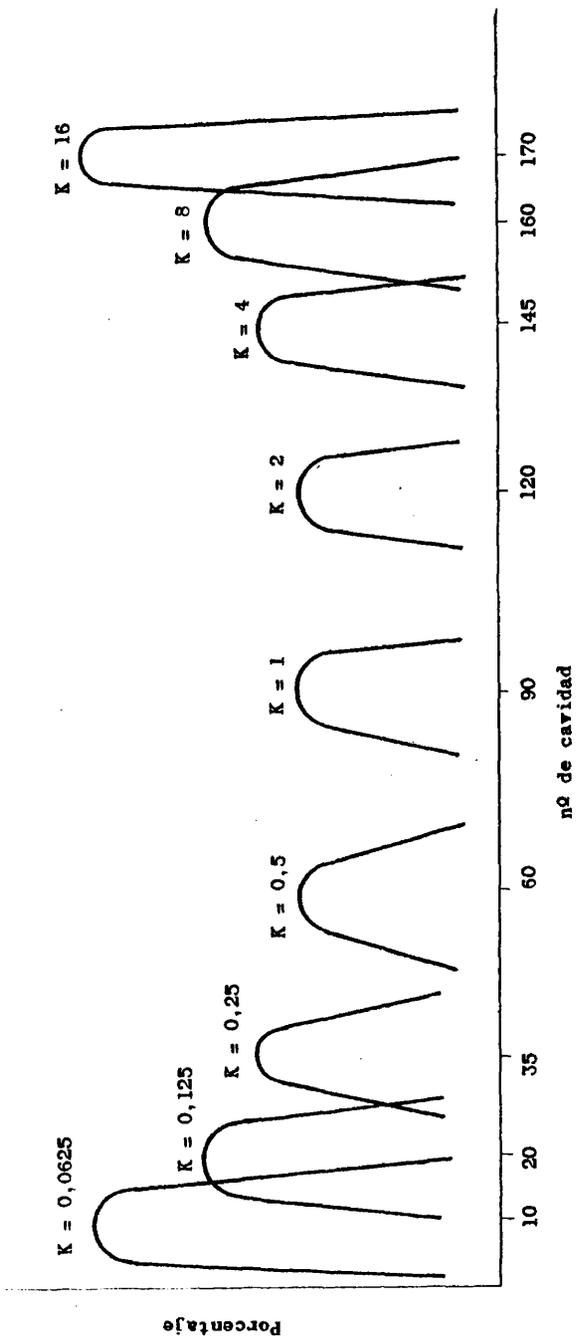


Fig. 3.- ESQUEMA DE LAS CURVAS TEORICAS DE DCC PARA SUSTANCIAS CON COEFICIENTE DE PARTICION K DISTINTOS. LA RELACION DE VOLUMENES  $L = 1$ .

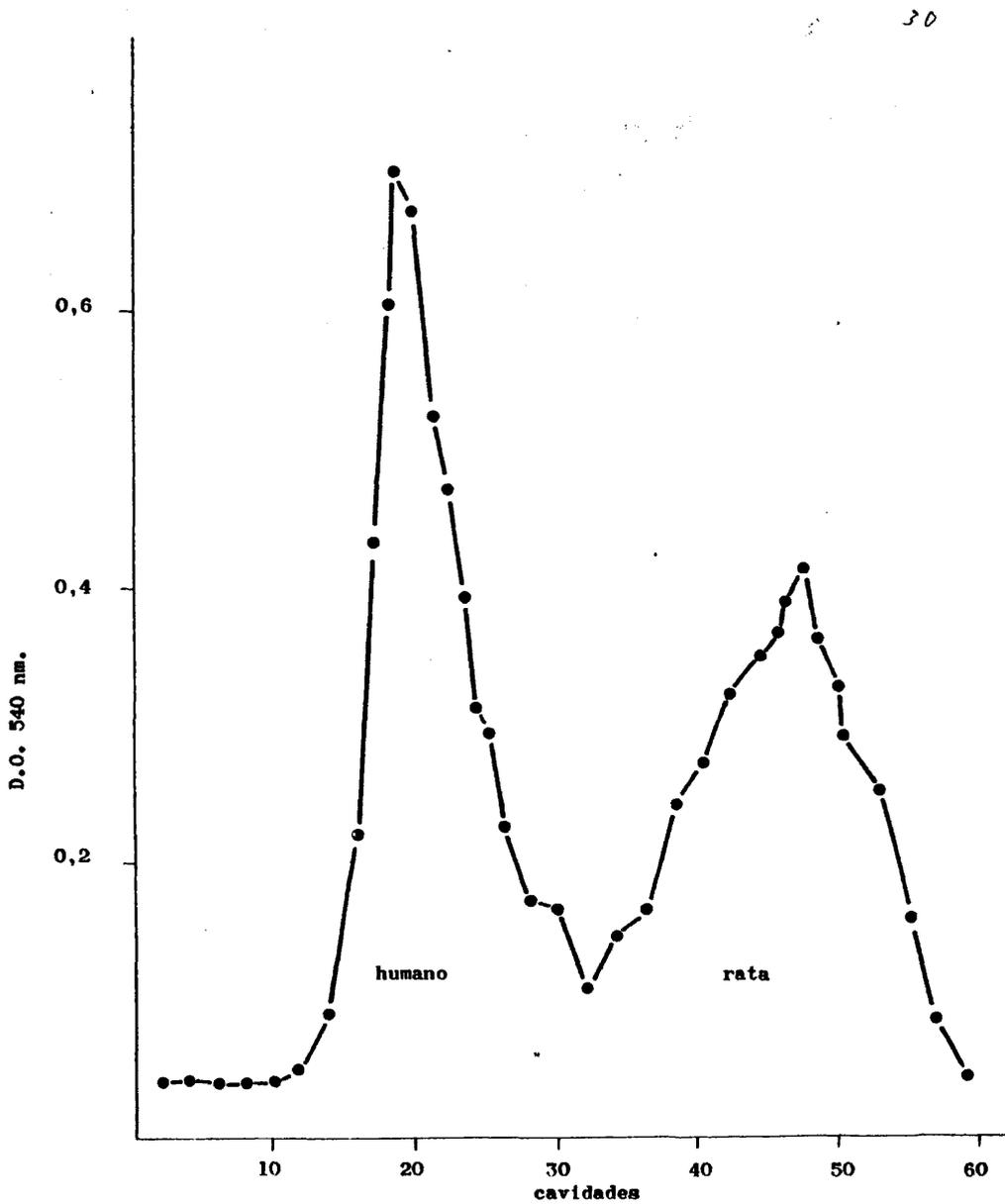


Fig. 4.- SEPARACION POR DCC DE DOS TIPOS CELULARES (ERITROCITOS HUMANOS Y ERITROCITOS DE RATA) CON COEFICIENTES DE PARTICION DISTINTOS.

#### 1.4.- OBJETO DEL TRABAJO.

El objeto del presente trabajo, como ya se indicó en la introducción, consiste en aportar una serie de datos experimentales encaminados a detectar, en la trayectoria que siguen las células eritrocitarias hacia su especialización en la producción de 2,3-DPG, en qué fase de la eritropoyesis se incrementa la síntesis de este compuesto. Está basado pues en el estudio de dos enzimas estrechamente relacionadas con el mencionado fosfato orgánico, la difosfoglicerato mutasa, como enzima directamente responsable de su síntesis y la fosfogliceratoquinasa localizada en la vía glicolítica, y que compete con la mutasa por el sustrato común 1,3-DPG.

En primer lugar estudiaremos dichas enzimas y el metabolito 2,3-DPG en tres poblaciones celulares representativas de la eritropoyesis (células eritroideas de médula ósea, reticulocitos de ratas fenilhidrazínicas y eritrocitos circulantes). Por otro lado y con el fin de dar un sentido de continuidad a la célula que está diferenciándose, y no distribuirla exclusivamente en tres compartimentos cerrados, utilizaremos la técnica de DCC en un sistema bifásico dextrano polietilenglicol, para separar las células componentes de dichos compartimentos según su estado relativo de disociación, maduración y envejecimiento. Previamente, se juzga necesaria la confirmación de la separación de los eritrocitos maduros según la edad celular mediante esta técnica, haciendo uso de marcaje isotópico con <sup>59</sup>Fe. Los valores de actividad quinásica y mutásica obtenidos en dichas células separadas se podrán tomar como parámetros biológicos indicativos del distinto grado de diferenciación celular, así como del grado de homogeneidad o heterogeneidad de las poblaciones sometidas a DCC.

Consideramos por ello que queda abierta la puerta tanto para el estudio del 2,3-DPG, acerca de su regulación, como desde el punto de vista citológico, genético etc. que nos brinda la separación de las células según su distinto grado de diferenciación.

**2.- MATERIAL Y METODOS.**

## 2.1.- MATERIAL.

### 2.1.1.- APARATOS UTILIZADOS.

Las medidas de pH se efectuaron en un pH-metro Metrohm-Herigau E-512.

Las pesadas de precisión se hicieron en balanza eléctrica Sartorius. El resto en una Stanton D. 50. T.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro con registrador Pye Unicam SP8-100.

Las determinaciones colorimétricas se efectuaron en un Spectronic-70, Bausch G Lomb.

Las medidas polarimétricas se determinaron en un polarímetro Steeg G Reuter SRG.

Para las incubaciones se utilizó un baño con agitación Selecta Unitronic-320.

Las centrifugaciones se realizaron en centrífuga refrigerada Janetzki K-24 y en centrífuga clínica de mesa Selecta.

Las c.p.m. se contaron en un detector de centelleo sólido modelo D.4.4P y una escala J.E.N. modelo E-17.

El microscopio óptico utilizado fué un Leitz-Wetzlar Orthoplan. El microscopio electrónico fué un Jeol, JEM-100-B.

### 2.1.2.- PRODUCTOS UTILIZADOS.

NADH, ATP, 2-P-glicolato, 2-3DPG, 3-PG, gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa, fosfogliceratoquinasa y fosfogliceratomutasa de Boehringer-Mannheim.

Azul brillante de cresil, solución Giemsa, bálsamo de Canadá (Caedax), Tris, EDTA, mercaptoetanol de Merck.

Fenilhidrazina de Hopkin y Williams LTD.

Heparina de laboratorios Leo.  
Seroalbúmina bovina de Sigma.  
Vitamina B12 de laboratorios Andromaco.  
Dextrano T-500 de Pharmacia.  
Polietilenglicol de Serva.  
<sup>59</sup>Fe, suministrado por Radiochemical Centre, Amersham, England.  
El resto de los productos utilizados los suministró Merck.

## 2.2.- MATERIAL BIOLÓGICO.

Los animales utilizados para la obtención de eritrocitos, reticulocitos y células eritroideas fueron ratas de raza Wistar. Se tomaron siempre lotes de cuatro machos jóvenes de unos 200-300 g de peso. La alimentación fué normal en todos los casos.

### 2.2.1.- OBTENCION DE ERITROCITOS.

La sangre de cuatro ratas se obtuvo por exanguinación del animal, recogiénose ésta sobre heparina. Una vez separado el plasma por centrifugación (1100 x g, 10 min.) y con el fin de obtener exclu-sivamente los eritrocitos, se procede a lavar las células con ClNa 0,15 M, eliminándose la capa superior después de cada centrifugación con el fin de retirar leucocitos y plaquetas. Las células así obtenidas se considera que son eritrocitos exclusivamente.

### 2.2.2.- OBTENCION DE RETICULOCITOS.

Para la obtención de reticulocitos se utilizó el método de BORSOOK y col. (1952) modificado por nosotros y basado en la administr

tración de fenilhidrazina, que produce la hemólisis eritrocitaria y la consiguiente liberación de reticulocitos al torrente circulatorio. La dosis se fijó en 4 mg. de fenilhidrazina contenidos en 0,5 ml. de una solución 1 mM de CIH, de acuerdo con WALTER y ALBERTSSON (1966). Puesto que tanto la duración del tratamiento como el tiempo transcurrido hasta la obtención de las células después de cesar éste influye en el porcentaje de reticulocitos, se hicieron recuentos celulares en los cinco días siguientes al cese del tratamiento, en dos lotes de ratas inyectadas i.p. con fenilhidrazina durante cinco o seis días respectivamente.

En la tabla nº 1 se recogen los resultados correspondientes.

**TABLA Nº 1.- PORCENTAJE DE RETICULOCITOS PRESENTES EN SANGRE DE RATAS TRATADAS CON FENILHIDRAZINA DURANTE a) CINCO DIAS Y b) SEIS DIAS EN LOS CINCO DIAS SIGUIENTES AL CESE DEL TRATAMIENTO.**

TRATAMIENTO	DIAS DESPUES DEL CESE DEL TRATAMIENTO				
	1º	2º	3º	4º	5º
a) CINCO DIAS	36	56	73	37	5
b) SEIS DIAS	40	62	90	42	6

Resultados expresados en % de reticulocitos presentes en sangre respecto al total de células rojas.

Puede observarse el alto porcentaje de reticulocitos en el torrente circulatorio al tercer día del cese del tratamiento (administración i.n. diaria durante seis días, de 4 mg. de fenilhidrazina). En los días sucesivos se detectó un elevado porcentaje de eritrocitos no normales, a la vez que disminuye la cantidad relativa de

reticulocitos.

Una vez obtenidas las células por exanguinación del animal, se procesan según el mismo esquema descrito para eritrocitos.



Fotografía (12.500 aumentos) de sangre (reticulocitos 90%) de rata anemizada por administración de fenilhidrazina.

### 2.2.3.- OBTENCION Y PREPARACION DE CELULAS ERITROIDEAS DE MEDULA OSEA.

La obtención de células eritroideas se realizó según el método de MEL y col. (1965). Se utilizaron para ello ratas Wistar tratadas con fenilhidrazina, según el esquema del apartado anterior, en donde la riqueza en reticulocitos es superior al 90%. Una vez exanguinadas y obtenidos los seis huesos largos, se cortan los extremos del hueso y se introduce una aguja hipodérmica con 6 ml. de solución salina isotónica y, mediante una ligera presión, la médula sale por el extremo opuesto en bloque o en pequeñas porciones. Se hace pasar varias veces la solución salina por el hueso hasta que queda limpio; para disgregar las células de la médula agitamos con una pipeta Pasteur, se deja un tiempo de reposo, y decantamos la suspensión haciéndola pasar por una media de nylon. Las células, posteriormente, se centrifugan, (1100 x g, 5 min.) y el precipitado se resuspende en suspensión salina fisiológica.

### 2.2.4.- ADMINISTRACION CON <sup>59</sup>Fe.

Se inyectaron i.p. tres ratas Wistar (200 g.) con 10 uCi de <sup>59</sup>Fe en forma de citrato férrico (WALTER, 1964). A los tiempos apropiados, 3; 26 y 55 días después de la inyección se extrajo la sangre, procediéndose como se indica en 2.2.1. para la obtención de las células.

### 2.2.5.- TINCION PARA MICROSCOPIA OPTICA. CONTAJE DE CELULAS.

La tinción para la identificación de los reticulocitos y tipos celulares presentes en el conjunto "células eritroideas" fué

realizada según el método de WINTROBE (1948). 5  $\mu$ l. de sangre o suspensión de células eritroideas procedentes de la mezcla de las cuatro ratas anemizadas, se colocaron sobre un porta y se mezclaron por agitación con espátula (2 min.) con igual volumen de una solución de azul brillante de cresil (10 mg/ml en ClNa 0,15 M). Una vez realizada la extensión sobre el porta, se dejó secar, y se fijó con etanol (2 min.). Cuando está seca la preparación se cubre con solución Giemsa (2 gotas/ml de agua destilada) durante 30 min.; se lava y se deja secar, inmovilizándose la preparación con bálsamo de Canadá y un cubreobjetos.

Para valorar la riqueza de reticulocitos de la muestra, se contaron en el microscopio (1250 aumentos) 10 campos, que recogían 1000 células. El número de reticulocitos se expresa como porcentaje del total de células rojas presentes.

En las preparaciones de células eritroideas, se observaron todos los componentes de la serie eritropoyética anteriores al reticulocito, esencialmente: proeritroblastos y eritroblastos basófilos, policromatófilos y ortocromáticos.

#### 2.2.6.- PREPARACION PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Las preparaciones para microscopía electrónica se realizaron en colaboración con el Departamento de Microscopía Electrónica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Se procedió de la siguiente manera: después de obtener los reticulocitos (2.2.2.) se tomaron 2 ml. de sangre total sobre 2 ml. de glutaraldeído al 2% en tampón fosfato pH = 7,4 se fija durante dos horas en reposo, se centrifuga y se desecha el sobrenadante. Posteriormente se lava dos veces con sacarosa (0,25 M) en tampón fosfato y se fija con tetróxido de osmio. Para la deshidratación se utilizó etanol desde 30%-99,5%, manteniéndose 10 min. dos veces sucesivas y con óxido de propileno-epon araldita en la proporción 1-1 durante ocho horas. Finalmente se incluye un trozo ( $\leq$  1 mm.) en la

cápsula, con la resina epón araldita, se mantiene en la estufa un día a 40°C y luego a 75°C hasta que tenga consistencia; por último se corta, y se tinte con acetato de uranilo al 2% y citrato de Pb al 1%.

#### 2.2.7.- CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE RETICULOCITOS.

Respecto a las características morfológicas y ultraestructurales de los reticulocitos obtenidos observadas al microscopio óptico y al electrónico podemos decir que:

a) al óptico hemos detectado en los frotis realizados alrededor de un 90% de reticulocitos, siendo la mayoría de ellos esféricos (esferocitos), destacándose un fino retículo disperso por todo el reticulocito a modo de malla tridimensional. Por otra parte, algunos de los reticulocitos y glóbulos rojos maduros presentan gruesos grumos basófilos que pudieran tratarse de cuerpos de Jolly.

b) al microscopio electrónico, los reticulocitos presentan unos bordes a veces regulares y otras de morfología dentada. En su interior hemos de destacar la presencia de abundantes ribosomas dispersos por todo el volumen citoplasmático. Se observa la existencia de algunas cisternas de retículo endoplásmico, las cuales suelen presentar en su interior vacuolizaciones, asimismo se han evidenciado estructuras del complejo de Golgi; las mitocondrias son escasas, con pocas crestas y de baja densidad electrónica. Finalmente, y al igual que al microscopio óptico hemos encontrado que algunos reticulocitos muestran en su porción central una zona vacuolizada e irregular existiendo en su interior unas masas amorfas de densidad electrónica media, que se identifican con restos de cromatina e invaginaciones citoplasmáticas, por lo que puede deducirse que se trata de un cuerpo de Jolly. Estas estructuras han sido evidenciadas en un porcentaje del 10%-15% de los reticulocitos presentes.

Podemos considerar que esta población reticulocitaria, obtenida



MICROGRAFIA ELECTRONICA (19.555 AUMENTOS) DE RETICULOCITO PRESENTE EN SANGRE DE RATA ANEMIZADA POR ADMINISTRACION DE FENILHIDRAZINA.



MICROGRAFIA ELECTRONICA (31.111 AUMENTOS) DE RETICULOCITO ATIPICO PRESENTE EN 10% EN LA SANGRE DE RATA ANEMIZADA POR ADMINISTRACION DE FENILHIDRAZINA.

nida por nosotros por tratamiento con fenilhidrazina, es válida a efectos del presente estudio. Tales poblaciones estan siendo utilizadas (RAPOPORT, 1974; WALTER, 1975) con análogos fines.

### 2.3.- METODOS.

#### 2.3.1.- PREPARACION DE HEMOLIZADOS CELULARES.

Para la determinación de las actividades enzimáticas en las diferentes poblaciones eritrocitarias, se hemolizan las células, previamente lavadas, por adición de igual volumen de agua destilada, y posterior congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) y descongelación dos veces sucesivas. Para la determinación de la actividad fosfogliceratoquinásica se centrifugaron dichos hemolizados ( $15000 \times g$ , 30 min.) para separar las membranas. Todos estos procesos se realizaron a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.3.2.- DETERMINACION DE 2,3-DIFOSFOGLICERATO.

Las alícuotas (0,5 ml.), obtenidas a los tiempos indicados en los apartados correspondientes de los resultados, se añadieron sobre 2 ml. de  $\text{ClO}_4\text{H}$  2 N. Previamente enfriado. Una vez centrifugados los tubos ( $2000 \times g$ , 15 min.) con objeto de eliminar el precipitado, los extractos perclóricos libres de proteína fueron neutralizados por adición de KOH (10 N, 1 N y 0,1 N) hasta alcanzar un pH = 7. El precipitado de  $\text{ClO}_4\text{K}$  formado fue separado por centrifugación ( $2000 \times g$ , 10 min.). La dilución sufrida por cada extracto fue tenida en cuenta a efectos de cálculo.

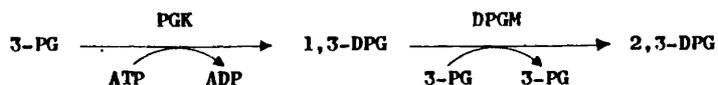
En dichos extractos perclóricos neutralizados, se determinó la concentración de 2,3-DPG enzimáticamente, utilizando para ello el método de ERICSON y De VERDIER (1972). La mezcla de reacción contiene en un volumen final de 2 ml.: Tris-ClH 50 mM, pH = 7,6; EDTA 5 mM;  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  50 mM; mercaptoetanol 25 mM; ATP 8 mM; NADH 1,5 mM; GAPDH 2 UI/ml; PGK 11 UI/ml; PGM 6 UI/ml; 2-P-glicolato 5 mM y 0,2 ml. de extracto. Una vez alcanzado el equilibrio, la reacción comienza por

adición del 2-P-glicolato, activador específico de la fosfatasa. Se mide el descenso de NADH a 340 nm. hasta alcanzar de nuevo el equilibrio.

### 2.3.3.- DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

#### 2.3.3.1.- Difosfogliceratomutasa.

El método de determinación de la actividad difosfoglicerato mutásica está basado en la medida a diferentes tiempos de incubación del 2,3-DPG formado, en el sistema de reacciones siguientes (JOYCE y GRISOLIA, 1959):

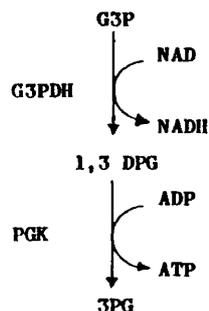


La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 5 ml.: Tris-ClH 150 mM, pH = 7,2; Cl<sub>2</sub>Mg 5 mM; ATP 10 mM; 3-PG 6,6 mM, PGK 18 UI/ml. La reacción comienza con la adición de 0,25 ml. de hemolizado. La mezcla total se incubó a 37°C en un baño con agitación (80 r.p.m.). A los tiempos apropiados descritos en los resultados, se tomaron alícuotas de 0,5 ml. que se desproteinizaron y neutralizaron, midiéndose el 2,3-DPG presente (2.3.2.).

#### 2.3.3.2.- Fosfogliceratoquinasa.

El principio del método consiste en la formación de 1,3-DPG a partir de 3-PG y posterior medida del 1,3-DPG por la oxidación del

NADH en presencia de G3PDH (YOSHIDA, 1975). El esquema de reacción es el siguiente:



La mezcla de reacción contiene en un volumen final de 2 ml.: 3PG 10 mM; ATP 5 mM; NADH 0,2 mM;  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  8 mM; Tris-ClH 80 mM, pH = 7,5; G3PDH 2 UI/ml. La reacción se inicia previa estabilización de la mezcla de reacción, con la adición de 0,01 o 0,02 ml. de los hemolizados, obtenidos como se indica en 2.3.1..

#### 2.3.4.- DETERMINACION DE HEMOGLOBINA.

La hemoglobina se determinó en suspensiones o hemolizados tanto de eritrocitos, reticulocitos o células eritroideas.

La determinación de Hb se realiza según el método de VAN KAMPEN y ZIJLSTRA (1961), basado en la oxidación de la hemoglobina por ferricianuro potásico, de tal manera que la metahemoglobina resultante reacciona con cianuro potásico para formar metahemoglobina que presenta un máximo de absorción de 540 nm.

La mezcla de reacción contiene un volumen final de 5 ml. teniendo: tampón de fosfato 2,5 mM, pH = 7,2; ClNa 1,5 mM; CNK 1 mM;  $(\text{Fe}(\text{CN})_6 \text{K}_3)$  0,6 mM; detergente 0,5%. Las alícuotas utilizadas va-

riaron según los distintos experimentos desde 0,05 ml. a 0,5 ml..  
Se lee a 540 nm frente a la mezcla de reacción sin problema.

Los valores se expresan en  $\mu$ moles de Hb/ml. de muestra.

#### 2.3.5.- DETERMINACION DE PROTEINAS Y ADAPTACION DEL METODO EN MUESTRAS QUE CONTIENEN DEXTRANO Y POLIETILENGLICOL.

La valoración de proteína se realizó según el método de LOWRY y col. (1951); el procedimiento seguido es el siguiente:

- reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/2.
- solución alcalina de cobre: 98 ml. de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 2% en NaOH 0,1 N + 1 ml. de  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  al 0,5% + 1 ml. de tartrato sodico-potasico al 1%.

A la muestra convenientemente diluida se le añadieron 5 ml. de la solución alcalina de cobre. Después de mezclar y reposar 10 min. se añaden 0,5 ml. del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se agita, se deja reposar 30 min. y se mide la absorción a 660 nm utilizando como referencia la mezcla de reacción sin muestra.

La concentración de proteínas se deduce a partir de una curva patrón realizada con concentraciones de seroalbúmina bovina conocida.

Para la determinación proteica, en muestras que contenían dextrano y polietilenglicol fué necesario eliminar dichos polímeros ya que el dextrano forma complejo con el  $\text{Cu}^{++}$ , produciéndose un precipitado que enmascara la determinación cuantitativa de proteínas. Por tanto, previamente a la determinación de proteínas, por el método de LOWRY, se realizó el siguiente esquema de eliminación de los polímeros.

