

R. 6522

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

ESTUDIO DE LA REGULACION A LARGO PLAZO DE LAS ENZIMAS
PRODUCTORAS DE NADPH: IMPLICACION DEL REQUERIMIENTO DE NADPH

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

Director:

Dr. D. Alberto Machado de la Quintana

Tesis que presenta el Ldo.
Antonio Ayala Gómez para optar
al grado de doctor en Farmacia

Sevilla, Noviembre de 1.986

A Elsa, Canela y Violeta.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a:

D. Alberto Machado por su manera de dirigir la realización de este trabajo y por su preocupación en mi formación, así como por su continuo esfuerzo para que nuestro laboratorio funcione.

A Josefina Cano por sus oportunas palabras de ánimo y porque gracias a ella le tengo mucho apego a lo que hago.

A María por toda su valiosa aportación en los preliminares de este trabajo y por su compañerismo.

A Isabel Fabregat por todo lo que me ha enseñado, por su amistad y por su colaboración.

A mi buen amigo Martiniano por soportarme hace ya mucho tiempo y por su ayuda.

A Juan Bautista por sus consejos y por los buenos momentos pasados en el laboratorio.

A Antonio "J" por su predisposición a ayudarme en todo momento y por sus sabias opiniones acerca de no pocos temas.

A Berta por sus ocurrencias y por su muy buena mano en el arte de la fotografía en condiciones adversas.

A Enrique, Elisa, Consuelo, y Cristina por sus aportaciones en el buen transcurrir de este Departamento.

A Pilar por su compañía y por su incondicional apoyo, entre otras muchas cosas.

A Rafael Ayala por sus continuas arengas para que terminase este trabajo y por haber soportado la lectura íntegra del mismo.

A mis padres porque gracias a ellos me ha sido posible alcanzar importantes metas.

ABREVIATURAS

BCNU	1,3-bis(cloroetil)-1-nitrosourea
DEAE-	Diethylaminoetil-
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato)
DTT	Ditiotreitol
EM	Enzima málica
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GR	Glutation reductasa
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
IDH	Isocitrato deshidrogenasa-NADP
NBT	Azul de tetrazolio
NEM	N-etilmaleimida
6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa
PMS	Sulfato de fenazina
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Error estandar de la media
TCA	Acido tricloroacético

INDICE.

	<u>Página</u>
<u>1 INTRODUCCION.</u>	11
<u>2 PLAN DE TRABAJO.</u>	21
<u>3 MATERIALES Y METODOS.</u>	24
3.1 Animales de experimentación	25
3.2 Aparatos	25
3.3 Productos	25
3.4 Tratamiento de las ratas	26
3.5 Determinación de las actividades enzimáticas.	27
3.5.1 Preparación de los homogeneizados	27
3.5.2 Determinación de glucosa-6-fosfato des- hidrogenasa	28
3.5.3 Determinación de 6-fosfogluconato des- hidrogenasa	28
3.5.4 Determinación de enzima málica	29
3.5.5 Determinación isocitrato deshidrogena- sa-NADP	29
3.5.6 Determinación de glutathion reductasa ..	30
3.5.7 Determinación de NADPH-citocromo c re- ductasa	30
3.5.8 Determinación de proteínas	30
3.6 Purificación de la enzima málica hepática ...	31
3.6.1 Preparación del extracto	31
3.6.2 Precipitación fraccionada con sulfato de amonio	32
3.6.3 Cromatografía de filtración en Sephadex G-200	32
3.6.4 Cromatografía de intercambio iónico ...	33

3.6.5 Cromatografía de afinidad en NADP-agarosa	33
3.7 Purificación de 6-fosfogluconato deshidrogenasa	34
3.7.1 Cromatografía de filtración en Sephadex G-200	34
3.7.2 Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa	34
3.7.3 Cromatografía de afinidad en NADP-agarosa	35
3.8 Purificación de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	35
3.8.1 Cromatografía de filtración en Sephadex G-200	35
3.8.2 Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa	36
3.8.3 Cromatografía de afinidad en NADP-agarosa	36
3.9 Electroforesis	36
3.10 Preparación de los antisueros	38
3.11 Técnica de doble inmunodifusión	39
3.12 Titulaciones de los anticuerpos obtenidos ...	39
3.13 Inmunoprecipitación de las actividades enzimáticas	40
3.14 Medida de la síntesis de ácidos grasos "in vivo"	40
3.15 Determinación de glutation	41
3.16 Determinación de NADP y NADPH	42
4 RESULTADOS.	44
4.1 Purificación de la enzima málica	45
4.2 Purificación de 6-fosfogluconato deshidrogenasa	51

4.3 Purificación de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	56
4.4 Caracterización y titulación de los anticuerpos obtenidos	62
4.5 Efecto de la variación en el consumo de NADPH sobre las actividades de las enzimas productoras de NADPH hepáticas y sobre la razón NADPH/NADP. Efecto comparativo de la inducción e inhibición de la síntesis de ácidos grasos	69
4.6 Estudio comparativo del efecto de la inducción e inhibición de la síntesis de los ácidos grasos sobre las actividades de las enzimas productoras de NADPH y sobre la razón NADPH/NADP en el tejido adiposo de ratas	80
4.7 Efecto de la variación en el consumo de NADPH causada por la administración de sustancias xenobióticas sobre las actividades de las enzimas productoras de NADPH de hígado de rata.	87
4.8 Efecto comparativo de la activación e inhibición de los procesos de detoxificación que usan NADPH sobre las actividades específicas de las enzimas productoras de NADPH de tejido adiposo	96
4.9 Efecto de la dieta pobre en proteínas sobre las actividades de las enzimas productoras de NADPH, sobre los sistemas de detoxificación y sobre el contenido de glutatión en hígado de rata: efecto de la suplementación de la dieta pobre en proteínas con diferentes aminoácidos sobre la inducción de la enzima málica en estas condiciones	104

<u>5 DISCUSION.</u>	109
5.1 Efecto sobre las enzimas productoras de NADPH del aumento o disminución en el requerimiento de NADPH, provocado por la activación e inhibición de la síntesis de ácidos grasos	112
5.2 Efecto de la activación e inhibición de los sistemas de detoxificación que consumen NADPH sobre las enzimas productoras de NADPH	117
5.3 Posible implicación de la enzima málica en los procesos de detoxificación	119
<u>6 CONCLUSIONES.</u>	126
<u>7 BIBLIOGRAFIA.</u>	130

1. INTRODUCCION

El NADPH es uno de los principales productos finales de los procesos metabólicos, siendo al mismo tiempo sustrato de importantes reacciones metabólicas y de detoxificación.

Dos importantes procesos consumidores de NADPH en hígado son la síntesis de los ácidos grasos y las reacciones de detoxificación.

La síntesis "de novo" de los ácidos grasos es catalizada por dos sistemas enzimáticos localizados en el citoplasma: acetil-CoA-carboxilasa y ácido graso sintetasa. Los niveles de estos sistemas enzimáticos cambian en respuesta a una gran variedad de estímulos nutricionales y hormonales como, por ejemplo, el ayuno-realimentación con dieta rica en hidratos de carbono o la administración de insulina (Valope y Vagelos, 1.976, revisión). Se han sugerido otros factores implicados en la regulación de la síntesis de ácidos grasos. Así, la actividad de la acetil-CoA-carboxilasa es afectada por varios metabolitos: ácidos tri- y di-carboxílicos (Matsushashi y col., 1.964; Moss y col., 1.972), malonil CoA (Hashimoto y Numa, 1.971) y algunos metabolitos del triptófano (Hashimoto y col., 1.971). Por otro lado, el complejo ácido graso sintetasa puede ser activado por varios azúcares fosforilados, siendo la fructosa 1,6-difosfato el más efectivo. Dicho metabolito revierte la inhibición por exceso de sustrato malonil-CoA (Numa y Yamashita, 1.974; Wakil y col., 1.983).

En relación a los procesos de detoxificación, los principales sistemas que requieren NADPH como cofactor son el sistema citocromo P-450 monooxigenasa y el sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa.

El sistema P-450 monooxigenasa, de localización microsomal, consiste en una flavoproteína, NADPH-citocromo P-450 reductasa, y un número de isoenzimas citocromo P-450, algunas de las cuales han sido purificadas y caracterizadas en detalle (Lu y West, 1.980; Vaxman y Walsh, 1.982). Este sistema cataliza la oxidación de un gran número de compuestos y puede ser inducido por la administración de barbitúricos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, insecticidas, etc. (Thomas y col., 1.982; Klimex y col., 1.982). Su función puede ser bloqueada por inhibidores selectivos, tales como 7,8-benzoflavona (Wiebel y col., 1.971), metirapona (Luu-The y col., 1.980), siendo el monóxido de carbono el más frecuentemente utilizado (Estabrook y col., 1.963). Este sistema requiere Oxígeno molecular como cofactor, y depende también del aporte de equivalentes reducidos para su función. Estos derivan principalmente del NADPH citosólico.

La glutatión peroxidasa es una enzima que presenta una alta actividad en el hígado, que varía considerablemente bajo la influencia de diversos factores fisiológicos, incluyendo el Selenio de la dieta (Lawrence y Burk, 1.976). Esta enzima cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno hasta agua o la reducción de hidroperóxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes, utilizando glutatión reducido (GSH). El glutatión oxidado formado es entonces reducido por la acción de la glutatión reductasa (GR), enzima que utiliza NADPH. Ambos procesos son citoplasmáticos.

Con respecto a las vías productoras de NADPH, las cuatro reacciones principales implicadas en el suministro de este nucleótido en los organismos superiores están catalizadas por las dos deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, la enzima málica y la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP.

El ciclo de las pentosas fosfato es una vía citoplasmática alternativa de oxidación de la glucosa, que produce NADPH en dos reacciones catalizadas por las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (D-glucosa-6-fosfato:NADP⁺ 1-oxidoreductasa, EC 1.1.1.49) (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-fosfo-D-gluconato:NADP⁺ 2-oxidoreductasa (descarboxilante), EC 1.1.1.40) (6PGDH).

La enzima málica (L-malato:NADP⁺ oxidoreductasa (oxalacetato descarboxilante), EC 1.1.1.40) (EM) fue originariamente encontrada en la fracción citoplasmática de las células hepáticas, y cataliza la descarboxilación oxidativa del malato a piruvato.

La isocitrato deshidrogenasa-NADP (treo-D₂-isocitrato:NADP⁺ oxidoreductasa (descarboxilante), EC 1.1.1.42) (IDH) cataliza la descarboxilación de isocitrato a α-cetoglutarato, y se localiza tanto en el citoplasma como en las mitocondrias de hígado de rata.

En relación a las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, existen dos tipos de regulación, al igual que en el caso de cualquier otra enzima: uno a corto plazo o regulación "fina", en el que se modifica la actividad de la proteína enzimática preexistente, y

otro a largo plazo, en el que se modifica la actividad mediante cambios en la cantidad de proteína enzimática.

Respecto a la regulación a corto plazo, este tipo de regulación se suponía existente únicamente sobre la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Varios autores (Eggleston y Krebs, 1.974) establecieron que el flujo a través del ciclo de las pentosas fosfato era únicamente controlado en la etapa inicial (reacción de G6PDH), ya que este paso tiene dos características especiales: 1) el producto inmediato es una lactona que es rápidamente hidrolizada a 6-fosfogluconato, y 2) la inhibición de la G6PDH por uno de sus productos: el NADPH. Estos autores encontraron que existe una completa inhibición de esta enzima cuando la razón NADPH/NADP es de aproximadamente 9. Puesto que en el citoplasma de hígado de rata la razón de nucleótidos libres es del orden de 100 (Veech y col., 1.969), sería imposible que el ciclo de las pentosas fosfato operase "in vivo". Este hecho obligó a la búsqueda de moduladores de esta actividad.

Al mismo tiempo, Sapag-Hagar (1.973) sugirieron la existencia de un imbalance incompatible con el normal funcionamiento del ciclo de las pentosas fosfato, ya que la velocidad máxima de 6PGDH es menor que la de G6PDH y su sensibilidad a la inhibición por NADPH en hígado es mayor.

En la búsqueda de posibles moduladores, Eggleston y Krebs (1.974) encontraron que el GSSG, a concentraciones fisiológicas, era capaz de invertir la inhibición de G6PDH por el NADPH, para lo cual era necesario un

cofactor proteico presente en el hígado y otros tejidos. Sin embargo, este resultado se encuentra actualmente muy cuestionado.

González y Lagunas (1.977) estudiaron también posibles moduladores de ambas enzimas. Ninguno de los estudiados tuvo ningún efecto sobre la inhibición de NADPH, y sólo la ribulosa 5-fosfato y la ribosa 5-fosfato fueron inhibidores de la 6PGDH. Sin embargo, esta inhibición pareció no tener significado fisiológico, puesto que las concentraciones fisiológicas de estos compuestos eran menores que las constantes de inhibición encontradas.

Recientemente, Fabregat y col. (1.985) han propuesto que la regulación del ciclo de las pentosas fosfato no estaría producida por ningún tipo de efector alostérico, sino que ésta sería debida únicamente a variaciones en la razón NADPH/NADP. Esta razón es capaz de producir la regulación de ambas enzimas, ya que las reacciones que catalizan se encuentran fuertemente desplazadas del equilibrio en la dirección de producción de NADPH, causa por la cual esta razón tiende a mantenerse alta en todas las condiciones fisiológicas. Las reacciones que desplazan el equilibrio son: la actuación de la lactonasa para la 6PGDH y los mecanismos de eliminación del CO₂ en todos los demás casos (6PGDH, EM e IDH). Esto permitiría además que todas las enzimas productoras de NADPH pudieran estar bajo un sistema de control a corto plazo por la razón NADPH/NADP. Esto ha sido demostrado para la fase oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato en hepatocitos (Fabregat y col., 1.985), adipo-

citos (Fabregat y col., 1.986) y acinis (Revilla y col., 1.986) aislados de ratas, así como para la enzima málica en adipocitos (Fabregat y col. 1.986) y acinis (Revilla y col., 1.986) también de ratas. Todas estas enzimas son fuertemente activadas por todas aquellos compuestos o circunstancias metabólicas que aumentan el consumo de NADPH, y son inhibidas cuando se produce una disminución de este consumo.

Con respecto a la regulación a largo plazo, que implica cambios en la cantidad de enzima, ésta es conocida desde antiguo (Fitch y Chaikoff, 1.960) y tiene lugar en condiciones en que también se activan algunas vías consumidoras de NADPH. En hígado, las concentraciones de G6PDH y 6PGDH cambian drásticamente en respuesta a diferentes estímulos hormonales y nutricionales. Así, la actividades de estas dos enzimas aumentan 5-10 veces 1) cuando las ratas se alimentan con una dieta de alto contenido glucídico (Fitch y Chaikoff, 1.960; Tepperman y Tepperman, 1.963), 2) durante la hiperlipogénesis adaptativa, causada por la realimentación de ratas ayunadas con una dieta rica en hidratos de carbono y libre de lípidos (Tepperman y Tepperman, 1.964) y 3) por acción de determinadas hormonas: insulina (Freedland y col., 1.966; Rudak y col., 1.971), glucocorticoides (Berdanier y col., 1.976; Berdanier y Shubeck, 1.979) y hormona tiroidea (Miksicek y Towle, 1.982). En algunos casos se ha sido descrito que esta inducción es el resultado de un incremento en la velocidad de síntesis de las enzimas como consecuencia de un aumento en la concentración celular de sus m-RNA (Miksicek y Towle, 1.982; Sun y Holten, 1.978).

Otra enzima muy relacionada con las dos anteriores, por su capacidad de generar NADPH, es la enzima málica. Los cambios en la actividad de esta enzima relacionados con modificaciones en la dieta han sido fundamentales para asignar a esta enzima un importante papel en la lipogénesis. Su inducibilidad por una gran variedad de estímulos hormonales y nutricionales ha sido muy estudiada (Fitch y Chaikoff, 1.960; Young y col., 1.964; Katsurada y col., 1.983; Drake y col., 1.983; Nepokroeff y col., 1.974; Silpananta y Goodridge, 1.971; Goodridge y col., 1.984), presentando en este sentido características comunes con las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato. En algunas de estas situaciones se ha descrito que el aumento en la actividad es consecuencia de un aumento en la síntesis de la enzima secundaria a un aumento en la concentración celular de su m-RNA (Hutchison y Holten, 1.978; Goodridge y Adelman, 1.976; Towle y col., 1.980; Mariash y col., 1.980; ; Magnuson y Nikodem, 1.983; Jump y col., 1.984). Existe, sin embargo, un número de observaciones que sugieren la participación de esta enzima en otros procesos metabólicos, aparte de la producción de NADPH para la biosíntesis de ácidos grasos. Así, se ha descrito una inducción específica de la enzima málica, sin cambios en la actividad de otras enzimas lipogénicas, cuando las ratas se alimentan con una dieta de bajo contenido proteico (Frenkel y col., 1.972).

Otra de las enzimas productoras de NADPH es la isocitrato deshidrogenasa-NADP (IDH). . Esta enzima ,que presenta unos perfiles de desarrollo totalmente diferentes a los encontrados para las tres enzimas anteriores (Andrés y col., 1.980), no sufre variación

alguna en su actividad ante los cambios en la dieta que afectan a la lipogénesis (Veech y col., 1.969), lo que hace suponer que esta enzima no tiene el sistema de control a largo plazo.

Todos estos datos nos permiten señalar que las enzimas productoras de NADPH son reguladas a corto plazo por la razón NADPH/NADP.

En cuanto a la regulación a largo plazo, por la que se modifican los niveles de estas enzimas, ya hemos mencionado que la inducción de G6PDH, 6PGDH y EM tiene lugar, generalmente, en condiciones en las que al mismo tiempo se produce una activación de las vías consumidoras de NADPH. Teniendo en cuenta esto, podemos sugerir que las actividades de G6PDH, 6PGDH y EM podrían ser reguladas a través de un mecanismo que implicase cambios en el requerimiento de NADPH. Así, un aumento o disminución en el requerimiento de NADPH durante suficiente tiempo, produciría, respectivamente, el aumento o disminución en los niveles de G6PDH, 6PGDH y EM, independientemente de la identidad de la vía consumidora de NADPH que hubiese sido activada o inhibida.

Con el fin de elucidar el posible papel desempeñado por el requerimiento de NADPH en la regulación a largo plazo de las enzimas productoras de NADPH, hemos realizado un estudio sistemático del efecto de los cambios en el flujo a través de diferentes vías consumidoras de NADPH sobre las cantidades y actividades de las enzimas G6PDH, 6PGDH y EM.

En nuestros experimentos, la activación de las vías consumidoras de NADPH se ha llevado a cabo: a) mediante la activación de la síntesis de los ácidos grasos, en respuesta a cambios en la dieta (ayuno-realimentación) o a la administración de insulina, y b) mediante la administración de productos como t-butil hidroperóxido, Fenobarbital y Bezafibrato, los cuales son metabolizados a través de sistemas de detoxificación que consumen NADPH.

La inhibición de estas vías consumidoras se ha producido por la administración de inhibidores específicos tales como Bezafibrato, el cual produce la inhibición de la síntesis de ácidos grasos, y BCNU, un inhibidor de la GR (Frischer y Ahmad, 1.977).

En estas circunstancias, hemos observado que un aumento en el consumo de NADPH conduce al aumento de la actividad específica de una o varias enzimas productoras de NADPH, y que cuando se previene este incremento en el consumo de NADPH los niveles de estas enzimas no cambian o son disminuidos.

Los resultados obtenidos corroboran nuestra anterior hipótesis, que es también confirmada por los valores de la razón NADPH/NADP encontrados en estas condiciones.

2. PLAN DE TRABAJO

2.1 Purificación de las enzimas productoras de NADPH estudiadas:

- Enzima málica
- glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- 6-fosfogluconato deshidrogenasa

2.2 Obtención de los anticuerpos frente a estas tres enzimas

2.3 Estudio del efecto sobre las actividades y cantidades de las enzimas productoras de NADPH y sobre la razón NADPH/NADP, en hígado y tejido adiposo, de:

2.3.1 La activación de la síntesis de ácidos grasos mediante el ayuno-realimentación o la administración de insulina.

2.3.2 La inhibición de la síntesis de ácidos grasos mediante la administración de Bezafibrato a ratas que están bajo condiciones metabólicas activadoras de la lipogénesis.

2.4 Estudio del efecto sobre las actividades y cantidades de las enzimas productoras de NADPH y sobre la razón NADPH/NADP, en hígado y tejido adiposo, de:

2.4.1 La activación de las enzimas de detoxificación que consumen NADPH (glutathion reductasa y NADPH-citocromo P-450 reductasa) mediante la administración de t-butil hidroperóxido, Fenobarbital y Bezafibrato.

2.4.2 La inhibición de las enzimas de detoxificación que consumen NADPH mediante la administración de BCNU.

2.5 Estudio de la inducción de la enzima málica en respuesta de la privación de proteínas en la dieta.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Los experimentos se han llevado a cabo utilizando ratas hembras de la raza Wistar de pesos comprendidos entre 150-250 g, criadas en el animalario de la Facultad de Farmacia. Las inmunizaciones con las enzimas purificadas se han realizado en conejos Neozelandeses blancos, de aproximadamente 1 año de edad.

3.2 APARATOS.

Las determinaciones espectrofotométricas se efectuaron en un espectrofotómetro Pye Unicam SP 1700 de Philips. Las medidas radiométricas se hicieron en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1800. Las centrifugaciones se realizaron en una ultracentrífuga Beckman mod. Spinco L/L2, en una centrifuga Kontron Centrikon H401 y en una microfuga Hettich Mikroliter. Para la determinación de nucleótidos se utilizó un electrodo de Oxígeno DW Hansatech.

3.3 PRODUCTOS.

Las enzimas, coenzimas y demás reactivos empleados, así como los productos usados en el tratamiento de los animales, procedían de Sigma, Boehringer, Merck, Bio-Rad, Amersham, Laboratorios Andreu, Laboratorios Bristol, Nordisk Gentofte y Panreac. Para las purificaciones enzimáticas se emplearon las siguientes columnas: Sephadex G-200 de Pharmacia Fine Chemical, DEAE-celulosa de Sigma y NADP-agarosa de P-L Biochemical.

3.4 TRATAMIENTO DE LAS RATAS.

En nuestros experimentos se usaron los siguientes grupos de ratas: (a) Ratas ayunadas-realimentadas, las cuales fueron privadas de alimento durante 48 h, al cabo de las cuales se les alimentó con una dieta especial rica en hidratos de carbono por espacio de otras 48 h. (b) Ratas tratadas con insulina durante 3 días (8 unidades/ 100 g/ día, subcutáneamente). (c) Ratas ayunadas-realimentadas y tratadas con Bezafibrato durante el periodo de realimentación (150 mg/ Kg/ día) mediante intubación gástrica. (d) Ratas tratadas simultáneamente con insulina (8 unidades/ 100 g/ día) y con Bezafibrato (150 mg/ Kg/ día) durante 3 días. (e) Ratas tratadas con t-butil hidroperóxido (25 mg/ Kg/ día, inyección intraperitoneal) durante 3 días. (f) Ratas tratadas simultáneamente con t-butil hidroperóxido (25 mg/ Kg/ día) y con BCNU (40 mg/ Kg/ día, inyección intraperitoneal) durante 3 días. (g) Ratas tratadas con Bezafibrato (150 mg/ Kg/ día) durante 3 días. (h) Ratas tratadas con Fenobarbital durante 4 días (70 mg/ Kg/ día, intraperitonealmente).

En todos los casos, las ratas se sacrificaron 24 h después de finalizado el tratamiento.

Para el estudio de los factores implicados en el incremento de la actividad de la enzima málica durante la adaptación a una dieta de bajo contenido en proteínas, se hicieron 8 grupos de ratas, los cuales se alimentaron durante 25 días con las siguientes dietas:

1) Ratas alimentadas con una dieta que contenía 18% de lactoalbúmina, 22% de sacarosa, 44% de dextrina, 11%

de aceite de maíz y 5% de corrector vitamínico-mineral (dieta control).

2) Ratas alimentadas con una dieta de bajo contenido proteico, que contenía 0,5% de lactoalbúmina, 27% de sacarosa, 56% de dextrina, 11% de aceite de maíz y 5,5% de corrector vitamínico-mineral (dieta pobre en proteínas).

3) Ratas alimentadas con la dieta pobre en proteínas, suplementada con cisteína (3 g/Kg de dieta).

4) Ratas alimentadas con la dieta pobre en proteínas (PP), suplementada con cisteína, glicina (12,69 g/Kg de dieta) y glutámico (40,0 g/Kg de dieta).

5) Ratas alimentadas con la dieta PP, suplementada con metionina, isoleucina (5,0 g/Kg de dieta), treonina (5,0 g/Kg de dieta) y valina (6,0 g/Kg de dieta).

6) Ratas alimentadas con dieta PP, suplementada con todos los aminoácidos esenciales: metionina, isoleucina, fenilalanina, lisina, treonina, triptófano, valina, arginina, histidina y leucina (7,5 g/Kg de dieta).

7) Ratas alimentadas con la dieta PP, suplementada con todos los aminoácidos esenciales salvo la metionina.

8) Ratas alimentadas con la dieta PP, suplementada tan sólo con metionina.

3.5 DETERMINACIONES DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

3.5.1 PREPARACION DE LOS HOMOGENEIZADOS

A las ratas, una vez sacrificadas mediante dislocación cervical, se les extrajo rápidamente el hígado y el tejido adiposo. Después de pesado y

troceado, los tejidos se homogeneizaron en siete volúmenes de tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, que contenía 0,25 M sacarosa, 1 mM EDTA y 1 mM DTT. La homogeneización se realizó en un homogeneizador con pistilo de teflón. El homogeneizado resultante se centrifugó a 800xg durante 10 min. El sobrenadante obtenido (sobrenadante 1) se volvió a centrifugar a 8.200xg durante 10 min para sedimentar las mitocondrias, centrifugación que se repitió, tras la separación del sedimento, para asegurar la total eliminación de éstas. El sobrenadante postmitocondrial se centrifugó a 105.000xg durante 60 min y el sedimento (fracción microsomal) se resuspendió en el tampón anteriormente citado en la proporción 1:7 (p/v). Todos los procesos de homogeneización y centrifugación se efectuaron a 4°C.

3.5.2 DETERMINACION DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

La actividad de esta enzima se determinó según el método descrito por Sapag-Hagar y col. (1.973), ligeramente modificado, midiendo la aparición de NADPH a 340 nm. El medio de reacción contenía en un volumen de 1 ml: tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7,0, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM NADP, 0,5 mM glucosa-6-fosfato y extracto. La reacción se inició con la adición de glucosa-6-fosfato a la cubeta y se leyó frente a una cubeta de referencia en la que se omitió el sustrato.

3.5.3 DETERMINACION DE 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA.

Esta enzima se midió por el mismo procedimiento

descrito para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, sustituyendo únicamente el sustrato. En este caso, la reacción se inició con la adición de 6-fosfogluconico a una concentración final de 0,5 mM.

3.5.4 DETERMINACION DE ENZIMA MALICA.

La actividad de esta enzima se determinó espectrofotométricamente a 340 nm, observando la aparición de NADPH, según el método de Ochoa y col. (1.948). En un volumen final de 1 ml, la concentración de los componentes de la mezcla de ensayo fue la siguiente: tampón Tris/HCl 100 mM, pH 7,4, 1 mM $MgCl_2$, 0,25 mM NADP, 1,5 mM ácido málico y extracto. La reacción se realizó frente a un blanco que no contenía málico, añadiendo éste a la cubeta problema.

3.5.5 DETERMINACION DE ISOCITRATO DESHIDROGENASA-NADP.

La actividad de esta enzima se midió según el procedimiento descrito por Plaut y Aogaichi (1.968). La aparición de NADPH se siguió espectrofotométricamente a 340 nm. Las concentraciones en cubeta de los elementos de la reacción fueron: tampón Tris/acetato 33 mM, pH 7,0, 6,6 mM $MnCl_2$, 0,25 mM NADP, 0,66 mM isocitrato y extracto en un volumen final de 1 ml. La reacción se disparó al añadir isocitrato a la cubeta problema.

3.5.6 DETERMINACION DE GLUTATION REDUCTASA.

La actividad de la glutacion reductasa se ensayó como describen Worthington y Rosemeyer (1.974), midiendo la oxidación de NADPH a 340 nm. En un volumen final de 1 ml los componentes de la reacción fueron: tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,0, 200 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,33 mM glutacion oxidado y extracto. El comienzo de la reacción se realizó al añadir a la cubeta el glutacion oxidado.

3.5.7 DETERMINACION DE NADPH-CITOCROMO C REDUCTASA.

Dicha enzima se determinó midiendo la velocidad de reducción de citocromo c a 550 nm de acuerdo con el método de Vermilion y Coon (1.978). Las concentraciones de los reactivos en el ensayo fueron: tampón fosfato potásico 300 mM, pH 7,7, 0,1 mM EDTA, 0,04 mM citocromo c, 0,2 mM NADPH y extracto microsomal. El comienzo de la reacción se realizó al añadir a la cubeta NADPH.

Todas las actividades enzimáticas se midieron a 37°C y se han expresado como nmoles de sustrato transformado por minuto y por mg de proteína. Todos los ensayos se llevaron a cabo en sobrenadante 1, salvo en el caso de la enzima NADPH-citocromo c reductasa, cuya actividad se determinó en la fracción microsomal.

3.5.8 DETERMINACION DE PROTEINAS.

La determinación de proteínas se realizó según el

método de Lowry y col. (1.951). En las fracciones obtenidas en las últimas etapas de purificación la determinación cuantitativa de proteínas se realizó previa precipitación de éstas con TCA y desoxicolato sódico, según el método descrito por Bensadoun y Weinstein (1.976).

3.6 PURIFICACION DE LA ENZIMA MALICA HEPATICA.

En cada purificación se partió de 70-90 g de tejido. El método utilizado fue básicamente el descrito por F-Lobato y col. (1.986). Tan sólo en la última etapa del proceso, la columna de afinidad 1-malato-AH sefarosa 4B se reemplazó por una de NADP-agarosa.

3.6.1 PREPARACION DEL EXTRACTO.

Tras un periodo de ayuno de 48 h, las ratas se realimentaron por espacio de otras 48 h con una dieta rica en hidratos de carbono, al cabo de las cuales se sacrificaron mediante dislocación cervical, extrayéndoles rápidamente el hígado. Después de pesado y troceado, el tejido se homogeneizó en 2 volúmenes de tampón Tris/HCl 15 mM, pH 7,4, que contenía 0,25 M sacarosa, 60 mM KCl, 1 mM EDTA y 1 mM DTT. El homogeneizado se centrifugó a 800xg durante 10 min y la fracción citosólica se obtuvo mediante ulterior centrifugación del sobrenadante a 105.000xg durante 60 min.

3.6.2 PRECIPITACION FRACCIONADA CON SULFATO DE AMONIO.

Al sobrenadante obtenido en la última etapa se le añadió lentamente sulfato de amonio sólido hasta alcanzar una saturación del 30%. La mezcla se agitó durante 60 minutos en hielo y se centrifugó a 27.000xg durante 30 min. Al sobrenadante así obtenido se le añadió suficiente sulfato de amonio para alcanzar una saturación del 50%. La mezcla se agitó y centrifugó como antes, obteniéndose un precipitado (precipitado 30-50%), que contenía glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, el cual se guardó a -20°C. Por último, el sobrenadante resultante se llevó al 80% de saturación. Después de agitar y centrifugar se obtuvo un precipitado (precipitado 50-80%) en el que se encontraban las enzimas málica y 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Este precipitado se resuspendió en la mínima cantidad posible de tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, y se dializó durante 18 h a 4°C en 2x1 l de este mismo tampón.

3.6.3 CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN SEPHADEX G-200.

La muestra dializada se centrifugó a 27.000xg, 30 min. El sobrenadante obtenido se aplicó a una columna de Sephadex G-200 (120 x 2.6 cm), previamente empaquetada y equilibrada con tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, a una velocidad de flujo de 15 ml/h. La muestra se eluyó utilizando el mismo tampón de equilibrio, a una velocidad de flujo de 10 ml/h. Todo el proceso se realizó a 4°C. En las fracciones eluidas se midió tanto la absorbancia a 280 nm como la actividad de la enzima málica.

3.6.4 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Al eluato obtenido en la etapa anterior y que contenía la enzima, se le añadió sulfato de amonio hasta el 80% de saturación. El sedimento obtenido por centrifugación a 27.000xg durante 30 min, se resuspendió en 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 5% glicerol y 2 mM β -mercaptoetanol (tampón 1), y se dializó durante 18 h en 2x1 l de este mismo tampón. El dializado se aplicó sobre una columna de DEAE-celulosa (17 x 1,6 cm) equilibrada con tampón 1. La velocidad de flujo, tanto de entrada como de elución de la muestra, fue de 7 ml/h. En estas condiciones la enzima málica no se unió a la columna, mientras que la 6-fosfoglucónato deshidrogenasa sí quedó retenida.

3.6.5 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN NADP-AGAROSA.

Las fracciones procedentes de la columna de DEAE-celulosa, que fueron seleccionadas por su mayor razón actividad /absorbancia a 280 nm, se pasaron a través de una columna de NADP-agarosa, previamente equilibrada con tampón Tris/ HCl 50 mM, pH 7,4 que contenía 10% de glicerol. Un pico inactivo de proteínas se eluyó con el tampón de equilibrio hasta que la absorbancia de las fracciones fue menor que 0,02. A continuación, la enzima málica, unida a la columna, se eluyó al final de un gradiente lineal de 0-0.02 mM de NADP en tampón de equilibrio.

3.7 PURIFICACION DE 6-FOSFOGLUCONICO DESHIDROGENASA.

3.7.1 CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN SEPHADEX G-200.

El precipitado del 50 al 80% de saturación de sulfato de amonio, obtenido como se describe en la sección 3.6.2 y que contenía tanto a la enzima málica como a la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, se pasó a través de una columna de Sephadex G-200 en las mismas condiciones ya descritas para la enzima málica. El eluato se concentró mediante la adición de sulfato de amonio hasta alcanzar un 80% de saturación. El sedimento obtenido se disolvió y dializó de igual forma que en el caso de la enzima málica.

3.7.2 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-CELULOSA.

El dializado obtenido en la etapa anterior se pasó a través de una columna de DEAE-celulosa equilibrada previamente con tampón 1, cuya composición se describió en la sección 3.6.4. En estas condiciones, al contrario de lo que ocurría con la enzima málica, la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa quedó retenida en la columna. Para que esto ocurriera fue especialmente crítico el que la velocidad de flujo fuese muy lenta (7 ml/h) La enzima se eluyó con un gradiente lineal de 0-0,1 M de NaCl en el mismo tampón.

3.7.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN NADP-AGAROSA.

Las fracciones eluidas de la columna anterior se pasaron una a una a través de una columna de NADP-agarosa, equilibrada con tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, 5 mM EDTA, 5% glicerol y 2 mM β -mercaptoetanol. La enzima pura, unida a la columna, se eluyó con un gradiente lineal de 0-0,6 mM de NADP en tampón de equilibrio.

3.8 PURIFICACION DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

3.8.1 CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN SEPHADEX G-200.

La fracción entre el 30 y el 50% de saturación de sulfato de amonio, obtenida tal como se describió en la sección 3.6.2 y que contenía glucosa-6-fosfato deshidrogenasa activa, se centrifugó a 27.000xg durante 30 min. El precipitado se resuspendió en la mínima cantidad posible de 50 mM Tris y 2 mM β -mercaptoetanol, pH 8,0 (tampón 2), y se dializó en 2x1 l del mismo tampón durante 18 h. Previa centrifugación a 27.000xg durante 10 min, la preparación dializada se aplicó a una columna de Sephadex G-200 que había sido equilibrada previamente con tampón 2. Las fracciones con actividad G6PDH se reunieron y se concentraron mediante la adición de sulfato de amonio hasta el 55% de saturación. El precipitado obtenido mediante centrifugación se disolvió y dializó en tampón 2 como antes.

3.8.2 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-CELULOSA.

El sobrenadante obtenido después de centrifugar el dializado a 27.000xg, 30 min. se pasó a través de una columna de DEAE-celulosa, previamente equilibrada con 0,02 M de tampón fosfato potásico, pH 7,0, que contenía 2 mM de β -mercaptoetanol. La enzima, que en estas condiciones permaneció unida a la columna, se eluyó con un gradiente lineal de 0,02-0,2 M de tampón fosfato potásico.

3.8.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN NADP-AGAROSA.

Las fracciones obtenidas de la columna de DEAE-celulosa se añadieron a una columna de NADP-agarosa equilibrada con tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, 5 mM EDTA, 5% glicerol y 2 mM β -mercaptoetanol. Un pico inactivo de proteínas se eluyó con el tampón de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm de la fracciones fue menor que 0,02. La enzima unida a la columna se eluyó con un gradiente lineal de 0-0,05 mM de NADP en tampón de equilibrio.

3.9 ELECTROFORESIS.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de SDS, se realizaron según el método descrito por Maizel (1.971). Para la preparación de los geles se utilizaron las siguientes soluciones de partida:

Sol. a: Acrilamida- bis acrilamida (30% T, 2,67% C)

Sol. b: 2 M Tris/HCl, pH 9,0

Sol. c: 1 M Tris/HCl, pH 6,5

Sol. d:- SDS al 10%

Sol. e:- Persulfato amónico al 10%

El gel separador se preparó según el siguiente protocolo:

solución a	11,0	ml
solución b	5,6	ml
solución d	0,3	ml
agua destilada .	12,84	ml
solución e	0,15	ml
TEMED	0,015	ml

El gel espaciador se preparó por combinación de las soluciones de partida en las siguientes proporciones:

solución a	1,66	ml
solución c	0,625	ml
solución d	0,1	ml
agua destilada .	7,53	ml
solución e	0,05	ml
TEMED	0,01	ml

Las muestras se mezclaron en proporción 1:1 con el tampón de muestra, cuya composición se detalla a continuación, y posteriormente hervidas a 100°C durante 5 min.

SDS	3,3%
Sacarosa	20%
Azul de Bromofenol ..	0,008%
Tris/HCl, pH 7,0	80 mM
EDTA	17 mM
DTT	17 mM

Como tampón de corrido se empleó una solución cuya composición fue: Tris 0,05 M-glicina 0,383 M, pH 8,3 y SDS al 0,1%.

En cuanto a las condiciones de las electroforesis, éstas se llevaron a cabo a 75 V mientras la muestra corría dentro del gel espaciador y a 150 V hasta que el frente llegó a 1 cm del final del gel separador.

Los geles, una vez finalizadas las electroforesis se tiñeron durante 30 min con Azul de Coomassie G al 0,25% (p/v) en etanol: agua: acético (5:5:1), tras lo cual se destiñeron con una solución que contenía ácido acético glacial al 7,5% y metanol al 5%.

3.10 PREPARACION DE LOS ANTISUEROS.

Los anticuerpos correspondientes a las tres enzimas estudiadas se prepararon mediante inoculación de las enzimas purificadas a conejos hembras Neozelandeses, siguiendo básicamente la técnica de Chauser (1.972). Las primeras dosis se acompañaron de igual volumen de adyuvante de Freund, mientras que para las siguientes se utilizó adyuvante incompleto. Las fracciones de γ -globulina se obtuvieron mediante dos precipitaciones

consecutivas con sulfato de amonio al 40%, seguidas de una diálisis frente a tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,2, que contenía 15 mM de NaCl.

3.11 TECNICA DE DOBLE INMUNODIFUSION.

Para demostrar la producción de anticuerpos se utilizó la técnica de doble inmunodifusión de Ouchterlony (1.953). Estos ensayos se realizaron en placas preparadas con 1% de agarosa y 0,02% de azida sódica. En el caso de los anticuerpos frente a la G6PDH, las bandas de precipitina fueron visualizadas tiñendo las placas con azul de Coomassie. Para ello, las placas se lavaron durante 12 h, agitándolas en 0,85% de NaCl. A continuación, los geles fueron cubiertos con papel de filtro, secados sobre un cristal, y teñidos y desteñidos de igual forma que la descrita en la sección 3.9 para la tinción de proteínas en los geles de poliacrilamida, con la salvedad de que en este caso el tiempo de tinción fue de 5 min.