A 0,2 ml. de muestra que contenía polímeros, se añadieron 0,2 ml. de TCA frío al 10% y 1 ml. de TCA frío al 5%. La mezcla se dejó en frío durante 30 min.; después, el precipitado de proteínas se centrifuga a 12000 x g durante 20 min.. El sobrenadante se retira y el precipitado se lava dos veces con 1,5 ml. de TCA frío al

5% y se centrifuga como al principio en ambos lavados. El precipitado se redissuelve con 0,2 ml. de NaOH 0,5 N a temperatura ambiente durante dos horas (ALBERTSSON, 1971).

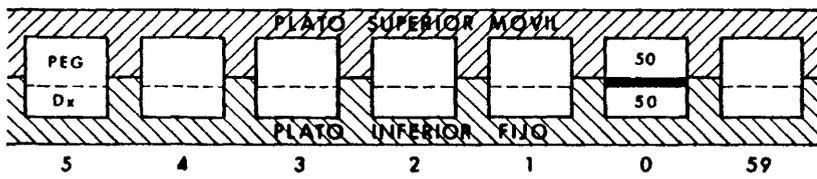
A continuación se realiza el esquema de determinación de proteínas mencionado anteriormente. Los valores obtenidos se deducen a partir de una curva patrón, sometida al mismo tratamiento que las muestras que poseen dextrano y polietilenglicol y se expresan los resultados en mg. de proteína/ml. de tubo.

#### 2.3.6.- DESCRIPCIÓN Y FUNCIONAMIENTO DEL APARATO DE DISTRIBUCIÓN EN CONTRACORRIENTE EN CAPA FINA.

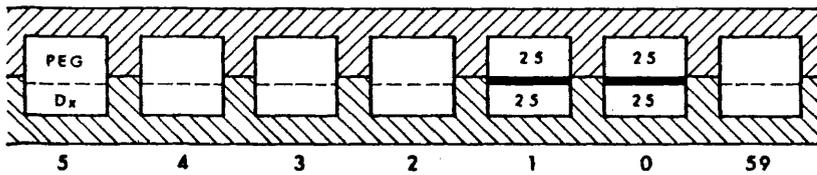
Está formado por dos platos contruidos en plexiglas con forma de corona circular; al acoplarse estos entre sí, de forma hermética se tiene el rotor propiamente dicho. Sus dimensiones son: diámetro externo 29 cm.; diámetro interno 15 cm.; espesor 4,5 cm.. En ambos platos hay 60 semicavidades, a intervalos de 6 grados. El volumen de la semicavidad inferior del rotor es de 0,79 ml. y el de la superior aproximadamente 2,5 ml.. Cada cavidad comunica con el exterior mediante un orificio situado en la cara externa del plato de arriba, que se emplea para la incorporación de la muestra y del sistema bifásico. Completa el rotor un aro del mismo material que al adaptarse a la superficie superior del mismo taponan los orificios de las cavidades. Los mecanismos de agitación se encuentran alojados en un bastidor, al que se adapta el rotor.

#### PROCEDIMIENTO.

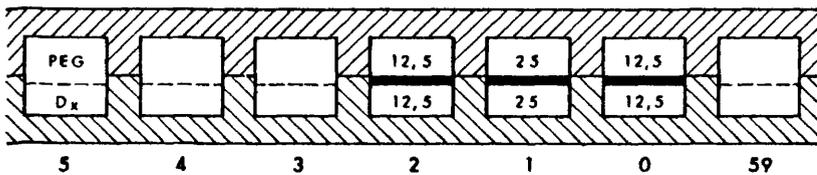
Una vez colocado el rotor sobre el mecanismo de agitación, se añade a 59 cavidades (de la 1 a la 59) el volumen de fase inferior y superior fijada previamente. En la cavidad 0 se añade la



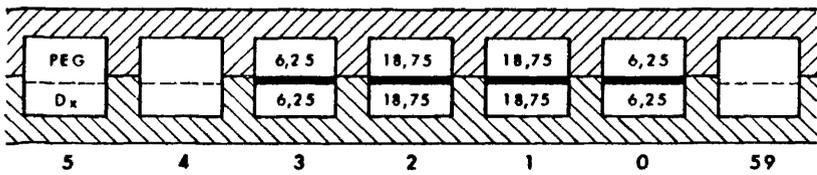
1<sup>o</sup> Transferecia (6°)



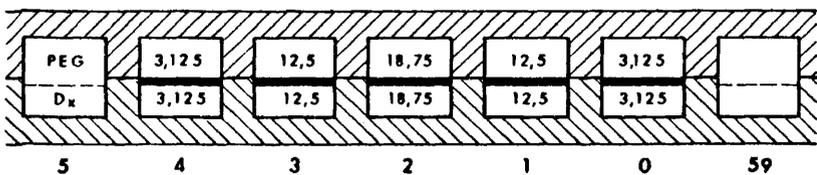
2<sup>o</sup>



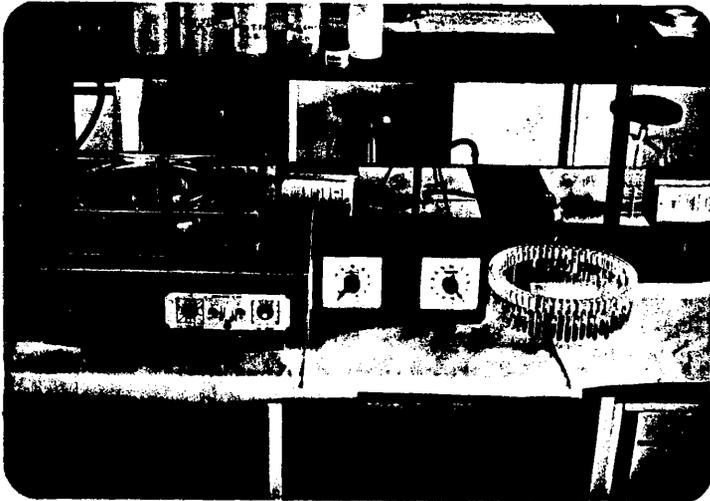
3<sup>o</sup>



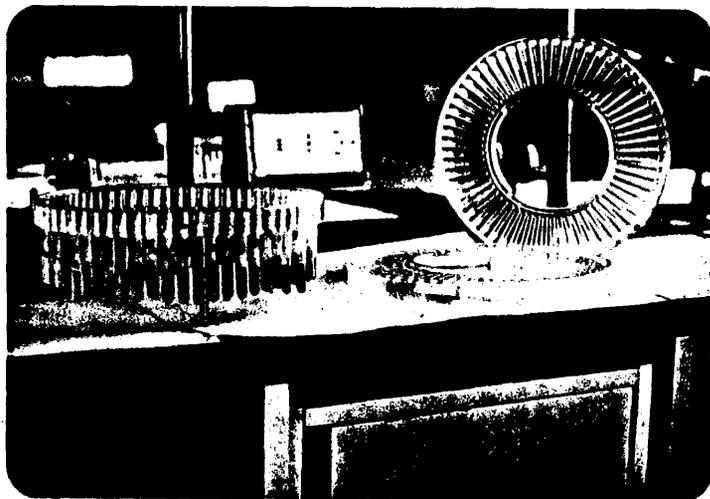
4<sup>o</sup>



ESQUEMA DE DISTRIBUCION EN CONTRACORRIENTE EN UN APARATO DE CAPA FINA. CANTIDAD INICIAL DE SUSTANCIA 100 . G = 1.



APARATO SEMIAUTOMATICO DE DCC.



ROTOR DEL APARATO DE DCC.

muestra y las fases, en proporciones tales que se mantenga la relación de volúmenes elegida. En ocasiones, y dependiendo de la cantidad de material particionado necesario, pueden llenarse con muestra, dos o mas cavidades.

Una vez llenas todas las cavidades, se inicia el proceso de distribución propiamente dicho, con la agitación del rotor (20 seg.), para mezclar el contenido de sus cavidades, y posterior reposo (5 min.) para facilitar la primera partición.

Si la cantidad total de sustancia añadida inicialmente en la cavidad 0 es 100, la cantidad de sustancia particionada será igual en ambas fases (50% en cada una), suponiendo un valor de  $K = 1$ . Es ahora cuando tiene lugar la primera transferencia mediante un giro de 6 grados del plato superior en el sentido de las agujas del reloj. Al producirse este primer deslizamiento del plato superior (móvil) respecto al inferior (fijo) entra en contacto la fase superior limpia de la cavidad 59 con la fase inferior que contiene sustancia de la cavidad 0, a la vez que la fase superior (conteniendo sustancia) de la cavidad 0 lo hace con la fase inferior limpia de la cavidad 1; después de agitar (20 seg.) y reposar (5 min.) la cantidad de sustancia distribuida en ambas fases de las cavidades 0 y 1 será igual a 25. Al producirse la segunda transferencia, las fases superiores de las cavidades 59, 0 y 1 (limpia en el primer caso y conteniendo 25 de sustancia en los dos restantes) se ponen en contacto, respectivamente, con las fases inferiores de las cavidades 0, 1 y 2 (conteniendo 25 de sustancia las dos primeras y sin sustancia la última). Después de agitación y reposo la sustancia queda así: 12,5 en ambas fases en las cavidades 0 y 2, y 25 en ambas fases, en la cavidad 1. Y así sucesivamente hasta la realización de la última transferencia (1 a 60 en nuestro caso). Una vez finalizado el proceso se acopla al rotor un colector de fracciones, especialmente diseñado, de tal manera que los orificios de llenado-vaciado de las cavidades del rotor coincidan con los tubos del colector. La inversión del conjunto formado por el rotor mas el colector acoplados permite recoger el contenido de las 60 cavidades en los 60 tubos del colector.

Los resultados se expresan representando en ordenadas la can

tividad de sustancia en cada cavidad y en abscisas el número de la ca  
vidad.

#### 2.3.7.- PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE POLIMEROS DEXTRANO Y POLI- ETILENGLICOL.

El dextrano T-500 utilizado es de Pharmacia, y contiene ge-  
neralmente un 5-10% de humedad, por ello, una vez preparadas las so  
luciones madre a partir de este producto, debe contrastarse su con-  
centración por polarimetría, las soluciones de dextrano preparadas  
son del 20% en peso.

Se pesan dextrano y agua destilada, en las proporciones con  
venientes para alcanzar una concentración del 20% en peso, se calien  
ta para facilitar la disolución hasta que comience a hervir agitando  
siempre. Se deja enfriar tapado con un vidrio de reloj, para conse-  
guir su completa estabilización. En una alícuota se determina por po  
larimetría la concentración, que suele ser superior al 20%, se de-  
terminan los gramos necesarios de agua para que la concentración sea  
del 20% y una vez añadidos éstos se comprueba de nuevo la concentra-  
ción del polímero por polarimetría.

El polietilenglicol utilizado en este trabajo es PEG 6000.  
Este polímero no requiere condiciones especiales para su preparación,  
ya que no es higroscópico. Se preparan soluciones madre del 40% en  
peso, dichas soluciones se mantienen largos periodos de tiempo a 4<sup>o</sup>C.

#### 2.3.8.- PREPARACION DE LOS SISTEMAS BIFASICOS.

##### 2.3.8.1.- Para experimentos de partición: influencia de la concentra ción de polímeros y sales.

La preparación de un sistema de fases para su posterior uti

PROTOCOLO 1.

CONDICIONES		PROCEDIMIENTO									
tubo nº	CONCENTRACIONES FINALES										
	Dx%	PEG%	TFNa M.	CINa M.	Dx 20%	PEG 40%	TFNa 0,2 M	CINa 1 M	H <sub>2</sub> O	suspensión células	
1	4	3	0,09	0,03	1g	0,375g	2,25g	0,15g	1,175g	0,05 ml.	
2	4,5	3,5			1,125g	0,45g			0,995g		
3	4,6	3,6			1,15g	0,45g			0,95g		
4	5	4			1,25g	0,5g			0,8g		
5	5,2	4,2			1,3g	0,525g			0,725g		
6	5,4	4,4			1,35g	0,55g			0,65g		
7	6	5			1,5g	0,625g			0,425g		
8	7	6			1,75g	0,75g			0,05g		
B	5	4			1,25g	0,5g	2,25g	0,15g	0,8g	0,05 ml.	

Dx = dextrano.

PROTOCOLO 2.

CONDICIONES	PROCEDIMIENTO											
	tubo nº	CONCENTRACIONES FINALES					Dx 20%	PEG 40%	TFNa 0,2M	CINA 1M	H <sub>2</sub> O	suspensión células
		Dx%	PEG%	TFNa M.	CINA M.							
1	5	4	0,11	0	1,25g	0,5g	2,75g	----	0,45g	0,05 ml.		
2			0,10	0,015			2,5g	0,075g	0,625g			
3			0,09	0,03			2,25g	0,15g	0,8g			
4			0,08	0,045			2g	0,225g	0,975g			
5			0,07	0,06			1,75g	0,3g	1,15g			
6			0,05	0,09			1,25g	0,45g	1,5g			
7			0,04	0,105			1g	0,525g	1,675g			
8			0,03	0,12			0,75g	0,6g	1,85g			
9			0,02	0,135			0,5g	0,675g	2,025g			
B			0,09	0,03			2,25g	0,15g	0,8g			

Dx = dextrano.

PROTOCOLO 3.

CONDICIONES		PROCEDIMIENTO								
tubo nº	CONCENTRACIONES FINALES									
	Dx%	PEG%	IFNa M.	C1Na M.	Dx 20%	PEG 40%	IFNa 0,2 M.	C1Na 1 M.	H <sub>2</sub> O	suspensión células
1	4	4	0,10	0,015	1g	0,5g	2,5g	0,075g	0,875g	0,05 ml.
2			0,09	0,03			2,25g	0,15g	1,05g	
3			0,07	0,06			1,75g	0,3g	1,4g	
4			0,05	0,09			1,25g	0,45g	1,75g	
5			0,03	0,12			0,75g	0,6g	2,1g	
B			0,09	0,03			2,25g	0,15g	1,05g	

Dx = dextrano.

lización en los experimentos de partición se realiza en tubos individuales graduados de 10 ml. de capacidad. Para conseguir las distintas concentraciones de volúmenes y sales, se pesan las soluciones madre de ambos polímeros, y, una vez diluidas convenientemente con las distintas sales, se obtendrán las concentraciones deseadas.

Para los distintos experimentos se siguieron los protocolos 1, 2 y 3 que se muestran en las páginas siguientes.

Una vez pesados los polímeros, sales y agua se centrifugan los tubos (1100 x g, 10000) con el fin de facilitar la separación de las fases; a continuación se procede a medir los volúmenes de ambas fases, retirando cuidadosamente la parte correspondiente a aquellas fases que representen mayor volumen; es entonces cuando se añade al sistema 0,05 ml. de la suspensión de células. Después de invertir unas 40-60 veces los tubos, con el fin de mezclar las partículas biológicas con los polímeros y sales, se dejan sedimentar durante 30 min..

Por último, se toma una alícuota de la fase superior (0,5 ml.) y se determina la concentración de hemoglobina para analizar en ella los resultados de la partición. Analizadas las concentraciones de hemoglobina en las distintas fases superiores, los resultados se expresan en tanto por ciento de partículas presentes en la fase superior, respecto del total de partículas añadidas (concentración de hemoglobina determinada en el tubo B).

Para la determinación de la influencia de la concentración de polímeros en eritrocitos a  $4^{\circ}\text{C}$  se realizó la partición en cámara fría.

#### 2.3.8.2.- Para la calibración del aparato de DCC.

Se pesa la cantidad teóricamente necesaria de soluciones madre de ambos polímeros, y después de diluir con tampón fosfato Na y agua hasta conseguir la concentración experimental deseada (5% de dextrano; 4% de polietilenglicol y 0,01 N de tampón fosfato Na), se

agita el sistema por inversión suave y repetida en embudo de decantación y se deja reposar (12-14 h.) a la temperatura que se realice el experimento de DCC, para facilitar la separación de las fases. Finalmente se recogen separadamente las fases, despreciando la interfase.

Una vez obtenidas las fases se llenan las cavidades inferior y superior del rotor (de la 1-59, con 0,79 de cada fase), manteniendo la relación de volúmenes igual a 1. En la cavidad 0, se pusieron 0,69 ml. de fase inferior mas 0,1 ml. de una solución de vitamina B (500 g), y, posteriormente, 0,79 ml. de fase superior. Una vez realizados los 60 giros, los resultados se expresan en D.O. a 525 nm.

Con el fin de determinar el coeficiente de partición K se determina la D.O. a 525 nm., en todas las cavidades, y en los tubos 25-35 se toman alícuotas de cada fase (superior e inferior) (0,05 ml. sobre 1,5 ml. de agua).

#### 2.3.8.3.- Para la separación de células por distribución en contracorriente.

Se pesan en embudo de decantación las cantidades necesarias de polímeros y sales para obtener un sistema bifásico de las siguientes concentraciones: 5% dextrano; 4% polietilenglicol; 0,03 ClNa y 0,09 TFNa. Dichas concentraciones fueron estudiadas en los experimentos de partición, y en estas condiciones la partición es del 50% - en ambas fases.

Una vez agitado convenientemente el sistema por inversión suave se deja reposar (12-24 h.) para facilitar la separación de las fases. Finalmente se recogen las fases y se elimina la interfase.

Se llenan las cavidades inferiores con 0,7 ml. de fase inferior y las cavidades superiores con 0,9 ml. de fase superior. La muestra, dependiendo de los distintos experimentos de distribución, se coloca en la cavidad 0 o en las cavidades 0, 1 y 2. Para la colocación de la muestra se realizó un "minisistema" con fase inferior

y muestra de tal manera que la relación es: 0,6 ml. de fase inferior y 0,1 ml. de muestra. Las células según los distintos experimentos se utilizan sin diluir o diluidas aproximadamente 1/2 con ClNa 0,15 M.

Una vez realizados los 60 giros, se recogen las 60 muestras sobre 1 ml. de agua o ClNa 0,15 M, determinándose el perfil de la distribución por medida de la concentración de Hb o lectura a 540 nm.

### 2.3.9.- MEDIDA DE LA RADIATIVIDAD.

La radiactividad de las muestras marcadas con  $^{59}\text{Fe}$ , emisor  $\gamma$ , se han medido en un detector de centello sólido, el cual va dotado de una escala J.E.N. Mod. E-17 con discriminadores de energía. El detector, constituido por un cristal de Ioduro Sódico activado con Talio, presenta geometría de pozo  $3\pi$ . La eficacia, determinada con patrones de  $^{137}\text{Cs}$ , es del 21%. Las muestras se midieron en un volumen final de 2,6 ml., y las medidas de radiactividad expresadas en c.p.m., fueron corregidas teniendo en cuenta la eficacia del aparato.

### 2.3.10.- VALORACION DE DATOS.

#### 2.3.10.1.- Cálculo de la significancia estadística por la distribución de Student.

Con objeto de verificar la significación de las diferencias obtenidas en la variación de las actividades enzimáticas en las distintas poblaciones estudiadas, se utilizó el test de la t de Student. La distribución de Student es una corrección de la distribución nor

mal de frecuencia, para pequeñas muestras (SPIEGEL, 1970). Con el cálculo de la *t* de Student para distintas probabilidades, evaluamos la mayor o menor probabilidad de que la diferencia de un resultado con otro sea o no estadísticamente significativa.

Se calcularon los límites de confianza a partir de los cuales la diferencia es: altamente significativa (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ), muy significativa (\*\*,  $p \leq 0,01$ ), significativa (\*,  $p \leq 0,05$ ) o casi significativa (0,  $p \leq 0,1$ ).

#### 2.3.10.2.- Ajuste de rectas por mínimos cuadrados.

El método de los mínimos cuadrados se utiliza para calcular curvas de ajuste cuando se dispone de una dispersión de puntos (SPIEGEL, 1970). En nuestro caso, representaciones de Lineveauer-Burk para cálculo de enzimas de velocidades máximas y constantes de Michaelis, así como la linealidad en la formación de 2,3-DPG.

**3.- RESULTADOS Y DISCUSION.**

### 3.1.- ACTIVIDADES DIFOSFOGLICERATOMUTASICA Y FOSFOGLICERATOQUINASICA EN LAS DIFERENTES POBLACIONES ERITROCITARIAS.

Una de las características del eritrocito, a diferencia de otras células, es la presencia de una alta concentración de 2,3-DPG ( $\approx 5$  mM). En este apartado se estudian parcialmente dos de las actividades enzimáticas, implicadas en el ciclo del 2,3-DPG, en las poblaciones celulares (precursores eritroideos, reticulocitos y eritrocitos). Los valores de actividad de dichas enzimas nos servirán como parámetros indicativos del proceso de diferenciación sufrido por la célula roja. Como etapa previa, y dado que el método de ensayo empleado para la difosfogliceratomutasa es una modificación y adaptación a la célula roja del método de JOYCE y GRISOLIA (1959) para músculo, se procede a un estudio crítico de las condiciones más idóneas y validez del mismo. Los resultados referentes a la falta de linealidad de formación respecto al tiempo del producto de la reacción (2,3-DPG), nos llevan a hacer una discusión de los métodos disponibles en la literatura para la determinación de dicha actividad.

En el caso de la difosfogliceratoquinasa la determinación de las actividades enzimáticas en las tres poblaciones eritrocitarias se ve complementado con unos ensayos encaminados a confirmar y/o establecer las constantes cinéticas fundamentales ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) de dicha enzima frente al 3-PG utilizado, en el método de determinación, como sustrato de la reacción.

#### 3.1.1.- DISCUSION DEL METODO DE ENSAYO EMPLEADO PARA LA DIFOSFOGLICERATOMUTASA.

El método de ensayo para la determinación de la actividad difosfogliceratomutásica se basa en la transformación del 3-PG en 1,3-DPG y éste en 2,3-DPG, mediante el acoplamiento de la fosfogliceratoquinasa y la difosfogliceratomutasa con medida posterior del

incremento producido de 2,3-DPG. (JOYCE y GRISOLIA, 1959) este método fué aplicado por primera vez en nuestro laboratorio a eritrocitos humanos (RONCALES, 1978). En aquel trabajo se intentaba calcular la actividad por el descenso de 3-PG producido en lugar de por el aumento de 2,3-DPG formado. Con el fin de simplificar el método, para la valoración del 3-PG se hizo uso de un procedimiento colorimétrico no enzimático de gran sencillez y economía (método del ácido cromotrópico de BARTLETT, 1959). Posteriormente (RONCALES, 1978) se calculó la actividad difosfogliceratomutásica determinando simultáneamente tanto el sustrato (3-PG) como el producto (2,3-DPG) por métodos enzimáticos más complejos pero al mismo tiempo más sensibles que el del ácido cromotrópico. Estos últimos resultados mostraron que no existe correspondencia entre los valores de actividad calculados por el descenso de 3-PG y por la producción de 2,3-DPG: la disminución de 3-PG es superior a la producción de 2,3-DPG a todos los tiempos estudiados (0; 5; 10 y 30 min.); ello hizo suponer que el 3-PG no es transformado exclusivamente en 2,3-DPG durante la incubación, sino que una parte significativa del mismo se degrada vía 2-PG. De estos resultados pudo concluirse:

- a) que la medida de la actividad difosfogliceratomutásica debe hacerse por valoración del 2,3-DPG formado y no por la de 3-PG consumido.
- b) quedó descartada la posibilidad de utilizar el método del ácido cromotrópico para la medida del 2,3-DPG producido, ya que la presencia de altas concentraciones de 3-PG, añadidas como sustrato de la reacción quinásica, no permiten valorar el 2,3-DPG adecuadamente.
- c) que la formación de 2,3-DPG observada durante la incubación de eritrocitos humanos no es lineal a partir de los primeros 5 min. y en consecuencia, las actividades enzimáticas calculadas a partir de dicho momento (concretamente a los 5; 10; 15 y 30 min.) son diferentes entre sí (0,44; 0,32; 0,26 y 0,19  $\mu$ moles 2,3-DPG formado/min/ $\mu$ mol Hb respectivamente) (RONCALES, 1978). Sin embargo es importante destacar aquí que los valores de actividad encontrados a los 10 y 15 min. de incubación (0,32 y 0,26, respectivamente) coinciden con los encontrados por otros autores para eritrocitos humanos (0,24-0,33) empleando técnicas (TORRANCE, 1974; ROSE, 1975; SASAKI

y col., 1975) basadas todas ellas en la de RAPOPORT y LUEBERING (1952), que son de uso general y rutinario en la determinación de la actividad difosfogliceratomutásica. Estos datos a los 10 y 15 min. nos servirán como punto de partida para la discusión de los resultados presentados a continuación.

3.1.1.1.- Formación de producto (2,3-DPG) respecto al tiempo, y efecto del 2,3-DPG presente sobre la actividad enzimática en eritrocitos y reticulocitos.

Dada la falta de linealidad de formación de 2,3-DPG en la de terminación enzimática de la difosfogliceratomutasa (a partir de los 5 primeros minutos de incubación) y puesto que en esta Tesis es importante evaluar dicha actividad a lo largo del proceso de diferenciación del eritrocito, se decidió confirmar dicha falta de linealidad, de modo sistemático, en las tres poblaciones celulares. Puesto que las células eritroideas, como veremos posteriormente, carecen de actividad mutásica, solo se presentan en este apartado los datos referentes a eritrocitos y reticulocitos.

En el caso de los eritrocitos se realizó en primer lugar, un estudio del efecto de la concentración proteica sobre la curva de aparición de 2,3-DPG respecto al tiempo. Para ello se utilizaron cinco hemolizados con concentraciones diferentes de hemoglobina (0,06; 0,12; 0,18; 0,37 y 0,6 mM). Los hemolizados obtenidos, como se indica en 2.3.1., se incubaron en la mezcla de reacción (2.3.3.1.), obteniendo se alícuotas a los 0,5; 2,5; 4 y 15 min. de incubación. Una vez desproteinizadas y neutralizadas se determinó el 2,3-DPG (2.3.2.). Los resultados obtenidos, a cualquiera de las distintas concentraciones proteicas, muestran que la formación de 2,3-DPG es lineal en los primeros 4 min. y que por el contrario deja de serlo a partir de este momento. Los valores de actividad calculados entre los 0,5 y 4 min. de incubación (1,88; 2,2; 2,0; 2,0 y 1,6  $\mu\text{moles 2,3-DPG/min}/\mu\text{mol Hb}$ ) son practicamente idénticos. (tabla nº 2)

**TABLA Nº 2.- EFECTO DE LA CONCENTRACION PROTEICA SOBRE LA FORMACION DE 2,3-DPG.**

Concentración proteica (mM Hb)	Actividad enzimática en los primeros 4 min.
0,06	1,88 <sub>n = 3</sub>
0,12	2,20 <sub>n = 3</sub>
0,18	2,00 <sub>n = 3</sub>
0,37	2,00 <sub>n = 3</sub>
0,60	1,60 <sub>n = 3</sub>

Valores de actividad expresados en  $\mu$ moles de 2,3-DPG/min/ $\mu$ mol Hb.

n, nº de experimentos.