3.12 TITULACIONES DE LOS ANTICUERPOS OBTENIDOS.

Para la titulación de los anticuerpos, se añadieron volúmenes crecientes de antisuero a una cantidad fija de sobrenadante obtenido tras centrifugar a 105.000xg. La mezcla de reacción se ajustó a un volumen constante con solución salina y Tritón X-100, éste último añadido a una concentración final de 1,7% (p/v). Las mezclas se incubaron 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C . Entonces, se centrifugaron a 12.000xg durante 10 min a 4°C . Las

actividades remanentes de las enzimas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido.

3.13 INMUNOPRECIPITACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

En todos los ensayos de inmunoprecipitación se usaron los sobrenadantes obtenidos por centrifugación a 105.000xg. Cantidades crecientes de antisuero se añadieron a una cantidad fija de enzima (50 o 100 mU, según la enzima y el tejido). La mezcla se ajustó a un volumen constante con solución salina y Tritón X-100, éste último añadido a una concentración final de 1,7% (p/v). Las mezclas de reacción se dejaron reaccionar durante 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, al cabo de lo cual se centrifugaron a 12.000xg durante 10 min a 4°C. Las actividades enzimáticas remanentes se ensayaron en alícuotas tomadas de los sobrenadantes obtenidos.

3.14 MEDIDA DE LA SINTESIS DE ACIDOS GRASOS "IN VIVO".

La síntesis de ácidos grasos "in vivo" se midió mediante la determinación de la incorporación de agua tritiada en los ácidos grasos del hígado y del tejido adiposo tras la inyección intraperitoneal de $^3\text{H}_2\text{O}$, según el método descrito por Stansbie y col (1.976). Para ello, las ratas fueron inyectadas con 5 mCi de agua tritiada en un volumen de 0,5 ml. Después de 60 min, previa anestesia con Nembutal (50 mg/Kg) 10 min antes, los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Las muestras de aproximadamente 1 g de tejido se saponificaron por calentamiento en 3 ml de KOH al 30%

(p/v) a 70°C durante 10-15 min, seguido de la adición de 3 ml de etanol del 95% (v/v), prolongándose el calentamiento a 70°C hasta completar 2 h. Después del enfriamiento y acidificación de las muestras con 3 ml de H₂SO₄ (9 M), los lípidos se extrajeron con 3x10 ml de éter de petróleo (40-60°). Los extractos se combinaron, se lavaron con 3x10 ml de agua destilada y se evaporaron hasta sequedad. Los residuos lipídicos se disolvieron en 15 ml de líquido de centelleo, cuya composición fue: difeniloxazol, 4 g; naftaleno, 60 g; metilglicol, 400 ml; tolueno, 600 ml. De la razón de la radioactividad en lípidos por g de tejido a la radioactividad específica del plasma, la lipogénesis se calculó como μ moles de ³H₂O incorporados por hora de tratamiento y por gramo de peso fresco de tejido. La eficiencia fue del orden del 25% para el Tritio.

3.15 DETERMINACION DE GLUTATION.

La determinación de glutation se llevó a cabo según el método de Hazelton y Lang (1.979), parcialmente modificado. Para la preparación del tejido, a las ratas sacrificadas por dislocación cervical se les extrajo rápidamente el hígado, el cual, previo lavado en solución salina fría, fue inmediatamente congelado mediante el uso de unas pinzas metálicas previamente introducidas en Nitrógeno líquido. Una porción de tejido, usualmente 250 mg, se homogeneizó a 4°C en 5 ml de una solución al 7% de ácido sulfosalicílico, que fue usado como precipitante de proteínas. El homogeneizado total se centrifugó a 14.000xg durante 15 min.

Para la determinación de glutation total (GSH y GSSG), a 0,1 ml de sobrenadante se le añadieron 3,9 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5, que contenía 0,005 M EDTA, para disminuir la concentración del ácido sulfosalicílico antes del ensayo.

El ensayo de glutation total se realizó mediante un método cíclico en el que la velocidad de reducción de DTNB es proporcional a la cantidad de GSSG y GSH presentes. La mezcla de ensayo contenía en un volumen de 1 ml: tampón fosfato sódico 0,1 M/EDTA-0,005 M, pH 7,5, DTNB 0,5 mM, 0,5 unidades de GR, NADPH 0,2 mM y extracto. La reacción se inició añadiendo GR, midiendo a continuación la velocidad de reducción de DTNB a partir del incremento de absorbancia a 412 nm. La concentración de glutation se determinó mediante comparación de los resultados con una curva estándar, preparada con cantidades conocidas de glutation y tratada de igual forma que las muestras problemas. Los resultados se expresan en µg de glutation total por g de tejido.

3.16 DETERMINACION DE NADP Y NADPH

Para la determinación de estos nucleótidos, los tejidos se congelaron rápidamente mediante el uso de unas pinzas metálicas previamente introducidas en Nitrógeno líquido, siendo a continuación pulverizados finamente en el estado congelado en un mortero. Los extractos ácidos, usados para la determinación de NADP, se obtuvieron mediante la adición de 5 volúmenes de solución de ácido perclórico 0,6 N al tejido pulverizado, homogeneizando a continuación durante 2 min. a 0°C con

un pistilo de teflón. Los extractos alcalinos, usados para la determinación de NADPH, se obtuvieron mediante la adición de 5 volúmenes de solución 0,5 N KOH al tejido pulverizado y homogeneizando como en el caso anterior. Ambos extractos se incubaron a 60°C durante 10 min.. Después de neutralizados, se centrifugaron a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para la determinación del nucleótido correspondiente, según ha sido descrito previamente (Fabregat y col., 1.985)

Las mezclas de reacción contenían, en un volumen final de 2 ml, tampón Tris/HCl 0,1 M, pH 8,0, glucosa -6-fosfato 1,2 mM, PMS 0,8 mM y EDTA 6 mM. La reacción se disparó con 10 unidades de G6PDH, midiéndose el consumo de Oxígeno a 37°C. El cálculo de la concentración de ambos nucleótidos se realizó por comparación con un estándar interno de NADP o NADPH para cada muestra.

4. RESULTADOS

4.1 PURIFICACION DE LA ENZIMA MALICA.

Un resumen del proceso de purificación de la enzima málica se presenta en la tabla 4.1.

La enzima málica presente en el precipitado 50-80% de saturación de sulfato de amonio, se aplicó sobre una columna de Sephadex G-200, tal como se describe en la sección 3.6.3 de Materiales y Métodos. En las fracciones obtenidas se determinó tanto la actividad enzimática como la absorbancia a 280 nm. El perfil de elución se muestra en la figura 4.1. Como puede observarse, tras este paso la actividad específica de la enzima fue 0,492 U/mg de proteínas, lo que representa un factor de purificación de 5 veces en relación a la enzima en el sobrenadante de partida.

La enzima concentrada se pasó seguidamente a través de una columna de DEAE-celulosa, a una velocidad de flujo de 7 ml/h. En este paso de purificación, fue decisivo para la separación de esta enzima de la 6PGDH el que la velocidad de flujo fuese baja. Tal como se indica en la tabla de purificación (tabla 4.1), tras el paso a través de esta columna no se produjo pérdida alguna de actividad, siendo el factor de purificación unas 12 veces mayor que en la anterior etapa. El perfil de elución se muestra en la figura 4.2.

La cromatografía de afinidad constituyó el último paso de la purificación. Las fracciones procedentes de la etapa anterior se pasaron una a una a través de una columna de NADP-agarosa. En nuestras condiciones, la enzima unida a la columna se eluyó, tras un pico

Etapa	Volumen (ml)	Proteínas (mg)	Actividad (U)	Actividad específica (U/mg)	Recuperación (%)	Purificación (veces)
Sobrenadante inicial	62,0	2579,2	249,0	0,097	100	
PP 50-80% de sat. sulf. am.	8,4	668,6	160,0	0,239	64,3	2,47
Eluato de Sephadex G-200	122,0	262,2	129,0	0,492	51,8	5,10
Eluato de DEAE-celulosa	58,3	21,27	128,6	6,046	51,6	62,7
Eluato de NADP-agarosa	201,0	0,402	98,2	244,35	39,4	2532,1

Tabla 4.1. ESQUEMA DE LA PURIFICACION DE LA ENZIMA MALICA HEPATICA.

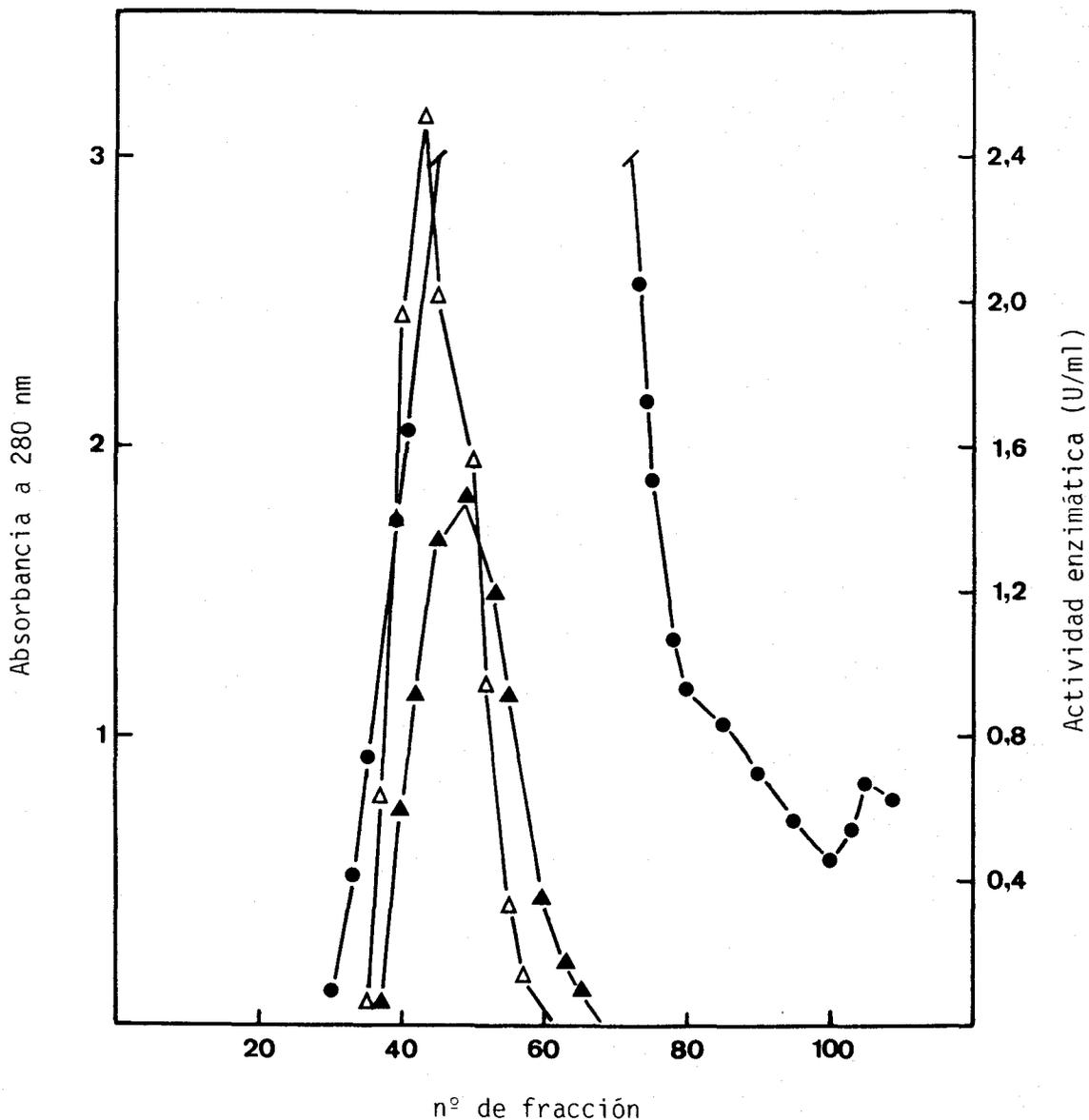


Figura 4.1. ELUCION DE LA ENZIMA MALICA Y DE LA 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA DE LA COLUMNA DE SEPHADEX G-200. Tamaño de la columna: 120x2,6 cm. Tampón de equilibrio y elución: Tris/HCl 50 mM, pH 7,4. Velocidad de flujo de la muestra: 10 ml/h. Volumen de las fracciones: 5,0 ml. ●—●, absorbancia a 280 nm. Δ—Δ, actividad de la enzima málica. ▲—▲, actividad de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

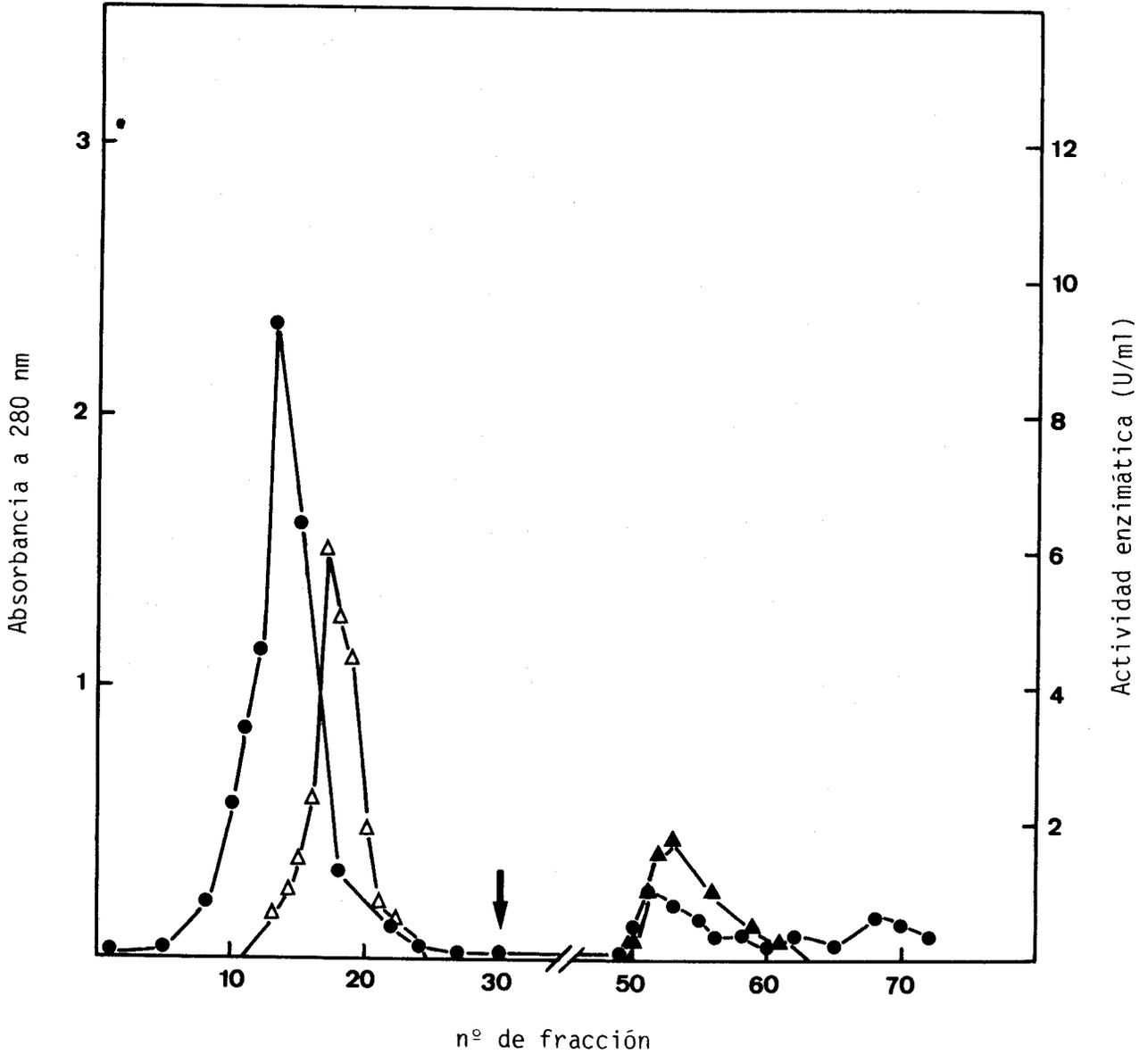


Figura 4.2. PERFIL DE ELUCION DE LA ENZIMA MALICA Y DE LA 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA DE LA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA. Tamaño de la columna: 17x1,6 cm Tampón de equilibrio: Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, 2 mM de β -mercaptoetanol y 5% de glicerol. Velocidad de flujo durante el equilibrado de la columna: 15 ml/h. Velocidad de flujo de entrada y elución de la muestra: 7 ml/h. Volumen de las fracciones: 5,3 ml. La flecha indica el inicio del gradiente 0-0,1 M de NaCl. ●—●, absorbancia a 280 nm. Δ — Δ , actividad de enzima málica. \blacktriangle — \blacktriangle , actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

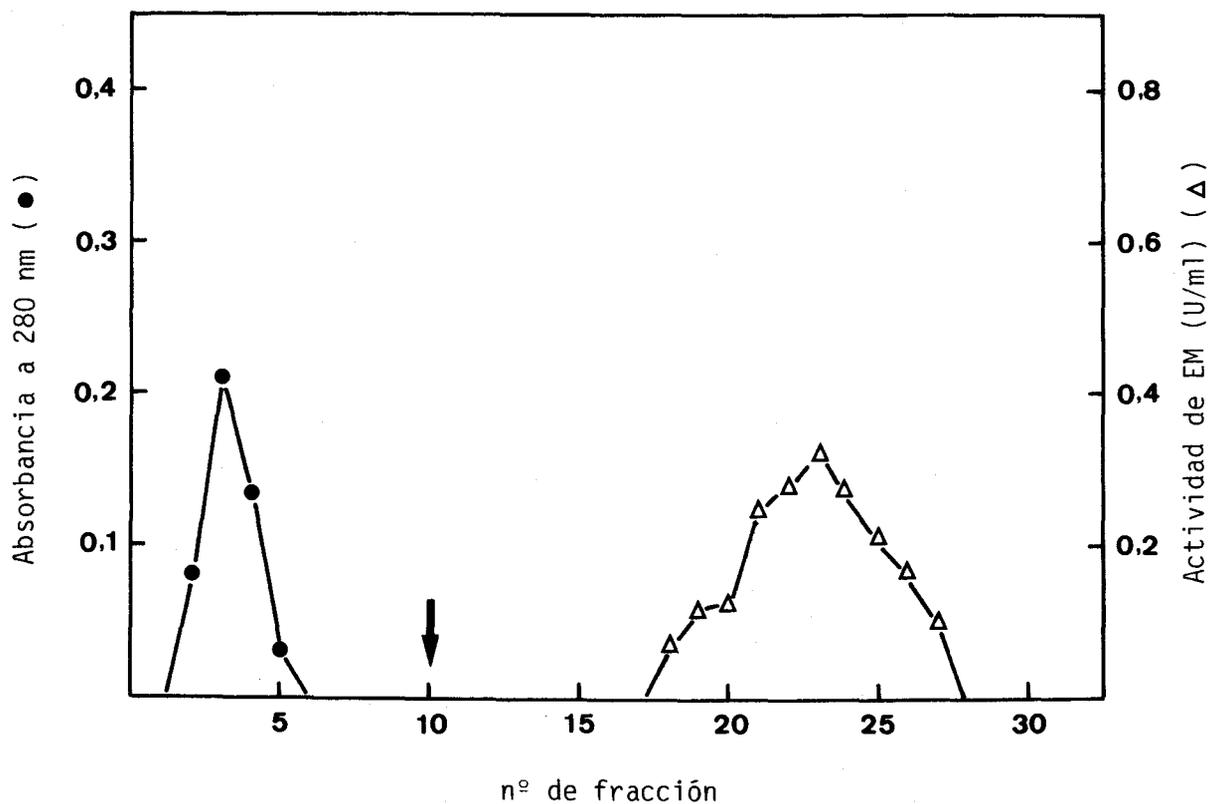


Figura 4.3. ELUCION DE LA ENZIMA MALICA UNIDA A LA COLUMNA DE NADP-AGAROSA. Tamaño de la columna 5x 1,0 cm. Tampón de equilibrio: Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, 10% de glicerol. Volumen de las fracciones: 4,7 ml. La flecha indica el inicio del gradiente lineal 0-0,02 mM de NADP

1

11

Fotografía 4.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA, EN PRESENCIA DE SDS, DE MUESTRAS PROCEDENTES DE CADA ETAPA DE LA PURIFICACION DE LA ENZIMA MALICA. El gel se tiñó con Azul de Coomassie, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. 2: marcadores de peso molecular; 4-6: muestras obtenidas de la columna de NADP-agarosa; 7: marcadores; 8: muestra obtenida de la columna de DEAE-celulosa; 9: muestra obtenida de la columna de Sephadex G-200; 10: precipitado 50-80% de saturación de sulfato de amonio; 11: extracto de partida.

inactivo de proteínas, al final de un gradiente lineal 0-0,02 mM de NADP. El perfil de elución se muestra en la figura 4.3. Las fracciones que contenían la enzima se congelaron a -20°C. En estas condiciones se mantenía la actividad siempre que el glicerol estuviese presente (10%) en el tampón de elución. En este paso, la actividad específica de la enzima aumentó hasta 244,35 U/mg de proteínas, siendo el factor de purificación 40 veces mayor que el obtenido en la etapa anterior. Como puede observarse en la tabla de purificación (tabla 4.1), al final de todo el proceso la enzima fue purificada 2532 veces con una recuperación del 39,4% de la actividad de partida.

La enzima málica aislada mediante este procedimiento exhibió una única banda en geles de poliacrilamida con SDS teñidos con Azul de Coomassie. En la fotografía 1 se visualiza todo el proceso de purificación.

4.2 PURIFICACION DE 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA.

Esta enzima, al igual que la anterior, también se encontró en la fracción 50-80% de saturación de sulfato de amonio. Este precipitado se dializó y aplicó sobre una columna de Sephadex G-200, obteniéndose el perfil de elución mostrado en la figura 4.1. El comportamiento de esta enzima en esta columna fue parecido al de la EM. Como puede observarse en la tabla 4.2, en la que está resumido todo el proceso de purificación de la enzima, tras esta etapa la actividad específica de la enzima fue 0,347 U/ mg de proteínas, lo que representa un factor de

Etapa	Volumen (ml)	Proteínas (mg)	Actividad (U)	Actividad específica (U/mg)	Recuperación (%)	Purificación (veces)
Sobrenadante de partida	62,0	2579,2	318,0	0,123	100	
PP 50-80% de sat. sulf. am.	8,4	668,6	159,0	0,238	50,0	1,9
Eluato de Sephadex G-200	122,0	262,2	90,9	0,347	28,6	2,8
Eluato de DEAE-celulosa	63,6	4,3	65,3	15,01	20,5	122,0
Eluato de NADP-agarosa	149,6	0,16	76,4	465,86	24,0	3787,5

Tabla 4.2. ESQUEMA DE LA PURIFICACION DE 6PGDH HEPATICA.

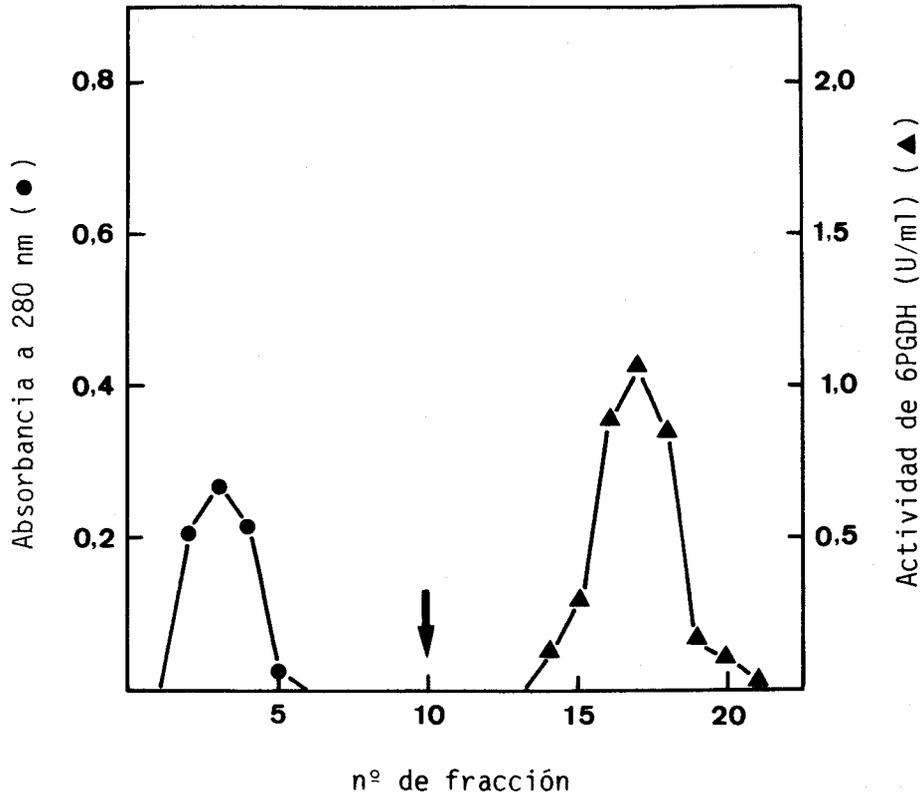


Figura 4.4. PERFIL DE ELUCION DE 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA DE LA COLUMNA DE NADP-AGAROSA. Tamaño de la columna: 5x1 cm. Tampón de equilibrio: Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, 5 mM EDTA, 2 mM β -mercaptoetanol y 5% glicerol. Volumen de las fracciones: 5,7 ml. La flecha indica el inicio de la elución con un gradiente lineal 0-0,6 mM de NADP en tampón de equilibrio.

1

14

Fotografía 4.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA, EN PRESENCIA DE SDS, DE MUESTRAS PROCEDENTES DE CADA ETAPA DE LA PURIFICACION DE LA 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA. El gel se tiñó con Azul de Coomassie, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. 1-5: muestras procedentes de la columna de NADP-agarosa; 6: marcadores; 7 y 8: muestras procedentes de la columna de DEAE-celulosa; 9 y 10: muestras obtenidas de la columna de Sephadex G-200; 11 y 12: precipitado 50-80% de saturación de sulfato de amonio; 13 y 14: extracto de partida.

purificación de 2,82. La recuperación de la actividad fue en este caso menor que para la EM.

En una segunda etapa, la columna de DEAE-celulosa se equilibró como se describe en Materiales y Métodos (sección 3.7.2). Después de la aplicación de la muestra dializada conteniendo la enzima y del lavado de la columna con tampón de equilibrio, la 6PGDH se eluyó con un gradiente lineal 0-0,1 M de NaCl. La velocidad de flujo fue de 7 ml/h, lo que fue crítico para que la enzima se quedase retenida en la columna. Las fracciones se recogieron, y en ellas se ensayaron la actividad de 6PGDH y la absorbancia a 280 nm. El perfil de elución se indica en la figura 4.2. Tras esta etapa, en la que apenas se produjo pérdida de actividad, la actividad específica aumentó hasta 15,01 U/mg de proteínas y el factor de purificación fue de 122,03.

Las fracciones que fueron seleccionadas en el paso anterior por poseer una mayor razón actividad/absorbancia a 280 nm, se aplicaron una a una sobre una columna de NADP-agarosa. Un pico inactivo de proteínas se eluyó con el tampón de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm fue menor que 0,02. A continuación, la enzima se eluyó con un gradiente lineal de 0-0,6 mM de NADP. El perfil de elución se muestra en la figura 4.4. Tras este paso de purificación, la actividad específica aumentó 31 veces. Como puede observarse en la tabla de purificación, la enzima sufrió una activación al pasar por la columna de aproximadamente un 17%.

En resumen, esta enzima fue purificada 3787,5 veces, con un rendimiento del 24%.

Tras la cromatografía de afinidad, las fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, presentando una única banda cuando se tiñeron con Azul de Coomassie. Los resultados del proceso de purificación se pueden apreciar en la fotografía 4.2.

4.3 PURIFICACION DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

Básicamente, el procedimiento de purificación de esta enzima es igual al de los dos casos anteriores. Esta enzima, a diferencia de la EM y de la 6PGDH, precipitó entre el 30 y el 50% de saturación de sulfato de amonio. Este precipitado se aplicó sobre una columna de Sephadex G-200. El perfil de elución se presenta en la figura 4.5. La actividad específica de la enzima eluida fue de 0,559 U/mg de proteínas (tabla 4.3), lo que representa un factor de purificación de 3,2 con respecto al extracto inicial. Aproximadamente 2/3 de la actividad se perdió como consecuencia del paso de la enzima a través de la columna.

La enzima eluida de la columna, una vez que fue concentrada mediante la adición de sulfato de amonio hasta el 55% de saturación, se hizo pasar a través de una columna de DEAE-celulosa en las condiciones ya descritas quedando retenida en el gel. Tras la elución de un pico inactivo de proteínas, se obtuvieron fracciones con G6PDH activa cuando se aplicó un gradiente lineal de 0,02-0,2 M de tampón fosfato potásico. El perfil de elución se muestra en la figura 4.6. En esta etapa, la actividad específica de la enzima aumentó hasta 4,67 U/mg de proteínas, lo que representa

Etapa	Volumen (ml)	Proteínas (mg)	Actividad (u)	Actividad especifica (U/mg)	Recuperación (%)	Purificación (veces)
Sobrenadante de partida	62,0	2579,2	458,0	0,177	100	
PP 30-50% de sat. sulf. Am.	8,3	852,4	315,0	0,369	68,8	2,1
Eluato de Sephadex G-200	121,0	179,1	100,2	0,559	21,9	3,2
Eluato de DEAE-celulosa	104,0	16,7	78,2	4,670	17,1	26,4
Eluato de NADP-agarosa	122,9	0,17	43,0	252,94	9,3	1429,0

Tabla 4.3. RESUMEN DE LA PURIFICACION DE G6PDH HEPATICA.

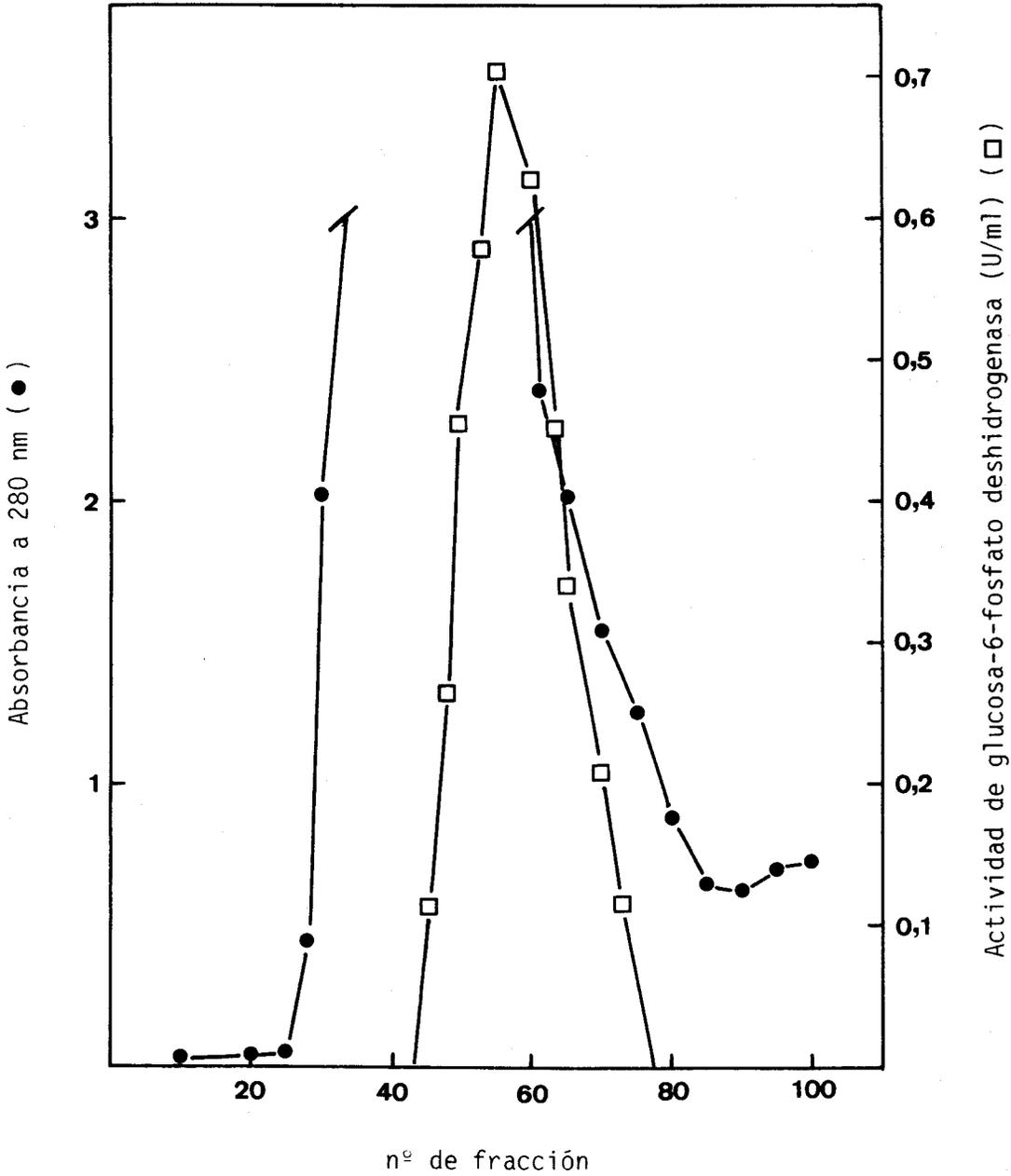


Figura 4.5. ELUCION DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA DE LA COLUMNA DE SEPHADEX G-200. Tamaño de la columna: 120x2,6 cm. Tampón de equilibrio y elución: Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, 2 mM β -mercaptoetanol. Velocidad de flujo de la muestra: 10 ml/h. Volumen de las fracciones: 5,3 ml.

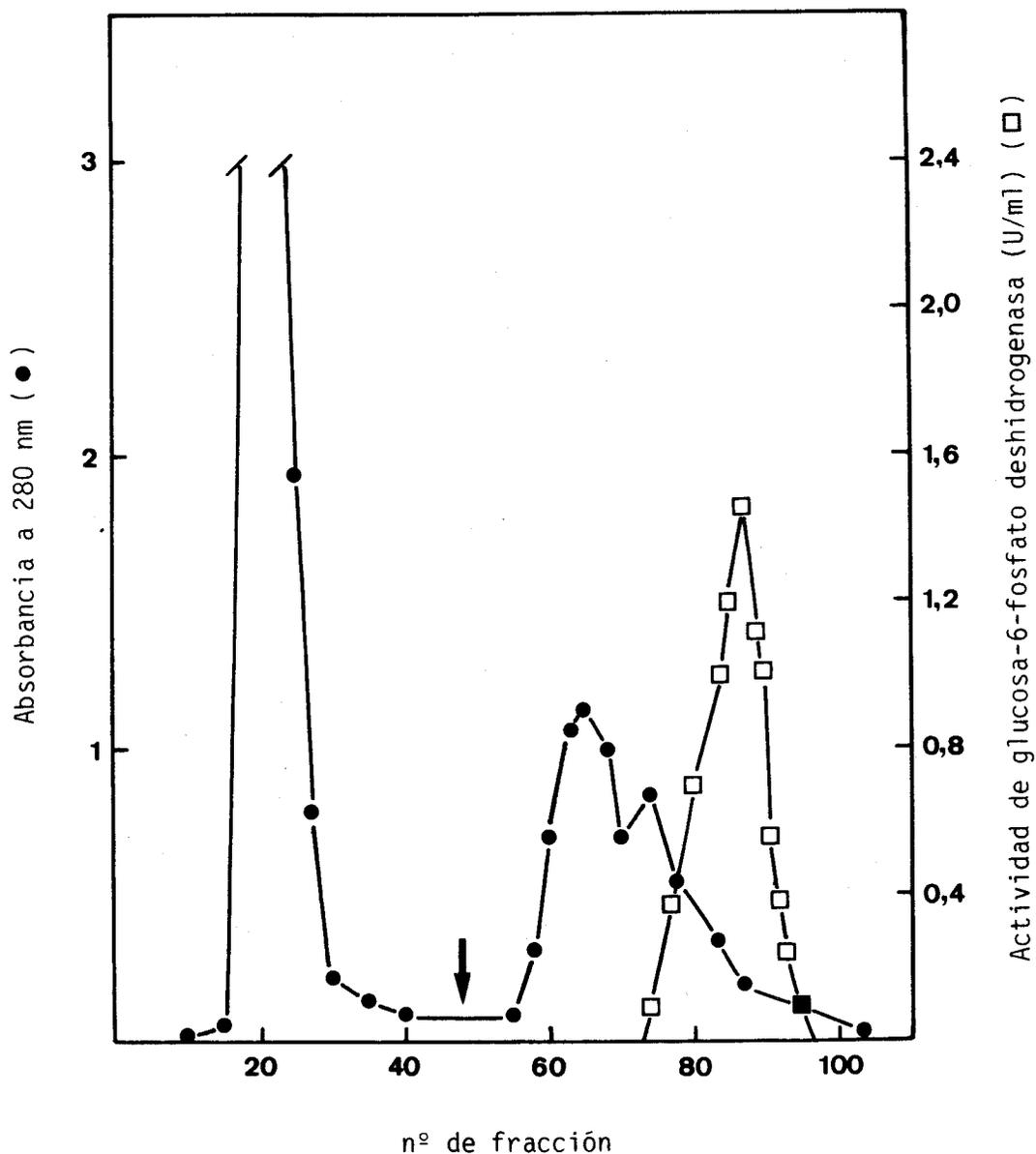


Figura 4.6. ELUCION DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA DE LA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA. Tamaño de la columna: 21x1,3 cm. Tampón de equilibrio: 0,02 M tampón fosfato potásico, pH 7,0, 2 mM β -mercaptoetanol. Velocidad de flujo durante el equilibrado y elución: 15 ml/h. Volumen de las fracciones: 5,2 ml. Elución: mediante gradiente lineal 0,02-0,2 M de tampón fosfato potásico, 2 mM β -mercaptoetanol. El inicio del gradiente se indica con la flecha.

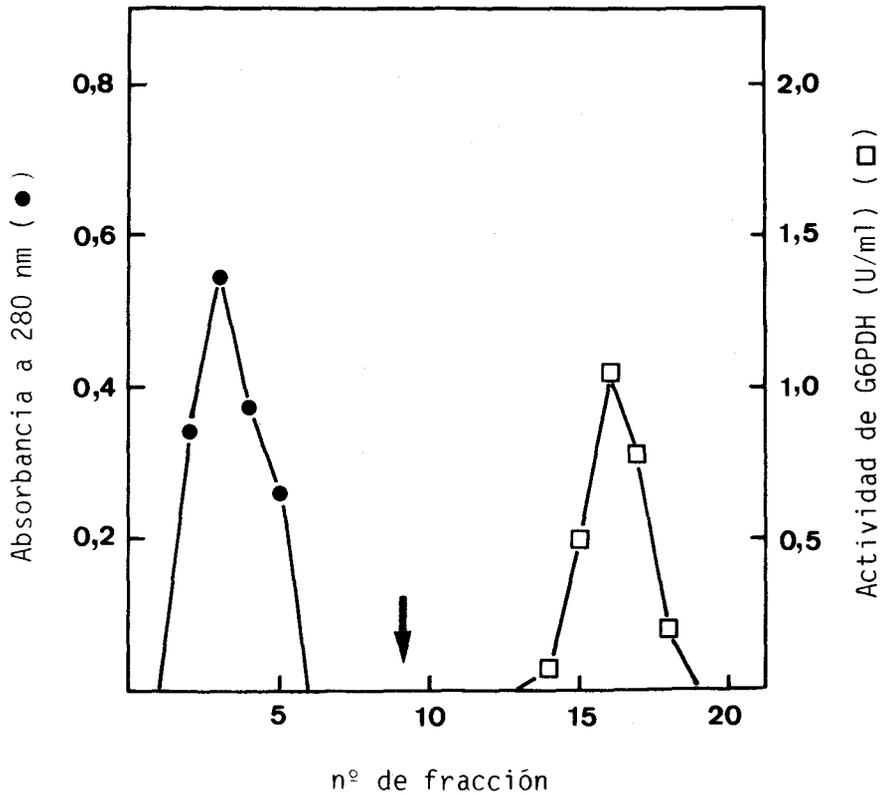


Figura 4.7. ELUCION DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA DE LA COLUMNA DE NADP-AGAROSA. Tamaño de la columna 4x1,0 cm. Tampón de equilibrio: Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, 5 mM EDTA, 2 mM β -mercaptoetanol y 5% glicerol. Volumen de las fracciones: 3,4 ml. La flecha indica el inicio de la elución con un gradiente lineal 0-0,05 mM de NADP en tampón de equilibrio.