Se concluye así que la formación de 2,3-DPG en los primeros 4 min. y, en definitiva, la actividad enzimática, es independiente de las distintas concentraciones hemoglobínicas utilizadas.

Para el estudio de la formación de 2,3-DPG respecto al tiempo, que se hace a continuación, los hemolizados correspondientes (concentración de hemoglobina  $0,12 \pm 0,013$  para eritrocitos y

$0,12 \pm 0,011$  para reticulocitos), se incubaron en la mezcla de reacción

(2.3.3.1.), de la que se obtuvieron alícuotas a los 0,5; 1,5; 2,5; 4; 10 y 15 min.. Los resultados, expresados en  $\mu$ moles de 2,3-DPG formados/min/ $\mu$ mol Hb se representan en la fig. 5 para eritrocitos, y fig. 6 para reticulocitos. En ambos casos se observa que la formación de 2,3-DPG solo es lineal en los primeros 4 min. de incubación.

Además, para demostrar que la pérdida de linealidad a partir

de los 4 min. se debe al acúmulo de 2,3-DPG, tanto en eritrocitos como en reticulocitos se realizó un segundo experimento en el que la cantidad de 2,3-DPG presente en la mezcla de reacción, antes de comenzar la incubación, era igual a la alcanzada en el experimento anterior a los 4 min. de incubación (concretamente en el caso de eritrocitos 10  $\mu$ moles de 2,3-DPG/ $\mu$ mol Hb, ver fig. 5, y en el de reticulocitos, 6  $\mu$ moles de 2,3-DPG/ $\mu$ mol Hb, fig. 6). Después de tomar alícuotas a los 0,5; 1,5; 2,5; 4; 10 y 15 min. se calcula la actividad enzimática y se expresan los resultados en las mismas figuras 5 y 6. La ausencia de linealidad desde el comienzo de esta incubación nos lleva a confirmar nuestros propios datos y a concluir, de acuerdo con ROSE (1970), que es el 2,3-DPG, producto de la reacción, el que inhibe la actividad difosfogliceratomutásica.

Esta falta de linealidad es un dato a tener en cuenta en este y cualquier otro estudio de la actividad difosfogliceratomutásica. Como ya se dijo en la introducción a este apartado (3.1.1.) los valores de actividad difosfogliceratomutásica para eritrocitos humanos encontrados a los 10 y 15 min. de incubación (0,32 y 0,26  $\mu$ moles 2,3-DPG/min/ $\mu$ mol Hb) coinciden con los encontrados por otros autores (0,24-0,33) empleando diferentes métodos enzimáticos, basados igualmente en la producción de 2,3-DPG (TORRANCE, 1974; ROSE, 1975; SASAKI y col., 1975). Sin embargo es sorprendente que en dichos trabajos se utilicen tiempos de incubación superiores a los 5 min. (variables generalmente entre 10 y 20 min.) sin que previamente haya sido demostrado en cada caso la linealidad o no linealidad de formación del 2,3-DPG; mas aún, cuando el único estudio realizado en este sentido es, el del trabajo original de RAPOPORT y LUEBERING (1952), en el que se demuestra claramente la linealidad hasta los 3-5 min.; siendo este trabajo el que sirvió de base a los mencionados autores para la aplicación de los distintos métodos enzimáticos utilizados por ellos. La circunstancia de que los datos de estos autores (0,24-0,33) coinciden con los encontrados en nuestro laboratorio para 10-15 min. de incubación en los que ya no es lineal la formación del fosfato, nos lleva a dudar de aquellos u otros resultados que hayan sido obtenidos con métodos en donde no se haya comprobado previamente la linealidad de formación de 2,3-DPG. Ello, apoya, al mismo tiem-

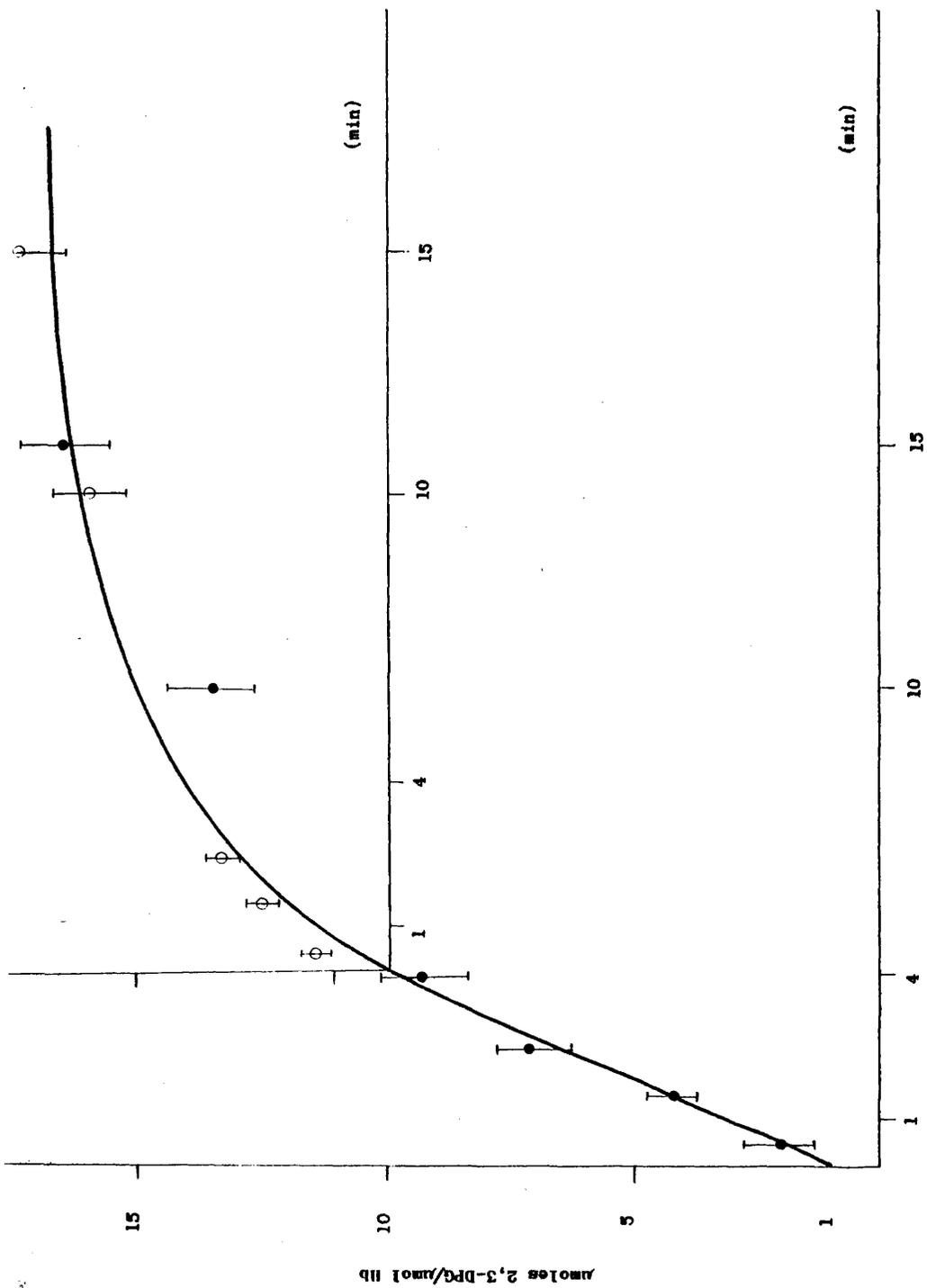


Fig. 5.- LINEARIDAD DE FORMACION DEL 2,3-DPG, Y EFECTO DEL MISMO SOBRE LA ACTIVIDAD DIFOSFOGLICERATOMUTASICA EN ERITROCITOS.

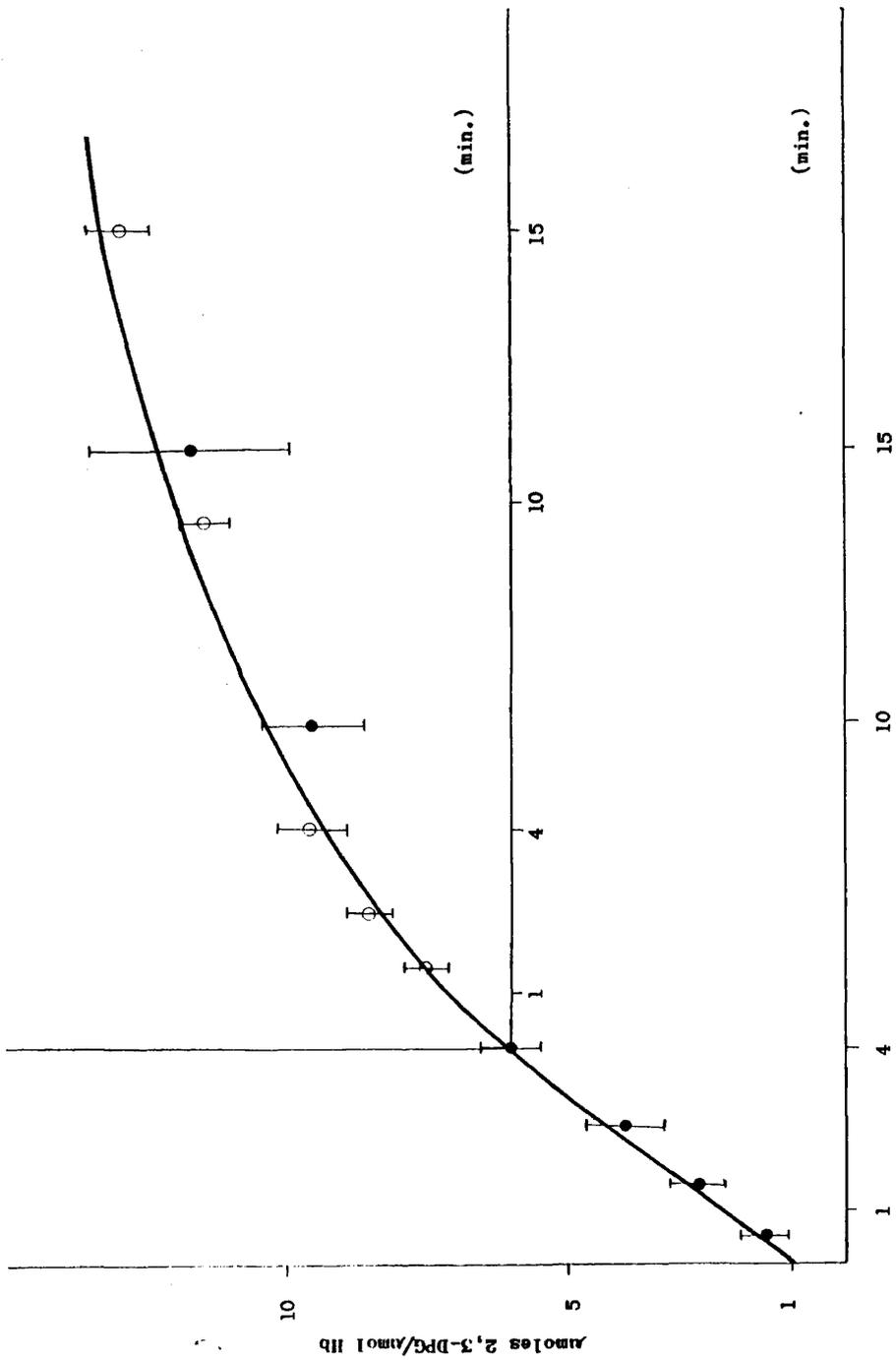


Fig. 6.- LINEARIDAD DE FORMACION DEL 2,3-DPG, Y EFECTO DEL MISMO SOBRE LA ACTIVIDAD DIFOSFOGLICERATOMUTASICA EN RETICULOCITOS.

po, la validez del procedimiento aquí descrito, y lleva a la conclusión de que los valores de actividad que pueden calcularse a partir de la fase lineal de formación del 2,3-DPG (fig. 5 y 6) son los únicos realmente válidos. Este será, por tanto, el criterio de medida de la actividad mutásica adoptada en esta Tesis.

### 3.1.1.2.- Variaciones de la actividad difosfogliceratomutásica en eritrocitos, reticulocitos y células eritroideas.

Una vez confirmada la existencia de la fase inicial lineal (hasta los 4 min.), tanto en eritrocitos como en reticulocitos de rata, se procedió a la determinación de la actividad difosfoglicera tomutásica, de modo estadístico, en estas células así como en precursores eritroideos. Los hemolizados correspondientes, obtenidos como se describe en 2.3.1., se incubaron en la mezcla de reacción (2.3.3.1.). Se tomaron alícuotas a los 0,5 y 4 min. de incubación y, previa desproteínización y neutralización, la actividad enzimática se calculó por el incremento de 2,3-DPG (2.3.2.). Los resultados de actividad enzimática específica (tabla nº 3) se expresan tanto en función de la concentración de hemoglobina como en función de la proteína total. Ello permite comparar valores de actividad enzimática específica en células en las que la proporción Hb/proteína pueda ser diferente.

Como puede observarse (tabla nº 3), no se detecta actividad difosfogliceratomutásica en células eritroideas. La actividad enzimática específica de reticulocitos supone, aproximadamente, un 60% de la encontrada en eritrocitos.

Es importante destacar este aumento de la actividad enzimática específica desde células eritroideas a eritrocitos por su posible significado. Puede ser una consecuencia del proceso de diferenciación eritrocitaria; ya que parece lógico que la especialización de estas células en la producción de 2,3-DPG, venga acompañada por un incremento de la actividad enzimática encargada de sintetizarlo. Las cé-

TABLA Nº 3.- VALORES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN ERITROCITOS, RETICULOCITOS Y CELULAS ERITROIDEAS.

	Actividad enzimática específica	
	$\mu\text{moles 2,3-DPG/min/}$ $\mu\text{mol Hb}$	$\mu\text{moles 2,3-DPG/min/mg}$ $\text{proteína.}$
Eritrocitos	$2,25 \pm 0,05$ *** n = 8	$0,03 \pm 0,004$ *** n = 8
Reticulocitos	$1,29 \pm 0,02$ n = 8	$0,015 \pm 0,025$ n = 8
Células Eritroideas	no se detecta	no se detecta

Los datos expresan:  $\bar{x} \pm$  D.S.; n, nº de experimentos;

\*\*\*  $p \leq 0,001$ .

lulas precursoras carecen de la enzima y, posiblemente ésta se sintetiza en alguna de las etapas intermedias de la eritropoyesis. Este punto es el que nos llevó, entre otros datos, a pensar en la necesidad de medir esta actividad en el mayor número posible de tipos celulares intermedios entre la célula progenitora y el eritrocito maduro, y en la necesidad, por tanto, de contar con un método eficaz de separación de tales tipos celulares. El hecho de la ausencia de actividad en la población que llamamos "células eritroideas" (que incluye un conjunto indefinido todavía de precursores), hace pensar en que la síntesis de la enzima pudiera producirse en las últimas etapas de la diferenciación y/o comienzo de la maduración (1.1.). Si esto es así, parece ser interesante medir la actividad en células eritrocitarias y sobre todo, reticulocitarias, sometidas al procedimiento de separación por DCC.

3.1.1.3.- Niveles de 2,3-DPG en eritrocitos, reticulocitos y células eritroideas.

La medida de la actividad mutásica debe venir acompañada evidentemente, de la determinación de los niveles intracelulares de 2,3-DPG en las tres poblaciones celulares. Para ello, previa obtención de las células (2.3.1.), se aplica el método descrito en 2.3.2.. Después de determinar hemoglobina en alícuotas de las mismas muestras (2.3.4.) se expresan los resultados ( $\bar{x} \pm$  D.S.; n, nº de experimentos) en  $\mu$ moles de 2,3-DPG presentes/ $\mu$ mol Hb.

Eritrocitos	$1,15 \pm 0,15$ n = 12
Reticulocitos	$1,06 \pm 0,15$ n = 10
Células Eritroideas	no se detecta.

Estos datos están de acuerdo con los del apartado anterior sobre aumento de la actividad mutásica con la diferenciación y/o maduración. Ambos parecen ser una consecuencia lógica del proceso de especialización del eritrocito maduro en la formación del 2,3-DPG. Al mismo tiempo hemos de resaltar que los valores de concentración de hemoglobina obtenidos para eritrocitos ( $4,93 \pm 0,40$ ) son prácticamente iguales a los de reticulocitos ( $4,40 \pm 0,03$ ); y que ambos difieren notablemente con los calculados para células eritroideas (1,07 n = 3). Parece lógico pensar que, puesto que las células observadas en las preparaciones celulares al microscopio óptico (2.2.5.) son: proeritroblasto y eritroblasto basófilo, policromatófilo y ortocromático, y, dado que a partir del eritroblasto ortocromático es cuando la síntesis de hemoglobina aumenta rápidamente hasta el reticulocito DENTON y col. (1975), los valores de hemoglobina obtenidos por noso

tros para células eritroideas sean considerablemente inferiores a los de eritrocitos y reticulocitos, y que estos dos tipos de células posean esencialmente la misma concentración de dicha proteína.

### 3.1.2.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOSFOGLICERATOQUINASICA EN ERITROCITOS, RETICULOCITOS Y CELULAS ERITROIDEAS.

Nuestro interes en el estudio de esta enzima radica en el hecho de ser la única implicada al mismo tiempo en la glicolisis y en el ciclo del 2,3-DPG. Hoy en día se encuentra bien establecido que el mantenimiento de un nivel constante de 2,3-DPG es debido prioritariamente al balance entre las actividades difosfoglicerato-mutásica y fosfogliceratoquinásica (RAPOPORT, 1968-1970), según se describió en 1.2.3.. Por otro lado, en nuestro laboratorio se viene realizando un estudio paralelo de otras quinasas de la glicolisis HK: (RONCALES y LUQUE, 1977; RONCALES, 1978) PFK: (PINILLA y LUQUE, 1977; LUQUE y col. 1977) y PK: (PINILLA y LUQUE sin publicar). Parecía adecuado por tanto, establecer en esta Tesis, de forma comparativa, las constantes cinéticas fundamentales ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) de la fosfogliceratoquinasa, que hasta ahora no han sido estudiadas en relación con los procesos de diferenciación y maduración del eritrocito. Por otro lado, dado el papel inhibitor del 2,3-DPG, sobre la actividad de esta enzima (ALI y BROWNSTONE, 1976 b), y, puesto que las "células eritroideas" (a diferencia de eritrocitos y reticulocitos) no contienen 2,3-DPG (3.1.1.3.); dicho metabolito puede condicionar una diferente regulación de la glicolisis a nivel de la fosfogliceratoquinasa en las distintas células de la eritropoyesis.

#### 3.1.2.1.- Efecto de la concentración del sustrato (3-PG): $K_m$ y $V_{max}$ .

La dificultad de conseguir 1,3-DPG, junto con su gran labili

dad, impide realizar la determinación de la actividad fosfoglicera-  
toquinásica utilizando 1,3-DPG como sustrato, por lo tanto, la reac-  
ción enzimática se mide en el sentido



En alícuotas (0,01 ml.) del hemolizado de eritrocitos obtenidos según se describe en 2.3.1. y después de haber sido dializado frente a Tris-ClH 50 mM, pH = 7,5, durante 24 horas con el fin de eliminar los metabolitos presentes; se emplea el método descrito en 2.3.2.2., con concentraciones crecientes de 3-PG (0,05-15 mM).

En la fig. 7 se recogen los resultados de actividad enzimática específica, expresados en umoles de 3-PG degradados/min/mg proteína, para las diferentes concentraciones de 3-PG empleado (curva de saturación del sustrato), así como la representación de los inversos. La recta, ajustada por el método de mínimos cuadrados (2.3.10.2.) nos proporciona las constantes cinéticas expresadas en la tabla nº 4.

Para los reticulocitos y células eritroideas se siguió el mismo procedimiento que para los eritrocitos. Los valores experimentales se representan en las figuras 8 y 9, respectivamente, y las constantes cinéticas en la tabla nº 4.

**TABLA Nº 4.- CONSTANTES CINÉTICAS PARA LA FOSFOGLICERATOQUINASA DE ERITROCITOS, RETICULOCITOS Y CELULAS ERITROIDEAS.**

	Vmax, umoles 3-PG/min/mg proteína	Km(3-PG), mM
Eritrocitos	1,04	0,24
Reticulocitos	0,24	0,15
C. Eritroideas	0,20	0,38

Obsérvese que los valores de  $K_m$  para el 3-PG son del mismo orden de magnitud en los tres tipos celulares (0,15 a 0,38 mM) y, en general, coinciden con los resultados encontrados por YOSHIDA (1975) para la enzima purificada de eritrocitos humanos (0,37 mM). Puede sugerirse, por tanto, que en las tres poblaciones celulares existe la misma especie molecular. La existencia de una sola isoenzima en eritrocitos humanos fué sugerida por BEUTLER (1969) y purificada y caracterizada posteriormente por SCOPES (1973). Es evidente a partir de dichos datos, la baja afinidad del enzima por el 3-PG, que contrasta con la elevada actividad de la misma por el 1,3-DPG, ( $K_m = 1 \mu M$ ), en sentido inverso. (ALI y BROWNSTONE, 1976 b).

Lo más significativo, por el contrario, son los datos de  $V_{max}$ . En eritrocitos la  $V_{max}$  es unas cinco veces superior que en reticulocitos y células eritroideas. Ello parece indicar, a falta de confirmación posterior, un incremento en la cantidad de enzima en la fase de maduración del reticulocito a eritrocito, una vez superada la etapa de diferenciación.

### 3.1.2.2.- Variaciones de la actividad fosfogliceratoquinásica en eritrocitos, reticulocitos y células eritroideas.

Una vez establecidas las constantes cinéticas se paso a determinar de modo estadístico el valor medio de actividad, a concentraciones saturantes de sustrato (10 mM), según se describe en 2.3.3.2.. Los resultados aparecen en la tabla nº 5.

Obsérvese que el valor máximo de actividad enzimática específica, expresada tanto en hemoglobina como en proteína total, es unas cinco veces superior en eritrocitos que en reticulocitos; y que dicho valor de actividad enzimática específica coincide con los encontrados en eritrocitos humanos por ALI y BROWNSTONE (1976 a). En las células eritroideas la actividad enzimática específica es igual a la del reticulocito. En este caso, la actividad enzimática específica solo puede ser expresada respecto a proteína total, ya que no hay coinci

TABLA Nº 5.- VALORES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN ERITROCITOS, RETICULOCITOS Y CELULAS ERITROIDEAS.

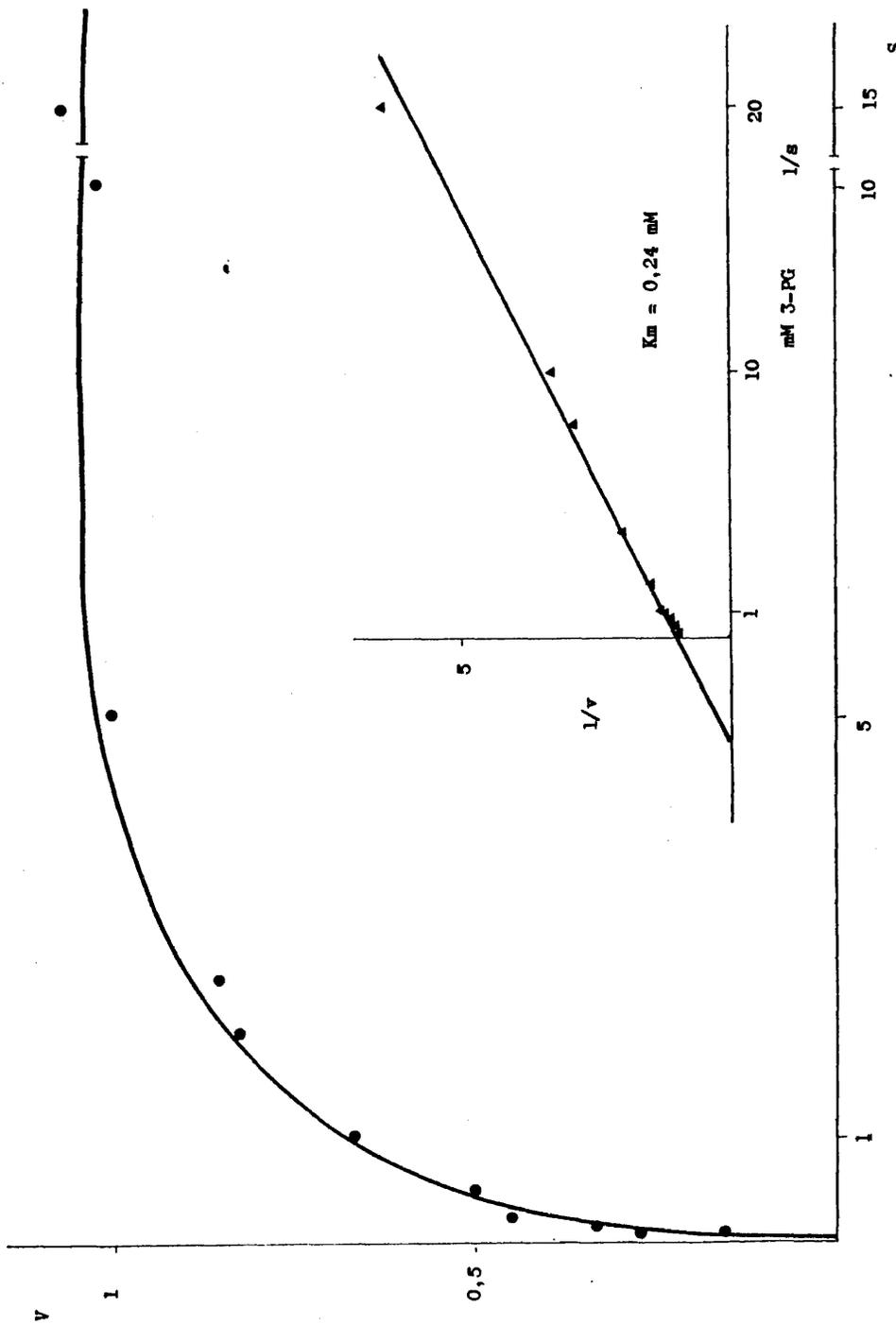
	Actividad enzimática específica	
	$\mu\text{moles 3-PG/min}/\mu\text{moles Hb}$	$\mu\text{moles 3-PG/min}/\text{mg proteína.}$
Eritrocitos	$91,80 \pm 6,15$ *** n = 10	$1,02 \pm 0,03$ *** n = 10
Reticulocitos	$21,20 \pm 1,52$ n = 10	$0,23 \pm 0,03$ n = 10
C. Eritroideas	_____	$0,20 \pm 0,04$ n = 8

Los datos se expresan:  $\bar{X} \pm$  D.S.; n, indica el número de experimentos; \*\*\*  $p < 0,001$ .

dencia (a diferencia de eritrocitos y reticulocitos) entre concentración de hemoglobina y de proteína. Estos datos no coinciden con los observados para el caso de la difosfogliceratomutasa, tabla nº 3 (3.1.1.2.), en que el aumento de la actividad enzimática desde células eritroideas a reticulocitos podría ser consecuencia de la especialización celular en la formación de 2,3-DPG. Aquí, la no variación de actividad quinásica durante esta etapa (tabla nº 5) puede ser un índice de que las células eritroideas contienen desde sus comienzos las enzimas glicolíticas. Parece lógico que la especialización en la producción de 2,3-DPG sea posterior a la aparición de actividad glicolítica.

En cuanto al significado bioquímico del aumento en actividad quinásica observado en el paso de reticulocitos a eritrocitos, no existe una explicación clara. Parece ser contrario al proceso normal de disminución de actividades enzimáticas que se observa durante el

envejecimiento, sólo puede sugerirse que este incremento sea una consecuencia de la alta capacidad de la enzima en la producción de ATP. Recordemos a estos efectos que el eritrocito, a diferencia del reticulocito, depende exclusivamente de la vía glicolítica anaerobia, para la producción de ATP (RAPOPORT, 1974).



● media de 3.      ▲ Fig. 7.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO (3 PG) SOBRE LA ACTIVIDAD  
 FOSFOGLICERATOQUINASICA EN ERITROCITOS (CALCULO DE  $K_m$ ).

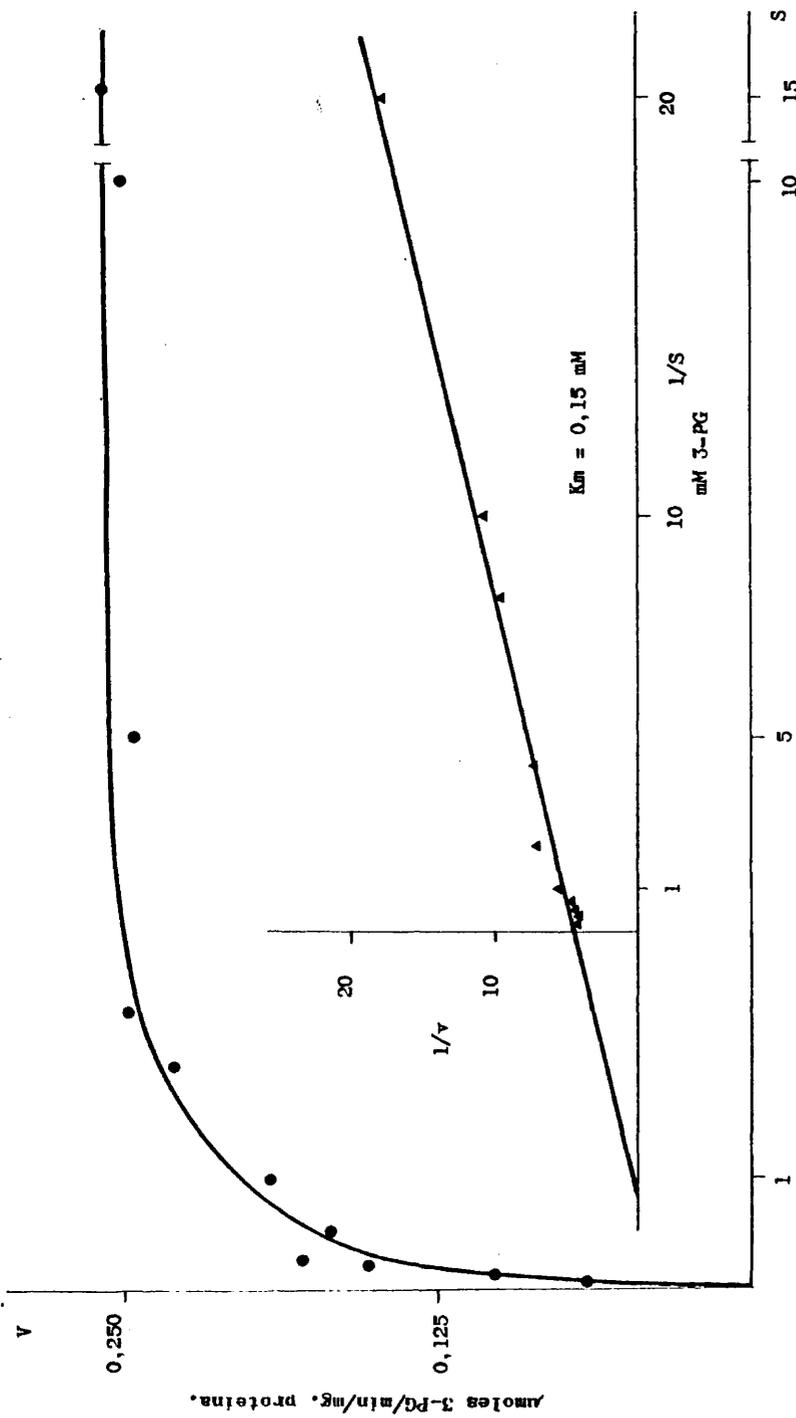
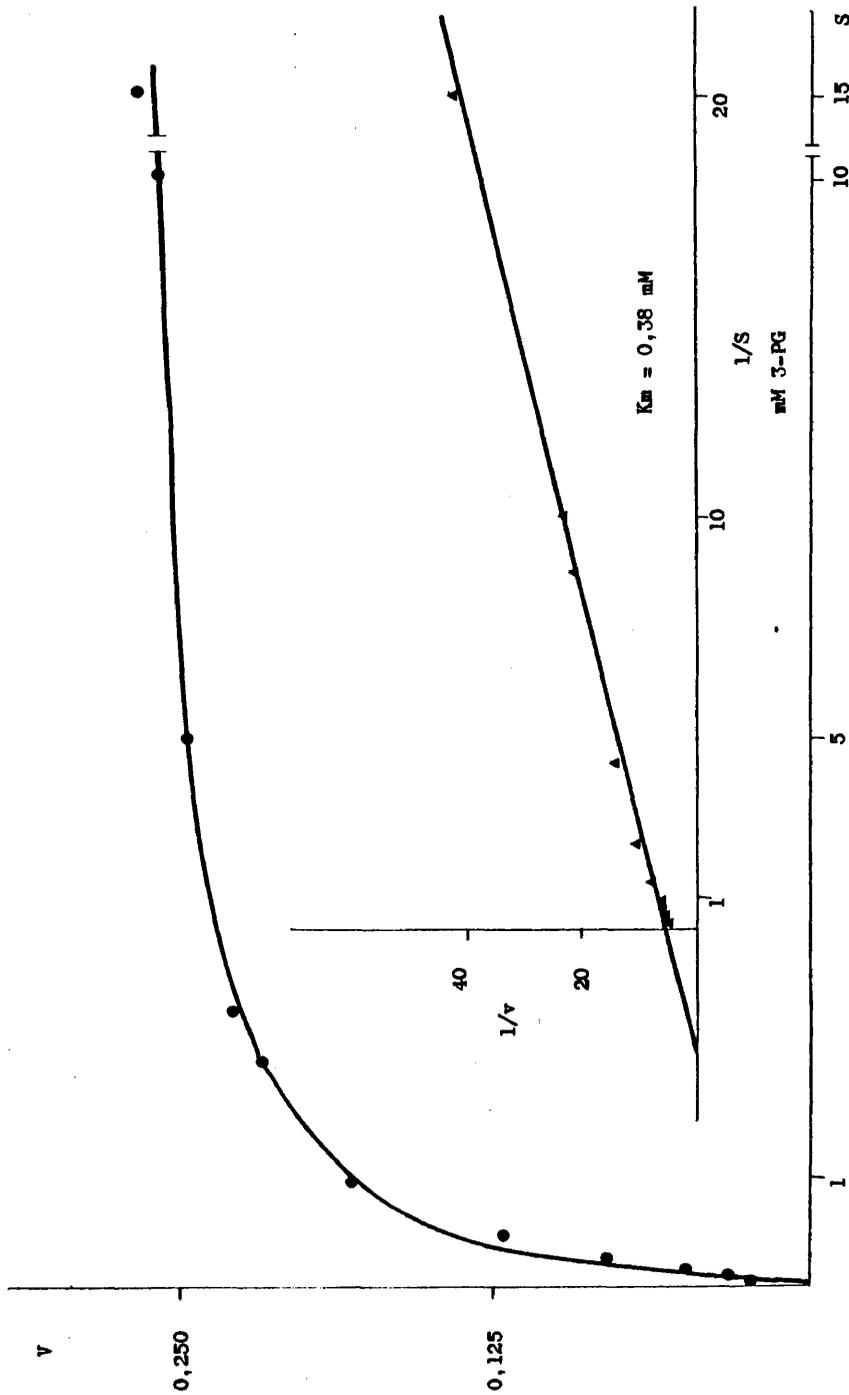


Fig. 8.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO(3-PG) SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOGLICERATOQUINASICA EN RETICULOCITOS. CALCULO DE  $K_m$ .

media de 3.



media de 3. Fig. 9.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO (3-PG) SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOGLICERATOQUINASICA EN "CELULAS ERITROIDES". CALCULO DE  $K_m$ .

### 3.2.- PROCEDIMIENTO Y CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA SEPARACION DE CELULAS POR DISTRIBUCION EN CONTRACORRIENTE (DCC).

#### 3.2.1.- DETERMINACION PREVIA DE LAS CONSTANTES DE PARTICION EN ERITROCITOS Y RETICULOCITOS. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE POLIMEROS, SALES Y TEMPERATURA.

En el primer conjunto de experimentos se trata de determinar las concentraciones adecuadas de polímeros y sales para una eficaz partición de eritrocitos y reticulocitos de rata, así como el efecto que la temperatura tiene sobre dichas particiones. El establecimiento de las condiciones experimentales óptimas para la obtención de un grado de partición cercano al 50% (40-60), es cuestión previa y fundamental a la aplicación del procedimiento de distribución en contracorriente (3.3.) para la separación de las células.

En primer lugar se estudia la influencia de concentraciones variables de polímeros (dextrano y polietilenglicol) sobre la partición de eritrocitos, a concentraciones fijas de sales (0,03 M de ClNa y 0,09 M de TFNa), a dos temperaturas distintas (4 °C y 25 °C). Para ello se utilizan suspensiones de eritrocitos preñados según se describe en 2.2.1. y soluciones patrón de polímeros (2.3.8.1.). El protocolo experimental es el descrito en 2.3.8.1. (1). En la fig. 10 se observa como la partición disminuye a medida que aumenta la razón de concentraciones dextrano/polietilenglicol, desde 4/3 a 7/6 y como esta disminución es muy marcada en la razón correspondiente a 5/4. En esta zona se obtienen grados de partición entre 50-60%. Esto implica, que cuanto mas nos alejamos del "punto critico" (fig. 1, 1.3.2.) al pasar de una razón 4/3 a otra 7/6, mayor cantidad de células abandonan la fase superior (polietilenglicol) y se adsorben en la interfase (dextrano).

En cuanto al efecto de la temperatura, y como puede verse igualmente en la fig. 10, su disminución desde 25 °C a 4 °C, produce un desplazamiento hacia la izquierda en la partición, a cualquier con

centración de polímeros ensayados. Todo ello de acuerdo con el desarrollo teórico que se hizo en la partición (1.3.1.). Sin embargo, esta variación no es significativa para las dos temperaturas aquí estudiadas. Concretamente, el valor  $K = 41\%$  correspondiente a  $4^{\circ}\text{C}$  no es demasiado diferente del valor  $K = 65\%$  obtenido a  $20^{\circ}\text{C}$ . Este dato es de interés pues indica que puede utilizarse el mismo sistema bifásico para la separación de eritrocitos bajo las mismas condiciones experimentales, en cámara fría ( $4^{\circ}\text{C}$ ) o a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\text{C}$ ).

Dado que el coeficiente de partición  $K$ , se expresa por el tanto por ciento de células existentes en la fase superior (respecto al total de células añadidas) y que una partición se define como óptima, cuando  $K$  alcanza valores cercanos al 50-60%, puede concluirse a partir de la fig. 10 que para las dos temperaturas estudiadas la concentración de polímeros más apropiada es: 5% dextrano y 4% polietilenglicol. Queda así establecida, la concentración óptima de polímeros para la partición.

Para el estudio de la fuerza iónica, la partición se realizó de acuerdo con los protocolos descritos en 2.3.8.1. (2) y (3). Las células se prepararon según se describe en 2.2.1. y 2.2.2.. Tanto para eritrocitos (fig. 11) como para reticulocitos (fig. 12), se realizan los experimentos a dos concentraciones de polímeros: 5% dextrano-4% polietilenglicol, y 4% dextrano-4% polietilenglicol. Los sistemas contienen cantidades crecientes de  $\text{ClNa}$  (hasta 0,15 M) y decrecientes de tampón fosfato  $\text{pH} = 6,8$  (desde 0,11 M). La proporción en que fueron añadidas ambas sales a cada uno de los sistemas ensayados, permite mantener la isotonicidad del medio y evitar, por tanto, la hemólisis celular.

Como puede verse en las figs. 11 y 12 la partición solo tiene lugar en los sistemas constituidos por dextrano (5%) y polietilenglicol (4%) y disminuye a medida que aumenta la concentración de  $\text{ClNa}$  respecto a la de tampón fosfato. Se puede observar que la concentración iónica más adecuada, es decir la correspondiente al 50%-60% de partición es la constituida por  $\text{ClNa}$  0,03 M y tampón fosfato 0,09 M. Concretamente el valor de partición encontrado para esta proporción de sales es del 65% para eritrocitos y del 58% para reticulocitos, de

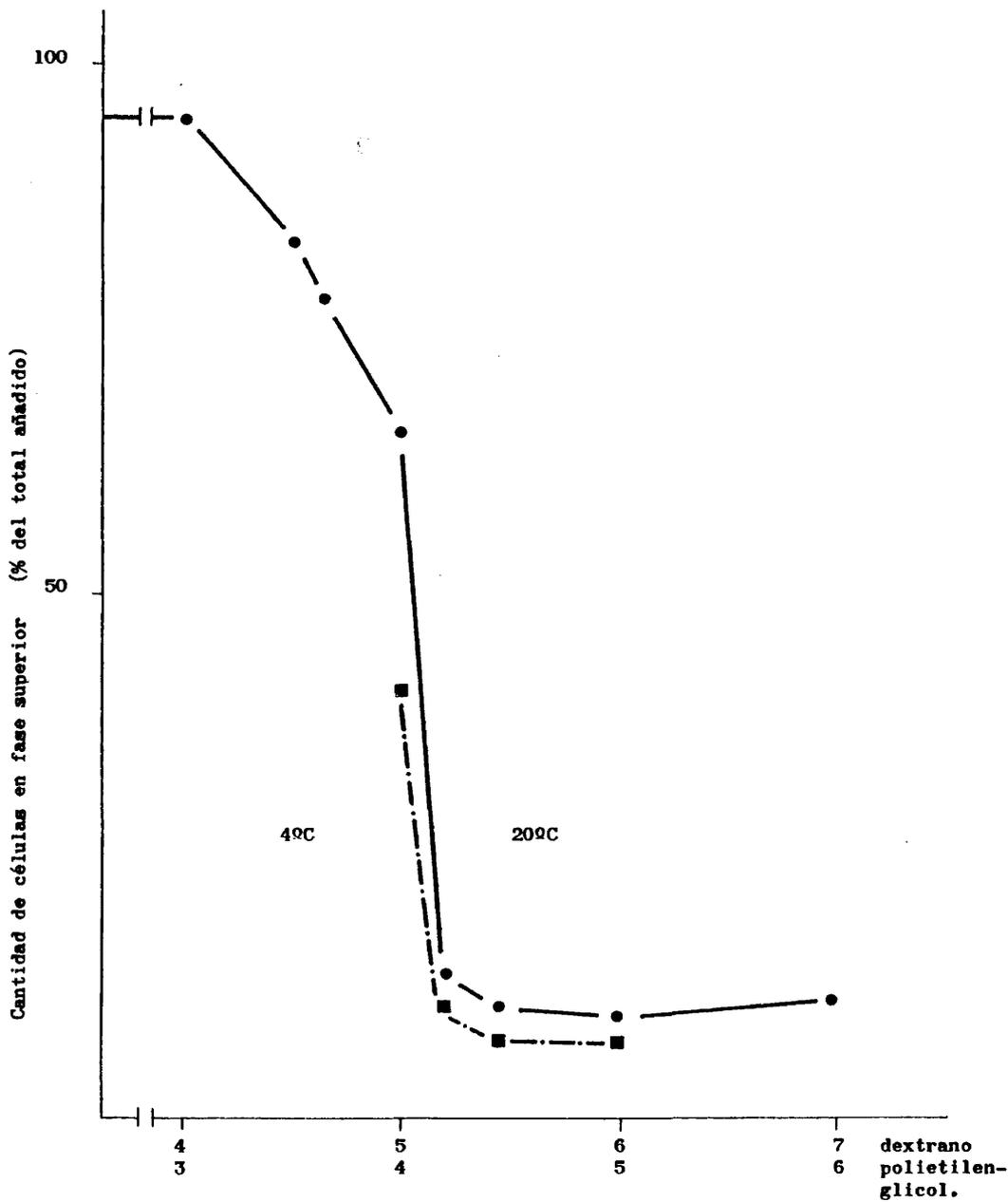


Fig. 10.- INFLUENCIA, SOBRE LA PARTICION DE ERITROCITOS, DE LA  $t_0$  (40°C y 20°C) y CONCENTRACION DE POLIMEROS DE UN SISTEMA BIFASICO CONSTITUIDO POR CANTIDADES VARIABLES DE DEXTRANO (4% a 7%) y POLIETILENGLICOL (3% a 6%) y CONCENTRACIONES FIJAS DE  $ClNa$  (0,03 M) y TAMPON FOSFATOS (0,09 M) pH = 6,8.

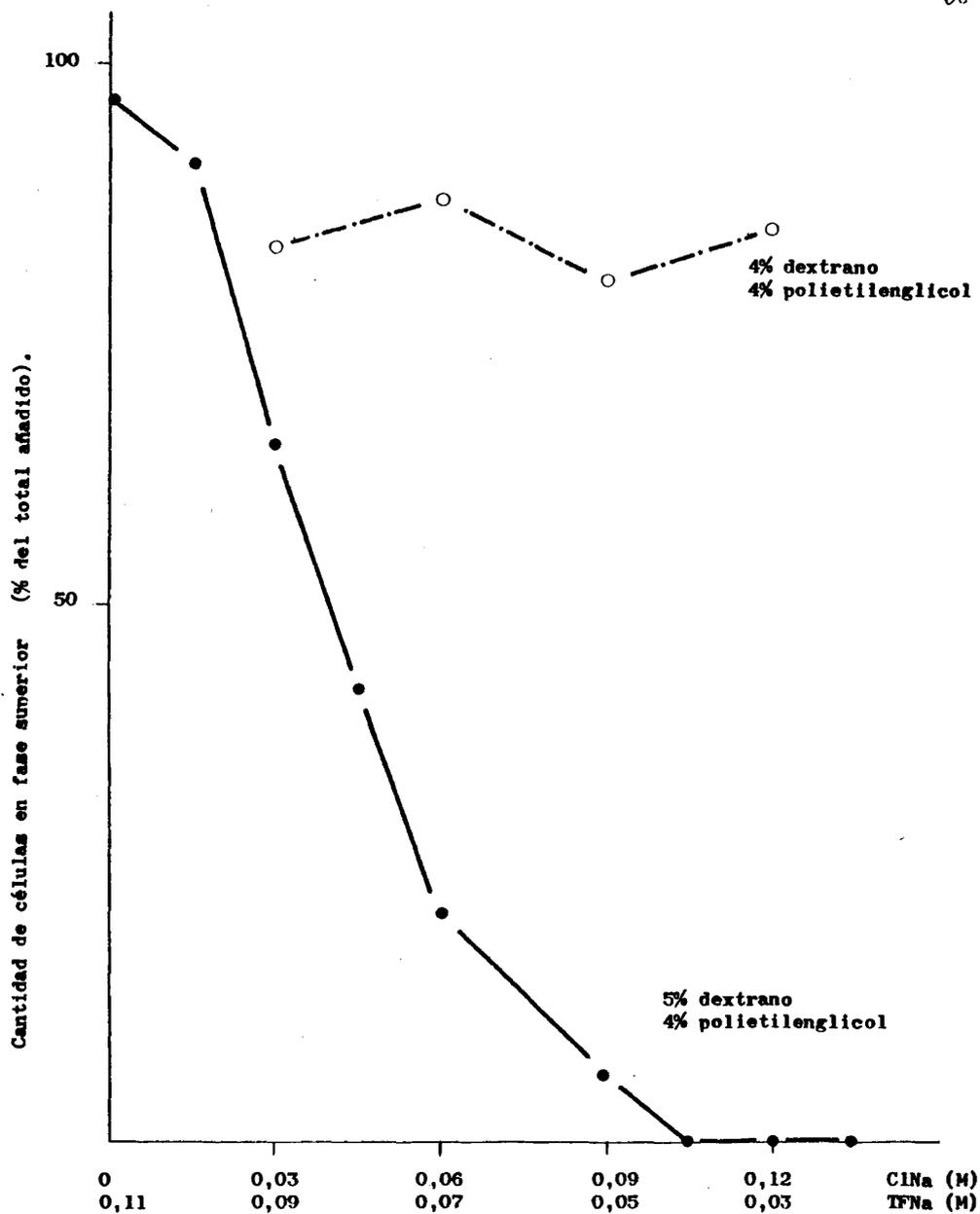


Fig. 11.- INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA (CONCENTRACIONES VARIABLES DE CINa y TAMPON FOSFATOS) SOBRE LA PARTICION DE ERITROCITOS EN UN SISTEMA BIFASICO CONSTITUIDO POR DEXTRANO (4% ó 5%) y POLIETILENGLICOL (4%).

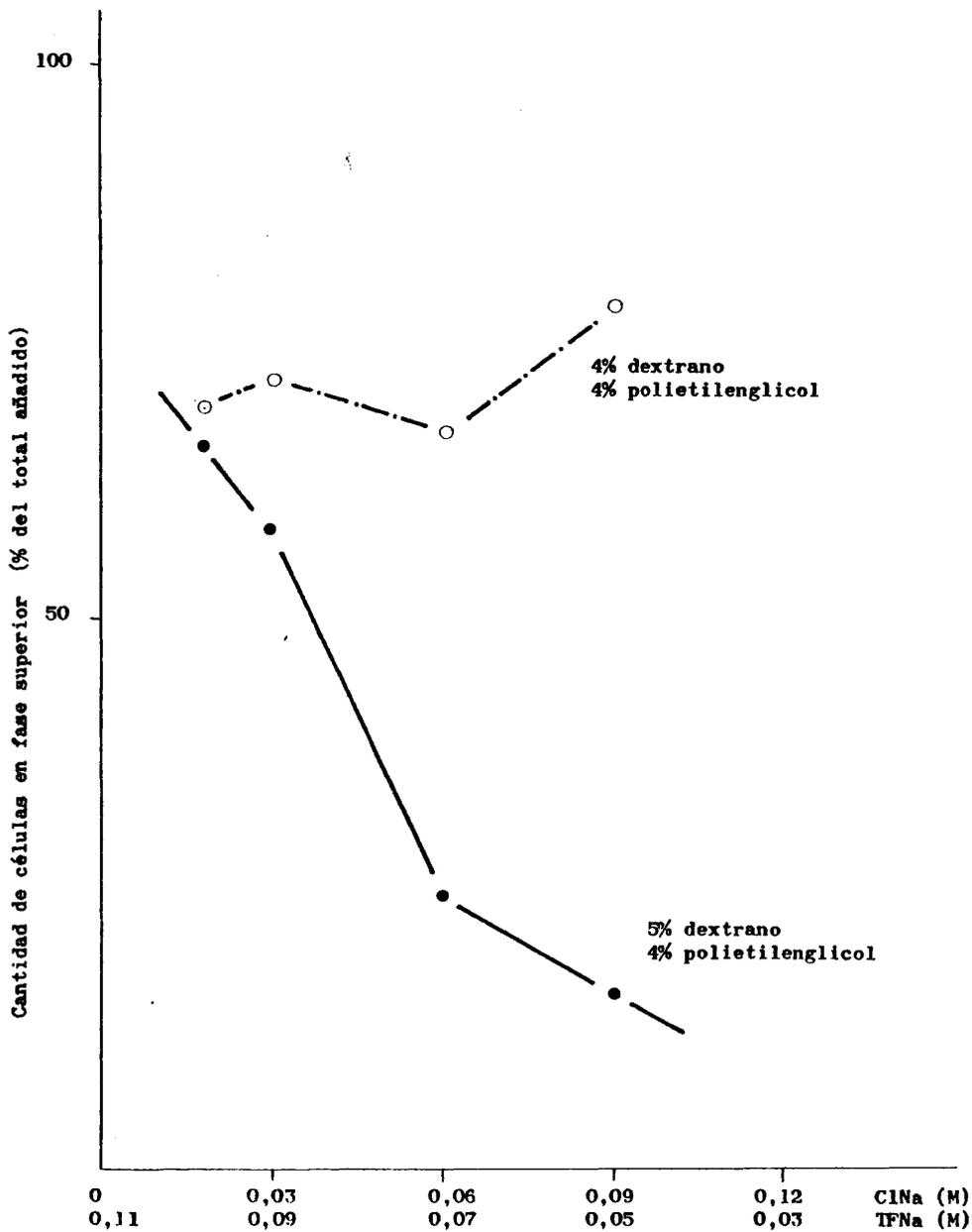


Fig. 12.- INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA (CONCENTRACIONES VARIABLES DE  $C1Na$  y TAMPON FOSFATOS) SOBRE LA PARTICION DE RETICULOCITOS EN UN SISTEMA BIFASICO CONSTITUIDO POR DEXTRANO (4% ó 5%) y POLIETILENGLICOL (4%).

tal manera que los coeficientes de partición son 1,85 y 1,38 respectivamente.