Fotografía 4.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA, EN PRESENCIA DE SDS, DE MUESTRAS PROCEDENTES DE CADA ETAPA DE LA PURIFICACION DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA. El gel se tiñó con Azul de Coomassie, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. 1 y 2: extracto inicial; 3 y 4: precipitado 30-50% de saturación de sulfato de amonio; 5 y 6: muestra obtenida de la columna de Sephadex G-200; 7-10: muestras obtenidas de la columna de DEAE-celulosa; 11: marcadores; 12-14 muestras obtenidas de la columna de NADP-agarosa.

un factor de purificación de 26,4 respecto al extracto inicial.

Por último, las fracciones obtenidas de la columna de intercambio iónico se pasaron independientemente a través de una columna de NADP-agarosa. La enzima se eluyó con un gradiente lineal de 0-0,05 mM de NADP (figura 4.7). La actividad específica aumentó hasta 252,94 U/mg de proteínas, lo que representa un factor de purificación final de 1429. Como se puede observar, en este paso se produjo otra importante pérdida de actividad enzimática. El rendimiento final fue el menor de las tres enzimas purificadas. Así, tan sólo un 9,3% de la actividad se recuperó al final de todo el proceso de purificación.

Los resultados del proceso de purificación se pueden apreciar en la fotografía 4.3.

4.4 CARACTERIZACION Y TITULACION DE LOS ANTICUERPOS OBTENIDOS.

Los anticuerpos frente a cada una de las enzimas estudiadas se obtuvieron como se indica en la sección 3.10 de Materiales y Métodos.

La especificidad de los antisueros se determinó mediante la técnica de doble inmunodifusión de Ouchterlony (1.953). Como puede observarse en las fotografías 4.4, 4.5 y 4.6, en todos los casos apareció una única banda de precipitina cuando los anticuerpos se probaron frente a diferentes fracciones obtenidas

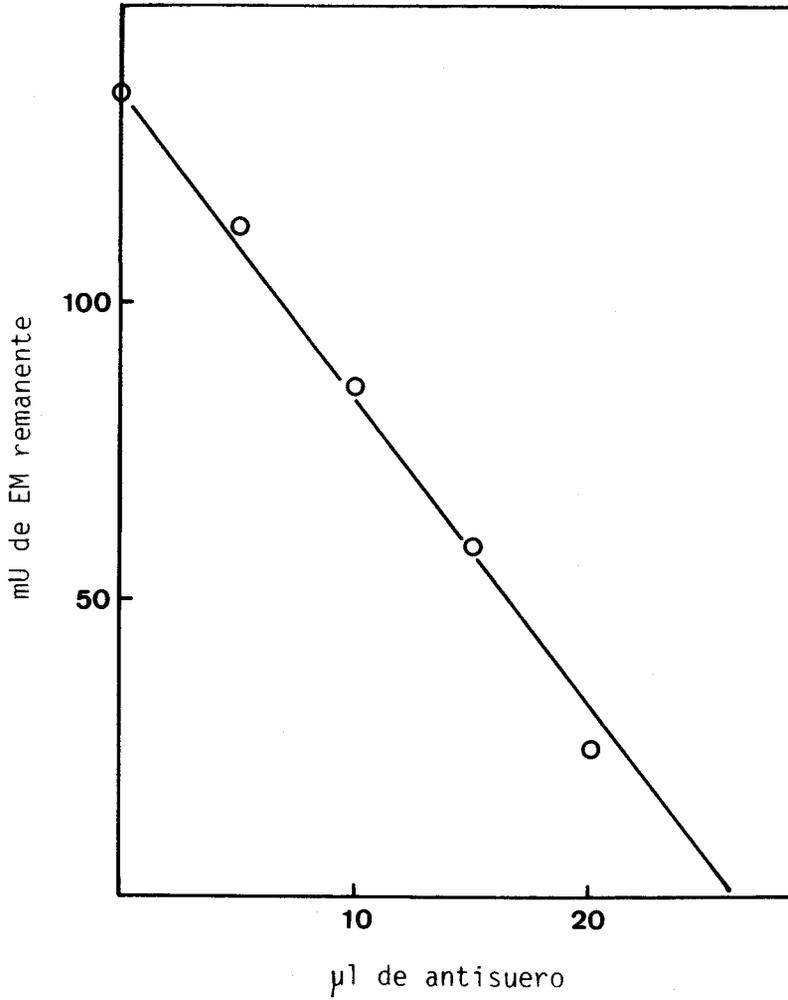


Figura 4.8. TITULACION DE LOS ANTICUERPOS OBTENIDOS FRENTE A LA ENZIMA MALICA. Cantidades crecientes de antisuero anti-EM se añadieron a una cantidad fija de enzima málica. Tras la incubación a 37°C durante 1 h, los tubos se mantuvieron a 4° toda la noche y se centrifugaron a 12.000xg. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido.

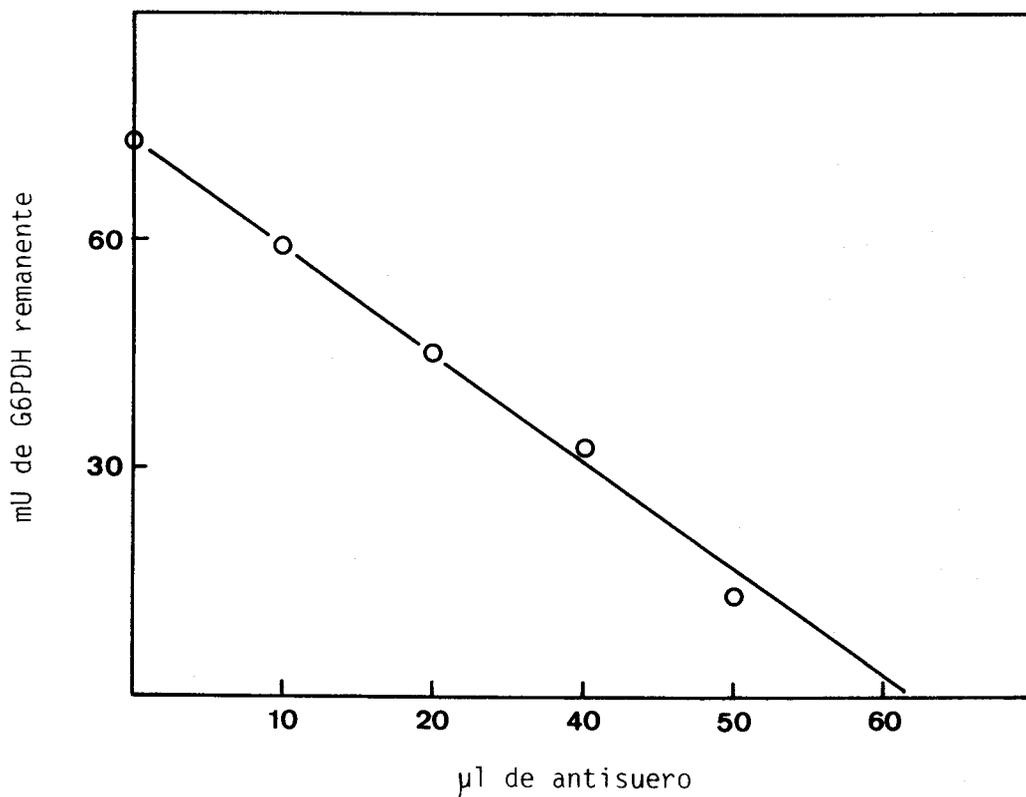


Figura 4.9. TITULACION DE LOS ANTICUERPOS OBTENIDOS FRENTE A LA ENZIMA G6PDH. Cantidades crecientes de antisuero anti-G6PDH se añadieron a una cantidad fija de G6PDH. Tras la incubación a 37°C durante 1 h, los tubos se mantuvieron a 4°C toda la noche y se centrifugaron a 12.000xg. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido.

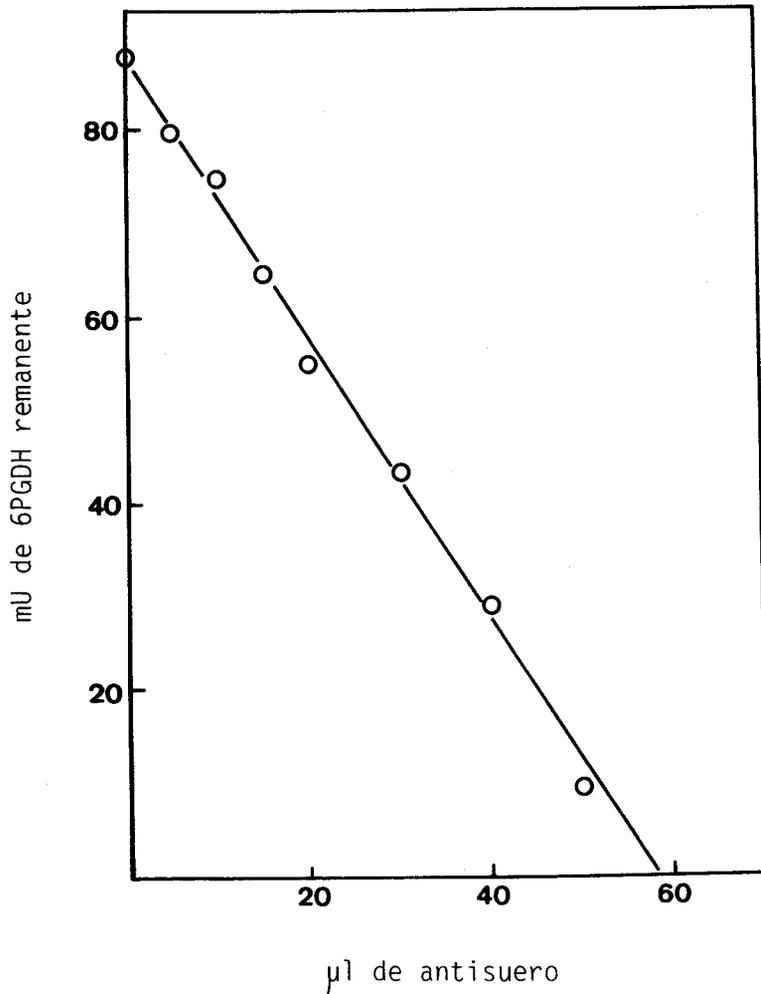
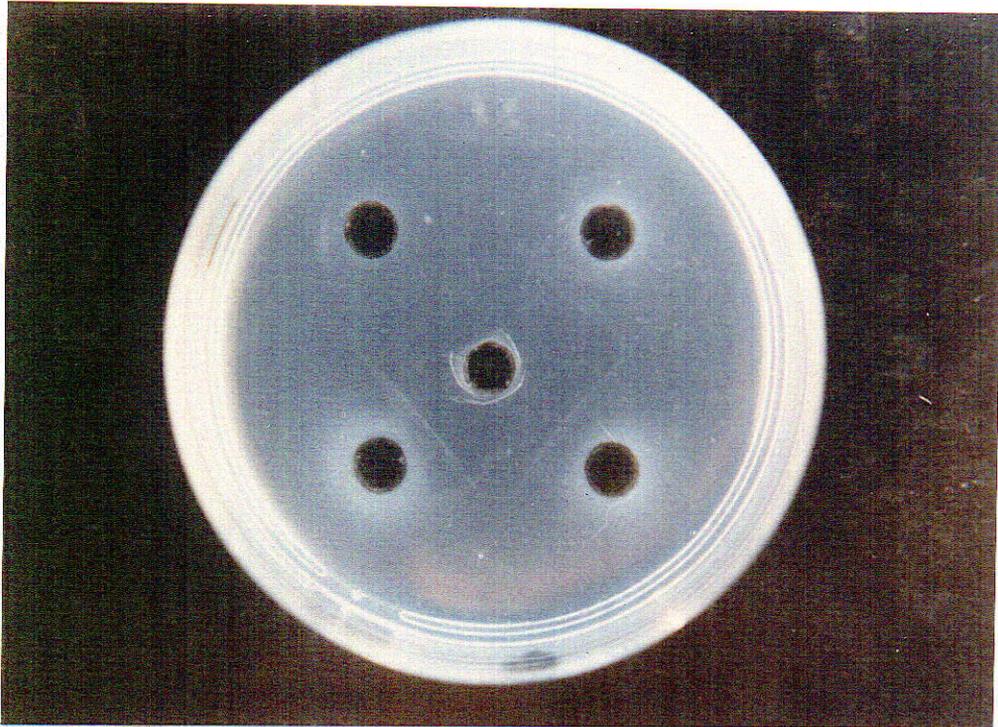


Figura 4.10. TITULACION DE LOS ANTICUERPOS OBTENIDOS FRENTE A LA ENZIMA 6PGDH. Cantidades crecientes de antisuero anti-6PGDH se añadieron a una cantidad fija de 6PGDH. Tras la incubación a 37°C durante 1 hora, los tubos de reacción se mantuvieron a 4°C toda la noche y se centrifugaron a 12.000xg. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido.



Fotografía 4.4. ANALISIS DE DOBLE INMUNODIFUSION DEL ANTICUERPO OBTENIDO FRENTE A LA EM. El pocillo central contiene antisuero anti-EM. Los otros pocillos contienen muestras de fracciones obtenidas de distintas columnas. Las placas se dejaron reaccionar una semana antes de tomar la fotografía.

Fotografía 4.5. ANALISIS DE DOBLE INMUNODIFUSION DEL ANTICUERPO OBTENIDO FRENTE A LA 6PGDH. El pocillo central contiene antisuero anti-6PGDH. Los otros pocillos contienen muestras de fracciones obtenidas de distintas columnas. Las placas se dejaron reaccionar una semana antes de tomar la fotografía.

Fotografía 4.6. ANALISIS DE DOBLE INMUNODIFUSION DEL ANTICUERPO OBTENIDO FRENTE A LA G6PDH. El pocillo central contiene antisuero anti-G6PDH. Los otros pocillos contienen muestras de fracciones obtenidas de distintas columnas. Las placas, que se dejaron reaccionar una semana antes de tomar la fotografía, se tiñeron con Azul de Coomassie, como se describe en Materiales y Métodos.

durante los procesos de purificación, lo cual representa una nueva evidencia de la purificación de las enzimas.

La titulación de los anticuerpos se realizó como se describe en la sección 3.12, añadiendo cantidades crecientes de antisuero a una cantidad fija de enzima. Los resultados de las titulaciones se muestran en las figuras 4.8, 4.9 y 4.10. Estas titulaciones corresponden a fracciones de antisuero obtenidas aproximadamente a los 45 días después de la primera inyección con la enzima purificada. En ellas se puede observar que 26 μ l de antisuero anti-EM precipitan 136 mU de esta enzima, que 58 μ l de antisuero anti-6PGDH precipitan 89 mU de 6PGDH y que 52 μ l de antisuero anti-G6PDH precipitan 74 mU de dicha enzima.

4.5 EFECTO DE LA VARIACION EN EL CONSUMO DE NADPH SOBRE LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH HEPATICAS Y SOBRE LA RAZON NADPH/NADP. EFECTO COMPARATIVO DE LA INDUCCION E INHIBICION DE LA SINTESIS DE ACIDOS GRASOS.

En nuestros experimentos se han usado dos condiciones metabólicas que incrementan la capacidad lipogénica de las ratas: ayuno-realimentación con una dieta rica en hidratos de carbono, y administración de insulina (Young y col., 1.964; Timmers y Knittle, 1.980; Alexander y col., 1.982; Zammit y Corstorphine, 1.982). Como esperábamos, en ambas condiciones se produjo una marcada estimulación de la biosíntesis de ácidos grasos en hígado y tejido adiposo. Como se indica en la tabla 4.4, se observaron incrementos de 5 y 7 veces,

Tratamiento	Hígado	Tejido adiposo	sangre
Control	10,49 ± 1,30 (4)	6,35 ± 0,87 (4)	0,82 ± 0,05 (4)
Ayuno- realimentac.	52,09 ± 10,82 ^{ej} (4)	43,05 ± 2,77 ^{hj} (4)	4,33 ± 1,83 ^{bj} (4)
Ayuno-real. + Bezafibrato	2,51 ± 0,15 ^{dj} ^{bk} (4)	5,01 ± 1,31 ^{ij} ^{hk} (4)	0,87 ± 0,47 ^{ij} ^{ak} (4)
Insulina	78,45 ± 16,16 ^{ej} (4)	67,52 ± 5,75 ^{hj} (4)	3,38 ± 1,01 ^{bj} (4)
Insulina + Bezafibrato	18,95 ± 2,21 ^{dj} ^{dl} (4)	4,86 ± 0,37 ^{ij} ^{hl} (4)	1,06 ± 0,18 ^{ij} ^{al} (4)

Tabla 4.4. EFECTO DEL BEZAFIBRATO SOBRE LA VELOCIDAD DE SINTESIS DE ACIDOS GRASOS EN HIGADO Y TEJIDO ADIPOSO Y SOBRE LA RADIOACTIVIDAD INCORPORADA EN LOS ACIDOS GRASOS CIRCULANTES EN SANGRE. Todas las ratas se inyectaron intraperitonealmente con 5 mCi/0,5 ml de agua tritiada. Una hora después de iniciado el tratamiento, los animales se sacrificaron tomándose las muestras de tejido y tratándose tal como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan en μ moles de $^3\text{H}_2\text{O}$ incorporados a ácidos grasos por hora de tratamiento y por gramo de peso fresco de tejido. Los resultados son medias \pm S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. j, comparado con valores controles; k, comparado con ratas ayunadas-realimentadas; l, comparado con ratas tratadas con insulina; a, $p < 0,05$; b, $p < 0,025$; c, $p < 0,0125$; d, $p < 0,01$; e, $p < 0,005$; f, $p < 0,0025$; h, $p < 0,0005$ i, $p > 0,05$.

respectivamente, en estos tejidos de ratas ayunadas-realimentadas, mientras que el tratamiento con insulina causó un incremento de 8 veces en hígado y de 11 veces en tejido adiposo. Al mismo tiempo hubo también un incremento de los ácidos grasos circulantes en sangre, de aproximadamente 5 veces.

Paralelamente, en estas condiciones hemos medido las actividades específicas de las enzimas productoras de NADPH hepáticas. Varios autores han descrito que las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato y la enzima málica son enzimas adaptativas, y que sus niveles son incrementados en animales alimentados con una dieta de alto contenido glucídico, siendo este aumento mucho mayor en la condición ayuno-realimentación, y en ratas tratadas con insulina. Como puede verse en la tabla 4.5, las actividades de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato aumentaron aproximadamente 2 veces, mientras que en el caso de la enzima málica el aumento fue de 5 veces. Las figuras 4.11a, 4.12a y 4.13a, en las que se representan respectivamente las inmunoprecipitaciones de G6PDH, 6PGDH y EM hepáticas, indican que los aumentos de las actividades específicas de estas enzimas fueron debidos a aumentos en las cantidades de enzimas inmunológicamente reactivas presentes bajo estas condiciones.

La isocitrato deshidrogenasa-NADP, por el contrario, tuvo un comportamiento totalmente diferente. Así, esta enzima sufrió una disminución significativa en su actividad específica en ratas ayunadas-realimentadas, y permaneció invariable al tratamiento con insulina.