La consideración de la fig. 1 (1.3.2.) nos permite deducir las ventajas teóricas de la razón 5%/4% de concentración de dextrano y polietilenglicol como la mas adecuada para la partición; por un lado se encuentra lo suficientemente alejada del "punto crítico", como para que se puedan conseguir distintos grados de partición en función de la concentración iónica empleada, y por otro lado se encuentra lo suficientemente cerca de dicho "punto crítico" como para dar lugar a una partición óptima. Al mismo tiempo puede observarse en las figs. 11 y 12 la no influencia de la concentración iónica sobre la partición de eritrocitos y reticulocitos, cuando el sistema bifásico contiene una concentración de polímeros 4% dextrano y 4% polietilenglicol. Esto es consecuencia de que la razón de concentración de polímeros se encuentra en este caso en el límite de la curva binodial (fig. 1, 1.3.2.). Así pues, como era teóricamente previsible, no hubo en la práctica formación de sistema bifásico.

### 3.2.2.- COMPROBACION DEL METODO SEMIAUTOMATICO DE DCC; CALCULO DE LAS CONSTANTES TEORICAS Y EXPERIMENTALES PARA UNA SUSTANCIA PURA (VIT. B12).

Con el fin de determinar el funcionamiento del aparato semi automático de DCC utilizado en este trabajo para la separación celular, se sometió previamente a la DCC una sustancia homogénea como la vit. B12. La distribución fué realizada en un sistema bifásico formado por 5% dextrano y 4% polietilenglicol, en presencia de tampón fosfato 0,01 M y siendo la relación de volúmenes (L) en ambas fases igual a 1. El sistema bifásico se preparó según se indica en 2.3.8.2. y la cantidad de muestra añadida, en una sola cavidad, fué de 0,1 ml. de una solución de vit. B12 (5000 µg/ml). De acuerdo con lo descrito en 1.3.1., se obtiene una curva de tipo gaussiana, con un pico único y bien definido (fig. 13). Calculando los valores de K para cada uno

de los puntos experimentales de la curva (tabla nº 6) y hallando el valor medio se obtiene que  $K$  es igual a 1,03. Por otro lado, se calculó  $T_{n,i}$  max. teórico, correspondiente a dicho  $K$  experimental, obteniéndose un valor teórico = 30,4, que prácticamente coincide con el experimental = 31. Esto confirma de acuerdo con la teoría (1.3.3.) que una sustancia homogénea de  $K = 1$  se distribuye en ambas fases al 50% en todas y cada una de las 60 cavidades del aparato de DCC. Dichos datos nos confirman, en definitiva, el buen funcionamiento del aparato semiautomático. A efectos comparativos, se observa también en la fig. 13 la curva teórica de DCC. Esta se calcula, mediante una función de distribución gaussiana (ecuación a), 1.3.3.), a partir de los datos experimentales correspondientes a la vit. B12 (tabla nº 7). Esta curva teórica es prácticamente superponible a la curva experimental; dato que corrobora el buen funcionamiento del aparato semiautomático de DCC.

Estos resultados permiten, por tanto, la aplicación a la separación celular, de nuestra versión semiautomática de DCC.

TABLA Nº 6.- CALCULO DEL  $t_{n,i}$  max TEORICO, CORRESPONDIENTE AL K EXPERIMENTAL.

Nº TUBO	D.O. FASE SUPERIOR	D.O. FASE INFERIOR	K EXPERIMENTAL
25	0,10	0,11	0,91
26	0,16	0,15	1,06
27	0,19	0,18	1,05
28	0,22	0,23	0,95
29	0,21	0,22	0,95
30	0,23	0,20	1,15
31	0,23	0,22	1,04
32	0,20	0,19	1,05
33	0,18	0,17	1,05
34	0,14	0,12	1,16
35	0,11	0,12	0,92
			<u>X = 1,03</u>

$$T_{n,i} \text{ max. teórico} = \frac{n G}{G + 1} = 30,4$$

$$T_{n,i} \text{ max. experimental} = 31$$

**TABLA Nº 7.- CALCULO DE LA CURVA TEORICA CORRESPONDIENTE A UNA SUS-  
TANCIA HOMOGENEA (VIT. D12).**

Aplicando la ecuación (a), 1.3.3.)

$$T_{n,i} = \frac{(G + 1)^2}{2 \cdot nG} \cdot e^{-\frac{(i - 1)^2}{2nG}} \cdot (G + 1)^2$$

donde:  $n = 60$

$G = 1,03$

$i = 31$

Para cada  $i$  tendremos un valor de  $T_n$

$i = 20$	$T_n = 0,003$
$i = 21$	$T_n = 0,074$
$i = 22$	$T_n = 0,014$
$i = 23$	$T_n = 0,024$
$i = 24$	$T_n = 0,041$
$i = 25$	$T_n = 0,063$
$i = 26$	$T_n = 0,091$
$i = 27$	$T_n = 0,123$
$i = 28$	$T_n = 0,155$
$i = 29$	$T_n = 0,183$
$i = 30$	$T_n = 0,203$
$i = 31$	$T_n = 0,210$
$i = 32$	$T_n = 0,203$
$i = 33$	$T_n = 0,183$
$i = 34$	$T_n = 0,155$
$i = 35$	$T_n = 0,123$
$i = 36$	$T_n = 0,091$
$i = 37$	$T_n = 0,063$
$i = 38$	$T_n = 0,041$
$i = 39$	$T_n = 0,024$
$i = 40$	$T_n = 0,014$

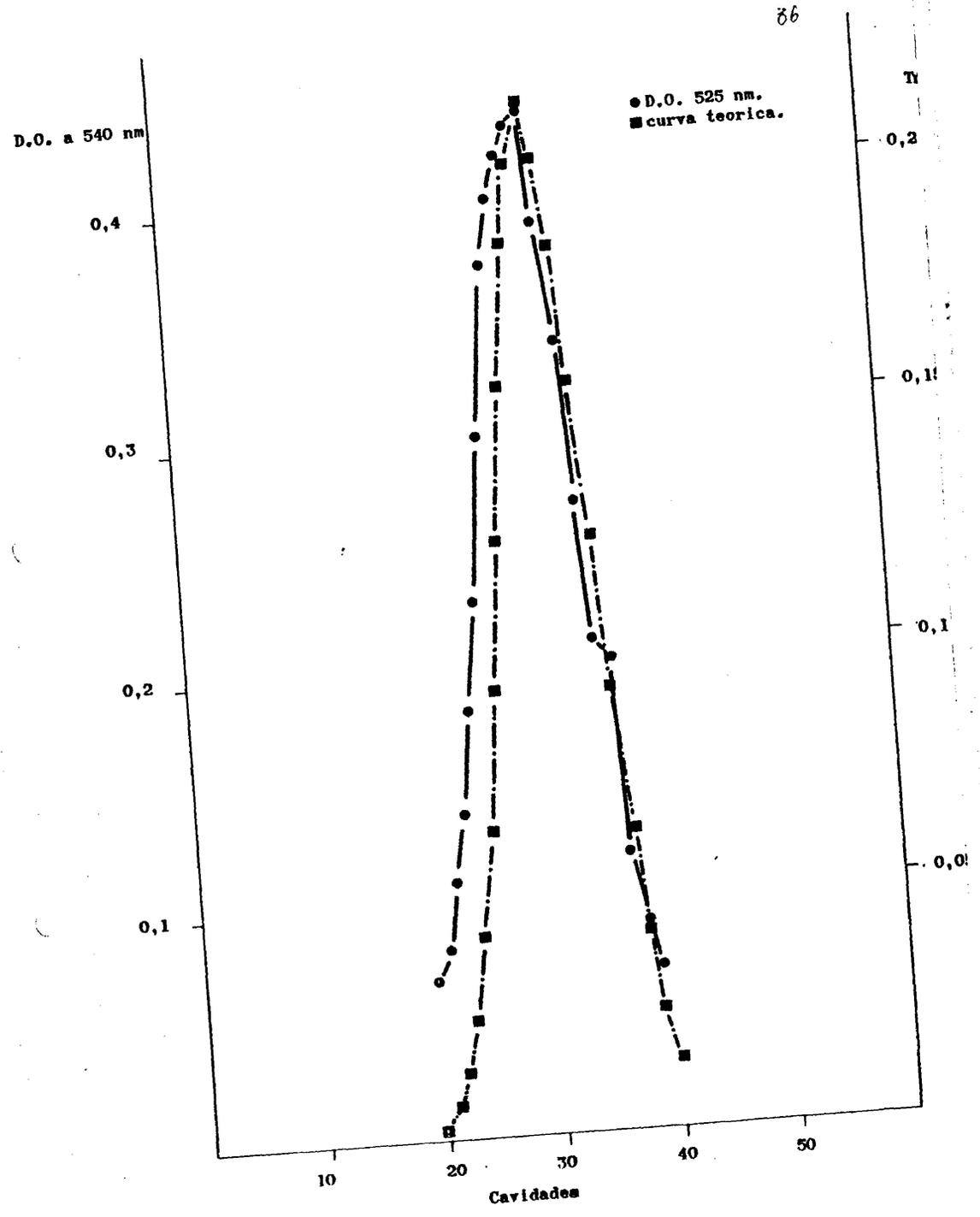


Fig. 13.- CURVA TEORICA Y EXPERIMENTAL DE LA DCC DE LA VIT. B12.

### 3.2.3.- CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA DISTRIBUCION DE ERITROCITOS Y RETICULOCITOS.

#### 3.2.3.1.- Influencia del tiempo de conservación de las células a $4^{\circ}\text{C}$ , en solución salina fisiológica.

La finalidad de este experimento es realizar separaciones de células sometidas a unas circunstancias experimentales que pudieran alterar sus propiedades de membrana. Es decir, se estudió el efecto que sobre la DCC puedan tener las modificaciones habidas en la membrana celular durante la conservación de aquellas en  $\text{ClNa}$   $0,15\text{ M}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para ello se realizó una distribución en contracorriente de eritrocitos obtenidos según 2.2.1.. El sistema bifásico se preparó como se indica en 2.3.8.3.. La muestra diluida a  $1/2$  se colocó en la cavidad 0 del rotor, y una vez realizados los 60 giros, las fracciones se recogen sobre  $1\text{ ml.}$  de agua. Los datos se expresan en D.O. a  $500\text{ nm.}$

En la fig. 14 a se observa que los eritrocitos presentan un pico máximo alrededor de la cavidad 54. Esta distribución, que corresponde a células recién obtenidas (0 h.), se toma como patrón respecto a las restantes. Las fig. 14 b, c y d muestran la distribución de los eritrocitos mantenidos a  $4^{\circ}\text{C}$  en cloruro sódico  $0,15\text{ M}$  durante 24, 48 y 72 h., respectivamente. Los correspondientes picos máximos se sitúan en las cavidades 52, 54 y 55. Puesto que tales distribuciones son semejantes a la tomada como patrón (0 h.) se puede concluir que la conservación de los eritrocitos en el intervalo de tiempo estudiado (0-72 h.) no se traduce, según estos resultados, en alteraciones de sus propiedades de membrana. Ello es importante pues nos permite cierta flexibilidad en cuanto al tiempo de realización de los experimentos de DCC; ya que permite separar células conservadas a  $4^{\circ}\text{C}$  en  $\text{ClNa}$   $0,15\text{ M}$ , durante al menos 72 h., sin que al parecer se deterioren sus características superficiales de membrana.

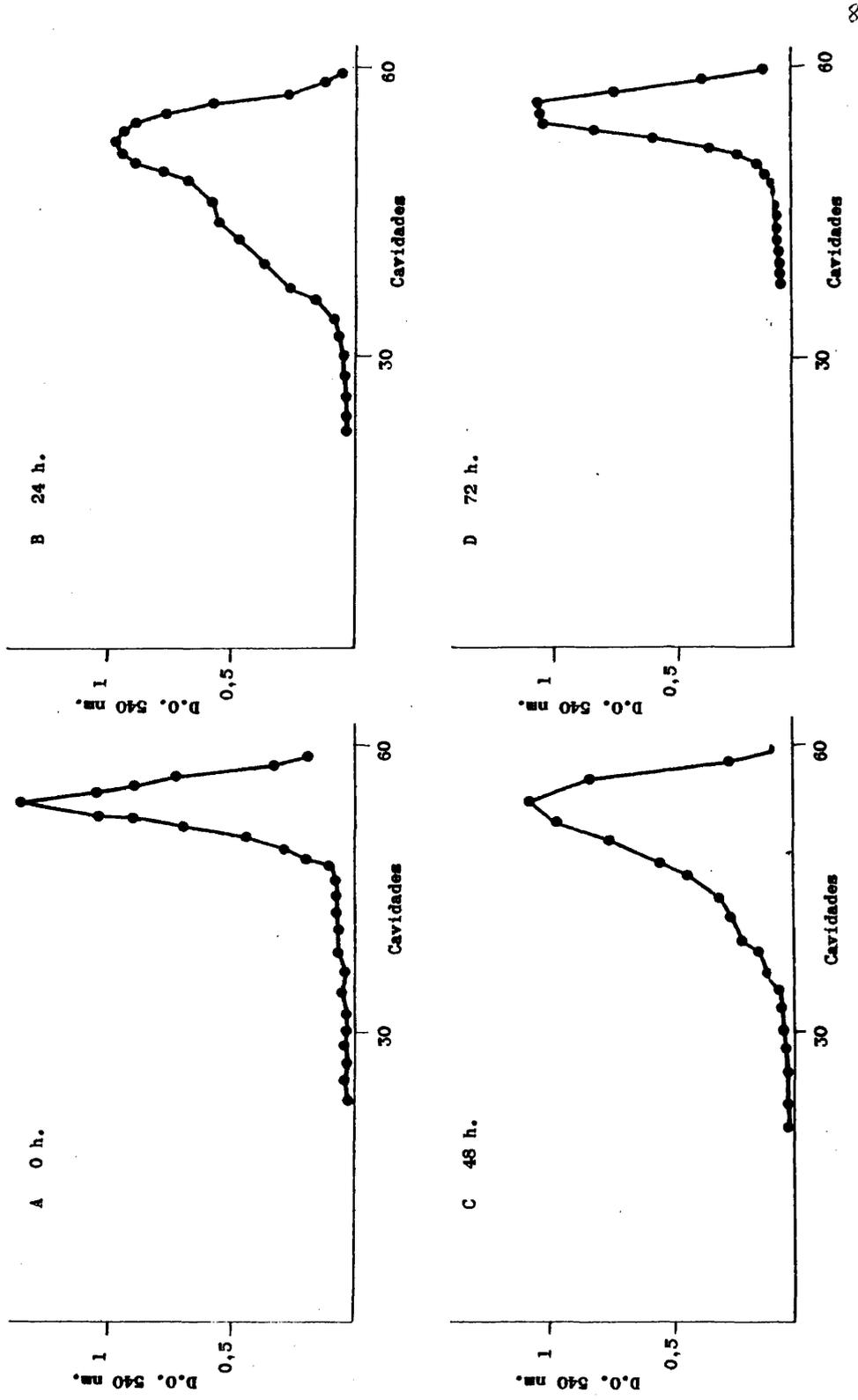


Fig. 14.- EFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACION DE LAS CELULAS EN CINA 0,15 M A 49C SOBRE LA DCC DE ERITROCITOS.

**3.2.3.2.- Influencia del número de cavidades conteniendo muestra y concentración de la misma sobre la separación por DCC de eritrocitos y reticulocitos.**

Con el fin de delimitar el volumen máximo de muestra que puede emplearse para la DCC de eritrocitos y reticulocitos, se pasó a estudiar el efecto que sobre la DCC tiene la concentración de la muestra y el número de cavidades conteniendo dicha muestra. El planteamiento de estos experimentos viene motivado por la necesidad de contar en cada cavidad, al final de la DCC, con una cantidad mínima de los distintos tipos de células, para el estudio posterior de actividades enzimáticas. Así pues, se realizaron distribuciones de eritrocitos y reticulocitos:

- a) bajo dos concentraciones de células (dilución 1/2 y no dilución)
- b) variando el número de cavidades (1-3) que contienen muestra.

Se utilizaron suspensiones de eritrocitos (2.2.1.) y reticulocitos (2.2.3.). El sistema bifásico fué el correspondiente al preparado en el apartado 2.3.8.3.. Los resultados, previa hemólisis del contenido de las 60 cavidades del rotor con 1 ml. de agua, se expresan en D.O. a 540 nm..

En la fig. 15, correspondiente a eritrocitos, se observa que la distribución no varía al aumentar el número de cavidades con muestra, desde una cavidad en fig. 15 a a tres cavidades en fig. 15 b. Asimismo el aumento de la concentración de muestra, desde dilución 1/2 en fig. 15 b a no dilución en fig. 15 c, no afecta significativamente la distribución. En estos tres casos el pico aparece alrededor de las cavidades 54, 51 y 53 respectivamente.

En la fig. 16 se muestran los resultados obtenidos para reticulocitos. Se comprueba la similitud de su perfil de DCC con el de eritrocitos tanto en distribuciones realizadas por la muestra diluida a 1/2 y una sola cavidad en fig. 16 a, como en las realizadas con reticulocitos sin diluir y tres cavidades en fig. 16 b. Estos datos referentes a concentración de muestra coinciden con los obtenidos para otras células, así, para E. Coli K12, la proporción de células en

la fase superior permanece constante al aumentar la cantidad total de células añadidas (ALBERTSSON, 1971). Se ha observado igualmente que la cantidad de almidón o de células de CHLORELLA PIREYNOIDOSA no alteran el comportamiento de la distribución (ALBERTSSON, 1958). Por tanto, podemos concluir, que en los límites estudiados por nosotros, la distribución de las partículas es independiente de la concentración de las muestras originales.

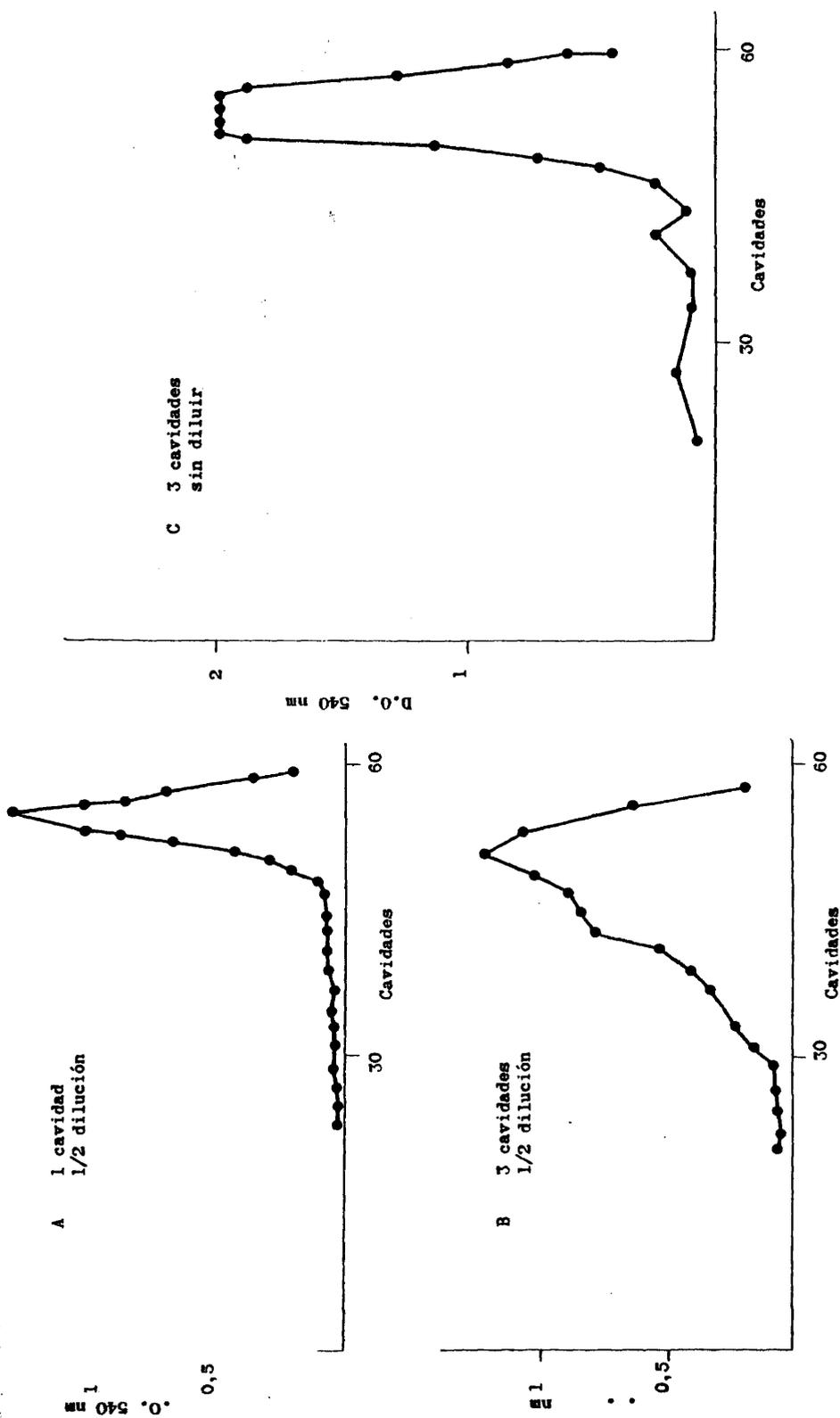


Fig. 15.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LA MUESTRA Y NO DE CAVIDADES CON MUESTRA EN LA DCC DE ERITROCITOS.

92

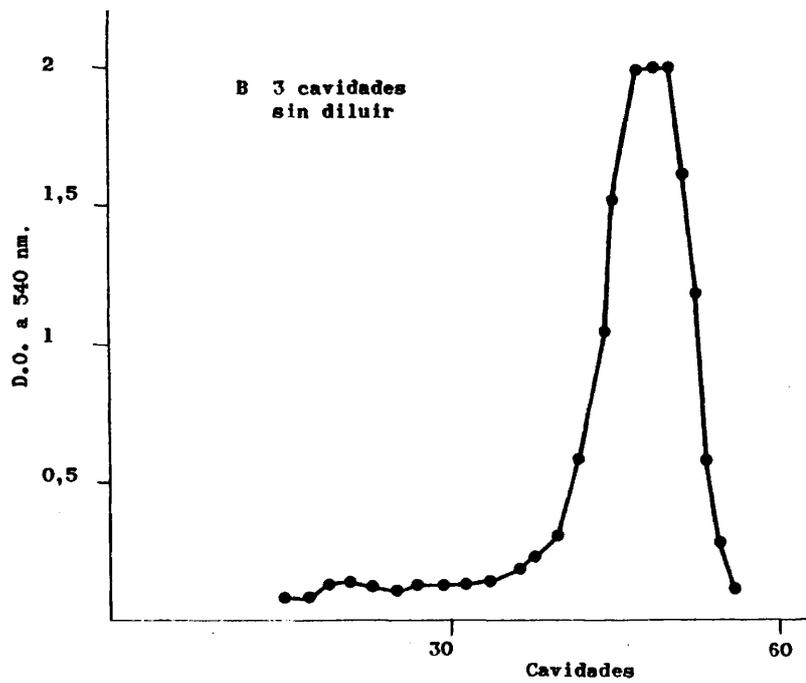
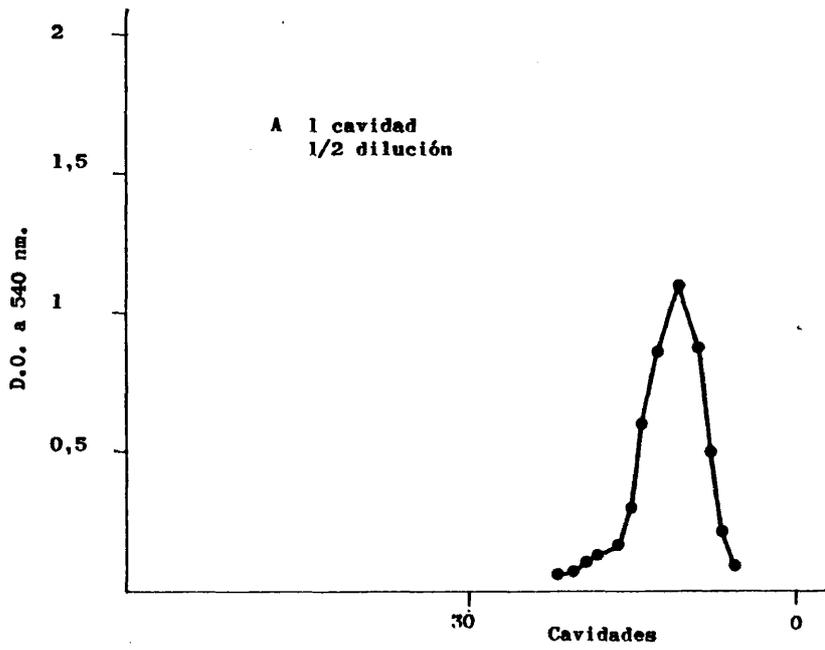


Fig. 16.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LA MUESTRA Y NO DE CAVIDADES CON MUESTRA EN LA DCC DE RETICULOCITOS.

### 3.2.3.3.- Influencia de la concentración salina del sistema bifásico.

Como se vió en el apartado 3.2.1. la concentración salina mo difica el coeficiente de partición de la célula. Con el fin de con- firmar cómo este efecto de la concentración salina se refleja en la distribución en contracorriente, se realizaron dos experimentos de DCC, empleando la misma concentración de polímeros (5% dextrano y 4% polietilenglicol):

- a) uno, a la concentración iónica a la que se obtiene un coeficiente de partición de 1,85 (0,03 M ClNa y 0,09 M tampón fosfato Na).
- b) otro, empleando una concentración salina (0,045 M ClNa y 0,08 M tampón fosfato Na) a la que el coeficiente de partición es 0,67.

Las células, preparadas según 2.2.1., se colocaron en una única cavidad. Una vez realizados los 60 giros, todas las cavidades fueron hemolizadas con 1 ml. de agua. Los resultados se expresan en D.O. a 540 nm.. En la fig. 17 se muestran los resultados de las dos distribuciones. Se observa que como consecuencia del menor coeficiente de partición la curva b se encuentra desplazada hacia la izquierda respecto a la a. Por otra parte,

aplicando la ecuación (b),(1.3.3.) y transformando K en G

$$T_{n,i \text{ max}} = \frac{nG}{G + 1}$$

para a)  $T_{n,i \text{ max.}} = 42,18$

para b)  $T_{n,i \text{ max.}} = 27,6$

Estos datos no coinciden exactamente con los experimentales, obtenidos a partir de la fig. 17 (a y b). Aquí, el pico de la DCC aparece en la cavidad 55 y 30, respectivamente. Dicha discrepancia puede deberse a que la ecuación  $T_{n,i \text{ max.}}$  está calculada para soluciones de sustancias homogéneas, y nosotros trabajamos con suspensiones de células, las cuales poseen una mayor densidad debido al peso de las mismas. Recordemos que en el caso de la Vit. B12 (sustancia homogénea) los datos experimentales sí coinciden con los teóricos (3.2.2.). Este efecto podría ser subsanado modificando el tiempo de sedimentación empleado en la distribución; aspecto que está siendo

do estudiado en una Tesis en nuestro laboratorio, encaminada a obte  
ner las características físico-químicas mas idóneas para la DCC.

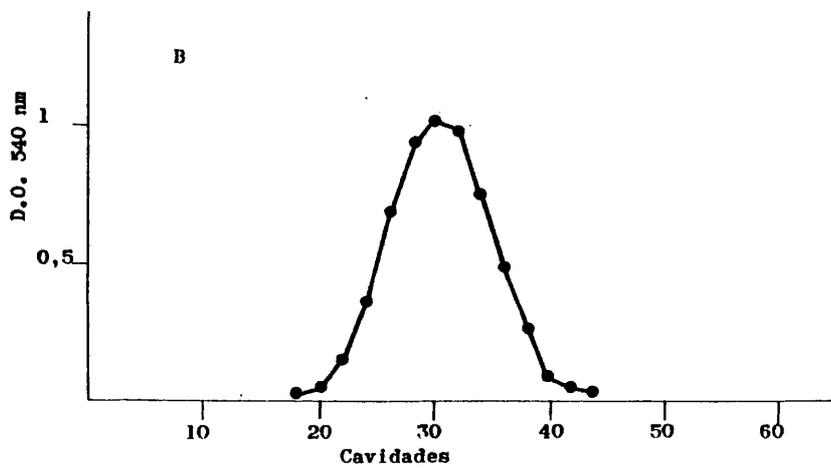
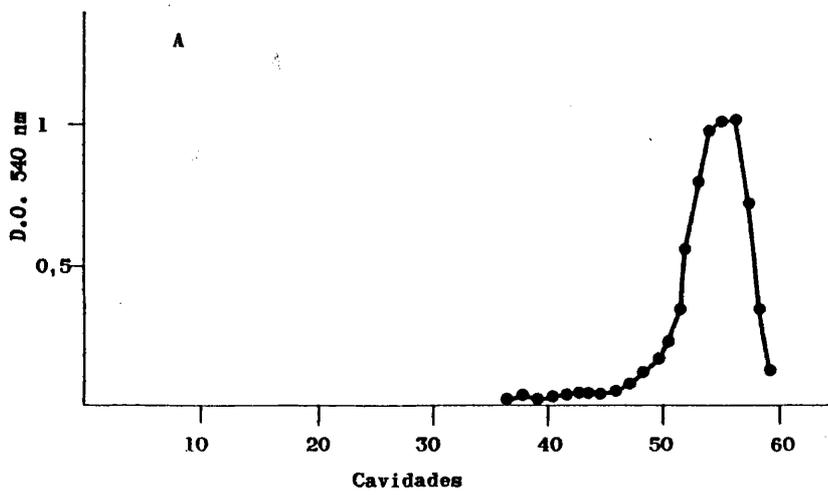


Fig. 17.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION SALINA EN LA DCC DE ERITROCITOS. A(0,03 M ClNa; 0,09 M TFNa) B(0,045 M ClNa; 0,08 M TFNa)

### 3.3.- APLICACION DE LA DCC A LA SEPARACION DE POBLACIONES CELULARES.

#### 3.3.1.- PERFIL DE LA DCC PARA ERITROCITOS Y RETICULOCITOS.

Una vez estudiadas las influencias de los distintos parámetros sobre la DCC, y elegidas las condiciones experimentales óptimas deducidas de los apartados anteriores, se procedió a realizar separaciones de las poblaciones de eritrocitos y reticulocitos por DCC.

El sistema bifásico empleado fué el descrito en 2.3.8.3., la muestra (0,1 ml. de células sin diluir) se colocó en tres cavidades del rotor. Los resultados, previa hemólisis del contenido de las 10 cavidades, con 1 ml. de agua se expresan en D.O. a 540 nm. Como se puede observar en la fig. 18 los eritrocitos presentan curvas experimentales de DCC con un pico en las cavidades 50-54 y los reticulocitos entre las 46-50. De acuerdo con sus coeficientes de partición, 1,85 y 1,38 respectivamente, y bajo las condiciones estudiadas, los tipos de las curvas teóricas de DCC obtenidas después de aplicar la ecuación:

$$T_{n,i \text{ max.}} = \frac{nG}{G + 1}$$

son: 42,1 para eritrocitos y 38,3 para reticulocitos.

Al igual que ocurría en el apartado anterior, podemos observar que no existe una correspondencia exacta entre los picos teóricos y los experimentales; como ya discutimos allí, esta discrepancia puede deberse a que nuestras suspensiones de eritrocitos y reticulocitos, tienen mayor densidad, como consecuencia del peso de las células, que las partículas en solución. Por otro lado, y dado que los coeficientes de partición de eritrocitos y reticulocitos no difieren considerablemente (1,85 y 1,38 respectivamente), las curvas de DCC de ambos tipos de células presentan un perfil en la DCC muy semejante; tanto que, como veremos posteriormente (3.3.3.1.) son superponibles. Sin embargo, esta semejanza entre ambas poblaciones celulares es sólo aparente; la población eritrocitaria está consti-

tuida por un conjunto de células de distinta edad, como veremos en 3.3.2.. Por el contrario, la población reticulocitaria depende del grado de maduración de las células que la componen (3.3.3.), lo cual es directamente dependiente del esquema seguido para la anemización (2.2.2.).

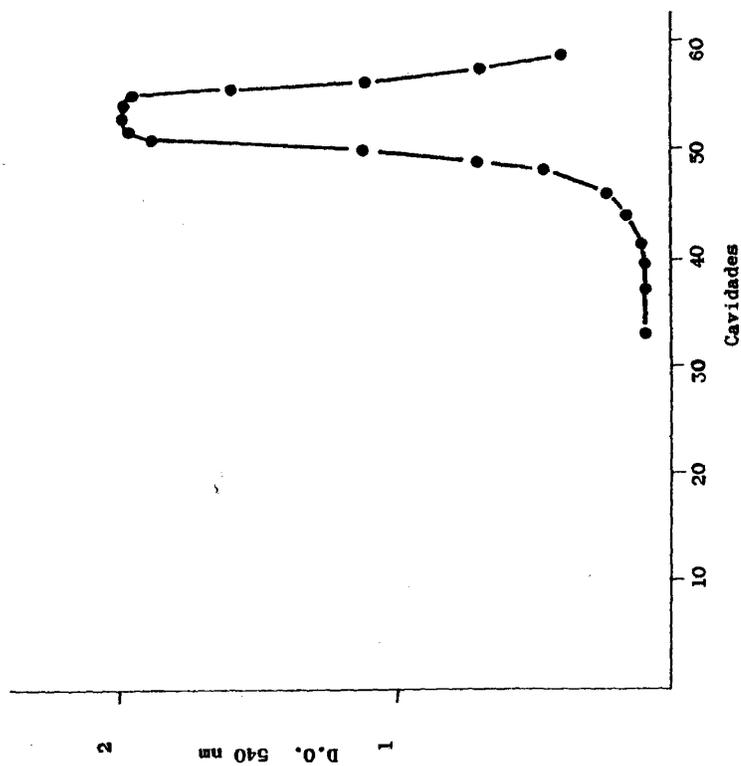
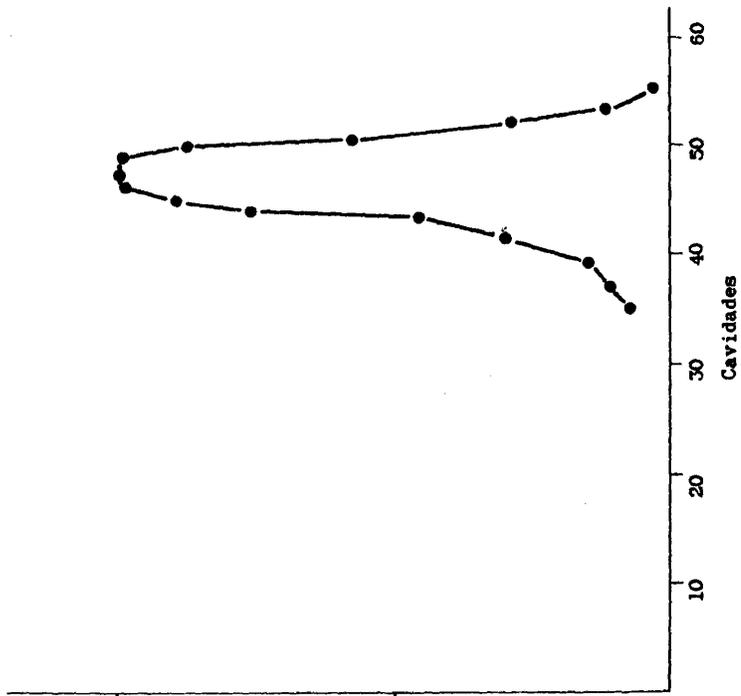


Fig. 18.- DISTRIBUCION EN CONTRACORRIENTE DE ERITROCITOS Y RETICULOCITOS.

3.3.2.- CONFIRMACION POR MARCAJE ISOTOPICO CON  $^{59}\text{Fe}$  DE LA PRESENCIA DE CELULAS DE DISTINTA EDAD EN LA DCC DE ERITROCITOS.

El estudio de la distribución de las células rojas según su edad ha sido realizado por WALTER y ALBERTSSON (1966); WALTER (1967); WALTER y SELBY (1967); WALTER y col. (1967, b). Son especialmente interesantes los trabajos conducentes a la localización de las células eritrocitarias según su edad, en el diagrama de DCC (WALTER, 1964; WALTER y SELBY, 1966; WALTER y col., 1970). Estos autores, inyectan do ratas con  $^{59}\text{Fe}$ , y tomando muestras de sangre a diferentes tiempos después de la administración del isótopo, establecieron la posición aproximada de los eritrocitos de diferente edad en las cavidades del rotor de la DCC. Los eritrocitos más jóvenes (2 días) se localizan en el extremo derecho del diagrama. A partir de este punto, los eritrocitos van situándose de forma gradual tanto más a la izquierda cuanto mayor es su edad, de tal manera que los más viejos se encuentran en el extremo izquierdo de la curva de distribución. Dada la importancia que tienen estos datos en relación con nuestra pretensión de estudiar las células eritrocitarias según su edad, parecía conveniente confirmarlos empleando nuestro aparato de capa fina de DCC.

En consecuencia, se planteó el siguiente experimento: se inyectaron tres ratas Wistar de aproximadamente 200 g de peso con  $^{59}\text{Fe}$  (2.2.4.). Se sacrifican los animales, a distintos tiempos de la inyección (3, 26 y 55 días) y se obtienen los eritrocitos (2.2.1.). El sistema bifásico se preparó como se indica en 2.3.8.3.. La muestra, diluida aproximadamente 1/2, se colocó en una cavidad del rotor. Una vez realizados los 60 giros, el contenido de las cavidades se hemolizan con 1 ml. de agua. Los resultados se expresan:

- a) en D.O. a 540 nm., para determinar la distribución de las células.  
b) en actividad específica relativa (A.E.R.), definida como:

c.p.m. en cada tubo

---

absorbancia a 540 nm. en cada tubo

---

c.p.m. de la alícuota original colocada en el rotor

---

absorbancia a 540 nm. de la alícuota original colocada en el rotor

Las c.p.m. se determinaron (2.3.9.) para detectar la incorporación de  $^{59}\text{Fe}$  en las distintas células. Se considera que los valores de A.E.R. por encima de 1 significan un enriquecimiento de células de la misma edad.

En la fig. 19 a, correspondiente a células obtenidas a los tres días de la administración del  $^{59}\text{Fe}$ , aparecen dos picos de A.E.R.. Esto sugiere la existencia de dos poblaciones de células jóvenes (de tres días o menos), una en la parte derecha de la distribución y otra en la izquierda. La población de la izquierda debe representar, de acuerdo con WALTER y SELBY (1966) y WALTER y col. (1970), a los reticulocitos jóvenes. Estos sedimentan más rápidamente que los eritrocitos debido a su densidad y tamaño (MEL, 1963). El pico de radioactividad encontrado a la derecha corresponde a los eritrocitos jóvenes, los que acaban de incorporar el  $^{59}\text{Fe}$ , así como a los reticulocitos viejos, todavía restantes, que pasarán a eritrocitos mediante un cambio drástico en sus características de membrana (ALBERTSSON, 1971). Ambas poblaciones de células jóvenes son, probablemente, similares a las descritas por SIMON y TOPPER (1957), en base a su diferente resistencia a la hemólisis en un medio hipotónico. También SASS y col. (1963) sugieren que uno de estos grupos pudiera corresponder a los reticulocitos y el otro a los eritrocitos jóvenes.

En la fig. 19 b, correspondiente a los eritrocitos obtenidos a los 26 días de la inyección, se observa cómo el máximo de actividad específica relativa, se encuentra desplazado hacia la izquierda respecto a la A.E.R. obtenida para tres días (fig. 19 a). Aparece un pico de radioactividad coincidente con la cavidad 54, lo que indica que alrededor de esta cavidad se encuentran los eritrocitos de 26 días de edad.

En la fig. 20 c, correspondiente a eritrocitos de 55 días, volvemos a observar también dos picos máximos de actividad específica relativa. El observado a la izquierda del diagrama de distribución celular corresponde a los eritrocitos de mayor edad, es decir, aquellos que incorporaron el  $^{59}\text{Fe}$  hace 55 días. Puesto que la vida media del eritrocito de rata es de unos 55 días (LEVY y col., 1959), el

pico de la derecha debe ser consecuencia de un nuevo ciclo de eritrocitos jóvenes que ya han incorporado el  $^{59}\text{Fe}$  y han salido al torrente (ALBERTSSON, 1971).

En la fig. 20 d se muestra la "curva compuesta" que recoge las conclusiones esenciales de los tres experimentos en ratas individuales. Nos muestra la posición aproximada de los eritrocitos de rata según su edad en el diagrama de la DCC.

Podemos concluir a la vista de estos datos, coincidentes con los obtenidos por WALTER y col. (1960); WALTER (1964); WALTER (1966), que la posición de los eritrocitos de la DCC está relacionada con la edad. A la derecha del perfil de DCC se encuentran los más jóvenes; a medida que aumentan en edad, y la partición se hace menor, la DCC se desplaza hacia la izquierda. El factor determinante de esta diferencia de distribución radica fundamentalmente en las distintas cargas superficiales que presentan las células (WALTER y col., 1967 b; BROOS y col., 1971). Como ejemplo demostrativo de esta correlación puede decirse que existe una correlación lineal entre la partición y la movilidad electroforética de los eritrocitos de un gran número de especies (WALTER y col., 1967 b).

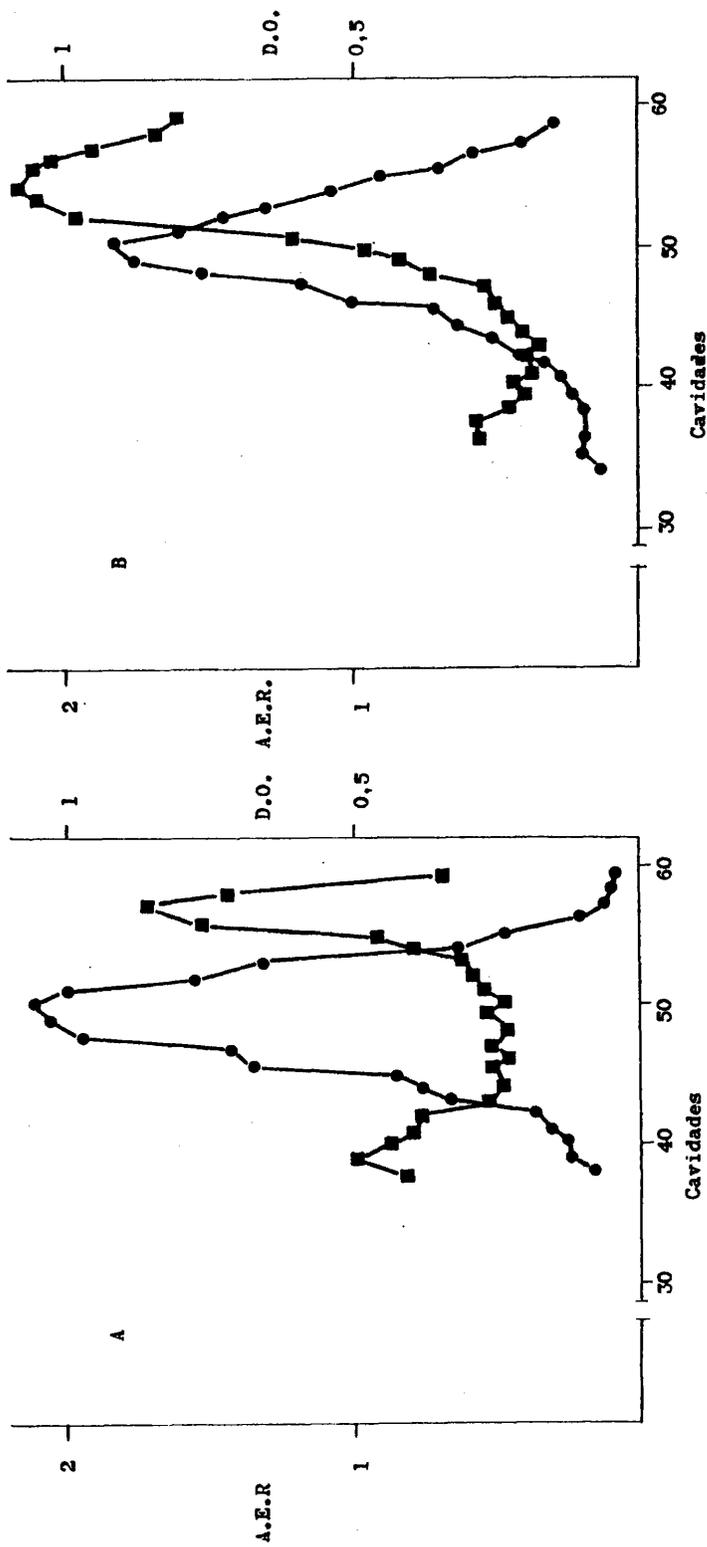


Fig. 19.- A. DCC DE CELULAS OBTENIDAS A LOS 3 DIAS DE SUMINISTRADO EL ISOTOPO.  
 B. DCC DE CELULAS OBTENIDAS A LOS 26 DIAS DE SUMINISTRADO EL ISOTOPO.

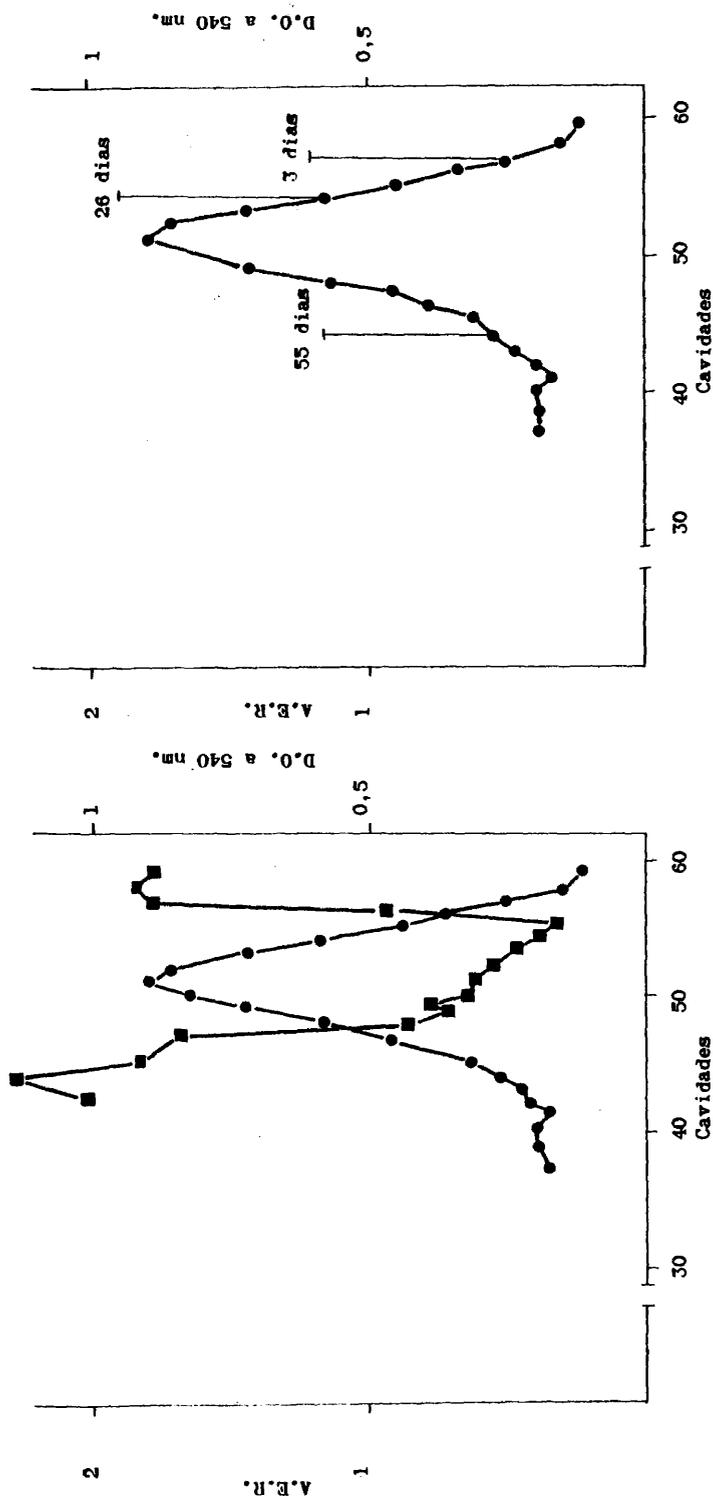


Fig. 20.- C. DCC DE CELULAS OBTENIDAS A LOS 55 dias DE ADMINISTRADO EL ISOTOPO.

D. "CURVA COMPUESTA" DE LOS TRES EXPERIMENTOS.

### 3.3.3.- SEPARACION POR DCC DE POBLACIONES CELULARES HETEROGENEAS.

#### 3.3.3.1.- Separación de poblaciones celulares artificialmente heterogéneas.

El hecho de la similitud de comportamiento de eritrocitos y reticulocitos en la DCC (3.3.1.) impide que, por ejemplo, una mezcla preparada artificialmente de eritrocitos y reticulocitos se separe durante la distribución en contracorriente. La fig. 21 nos muestra la curva de DCC correspondiente a una mezcla de ambas células. Estas fueron obtenidas según 2.2.1. y 2.2.2.; la mezcla de ambos tipos de células se realizó a partes iguales. Para la DCC se utilizó el sistema bifásico habitual (2.3.8.3.) colocándose la mezcla (0,1 ml.) en tres cavidades del rotor. Los resultados, expresados en D.O. 540 nm., aparecen en la fig. 21. Nos muestran una curva de aspecto homogéneo, a pesar de ser dos los tipos de células presentes. Ello puede ser debido a que los reticulocitos empleados (riqueza ~ 90%), obtenidos por inyección con fenilhidrazina (2.2.2.), son reticulocitos en un estado muy avanzado de maduración, es decir muy próximo a los eritrocitos. Estos reticulocitos pueden corresponderse, por tanto, con los que WALTER (1966) denomina "reticulocitos viejos", los cuales poseen un coeficiente de partición mayor que el de reticulocitos jóvenes (WALTER, 1965). Se llega así a la conclusión de que la separación por DCC de población de eritrocitos circulantes y de reticulocitos obtenidos según el esquema de tratamiento con fenilhidrazina (riqueza ~90%) es prácticamente imposible. Por el contrario, esta separación comienza a ser factible cuando, como veremos a continuación, los reticulocitos de la muestra no se encuentran en tan avanzado estado de maduración.