Tratamiento	G6PDH	6PGDH	EM	IDH
Control	54,5 ± 1,9 (18)	58,2 ± 2,0 (27)	8,9 ± 0,4 (19)	203,1 ± 6,8 (7)
Ayuno- realimentac.	104,8 ± 7,8 ^{hj} (11)	98,3 ± 3,6 ^{hj} (8)	45,1 ± 3,3 ^{hj} (8)	165,6 ± 2,3 ^{fj} (4)
Ayuno-real.+ Bezafibrato	56,6 ± 2,4 ^{ij} _{fk} (4)	58,7 ± 1,5 ^{ij} _{hk} (4)	92,0 ± 6,1 ^{hj} _{hk} (7)	164,8 ± 2,4 ^{fj} _{ik} (4)
Insulina	131,4 ± 9,1 ^{hj} (6)	81,8 ± 5,5 ^{hj} (6)	45,3 ± 3,0 ^{hj} (4)	210,6 ± 3,4 ^{ij} (4)
Insulina + Bezafibrato	56,5 ± 3,7 ^{ij} _{hl} (4)	51,5 ± 1,6 ^{ij} _{hl} (6)	52,2 ± 6,9 ^{hj} _{il} (6)	232,0 ± 5,4 ^{dj} _{dl} (4)

Tabla 4.5. EFECTO DEL AYUNO-REALIMENTACION, AYUNO-REALIMENTACION + BEZAFIBRATO, INSULINA E INSULINA + BEZAFIBRATO SOBRE LAS ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH HEPATICAS. Las actividades especificas, medidas como se describe en la sección de Materiales y Métodos, se expresan como nmol de NADPH/mg de proteínas/min. Los resultados son medias ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. Los análisis estadísticos se basaron en comparaciones realizadas usando la t de Student. j,comparado con valores controles; k,comparado con ratas ayunadas-realimentadas; l,comparado con ratas tratadas con insulina; a,p< 0,05; b,p< 0,025; c,p< 0,0125; d,p< 0,01; e,p< 0,005; f,p< 0,0025; h,p< 0,0005 i,i,p> 0,05.

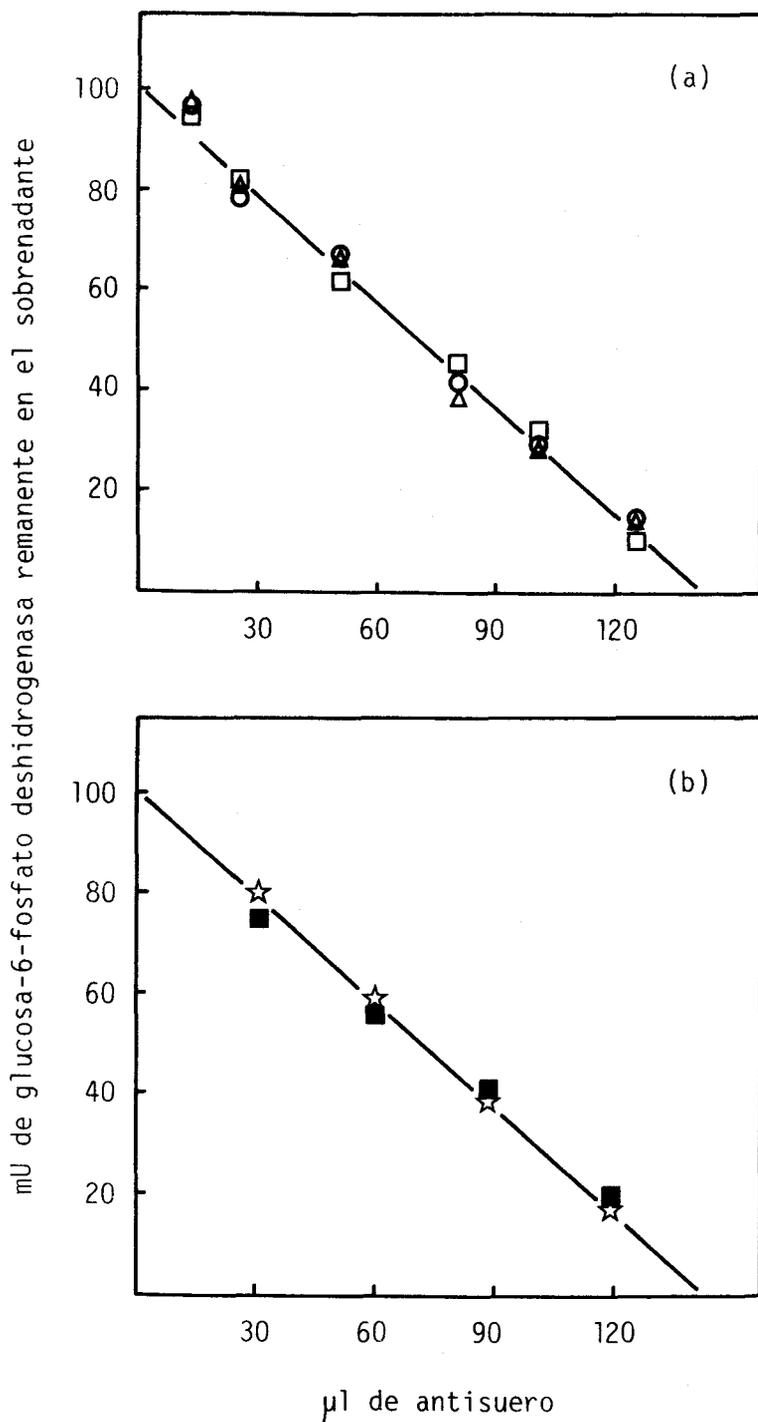


Figura 4.11. INMUNOPRECIPITACION DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA HEPATICA. Una cantidad fija de G6PDH (100 mU) se incubó con volúmenes crecientes de antisuero como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los tubos de reacción. Cada punto corresponde a 3 experimentos individuales. (Δ) control, (□) ratas ayunadas-realimentadas, (○) ratas tratadas con insulina, (■) ratas ayunadas-realimentadas y tratadas con Bezafibrato, (☆) ratas tratadas con insulina y Bezafibrato.

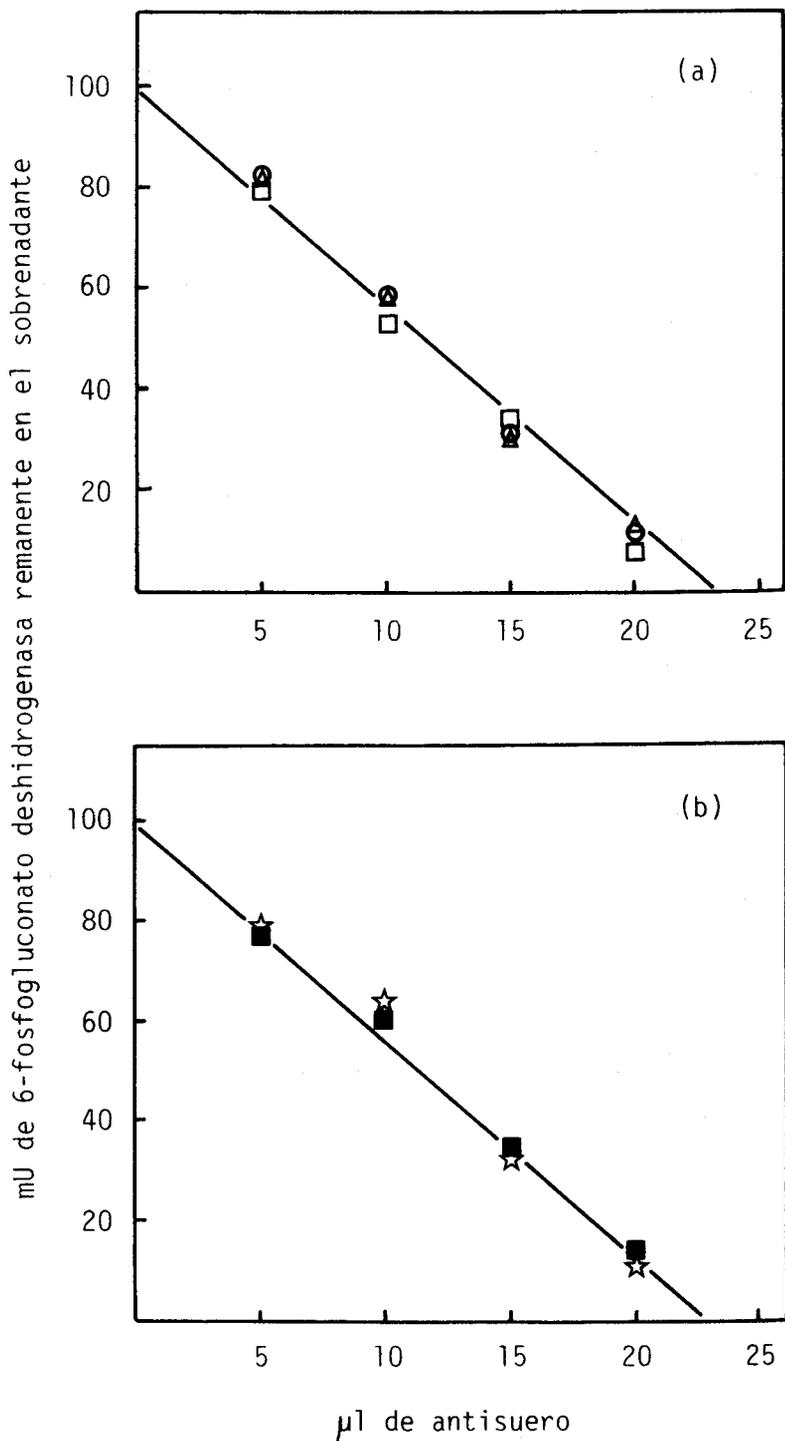


Figura 4.12. INMUNOPRECIPITACION DE 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA HEPATICA. Una cantidad fija de 6PGDH (100 mU) se incubó con volúmenes crecientes de antisuero como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los tubos de reacción. Cada punto corresponde a 3 experimentos individuales. (Δ) control, (□) ratas ayunadas-realimentadas, (○) ratas tratadas con insulina, (■) ratas ayunadas-realimentadas y tratadas con Bezafibrato, (☆) ratas tratadas con insulina y Bezafibrato.

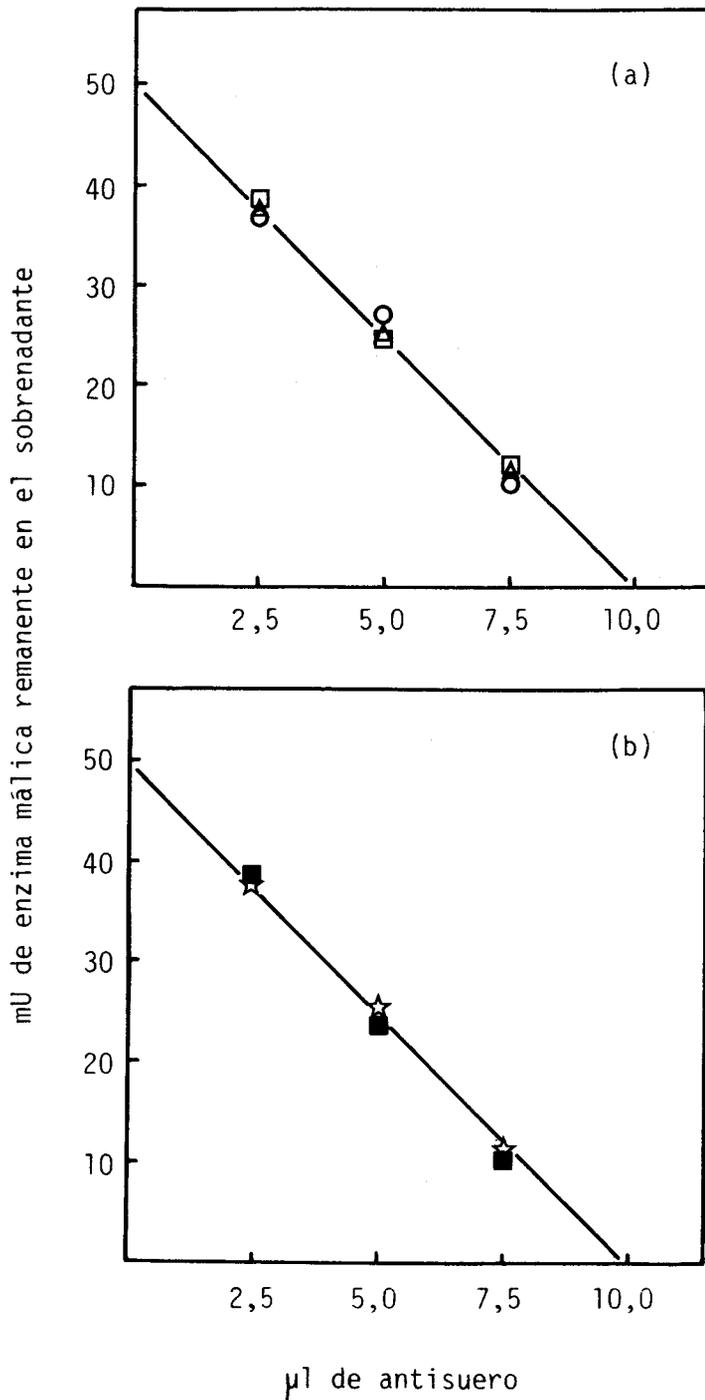


Figura 4.13. INMUNOPRECIPITACION DE LA ENZIMA MALICA HEPATICA. Una cantidad fija de 6PGDH (50 mU) se incubó con volúmenes crecientes de antisuero como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los tubos de reacción. Cada punto corresponde a 3 experimentos individuales. (Δ)control, (□)ratas ayunadas-realimentadas, (○)ratas tratadas con insulina, (■)ratas ayunadas-realimentadas y tratadas con Bezafibrato, (☆)ratas tratadas con insulina y Bezafibrato.

En estas condiciones hubo también una disminución de la razón NADPH/NADP (tabla 4.6), probablemente como consecuencia de la activación de la lipogénesis. Esta disminución fue mayor con el ayuno-realimentación.

Por otro lado, hemos estudiado el efecto de la administración de Bezafibrato durante el periodo de la realimentación o en conjunción con la administración de insulina. Este fármaco es uno de los más utilizados para el tratamiento de los desórdenes del metabolismo lipídico. La acción por la cual el Bezafibrato disminuye los niveles de los lípidos ha sido objeto de investigaciones, justificándose principalmente su acción por el rápido y sustancial aumento en la actividad del sistema de la β -oxidación peroxisomal (Lazarow, 1.982) . Sin embargo, su actuación sobre las vías biosintéticas de los lípidos no está tan bien establecida. Nosotros hemos estudiado el efecto del Bezafibrato sobre la síntesis de ácidos grasos "in vivo" en ratas ayunadas-realimentadas con una dieta rica en hidratos de carbono o tratadas con insulina, condiciones ambas en las que, como hemos dicho, tiene lugar un marcado aumento de la lipogénesis. La velocidad de síntesis de ácidos grasos se ha estimado midiendo la incorporación de agua tritiada en los ácidos grasos. Los resultados de la tabla 4.4 indican que el Bezafibrato previene la inducción de la síntesis de ácidos grasos producida por la dieta o por la administración de insulina. Este efecto es mayor en ratas ayunadas-realimentadas, en las que la velocidad de síntesis de los ácidos grasos fue disminuida muy considerablemente hasta un valor de 4 veces menor que la velocidad observada en los controles. Con respecto al efecto del Bezafibrato sobre los ácidos

Tratamiento	NADPH	NADP	NADPH/NADP
Control	233,9 ± 28,1 (4)	47,3 ± 6,9 (4)	5,1 ± 0,3 (4)
Ayuno- realimentac.	211,4 ± 15,7 (4)	62,5 ± 5,3 (4)	3,4 ± 0,3 ^{ej} (4)
Ayuno-real.+ Bezafibrato	234,0 ± 9,4 (4)	42,5 ± 1,8 (4)	5,5 ± 0,1 ^{ij} (4) ^{hk}
Insulina	252,5 ± 34,5 (4)	57,5 ± 3,6 (4)	4,3 ± 0,4 ^{ij} (4)
Insulina + Bezafibrato	410,8 ± 36,4 (4)	57,3 ± 3,6 (4)	7,1 ± 0,2 ^{fj} (4) ^{hl}

TABLA 4.6. EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES METABOLICAS ACTIVADORAS E INHIBIDORAS DE LA LIPOGENESIS SOBRE LA RAZON NADPH/NADP EN HIGADO DE RATA. La concentración de NADPH y NADP se determinaron como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados están dados en nmoles/ g de tejido como medias ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. Los análisis estadísticos se basaron en comparaciones realizadas usando la t de Student. j, comparado con valores controles; k, comparado con ratas ayunadas-realimentadas; l, comparado con ratas tratadas con insulina; a, p < 0,05; b, p < 0,025; c, p < 0,0125; d, p < 0,01; e, p < 0,005; f, p < 0,0025; h, p < 0,0005 ; i, p > 0,05.

grasos circulantes en la sangre, no se puede excluir la posibilidad de que este fármaco afecte específicamente el aclaramiento plasmático de los ácidos grasos. El efecto inhibitor del Bezafibrato sobre la síntesis de los ácidos grasos ha sido también puesto de manifiesto en nuestro Departamento mediante estudios "in vitro" realizados en hepatocitos adipocitos y acinis aislados, de ratas (Villanueva y col. 1.986)

Por otro lado, como puede verse en la tabla 4.5, el Bezafibrato previno también la inducción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa hepáticas producidas por la dieta o por la insulina, de forma que las actividades específicas de estas enzimas fueron iguales a las encontradas en ratas controles.

El Bezafibrato anuló también la disminución de la razón NADPH/NADP, probablemente como consecuencia de la inhibición de la lipogénesis y de un bloqueo en la utilización de NADPH. En ratas tratadas conjuntamente con insulina y Bezafibrato la concentración de NADPH fue aproximadamente 2 veces mayor que en el resto de las situaciones, y, consecuentemente, el valor de la razón estuvo por encima del valor control.

Las figuras 4.11b y 4.12b, que representan las inmunoprecipitaciones de G6PDH y 6PGDH hepáticas, indican que las cantidades de estas enzimas fueron también proporcionales a las actividades específicas encontradas bajo estas situaciones.

El comportamiento de las otras dos enzimas productoras de NADPH fue, sin embargo, totalmente diferente. Así, mientras que la actividad de la IDH no varió al administrarse Bezafibrato, con respecto a los valores obtenidos cuando la lipogénesis fue activada, la actividad específica de la EM se duplicó con respecto a las ratas ayunadas-realimentadas, y no varió cuando el Bezafibrato se administró conjuntamente con la insulina.

En la figura 4.13b se muestra la inmunoprecipitación de la enzima málica y como puede observarse, la actividad de esta enzima fue dependiente de la cantidad de proteína presente.

Un dato importante a tener en cuenta es el efecto del Bezafibrato sobre la enzima NADPH-citocromo c reductasa. Este fármaco produjo un incremento de aproximadamente 1,5 veces en la actividad de esta enzima con respecto a ratas ayunadas-realimentadas, en las cuales dicha enzima estaba ya aumentada en relación a ratas controles. La actividad específica de esta enzima de destoxicación en animales controles, en ayunadas-realimentadas y en ayunadas-realimentadas y tratadas con Bezafibrato, fue respectivamente $115,3 \pm 7,1$ (7), $139,4 \pm 9,6$ (6) y $206,7 \pm 25,7$ (4) (nmoles/min/mg de proteínas; entre paréntesis se indica el número de animales). Estos resultados, que podrían ser debidos a la posible implicación de esta enzima en el metabolismo del Bezafibrato, ya que la NADPH-citocromo c reductasa es una enzima inducible por diferentes compuestos xenobióticos (Conney, 1.967), nos permien comprobar a su vez que el efecto del Bezafibrato no es debido a la inhibición de la síntesis de proteínas.

4.6 ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA INDUCCION E INHIBICION DE LA SINTESIS DE ACIDOS GRASOS SOBRE LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH Y SOBRE LA RAZON NADPH/NADP EN EL TEJIDO ADIPOSO DE RATAS.

En la tabla 4.7 están resumidos los efectos de las condiciones metabólicas lipogénicas y el efecto del Bezafibrato, en las mismas condiciones antes mencionadas, sobre las actividades específicas de las enzimas estudiadas. Como puede verse, el comportamiento del tejido adiposo en estas condiciones presentó algunas diferencias con respecto al hígado.

En el caso de las deshidrogenasas, la realimentación con la dieta rica en hidratos de carbono produjo tan sólo un incremento de 1,5 veces en la actividad específica de la 6PGDH, y no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de la G6PDH. Sin embargo, como puede verse en la misma tabla, la insulina produjo un incremento en la actividades específicas de ambas enzimas.

En relación a la síntesis de los ácidos grasos, en este tejido se observó un aumento de 7 veces en ratas ayunadas-realimentadas, mientras que el tratamiento con insulina causó un incremento de 11 veces (tabla 4.4). En ambas situaciones se produjo una disminución significativa de la razón NADPH/NADP (tabla 4.8).

Los cambios de actividad de la EM fueron muy parecidos a los de G6PDH. Así, la actividad de esta enzima sólo aumentó cuando las ratas se trataron con

Tratamiento	G6PDH	6PGDH	EM	IDH
Control	92,7 ± 2,9 (9)	24,8 ± 0,9 (10)	172,9 ± 23,1 (10)	74,2 ± 5,1 (7)
Ayuno- realimentac.	94,4 ± 8,6 ^{ij} (4)	38,9 ± 1,9 ^{hj} (4)	202,1 ± 13,8 ^{ij} (4)	61,9 ± 3,3 ^{aj} (6)
Ayuno-real.+ Bezafibrato	95,7 ± 4,4 ^{ij} (4)	25,5 ± 3,3 ^{ij} (6)	163,5 ± 17,1 ^{ij} (5)	60,8 ± 2,9 ^{aj} (4)
Insulina	142,2 ± 9,0 ^{hj} (6)	44,3 ± 0,7 ^{hj} (4)	382,2 ± 49,6 ^{hj} (5)	76,7 ± 3,7 ^{ij} (4)
Insulina + Bezafibrato	136,2 ± 11,6 ^{fj} (8)	47,0 ± 4,6 ^{hj} (5)	373,7 ± 47,9 ^{hj} (5)	77,4 ± 3,8 ^{ij} (4)

Tabla 4.7. EFECTO DEL AYUNO-REALIMENTACION, AYUNO-REALIMENTACION + BEZAFIBRATO, INSULINA E INSULINA + BEZAFIBRATO SOBRE LAS ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH DEL TEJIDO ADIPOSEO. Las actividades especificas, medidas como se describe en la sección de Materiales y Métodos, se expresan como nmol de NADPH/mg de proteínas/min. Los resultados son medias ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. Los análisis estadísticos se basaron en comparaciones realizadas usando la t de Student. j, comparado con valores controles; k, comparado con ratas ayunadas-realimentadas; l, comparado con ratas tratadas con insulina; a, p < 0,05; b, p < 0,025; c, p < 0,0125; d, p < 0,01; e, p < 0,005; f, p < 0,0025; h, p < 0,0005; i, p > 0,05.

insulina, y permaneció invariable con los cambios en la dieta.

Con respecto a la IDH, el comportamiento de esta enzima fue semejante al encontrado en hígado: su actividad específica disminuyó con el ayuno-realimentación y no varió con el tratamiento de insulina.

En las figuras 4.14a, 4.15a y 4.16a, en las que se representan, respectivamente, las inmunoprecipitaciones de la G6PDG, 6PGDH y EM de tejido adiposo, se puede observar que bajo estas condiciones las actividades enzimáticas fueron proporcionales a las cantidades presentes de proteínas.

El efecto del Bezafibrato en este tejido es, al mismo tiempo, algo diferente. Así, aunque el Bezafibrato a las dosis administradas previno en su totalidad la activación de la síntesis de ácidos grasos causada por la dieta o por la insulina (tabla 4.4), sólo inhibió la inducción de 6PGDH producida por el ayuno-realimentación, y no produjo considerable variación sobre la inducción de G6PDH y 6PGDH causada por la insulina. Este fármaco tampoco afectó a las actividades específicas de EM e IDH con respecto a las actividades encontradas bajo las condiciones activadoras de la lipogénesis (tabla 4.7).

En cuanto al efecto de la inhibición de la lipogénesis sobre la razón NADPH/NADP en este tejido, en la tabla 4.8 puede verse que el Bezafibrato sólo previno el descenso de la razón en ratas ayunadas-realimentadas y no en ratas tratadas con insulina.

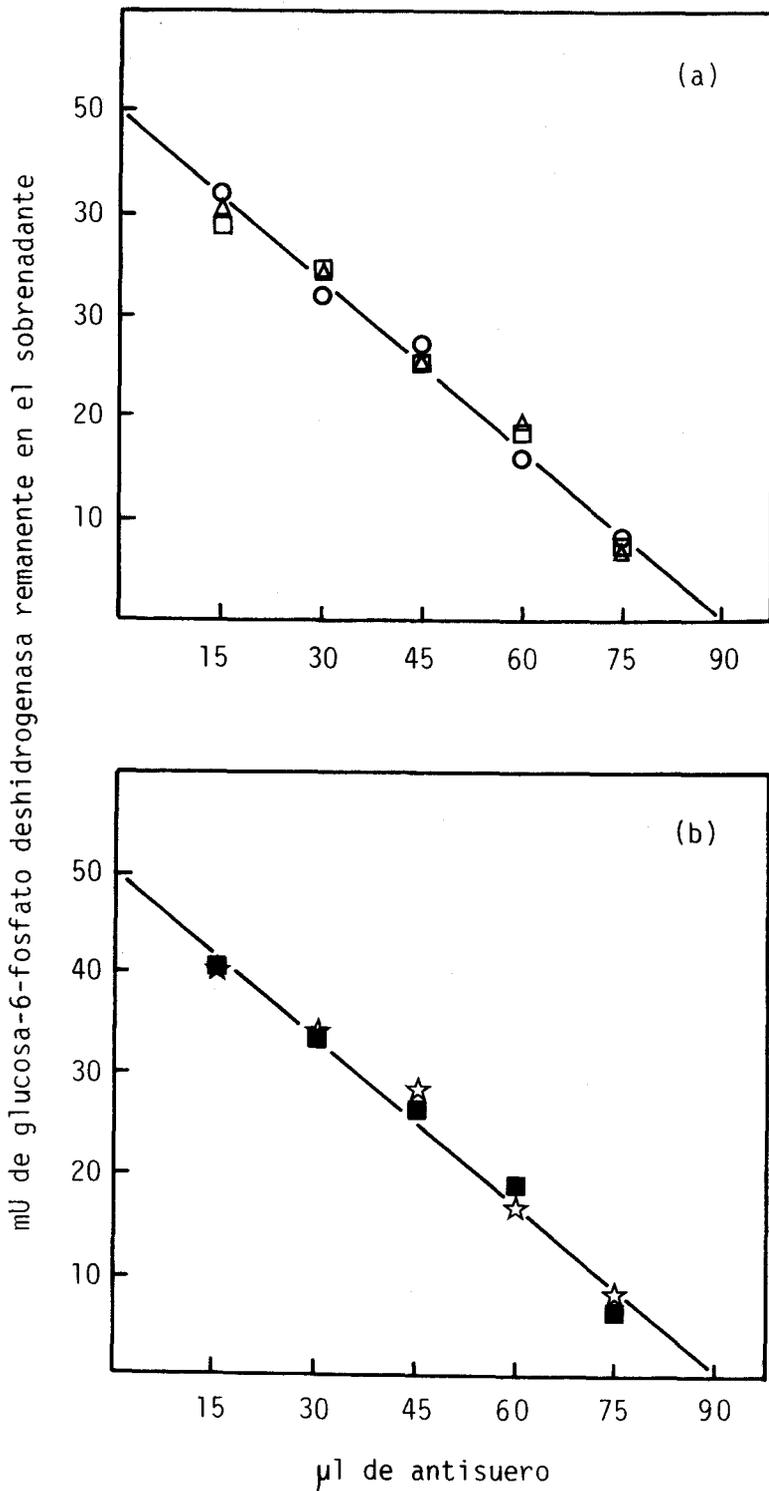


Figura 4.14. INMUNOPRECIPITACION DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA DE TEJIDO ADIPOSITO. Una cantidad fija de G6PDH (50 mU) se incubó con volúmenes crecientes de antisuero como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los tubos de reacción. Cada punto corresponde a 3 experimentos individuales. (Δ) control, (□) ratas ayunadas-realimentadas, (O) ratas tratadas con insulina, (■) ratas ayunadas-realimentadas y tratadas con Bezafibrato, (★) ratas tratadas con insulina y Bezafibrato.

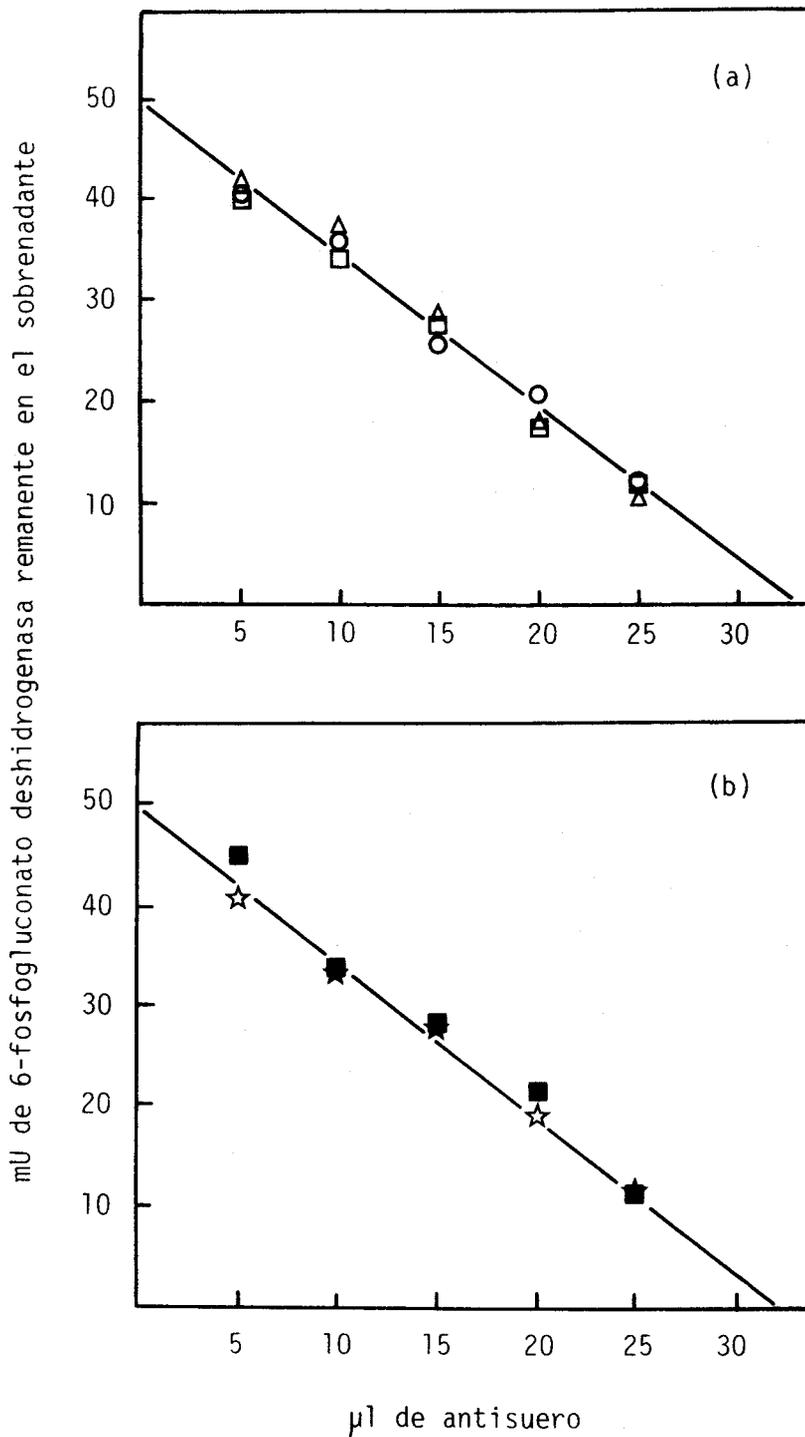


Figura 4.15. INMUNOPRECIPITACION DE 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA DE TEJIDO ADIPOSITO. Una cantidad fija de 6PGDH (50 mU) se incubó con volúmenes crecientes de antisuero como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los tubos de reacción. Cada punto corresponde a 3 experimentos individuales. (Δ)control, (□)ratas ayunadas-realimentadas, (○)ratas tratadas con insulina, (■)ratas ayunadas-realimentadas tratadas con Bezafibrato, (☆)ratas tratadas con insulina y Bezafibrato.

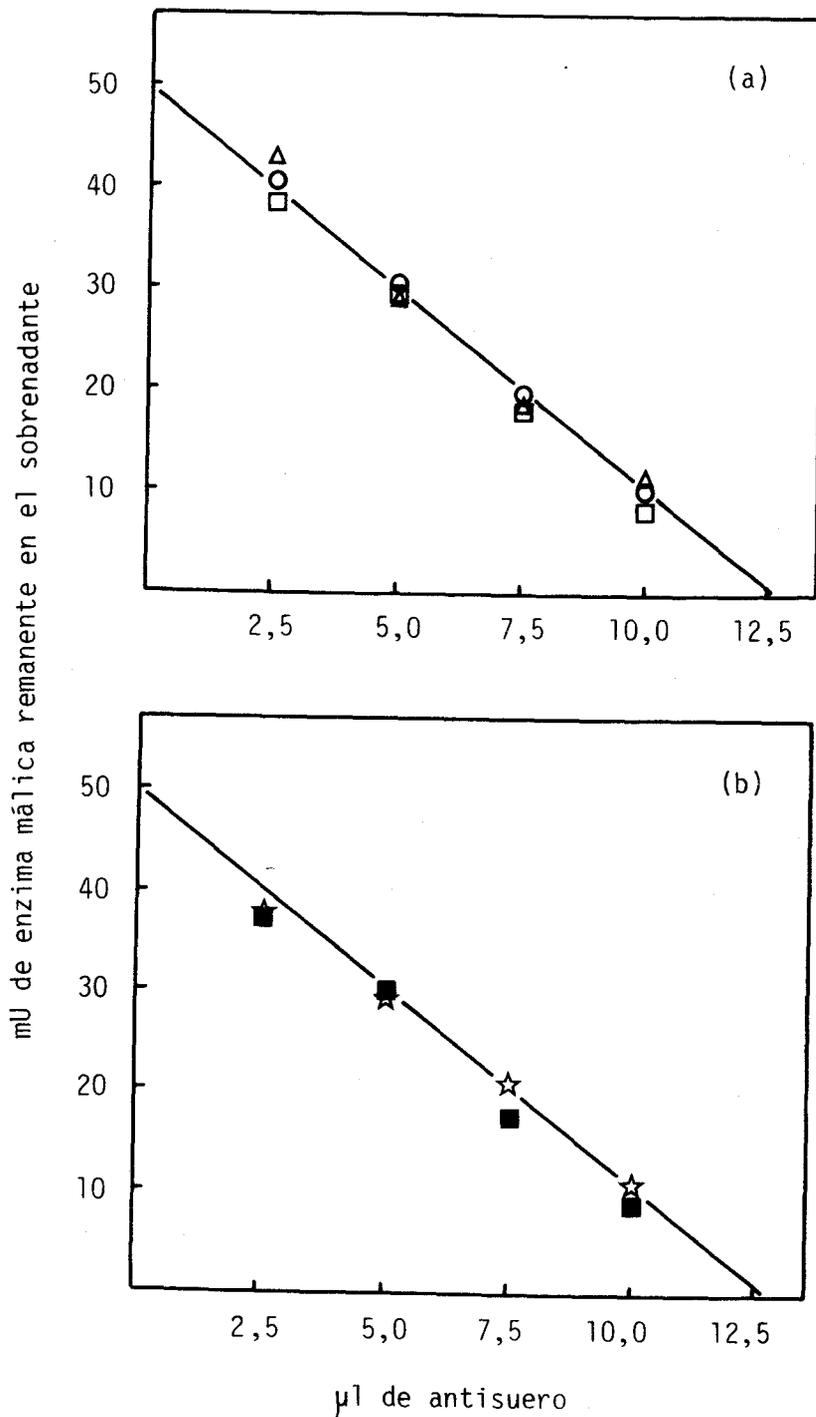


Figura 4.16. INMUNOPRECIPITACION DE LA ENZIMA MALICA DE TEJIDO ADIPOSITO. Una cantidad fija de EM (50 mU) se incubó con volúmenes crecientes de antisuero como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los tubos de reacción. Cada punto corresponde a 3 experimentos individuales. (Δ)control, (□)ratas ayunadas-realimentadas, (○)ratas tratadas con insulina, (■)ratas ayunadas-realimentadas y tratadas con Bezafibrato, (☆)ratas tratadas con insulina y Bezafibrato.

Tratamiento	NADPH	NADP	NNADPH/NADP
Control	5,50 ± 0,46 (4)	2,12 ± 0,20 (4)	2,59 ± 0,02 (4)
Ayuno- realimentac.	1,81 ± 0,51 (4)	1,71 ± 0,09 (4)	1,10 ± 0,22 ^{hj} (4)
Ayuno-real. + Bezafibrato	3,76 ± 1,45 (4)	1,82 ± 0,55 (4)	2,31 ± 0,68 ^{ij} (4) ^{ik}
Insulina	3,67 ± 0,39 (4)	2,26 ± 0,16 (4)	1,64 ± 0,04 ^{hj} (4)
Insulina + Bezafibrato	4,38 ± 0,79 (4)	3,21 ± 0,31 (4)	1,33 ± 0,20 ^{hj} (4) ^{il}

Tabla 4.8. EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES METABOLICAS ACTIVADORAS E INHIBIDORAS DE LA LIPOGENESIS SOBRE LA RAZON NADPH/NADP EN TEJIDO ADIPOSO DE RATA. La concentración de NADPH y NADP se determinaron como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados están dados en nmoles/ g de tejido como medias ± S.E. M. para el número de animales indicado entre paréntesis. Los análisis estadísticos se basaron en comparaciones realizadas usando la t de Student. j, comparado con valores controles; k, comparado con ratas ayunadas-realimentadas; l, comparado con ratas tratadas con insulina; a, p < 0,05; b, p < 0,025; c, p < 0,0125; d, p < 0,01; e, p < 0,005; f, p < 0,0025; h, p < 0,0005; i, p > 0,05.

Las inmunoprecipitaciones con antisueros específicos indicaron que las actividades específicas de G6PDH, 6PGDH y EM del tejido adiposo fueron en todas estas situaciones proporcionales a las cantidades presentes de proteínas (tablas 4.14b, 4.15b y 4.16b), ya que para cada enzima la cantidad de antisuero necesario para precipitar una cantidad fija de miliunidades fue siempre la misma, independientemente de la condición metabólica.

4.7 EFECTO DE LA VARIACION EN EL CONSUMO DE NADPH CAUSADO POR LA ADMINISTRACION DE SUSTANCIAS XENOBIOTICAS SOBRE LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH DE HIGADO DE RATA.

En esta etapa, el consumo de NADPH se incrementó mediante la administración de diferentes sustancias que son metabolizadas a través de los procesos de detoxificación que usan NADPH: a) t-butil hidroperóxido (tBHP), cuyo metabolismo es mediado por el sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa (Lotscher y col., 1.979) y b) Fenobarbital y Bezafibrato, compuestos que son metabolizados a través de la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa (Conney, 1.967). Al mismo tiempo, la inhibición de las vías consumidoras de NADPH se llevó a cabo usando BCNU, un inhibidor de la glutatión reductasa (Frischer y Ahmad, 1.977).