### 3.3.3.2.- Sangre que contiene un 36% de reticulocitos.

En este caso se emplea una mezcla natural, de eritrocitos y reticulocitos. Esta población heterogénea se obtiene siguiendo el esquema de tratamiento con fenilhidrazina (2.2.2.) en el que se consigue una población de células rojas circulantes que contiene un 36% de reticulocitos. Para la DCC de la mencionada población de eritrocitos y reticulocitos se emplea el sistema bifásico descrito en 2.3.8.3.; 0,1 ml. de la suspensión de dicha muestra natural se colocan en una cavidad del rotor.

En la fig. 22 se observa, a diferencia de la fig. 21, una marca de heterogeneidad en los dos experimentos realizados. Esta heterogeneidad es mayor en la zona de la izquierda de la distribución, lo cual nos indica que los reticulocitos salidos al torrente circulatorio como consecuencia del tratamiento con fenilhidrazina y presentes por tanto en la suspensión, pueden corresponder a los reticulocitos jóvenes descritos por WALTER y ALBERTSSON (1976). Según estos autores, los reticulocitos jóvenes, a diferencia de los reticulocitos viejos, poseen un comportamiento distinto en la DCC respecto a los eritrocitos. Las características de la superficie de membrana de estos reticulocitos jóvenes difieren considerablemente de las de eritrocitos, siendo su coeficiente de partición menor.

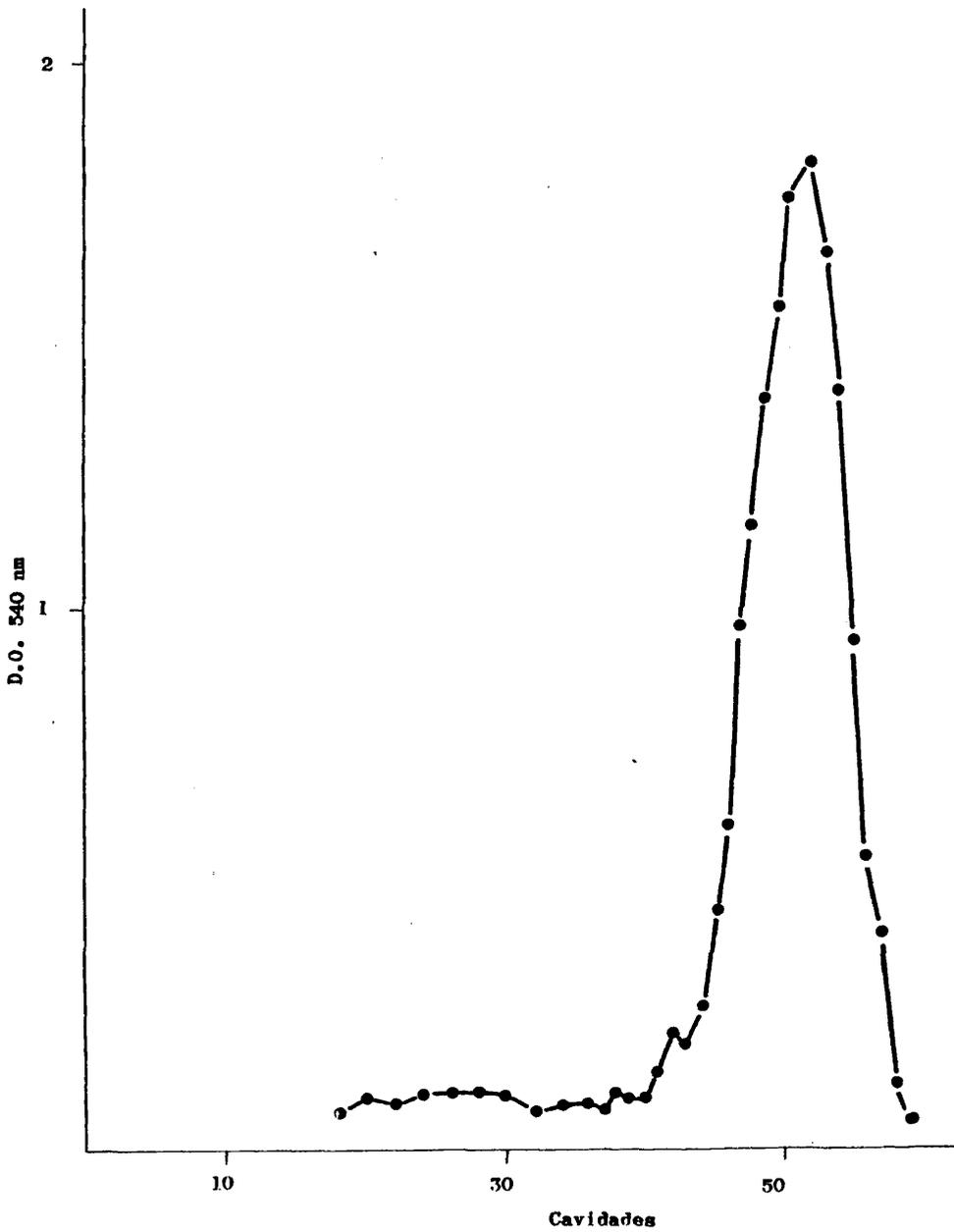


Fig. 21.- DCC DE POBLACIONES "ARTIFICIALMENTE" HETEROGENEAS (ERITROCITOS Y RETICULOCITOS CON UNA RIQUEZA 90%)

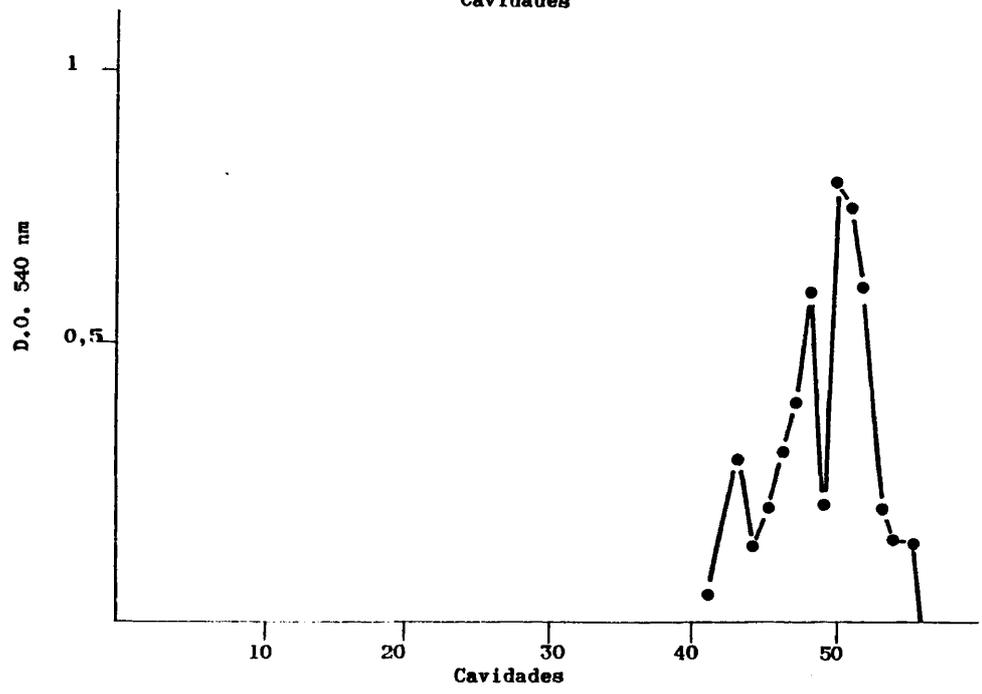
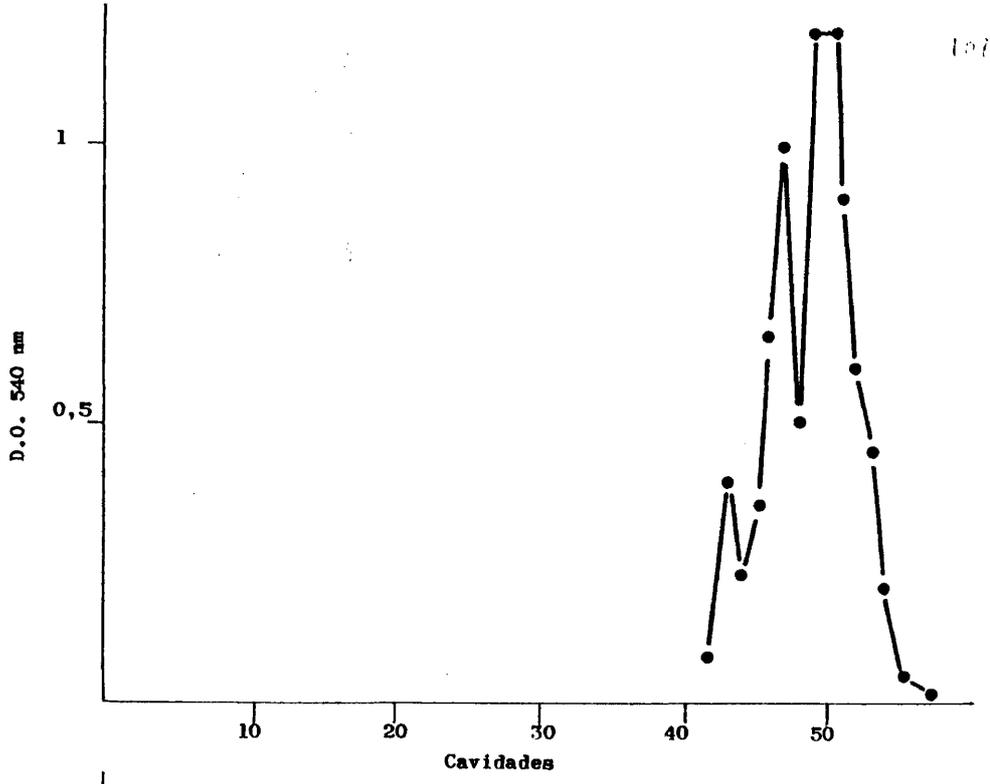


Fig. 22.- DCC DE UNA POBLACION DE CELULAS ROJAS QUE CONTIENE UN 36% DE RETICULOCITOS.

### 3.3.3.3.- Separación preliminar de precursores eritroideos de médula ósea.

Con objeto de separar, para su posterior estudio metabólico, los distintos tipos celulares integrantes del conjunto denominado "células eritroideas", se realizó una distribución en contracorriente de dicha población. Las células se obtienen como se indica en 2.2.3.. El sistema bifásico utilizado fué descrito en 2.3.8.3. y la cantidad de células añadidas 0,1 ml., en una cavidad del rotor. Una vez realizados los 60 giros y hemolizadas las células con 1 ml. de agua se determina la concentración proteica en cada tubo (2.3.5.) y se expresan los resultados en mg. de proteína/ml. de tubo frente al número de cavidad.

La fig. 23 nos muestra la amplia heterogeneidad de tipos celulares presentes en la muestra estudiada; que como vimos en 2.2.3. fundamentalmente corresponden a: proeritroblastos y eritroblastos basófilo, policromatófilo y ortocromático. Lo cual supone con toda seguridad diferentes coeficientes de partición en la mencionada muestra. Como es sabido (1.1.), durante el proceso de diferenciación, las células sufren cambios morfológicos y estructurales bruscos, que se manifiestan en las características de su superficie de membrana y consecuentemente en coeficientes de partición distintos.

Nuestros trabajos futuros están encaminados a la identificación de cada uno de estos tipos celulares y, posteriormente, al estudio en dichas células de las distintas actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo del 2,3-DPG, y de la glicolisis en general. Pensamos que este estudio sistemático en células eritroideas separadas por DCC nos llevará a conclusiones globales en relación con los cambios bioquímicos que se producen durante la diferenciación.

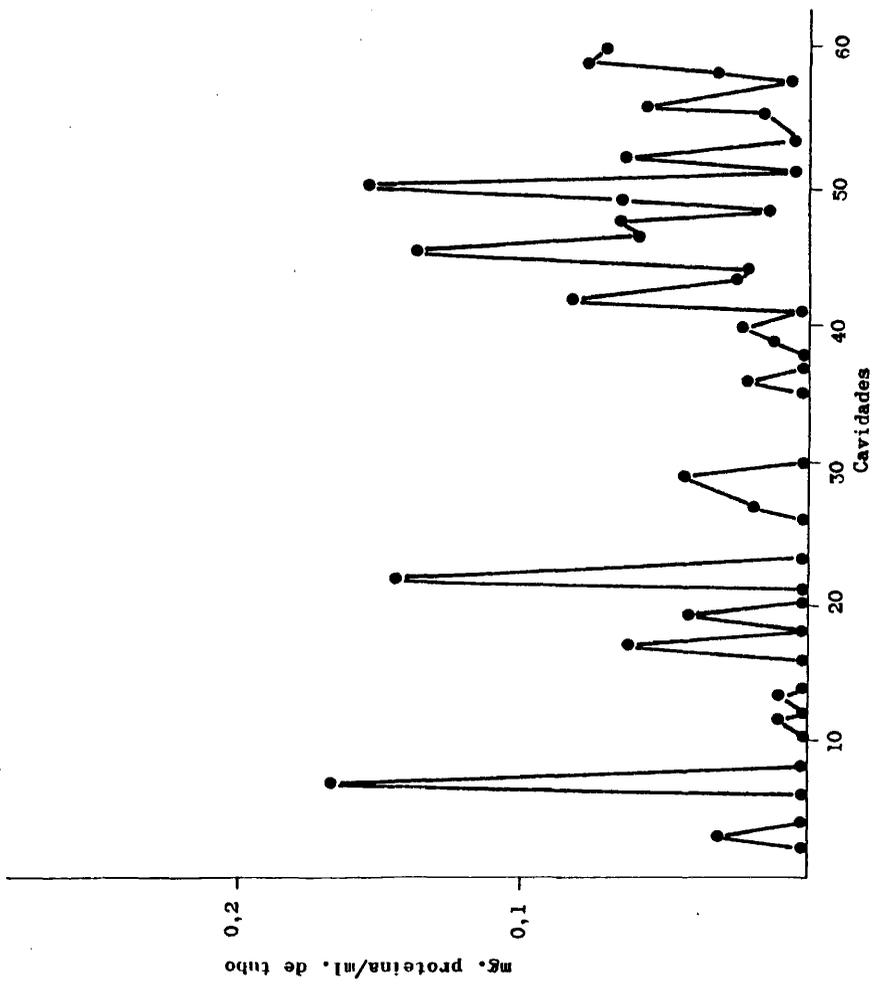


Fig. 23.- DCC DE PRECURSORES ERITROIDES.

### 3.3.4.- ACTIVIDAD FOSFOGLICERATOQUINASICA EN CELULAS ERITROCITARIAS DE DISTINTA EDAD Y RETICULOCITARIAS.

Conocida la posición de las distintas células según su edad en el proceso de envejecimiento del eritrocito (3.3.2.), y puesto que uno de los objetivos de nuestro trabajo era el estudio de la posible variación de la actividad enzimática en dichas células a lo largo del proceso de maduración y envejecimiento del eritrocito, se procedió a determinar la actividad específica de la fosfogliceratoquinasa (2.3.3.2.), en poblaciones reticulocitarias y eritrocitarias separadas por DCC. La distribución en contracorriente se realizó bajo las condiciones establecidas en 3.3.1.. Los datos de actividad enzimática específica se refieren a concentración de Hb (mM) y se representan gráficamente frente al número de cavidad.

Las fig. 24 y 25 nos muestran los resultados de actividad enzimática específica de las dos poblaciones mencionadas.

Como puede observarse en todos los experimentos realizados, los resultados difieren de una a otra población celular. En el caso de los eritrocitos se aprecia un aumento de actividad enzimática es pecífica a medida que aumenta la edad de la célula, mientras que en la población reticulocitaria los valores de actividad enzimática específica se mantienen prácticamente constantes a lo largo de la DCC. Los resultados correspondientes a reticulocitos (fig. 25) son un índice de la homogeneidad de esta población (riqueza  $\geq 90\%$ ), según se demostró en 3.3.1. y 3.3.3.. Es lógico, por tanto, que presenten una actividad enzimática uniforme, no solo de fosfogliceratoquinasa, sino de cualquier otra enzima que se analizase. En cambio, los resultados correspondientes a eritrocitos (fig. 24) ofrecen una doble consideración:

- a) por un lado, pueden ser una demostración clara de heterogeneidad (células de distinta edad) de sus componentes, pues aparecen activi dades enzimáticas significativamente distintas en cavidades donde se han distribuido células diferentes y
- b) por otro, debería ser posible poder explicar esta diferencia de

actividad enzimática, con las correspondientes edades celulares; sin embargo, no podemos por ahora establecer una relación clara al respecto; parece como si el envejecimiento celular fuese acompañado de un incremento de la actividad fosfogliceratoquinásica; un comportamiento parecido se ha encontrado en el caso de la fosfofructoquinasa (PINILLA y LUQUE, datos sin publicar). Nuestro grupo está pretendiendo analizar todas las enzimas glicolíticas en células separadas por DCC, para poder obtener conclusiones globales acerca del proceso bioquímico del envejecimiento que pueden ser comparables con los resultados obtenidos por otros autores empleando procedimientos diferentes de separación celular (CHAPMAN y SCHAUMBURG, 1967; GANZONI y col., 1971; DENTON y col., 1975).



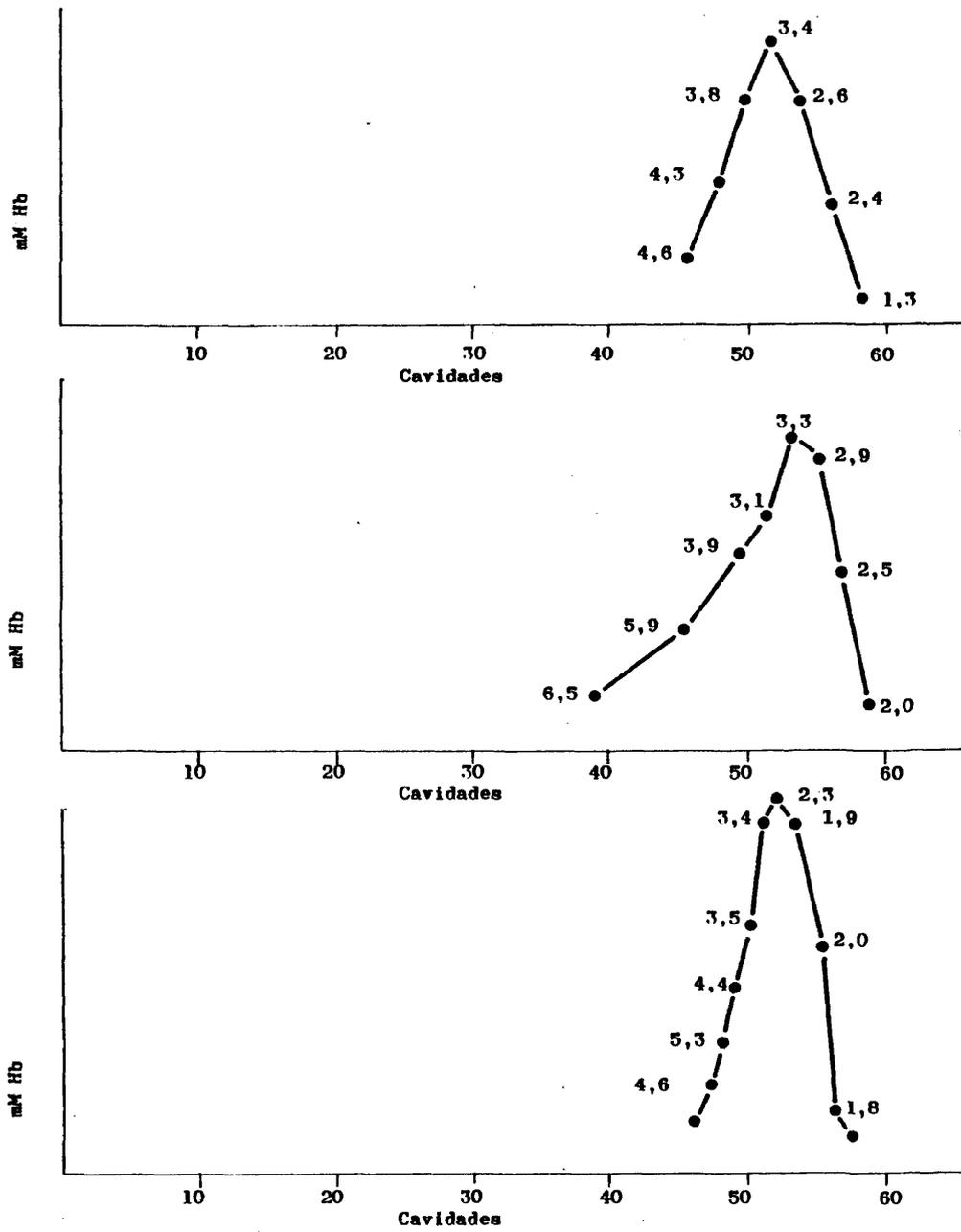


Fig. 24.- ACTIVIDAD FOSFOGLICERATOQUINASICA EN CELULAS ERITROCITARIAS DE DISTINTA EDAD.

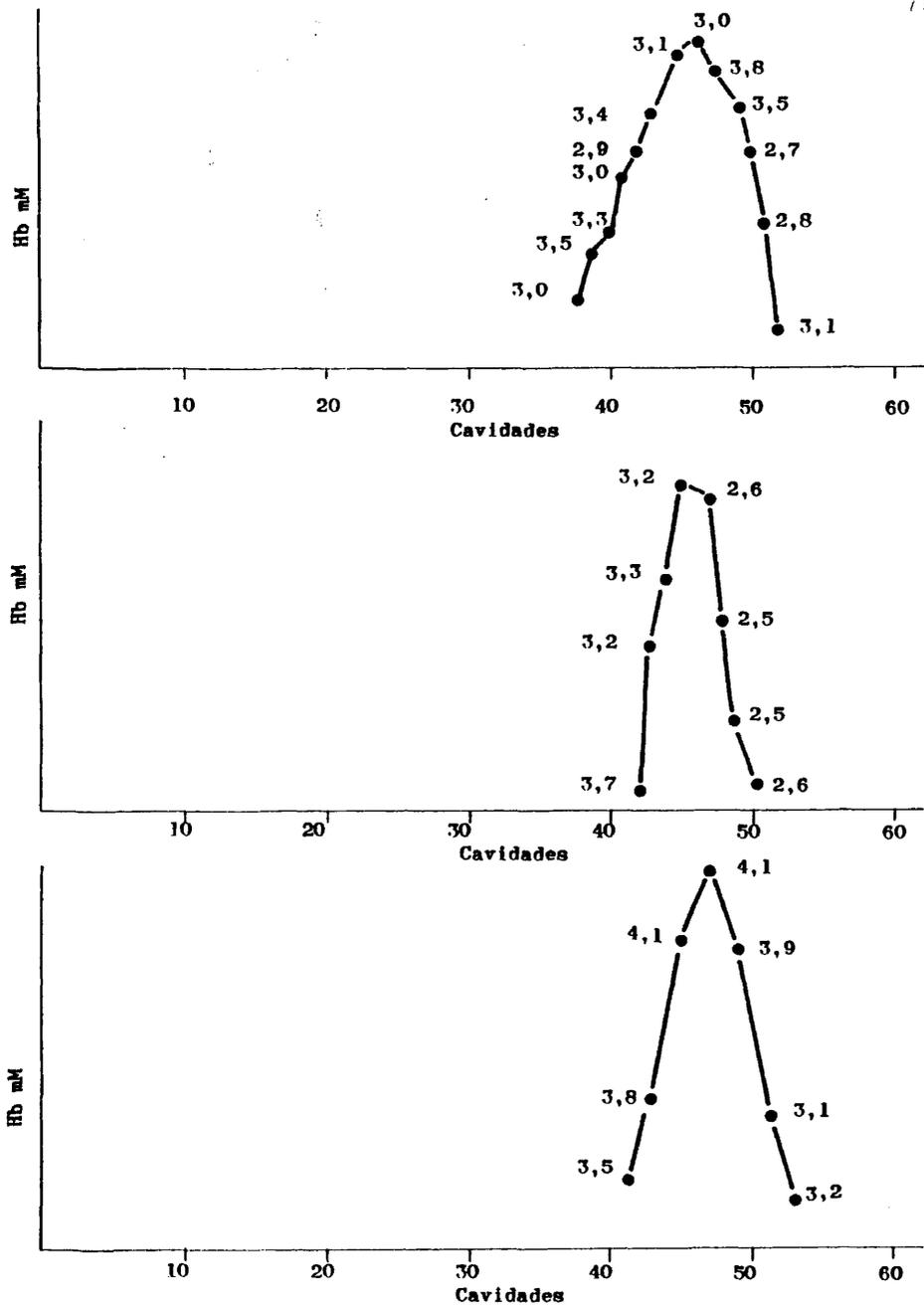


Fig. 25.- ACTIVIDAD FOSFOGLICERATOQUINASICA EN CELULAS RETICULOCITARIAS.



**CONCLUSIONES:**

1.- Al estudiar el método de ensayo de la difosfogliceratomutasa, como fase previa a su aplicación a las distintas poblaciones celulares, se ha encontrado que: el propio producto de la reacción (2,3-DPG) es el responsable de la pérdida de linealidad de su formación a partir de los 4 primeros min. de incubación.

2.- Al calcular las concentraciones de 2,3-DPG y actividades difosfogliceratomutásicas de las distintas poblaciones celulares se observa:

- a) que no se detecta 2,3-DPG, ni actividad difosfogliceratomutásica en el "pool" de células eritroideas.
- b) por el contrario, el fosfato orgánico y la enzima que lo sintetiza se encuentran presentes tanto en reticulocitos como en eritrocitos, presentando aparentemente estas últimas células el máximo de actividad enzimática.

Este aumento brusco de la actividad difosfogliceratomutásica desde células eritroideas a reticulocitos y eritrocitos, puede explicar la elevada concentración del 2,3-DPG en las células responsables de la oxigenación.

3.- En cuanto a la fosfogliceratoquinasa, no se observa aumento alguno de actividad desde las células eritroideas indiferenciadas, a las células diferenciadas. Este dato unido al aumento de difosfogliceratomutasa, indica que la especialización celular en la formación de 2,3-DPG, a diferencia de la aparición de actividad glicolítica (representada en este caso por la actividad fosfogliceratoquinásica) es un proceso específico de la eritropoyesis.

4.- Como introducción al procedimiento de DCC para separación de cé

lulas, se establecen como óptimas tanto para eritrocitos como para reticulocitos las siguientes condiciones experimentales y de partición:

- a) concentración de polímeros: 5% dextrano y 4% polietilenglicol.
- b) concentración de sales: 0,03 M ClNa y 0,09 M TFNa.

Bajo estas condiciones experimentales, los coeficientes de partición de eritrocitos y reticulocitos son: 1,85 y 1,38 respectivamente.

- 5.- Realizada la DCC de una sustancia homogénea (Vit. B12), se confirma, tanto teórica como experimentalmente, el correcto funcionamiento de la versión semiautomática de DCC empleado en esta Tesis.
- 6.- Analizados los distintos parámetros utilizados en el procedimiento de la DCC:
  - a) se demuestra que el tiempo de conservación de las células en ClNa 0,15 M. a 40C y la concentración o número de cavidades con muestra, no influyen en la DCC.
  - b) se confirma que la influencia de la concentración salina sobre la partición se manifiesta en la distribución de las células.
- 7.- Se establecen los perfiles standard de DCC para poblaciones eritrocitarias circulantes de ratas normales y poblaciones reticulocitarias circulantes de ratas fenilhidrazínicas.
- 8.- De acuerdo con sus respectivos coeficientes de partición, ambas poblaciones celulares muestran un perfil de DCC muy semejante; como consecuencia, aparece un pico único al someter a DCC una mezcla artificial de ambas.

- 9.- El procedimiento de DCC permite la separación de células integrantes de poblaciones heterogéneas como se demuestra por la aparición de diversos picos en los perfiles correspondientes a eritrocitos circulantes que contienen un 36% de reticulocitos. Este dato es indicativo de la capacidad técnica para separar células de distinto grado de maduración.
- 10.- Se confirma, por marcaje isotópico con  $^{59}\text{Fe}$ , la posición, en función de su edad, de las células integrantes de la población eritrocitaria circulante de ratas normales.
- 11.- La aparición de distintos valores de actividad fosfogliceratoquinásica en las células procedentes de la separación por DCC de una población eritrocitaria normal, es un reflejo de la distinta edad de las células componentes de dicha población, y constituye por tanto, un parámetro indicativo del proceso de envejecimiento.
- 12.- La semejanza en los valores de actividad fosfogliceratoquinásica, obtenidos al someter a DCC una población reticulocitaria de riqueza ~95% nos confirma la homogeneidad celular de esta población.
- 13.- La gran diversidad de picos observados en el perfil de DCC correspondientes al "pool" de células eritroides de médula ósea son representativas del distinto grado de diferenciación de dicha población. Este dato ofrece grandes perspectivas, ya que abre el camino al empleo de la técnica en el estudio de la diferenciación eritrocitaria desde enfoques no solo bioquímicos, sino también morfológicos, genéticos, etc.

**BIBLIOGRAFIA.**

**BIBLIOGRAFIA.**

- 1.- ALBERTSSON, P.A. (1958). *Biochim. Biophys. Acta* 27, 378.
- 2.- ALBERTSSON, P.A. y BRAID, G.D. (1962). *Exp. Cell. Res.* 28, 296.
- 3.- ALBERTSSON, P.A. (1965). *Anal. Biochem.* 11, 121.
- 4.- ALBERTSSON, P.A. (1971). "Partition of cell particles and macromolecules". Almquist & Wiksell. Estocolmo.
- 5.- ALI, M. y BROWNSTONE, Y.S. (1976 a). *Biochim. Biophys. Acta* 445, 74.
- 6.- ALI, M. y BROWNSTONE, Y.S. (1976 b). *Biochim. Biophys. Acta* 445, 89.
- 7.- ASKARI, A. y RAO, S.N. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 151, 198.
- 8.- BAGGOTT, J. (1978). *Trends Biochem. Sci.* 3, 30.
- 9.- BALDWIN, J.N. (1976). *Br. Med. Bull.* 32, 213.
- 10.- BANK, A.; RIFKIND, R.A. y MARKS, P.A. (1970). En "Regulation of hematopoiesis" (A.S. Gordon ed.). Appleton Century Crofts. New York. pg. 701.
- 11.- BANSIL, R.; HERZFELD, J. y STANLEY, H.E. (1974). *Science* 186, 929.
- 12.- BARTLETT, G.R. (1959). *J. Biol. Chem.* 234, 449.
- 13.- BARTLETT, G.R. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 156, 221.
- 14.- BENESCH, R. y BENESCH, R.E. (1967). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26, 162.
- 15.- BENESCH, R.; BENESCH, R.E. y YU, C.L. (1968). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 59, 526.
- 16.- BENESCH, R.; BENESCH, R.E. y ENOKI, Y. (1968). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 61, 1102.
- 17.- BENESCH, R. y BENESCH, R.E. (1969). *Nature.* 221, 618.
- 18.- BENESCH, R.E.; BENESCH, R. y YU, C.L. (1969). *Biochemistry.* 8, 2567.
- 19.- BENESCH, R.E.; BENESCH, R. y RENTHAL, R. (1971). *Nature New. Biol.* 234, 174.
- 20.- BENESCH, R.E. y BENESCH, R. (1974). *Adv. Protein Chem.* 28, 211.
- 21.- BEUTLER, E. (1969). *Biochem. Genet.* 3, 189.

- 22.- BEUTLER, E. (1969). *Blood*. 33, 496.
- 23.- BEUTLER, E. (1971). *Nature New Biol.* 232, 20.
- 24.- BIENZLE, V. y PJURA, W.I. (1977). *Clin. Chim. Acta* 76, 183.
- 25.- BOLTON, W.; COX, J.M. y PERUTZ, M.F. (1968). *J. Mol. Biol.* 33, 283.
- 26.- BORSOOK, H.; DEASY, C.L.; HAAGEN-Smit, A.J.; KEIGHLEY, G. y LOWY, P.H. (1952). *J. Biol. Chem.* 196, 669.
- 27.- BRENA, D.; LUZZANA, M.; PACEM PERRELLA, M.; ROSSI, F.; ROSSI-BERNARDI, L. y ROUGHTON, F.I.W. (1972). En "Advances in Experimental Medicine and Biology" Vol. 28. 19.
- 28.- BREWER, G.J. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* 192, 157.
- 29.- BREWER, G.I. ed. (1970). "Red Cell Metabolism and Function". Plenum Press. New York.
- 30.- BREWER, G.I. ed. (1972). "Haemoglobin and red Cell Structure and Function". Plenum Press. New York.
- 31.- BROOKS, D.E.; SEAMAN, G.V.F. y WALTER, H. (1971). *Nature New Biol.* 234, 61.
- 32.- BUNN, H.F.; MAY, M.H.; KOCHOLATY, W.F. y SHIELDS, C.E. (1969). *J. Clin. Invest.* 48, 311.
- 33.- DUNN, H.F. y JANDL, J.H. (1970). *New. Engl. J. Med.* 282, 1414.
- 34.- DUNN, H.F. (1971). *Science* 172, 1049.
- 35.- CHANUTIN, A. y CURNISH, R.R. (1967). *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 96.
- 36.- CHANUTIN, A. y HERMANN, E. (1969). *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 180.
- 37.- CHAPMAN, R.G. y SCHAUMBURG, L. (1967). *Brit. J. Haematol.* 13, 665.
- 38.- CHIBA, H. y SASAKI, R. (1978). "Current Topics in Cellular Regulation". (HORECKER, B.L. y STADTMAN, E.R. eds.) Academic Press. New York. pg. 75.
- 39.- COHEN, N.S.; EKHOLM, J.E.; LUTHRA, M.G. y HANAGAN, D.J. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 419, 229.
- 40.- CRAIG, L.C. y CRAIG, D. (1956). "Techniques of Organic Chemistry". Vol. 3. Parte I. (WEISSBERGER, A. ed.). Interscience Publishers. New York.
- 41.- CRAIG, I.C. (1961). "Biochemist's Handbook" Ed. C. Long. Sp.. London. pg. 98.

- 42.- CURRY, J.L. y TRENTIN, J.J. (1967). *Developm. Biol.* 15, 395.
- 43.- DENTON, N.J.; SPENCER, N. y ARNSTEIN, H.R.V. (1975). *Biochem. J.* 146, 205.
- 44.- DE VERDIER, C.H. y GROTH, T.L. (1973). *Eur. J. Biochem.* 32, 188.
- 45.- DICKERMAN, H.W.; CHENG, T.C.; KAZAZIAN, H.H. y SPIVAK, J.L. (1976). *Arch. Biochem. Biophys.* 177, 1.
- 46.- DIEDERICH, D.; DIEDERICH, D.I.; LUQUE, J. y GRISOLIA, A. (1969). *FEBS. Lett.* 5, 7.
- 47.- DIEDERICH, D.; KHAN, A.; SANTOS, A. y GRISOLIA, S. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 441.
- 48.- DUHM, J.; DEUTICKE, B. y GERLACH, E. (1969). *Pfluegers. Arch.* 306, 329.
- 49.- DUHM, J. (1971). *Pfluegers. Arch.* 326, 341.
- 50.- DUHM, J. y GERLACH, E. (1974). En "The human red cell in vitro" (GREENWALT, T.J. y JAMIESON, G.A. eds.). Grune & Stratton, New York. pg. 111.
- 51.- DUHM, J. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 385, 68.
- 52.- DUHM, J. (1976). *Pfluegers. Arch.* 363, 55.
- 53.- ERICSON, A. y DE VERDIER, C.H. (1972). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, 85.
- 54.- ERSLEV, A.J. y GABUZDA, T.G. (1975). "Pathophysiology of blood". W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- 55.- FORSTNER, J.F. y LIONETTI, J. (1968). *Biochem. Biophys. Acta* 158, 317.
- 56.- FOTHERGILL, L. y HODGSON, G.I. (1976). *Biochem. J.* 153, 145.
- 57.- FRANK, A. y OSKI, M.D. (1970). "Blood cells as a tissue". (HOLMES, W.L. ed.) Plenum Press. New York.
- 58.- GANZONI, A.M.; BARRAS, J.P. y MARTI, H.R. (1976). *Vox. Sang.* 30, 161.
- 59.- GERLACH, E.; DUHM, J. y DEUTIKE, B. (1970). En "Red Cell Metabolism and Function" (BREWER, G.J. ed.). Plenum Press. New York. pg. 155.
- 60.- GOLDWASER, E. (1975). *Fed. Proc.* 34, 2285.
- 61.- GORDON, A.S. y ZANJANI, E.D. (1970). En "Regulation of hemato-poiesis" (GORDON, A.S. ed.). Appleton Century Crofts. New York. pg. 413.

- 62.- HAMASAKI, M. y MINAKAMI, S. (1972). *J. Biochem. (Tokyo)*. 72, 981.
- 63.- HARKNESS, D.R. y ROTH, S. (1969). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 849.
- 64.- HARKNESS, D.R. y PONCE, J. (1969). *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 113.
- 65.- HARKNESS, D.R.; THOMPSON, W.; ROTH, S. y GRAYSON, V. (1970). *Arch. Biochem. Biophys.* 138, 208.
- 66.- HARRIS, J.W. y KELLERMAYER, R.W. (1970). "The red cell. Production, metabolism, destruction: normal and abnormal". Harvard University Press. Cambridge.
- 67.- HARRISON, P.R.; CONKIE, D.; AFFARA, N. y PAUL, J. (1974). *J. Cell. Biol.* 63, 402.
- 68.- HASHIMOTO, T. y YOSHIKAWA, H. (1964). *J. Biochem. (Tokyo)* 56, 279.
- 69.- HASS, L.F. y MILLER, K.B. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 970.
- 70.- HASS, L.F. y MILLER, K.B. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 3798.
- 71.- HASS, L.F.; MILLER, K.B. y FUJII, C.C. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 1602.
- 72.- HECKER, E. (1955). "Verteilungsverfahren in Laboratorium; Monographien zu Angewandte Chemie und Chemie-Ingenieur-Technik". No. 67. Verlag Chemie GmbH. Weinheim. Germany.
- 73.- HODGSON, G. (1970). En "Regulation of hematopoiesis" (GORDON, A.S. ed.). Appleton Century Crofts. New York. pg. 459.
- 74.- IATRIDIS, S.G.; IATRIDIS, P.G.; MARKIDOU, S.G. y RAGATZ, B.H. (1975). *Science* 187, 259.
- 75.- IKURA, K.; SASAKI, R.; MARITA, H.; SUGIMOTO, E. y CHIBA, H. (1976). *Eur. J. Biochem.* 66, 515.
- 76.- ITANO, H. y ROBINSON, E. (1956). *J. Am. Chem. Soc.* 78, 6415.
- 77.- JACOBASCH, G.; MINAKAMI, S. y RAPOPORT, S.M. (1974). En "Cellular and Molecular Biology of erythrocytes". (YOSHIKAWA, H. y RAPOPORT, S.M. eds.). MTP Co. London. pg. 55.
- 78.- JAMES, E.; HURST, R.O. y GLYNN, T.S. (1971). *Can. J. Biochem.* 49, 1183.
- 79.- JOYCE, B.K. y GRISOLIA, S. (1959). *J. Biol. Chem.* 234, 1330.

- 80.- KAPPEL, W.K.; SHEIDLEY, R.H.; MILLER, K.B. y HASS, L.F. (1975).  
Fed. Proc. 34, 576.
- 81.- KAPPEL, W.K. y HASS, L.F. (1976). Biochemistry. 15, 290.
- 82.- KATZ, J.H. (1965). Scand. J. Haematol. 6 Suppl. 15.
- 83.- KILMARTIN, J.V. y ROSSI-BERNARDI, L. (1973). Physiol Rev. 53,  
836.
- 84.- KILMARTIN, J.V. (1976). Brit. Med. Bull. 32, 209.
- 85.- KILMARTIN, J.V. (1977). Trends Biochem. Sci. 2, 247.
- 86.- KING, T.P. y CRAING, L.C. (1962). "Methods of Biochemical Anaysis".  
Vol. 10, (GLICK, D. ed.) Interscience Publishers Inc. New York.  
pg. 201.
- 87.- KRANTZ, S.B. y GOLDWASSER, E. (1965). Biochim. Biophys. Acta  
103, 325.
- 88.- LARSSON-RAZNIKIEWICZ, M. (1967). Biochim. Biophys. Acta 132, 33.
- 89.- LEVY, L.M.; WALTER, H. y SASS, M.D. (1959). Nature 184, 643.
- 90.- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.I.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951).  
J. Biol. Chem. 193, 265.
- 91.- LUQUE, J.; DIEDERICH, D. y GRISOLIA, S. (1969). Biochem. Bionhys.  
Res. Commun. 36, 1019.
- 92.- LUQUE, J. y PINILLA, M. (1973). An. R. Acad. Farm. 39, 309.
- 93.- LUQUE, J.; RONCALES, P.; TEJERO, C. y PINILLA, M. (1977). Acta  
Biol. Med. Germ. 36, 631.
- 94.- MARKS, P.A.; RIFKIND, R.A. y DANON, D. (1963). Proc. Nat. Acad.  
Sci. USA, 50, 336.
- 95.- Mc CULLOCH, E.A. (1970). En "Regulation of hematopoiesis" (GOR-  
DON, A.S. ed.) Appleton Century Crofts. New York. pg. 133.
- 96.- MEL, H.C. (1963). Nature 200, 423.
- 97.- MEL, H.C.; MITCHELL, L.T. y THORELL, B. (1965). Blood 25, 63.
- 98.- MOORE, M.A.S.; METCALF, D. (1970). Brit. J. Haematol. 18, 279.
- 99.- OSKI, F.A.; GOTTLIEB, A.I.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. y MILLER,  
W.W. (1969). New. Engl. J. Med. 200, 1165.
- 100.- OSKI, F.A.; TRAVIS, S.F.; MILLER, L.D.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.  
y CANNON, E. (1971). Blood 37, 52.
- 101.- ORSTRON, A. (1951). Arch. Biochem. Biophys. 33, 484.

- 102.- PAUL, J. (1976). *Brit. Med. Bull.* 32, 277.
- 103.- PERUTZ, M.F. (1967). *Endeavour* 97, 3.
- 104.- PERUTZ, M.F. (1976). *Brit. Med. Bull.* 32, 195.
- 105.- PERUTZ, M.F. (1979). *Invest. Ciencia* 29, 40.
- 106.- PINILLA, M.; LUQUE, J. y SANTOS-RUIZ, A. (1973). *Ann. Pharm. Franc.* 31, 503.
- 107.- PINILLA, M. y LUQUE, J. (1977). *Mol. Cell. Biochem.* 15, 219.
- 108.- PIZER, L.L. (1962) En "The Enzymes" (BOYER, P.D.; LARDY, H. y MYRBACK, M. eds.). Academic Press. New York. Vol 6, 179.
- 109.- PONCE, J.; ROTH, S. y HARKNESS, D.R. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 250, 63.
- 110.- RAO, D.R. y OESPER, P. (1964). *Biochem. J.* 81, 405.
- 111.- RAPOPORT, S. y GUEST, G.M. (1939). *J. Biol. Chem.* 129, 781.
- 112.- RAPOPORT, S. y LUEBERING, J. (1950). *J. Biol. Chem.* 185, 507.
- 113.- RAPOPORT, S. y LUEBERING, J. (1951). *J. Biol. Chem.* 189, 683.
- 114.- RAPOPORT, S. y LUEBERING, J. (1952). *J. Biol. Chem.* 196, 583.
- 115.- RAPOPORT, S. (1968). En "Essays in Biochemistry" (CAMPBELL, P.N. y GREVILLE, G.D. eds.). Vol. 4. Academic Press. New York. pg. 69.
- 116.- RAPOPORT, S. (1970). *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52, 1169.
- 117.- RAPOPORT, S.; ROSENTHAL, S.; SCHEWE, T.; SCHULZE, M. y MILLER, M. (1974). En "Cellular and Molecular biology of erythrocytes" (YOSHIKAWA, H. y RAPOPORT, S. eds.). Urban & Schwarzenberg. Munich. pg. 93.
- 118.- RAPOPORT, T.A.; HEINRICH, R. y RAPOPORT, S.M. (1976). *Biochem. J.* 154, 449.
- 119.- RAPOPORT, I.; BERGER, H.; ELSNER, R. y RAPOPORT, S. (1977). *Eur. J. Biochem.* 73, 421.
- 120.- RAY, W.J.Jr. y PECK, E.J.Jr. (1972). En "The enzymes" (BOYER, P.D. ed.). Academic Press. New York. Vol. 6, pg. 407.
- 121.- REISSMANN, K.R. (1950). *Blood* 5, 372.
- 122.- RIFKIND, R.A.; DANON, D. y MARKS, P.A. (1964). *J. Cell. Biol.* 22, 599.
- 123.- RIFKIND, R.A. (1974). En "Concepts of development" (LASH, J. y WHittaker, J.R. eds.) Sinauer Associates Inc. Publishers. Stamford. pg. 149.

- 124.- RIGGS, A. (1972). En "Biochemical regulatory mechanisms in eukaryotic cells". (KUN, E. y GRISOLIA, S. eds.). John Wiley Ltd. Londres. pg. 1.
- 125.- RONCALES, P. y LUQUE, J. (1977). Comunicación. 7º Congreso SEB. Pamplona.
- 126.- RONCALES, P. (1978). Tesis Doctoral. Madrid.
- 127.- ROSA, R.; GAILLARDON, J. y ROSA, J. (1973). Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 536.
- 128.- ROSA, R.; NAJEAN, Y.; PREHV, M.; BEUZARD, Y. y ROSA, J. (1977). Blood 50 suppl. 84.
- 129.- ROSE, Z.B. (1968). J. Biol. Chem. 243, 4810.
- 130.- ROSE, Z.B. y LIEBOWITZ, J. (1970). J. Biol. Chem. 245, 3232.
- 131.- ROSE, Z.B. (1970). En "Red cell Metabolism and Function". (BREWER, J. ed.). Plenum Press. New York. pg. 137.
- 132.- ROSE, Z.B. y WHALEN, R.G. (1973). J. Biol. Chem. 248, 1513.
- 133.- ROSE, Z.B. (1973). Arch. Biochem. Biophys. 158, 903.
- 134.- ROSE, Z.B. (1975). "Methods in enzymology" Vol. 52. (WOOD, W.A. ed.). Academic Press. New York. pg. 450.
- 135.- ROSE, Z.B. y DUBE, S. (1976). Arch. Biochem. Biophys. 177, 284.
- 136.- RUIZ-LOPEZ, M.C.; TEJERO, C.; PINILLA, M. y LUQUE, J. (1979). An. Quim. RSEFQ. 75, 156.
- 137.- SASAKI, R.; IKURA, K.; SUGIMOTO, E. y CHIBA, H. (1975). Eur. J. Biochem. 50, 581.
- 138.- SASS, M.D.; LEVY, L.M. y WALTER, H. (1963). Can. J. Biochem. Physiol. 41, 2287.
- 139.- SCHEWE, CH.; JACOBASCH, G. y RAPOPORT, S. (1972). Acta. Biol. Med. Germ. 28, 437.
- 140.- SCHROTER, W.; NEYDEN, H. (1965). Biochem. Zeit. 341, 387.
- 141.- SCOPES, E. (1973). "The enzymes" (BOYER, P.D. ed.). Academic Press. New York. Vol 8, pg. 335.
- 142.- SIMON, E.R. y TOPPER, Y.J. (1957). Nature 180, 1211.
- 143.- SKARBERG, K.O. (1974) Acta Med. Scand. 195, 291.
- 144.- SKUTELSKY, E. y DANON, D. (1970). Exp. Cell. Res. 60, 427.
- 145.- SPIEGEL, M.R. (1970). "Teoría y Problemas de estadística" Mc Graw-Hill. Mexico.

- 146.- STEPHENSON, J.R.; AXELRAD, A.A.; Mc LEOD, D.C. y SHREEVE, M.M. (1971). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68, 1542.
- 147.- STRIVASTAVA, S.K. y BEUTLER, E. (1972). Arch. Biochem. Biophys. 148, 249.
- 148.- TARBUTT, R.G. (1969). Brit. J. Haematol. 16, 9.
- 149.- TAVASSOLI, M. y CROSDY, W.H. (1973). Science 179, 912.
- 150.- TAVLE, P.V. y SINGER, R. (1956). Adv. Protein Chem. 11, 237.
- 151.- TERADA, M.; CANTOR, L.; METAFORA, S.; RIFKIND, R.A.; MARKS, P.A. y BANK, A. (1972). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69, 3575.
- 152.- TILL, J.E. y Mc CULLOCH, E.A. (1971). En "Developmental Aspects of the cell cycle" (CAMERON, I.L.; PADILLA, G.M. y ZIMMERMAN, A. N. eds.). Academic Press. New York. pg. 297.
- 153.- TILL, J.E.; PRICE, G.B.; MAK, T.W. y Mc CULLOCH, E.A. (1975). Fed. Proc. 34, 2279.
- 154.- TOMODA, A.; HAMASAKI, M. y MINAKAMI, S. (1975). Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 1127.
- 155.- TORRANCE, J.D. (1974). Clin. Chim. Acta 50, 103.
- 156.- TRUMAN, D.E.S. (1974). "The biochemistry of cytodifferentiation" Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- 157.- VAN KAMPEN, E.J. y ZIJLSTRA, W.G. (1961). Clin. Chim. Acta 6, 538.
- 158.- WALTER, H.; SELBY, F.W. y BRAKE, J.M. (1964). Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 497.
- 159.- WALTER, H.; WINGE, R. y SELBY, F.W. (1965). Biochim. Biophys. Acta 109, 293.
- 160.- WALTER, H. y SELBY, F.W. (1966). Biochim. Biophys. Acta 112, 146.
- 161.- WALTER, H. y ALBERTSSON, P.A. (1966). Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 670.
- 162.- WALTER, H. y SELBY, F.W. (1967). Biochim. Biophys. Acta 148, 517.
- 163.- WALTER, H.; KROB, E.J.; GARZA, R. y ASCHER, G.S. (1967 a) Exp. Cell. Res. 55, 57.
- 164.- WALTER, H.; SELBY, F.W. y GARZA, R. (1967 b). Biochem. Biophys. Acta 136, 148.
- 165.- WALTER, H.; GARZA, R. y COYLE, R.P. (1968 a). Biochim. Biophys. Acta 156, 409.
- 166.- WALTER, H.; GARZA, R. y SELBY, F.W. (1968 b). Exp. Cell. Res. 49, 679.

- 167.- WALTER, H.; KROB, E.J. y GARZA, R. (1968 c). *Biochim. Biophys. Acta* 165, 507.
- 168.- WALTER, H.; KROB, E.J.; GARZA, R. y ASCHER, G.S. (1969 a). *Exp. Cell. Res.* 55, 57.
- 169.- WALTER, H.; KROB, E.J. y ASCHER, G.S. (1969 b). *Exp. Cell. Res.* 55, 279.
- 170.- WALTER, H.; ERIKSSON, G.; TAUBE, D.; ALBERTSSON, P.A. (1970). *Exp. Cell. Res.* 64, 486.
- 171.- WALTER, H. (1975). En "*Methods in cell Biology*" 9, 25.
- 172.- WISS, P.A. (1973). *Differentiation* 1, 3.
- 173.- WEISSBLUTH, M. (1974). "*Hemoglobin Cooperativity and Electronic properties*". Springer Verlag. Berlin.
- 174.- WINTROBE, M.M. (1948). "*Hematologia clínica*". (Ed. Interamericana). México.
- 175.- YIP, L.C. y BALIS, M.E. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 722.
- 176.- YOSHIDA, A. (1975). En "*Methods in Enzymology*". 42, 144.