En la tabla 4.9 se muestran las actividades específicas de las enzimas de detoxificación de hígado y tejido adiposo cuando los animales se trataron con los citados compuestos. Como puede verse, en hígado la administración de tBHP produjo un incremento

Tratamiento	Higado		Tejido adiposo	
	GR	cit. c red.	GR	cit. c red.
Control	57,3 ± 1,6 (9)	115,3 ± 7,1 (7)	53,9 ± 2,9 (7)	13,9 ± 0,9 (9)
t-BHP	65,6 ± 4,3 ^{aj} (6)	152,2 ± 8,8 ^{ej} (6)	66,4 ± 9,8 ^{aj} (4)	13,1 ± 0,7 ^{ij} (4)
t-BHP + BCNU	21,5 ± 5,7 ^{hj} _{hm} (5)	125,5 ± 9,8 ^{ij} _{am} (5)	4,6 ± 1,3 ^{hj} _{hm} (4)	7,9 ± 1,3 ^{dj} _{dm} (4)
Fenob.	80,8 ± 3,3 ^{hj} (6)	208,0 ± 12,2 ^{hj} (6)	56,0 ± 1,7 ^{ij} (4)	19,7 ± 7,4 ^{ij} (4)
Bezaf.	81,6 ± 1,2 ^{aj} (4)	160,2 ± 10,5 ^{ej} (4)	52,3 ± 3,4 ^{ij} (4)	15,2 ± 1,4 ^{ij} (4)

Tabla 4.9. EFECTO DEL t-BHP, t-BHP+BCNU, FENOBARBITAL Y BEZAFIBRATO SOBRE LAS ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE LAS ENZIMAS DE DESTOXIFICACION DE HIGADO Y TEJIDO ADIPOSEO DE RATA. Las actividades especificas, medidas como se describe en la sección de Materiales y Métodos, se expresan como nmol de NADPH/ mg de protefnas/min. Los resultados son medias ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. Los análisis estadísticos se basaron en comparaciones realizadas usando la t de Student. j, comparado con valores controles; m, comparado con ratas tratadas con t-BHP; a,p< 0,05; b,p<0,025; c,p<0,0125; d,p< 0,01; e,p<0,005; f,p<0,0025; h,p< 0,0005; i,p> 0,05.

significativo de las actividades específicas de las enzimas de detoxificación consumidoras de NADPH: glutation reductasa y NADPH-citocromo c reductasa. La acción del tBHP sobre la GR es debida al hecho de que este compuesto es metabolizado a través de la oxidación de GSH.

Resultados similares, pero más marcados, se obtuvieron cuando a las ratas se les administró Fenobarbital o Bezafibrato. El tratamiento con cualquiera de estos dos compuestos causó un incremento de 1,8 y 1,4 veces, respectivamente, en la actividad de NADPH-citocromo c reductasa y GR.

En relación al efecto que sobre las enzimas productoras de NADPH tienen estos compuestos, en la tabla 4.10 se puede observar que la administración de tBHP produjo, al mismo, tiempo un incremento significativo de las actividades específicas tanto de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato hepáticas como de la EM, no afectando en absoluto a la actividad de la IDH.

Las figuras 14.17, 14.18 y 14.19 representan las inmunoprecipitaciones de la G6PDH, 6PGDH y EM hepáticas respectivamente de ratas tratadas con tBHP. Los resultados indican que en los tres casos los incrementos de las actividades específicas fueron debidos a incrementos en la cantidades de las enzimas.

Estos aumentos en las actividades de estas enzimas fueron acompañados por un descenso de la razón NADPH/NADP en este tejido hasta un valor de 3,0 (tabla 4.11).

Tratamiento	G6PDH	6PGDH	EM	IDH
Control	54,5 ± 1,9 (18)	58,2 ± 2,0 (27)	8,9 ± 0,4 (19)	203,0 ± 6,8 (7)
t-BHP	62,7 ± 4,4 ^{aj} (12)	71,1 ± 2,9 ^{hj} (12)	15,5 ± 1,8 ^{hj} (7)	201,1 ± 4,9 ^{ij} (4)
t-BHP + BCNU	30,2 ± 2,3 ^{hj} _{fm} (4)	50,1 ± 2,8 ^{ij} _{fm} (4)	5,9 ± 0,7 ^{fj} _{dm} (4)	N.D.
Fenobarbital	49,2 ± 2,5 ^{ij} (8)	63,2 ± 4,5 ^{ij} (9)	28,3 ± 1,3 ^{hj} (6)	263,6 ± 8,2 ^{hj} (4)
Bezafibrato	52,3 ± 3,2 ^{ij} (4)	68,4 ± 2,8 ^{aj} (4)	34,3 ± 4,7 ^{hj} (4)	161,1 ± 5,2 ^{fj} (4)

Tabla 4.10. EFECTO DE LA ACTIVACION E INHIBICION DE LOS SISTEMAS DE DESTOXIFICACION, MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE DIFERENTES SUSTANCIAS, SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH DE HIGADO DE RATA . Las actividades especificas, medidas como se describe en la sección de Materiales y Métodos, se expresan como nmol de NADPH/mg de proteínas/min. Los resultados son medias ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. Los análisis estadísticos se basaron en comparaciones realizadas usando la t de Student. j,comparado con valores controles; m,comparado con ratas tratadas con t-BHP; a,p< 0,05; b,p< 0,025; c,p< 0,0125; d,p< 0,01; e,p< 0,005; f,p< 0,0025; h,p< 0,0005 i,p> 0,05.

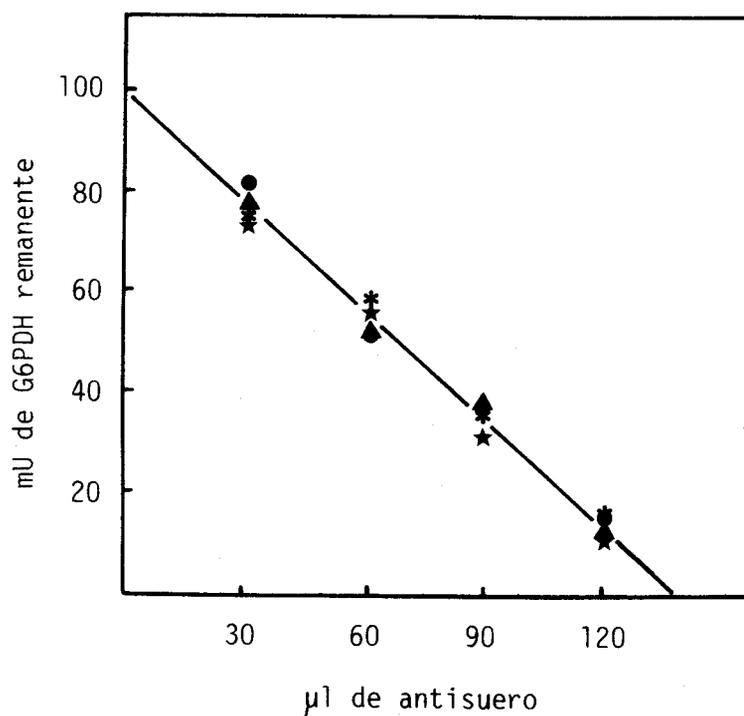


Figura 4.17. INMUNOPRECIPITACION DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA HEPATICA. Una cantidad fija de G6PDH (100 mU) se incubó con volúmenes crecientes de antisuero como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los tubos de reacción. Cada punto corresponde a 3 experimentos individuales. (▲) ratas tratadas con t-BHP, (●) ratas tratadas con t-BHP + BCNU, (*) ratas tratadas con Fenobarbital, (★) ratas tratadas con Bezafibrato.

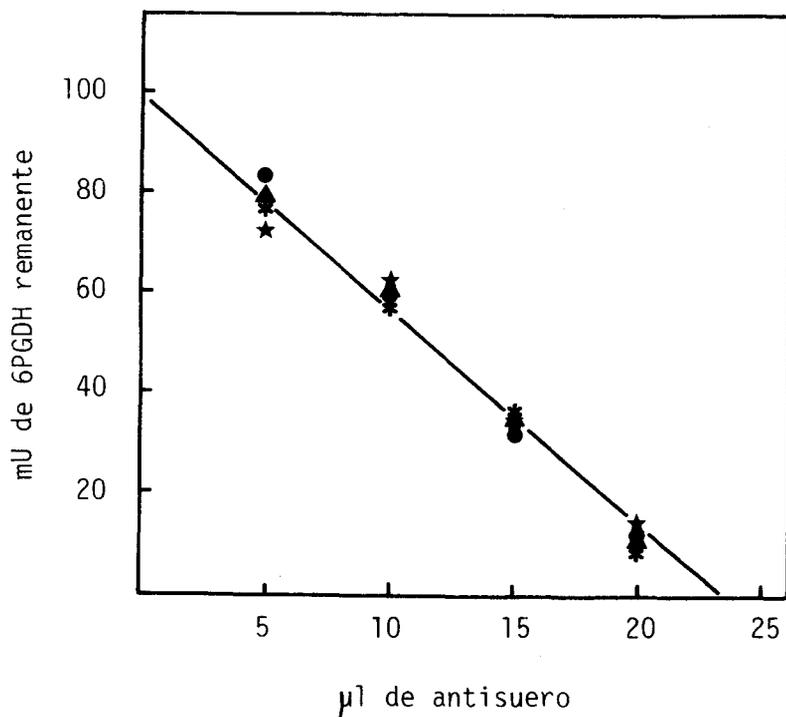


Figura 4.18. INMUNOPRECIPITACION DE 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA HEPATICA. Una cantidad fija de 6PGDH (100 mU) se incubó con volúmenes crecientes de antisuero como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los tubos de reacción. Cada punto corresponde a 3 experimentos individuales. (\blacktriangle) ratas tratadas con t-BHP, (\bullet) ratas tratadas con t-BHP + BCNU, ($*$) ratas tratadas con Fenobarbital, (\star) ratas tratadas con Bezafibrato.

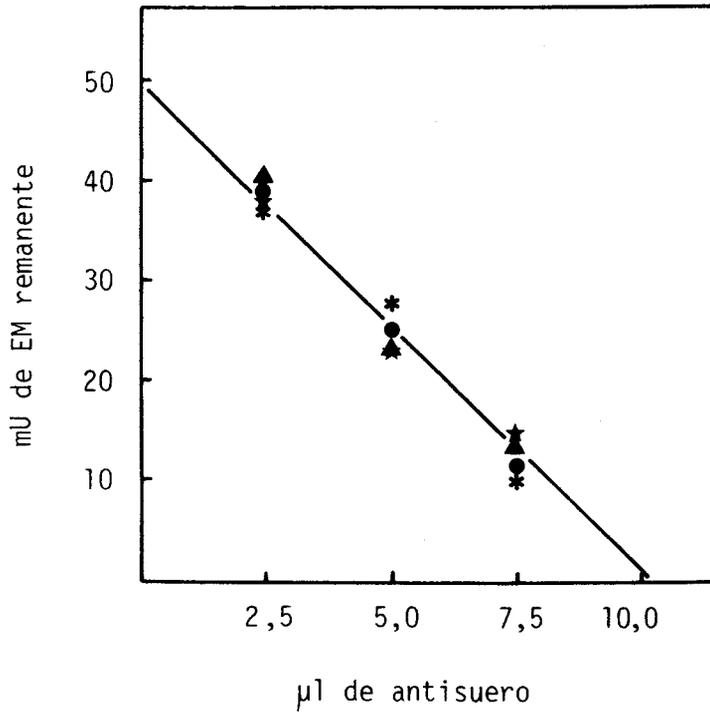


Figura 4.19. INMUNOPRECIPITACION DE LA ENZIMA MALICA HEPATICA. Una cantidad fija de EM (50 mU) se incubó con volúmenes crecientes de antisuero como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los tubos de reacción. Cada punto corresponde a 3 experimentos individuales. (▲)ratas tratadas con t-BHP, (●)ratas tratadas con t-BHP + BCNU, (*)ratas tratadas con Fenobarbital, (★)ratas tratadas con Bezafibrato.

Tratamiento	NADPH	NADP	NADPH/NADP
Control	233,9 ± 28,1 (4)	47,3 ± 6,9 (4)	5,1 ± 0,30 (4)
t-BHP	153,3 ± 13,0 (4)	50,8 ± 5,8 (4)	3,0 ± 0,09 ^{hj} (4)
t-BHP+BCNU	359,5 ± 6,1 (4)	91,2 ± 5,3 (4)	4,0 ± 0,27 ^{bj dm} (4)
Fenobarb.	230,5 ± 16,5 (4)	65,0 ± 6,6 (4)	3,6 ± 0,10 ^{fj} (4)
Bezafibrato	208,7 ± 8,6 (4)	60,6 ± 6,1 (4)	3,5 ± 0,20 ^{fj} (4)

Tabla 4.11. EFECTO DE LA ACTIVACION E INHIBICION DE LOS SISTEMAS DE DESTOXIFICACION, MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE DIFERENTES SUSTANCIAS, SOBRE LA RAZON NADPH/NADP EN HIGADO DE RATA. La concentración de NADPH y NADP se determinaron como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados están dados en nmoles/ g de tejido como medias ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. Los análisis estadísticos se basaron en comparaciones realizadas usando la t de Student. j, comparado con valores controles; m, comparado con ratas tratadas con t-BHP; a, p < 0,05; b, p < 0,025; c, p < 0,0125; d, p < 0,01; e, p < 0,005; f, p < 0,0025; h, p < 0,0005; i, p > 0,05.

En contraste con estos resultados, en ratas tratadas con tBHP + BCNU la actividad específica de la NADPH-citocromo c reductasa no sufrió variación, mientras que, tal como se esperaba, la actividad de la GR hepática disminuyó notablemente, debido al efecto inhibitor del BCNU sobre la GR, hasta un valor de, aproximadamente, un tercio de la actividad de las ratas controles. (tabla 4.9).

Paralelamente a este efecto sobre las enzimas de detoxificación, la inducción de las enzimas G6PDH, 6PGDH y EM causada por tBHP fue fuertemente suprimida por la administración de BCNU, como puede verse en la tabla 4.10. Aunque para las tres enzimas las actividades específicas estuvieron por debajo de los valores controles, este efecto fue mucho mayor sobre la G6PDH, cuya actividad fue aproximadamente el 50% de la observada en controles.

Al igual que en las condiciones anteriores, las inmunoprecipitaciones de estas tres enzimas con antisueros específicos revelaron que en ratas tratadas con tBHP y con tBHP+BCNU las cantidades de enzimas fueron proporcionales a las actividades enzimáticas encontradas (figuras 4.17, 4.18 y 4.19).

Este efecto del tBHP+BCNU sobre las inducciones enzimáticas fue acompañado por un incremento en la razón NADPH/NADP con respecto al valor encontrado en ratas tratadas exclusivamente con tBHP, pero sin llegar a alcanzar los resultados observados en animales controles.

Como se ha mencionado anteriormente, otros compuestos usados en nuestros experimentos para producir cambios en el consumo de NADPH han sido Fenobarbital y Bezafibrato. El efecto de estas sustancias sobre las enzimas productoras de NADPH puede verse en la tabla 4.10. Los resultados indican que con ambos tratamientos la actividad específica de la EM aumentó aproximadamente 3,5 veces, sin cambios paralelos en la actividad de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato. La IDH, en cambio, no respondió de igual forma a los dos tratamientos. Así, mientras que en ratas a las que se les administró Fenobarbital la actividad de esta enzima se incrementó significativamente, en ratas tratadas con Bezafibrato su actividad específica disminuyó.

Con respecto al efecto de estos compuestos sobre la razón NADPH/NADP en hígado, puede verse en la tabla 4.11 que en ambos casos se produjo una disminución muy similar de esta razón.

Las inmunoprecipitaciones indicaron que en todos los casos y para cada enzima se necesitó el mismo volumen de antisuero específico para precipitar unas determinadas miliunidades, lo que indica que, en estas condiciones, las cantidades de las enzimas fueron proporcionales a las actividades enzimáticas encontradas (figuras 4.17, 4.18 y 4.19).

4.8 EFECTO COMPARATIVO DE LA ACTIVACION E INHIBICION DE LOS PROCESOS DE DESTOXIFICACION QUE USAN NADPH SOBRE LAS ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH DE TEJIDO ADIPOSEO.

Los efectos de las sustancias xenobióticas sobre las actividades enzimáticas en el tejido adiposo están resumidos en las tablas 4.9 y 4.12. Como puede observarse (tabla 4.9), la actividad específica de la NADPH-citocromo c reductasa es menor que en hígado, presumiblemente debido al hecho de que el hígado tiene una mayor capacidad de detoxificación. La actividad específica de esta enzima fue ligeramente aumentada por Fenobarbital y su actividad fue significativamente reducida por BCNU.

Con respecto a la GR, en tejido adiposo la actividad de esta enzima fue solamente aumentada por tBHP, debido a que este compuesto es metabolizado a través de la oxidación de GSH (Lotscher y col., 1.979). Al mismo tiempo, y como se esperaba, el BCNU produjo una gran disminución de GR hasta valores 10 veces menores que los observados en ratas controles.

En cuanto al efecto del tBHP sobre las enzimas productoras de NADPH en este tejido, como puede verse en la tabla 4.12 el comportamiento tanto de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato como de la EM fue parecido al encontrado en hígado: la administración de tBHP provocó un aumento en las actividades específicas de estas enzimas, aumento que fue suprimido por la administración conjunta de BCNU. Al igual de lo que ocurrió en hígado, las actividades enzimáticas fueron menores que la de los controles, sobre todo en el caso de la G6PDH, cuya actividad fue un 50% menor. Por el contrario, la actividad de la IDH tampoco varió en este tejido con el tratamiento con tBHP.

Tratamiento	G6PDHH	6PGDH	EM	IDH
Control	92,7 ± 2,9 (9)	24,8 ± 0,9 (10)	172,9 ± 23,1 (10)	74,2 ± 5,1 (7)
t-BHP	133,6 ± 3,9 ^{hj} (4)	48,5 ± 2,2 ^{hj} (4)	305,5 ± 63,3 ^{bj} (4)	64,4 ± 2,8 ^{ij} (4)
t-BHP+BCNU	55,1 ± 10,7 ^{hm} (4)	20,0 ± 3,1 ^{aj} (4)	55,3 ± 11,5 ^{bj} (4)	N. D.
Fenobarbit.	109,6 ± 13,4 ^{ij} (4)	22,9 ± 1,8 ^{ij} (4)	279,6 ± 32,7 ^{bj} (4)	98,3 ± 2,9 ^{ej} (4)
Bezafib.	91,2 ± 16,6 ^{ij} (4)	26,7 ± 7,7 ^{ij} (4)	190,0 ± 17,6 ^{ij} (4)	84,6 ± 13,0 ^{ij} (4)

Tabla 4.12. EFECTO DE LA ACTIVACION E INHIBICION DE LOS SISTEMAS DE DESTOXIFICACION, MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE DIFERENTES SUSTANCIAS, SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH DEL TEJIDO ADIPOSEO. Las actividades especificas, medidas como se describe en la sección de Materiales y Métodos, se expresan como nmol de NADPH/mg de protefnas/min. Los resultados son medias ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. Los análisis estadísticos se basaron en comparaciones realizadas usando la t de Student. j,comparado con valores controles; m,comparado con ratas tratadas con t-BHP; a,p< 0,05; b,p< 0,025; c,p< 0,0125;d,p<0,01; e,p< 0,005; f,p< 0,0025; h,p< 0,0005; i,p> 0,05.

Tratamiento	NADPH	NADP	NADPH/NADP
Control	5.50 ± 0,46 (4)	2,12 ± 0,20 (4)	2,59 ± 0,02 (4)
t-BHP	0,83 ± 0,06 (4)	2,43 ± 0,31 (4)	0,34 ± 0,01 ^{hj} (4)
t-BHP+BCNU	4,86 ± 0,45 (4)	3,46 ± 0,02 (4)	1,40 ± 0,14 ^{hj} (4) ^{hm}
Fenobarb.	5,63 ± 0,18 (4)	4,72 ± 0,16 (4)	1,19 ± 0,08 ^{hj} (4)
Bezafibrato	2,16 ± 0,37 (4)	2,08 ± 0,29 (4)	1,06 ± 0,16 ^{hj} (4)

Tabla 4.13. EFECTO DE LA ACTIVACION E INHIBICION DE LOS SISTEMAS DE DESTOXIFICACION, MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE DIFERENTES SUSTANCIAS, SOBRE LA RAZON NADPH/NADP DE TEJIDO ADIPOSITO DE RATA. La concentración de NADPH y NADP se determinaron como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados están dados en nmoles/ g de tejido como medias ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. Los análisis estadísticos se basaron en comparaciones realizadas usando la t de Student. j, comparado con valores controles; m, comparado con ratas tratadas con t-BHP; a, p < 0,05; b, p < 0,025; c, p < 0,0125; d, p < 0,01; e, p < 0,005; f, p < 0,0025; h, p < 0,0005 ; i, p > 0,05.

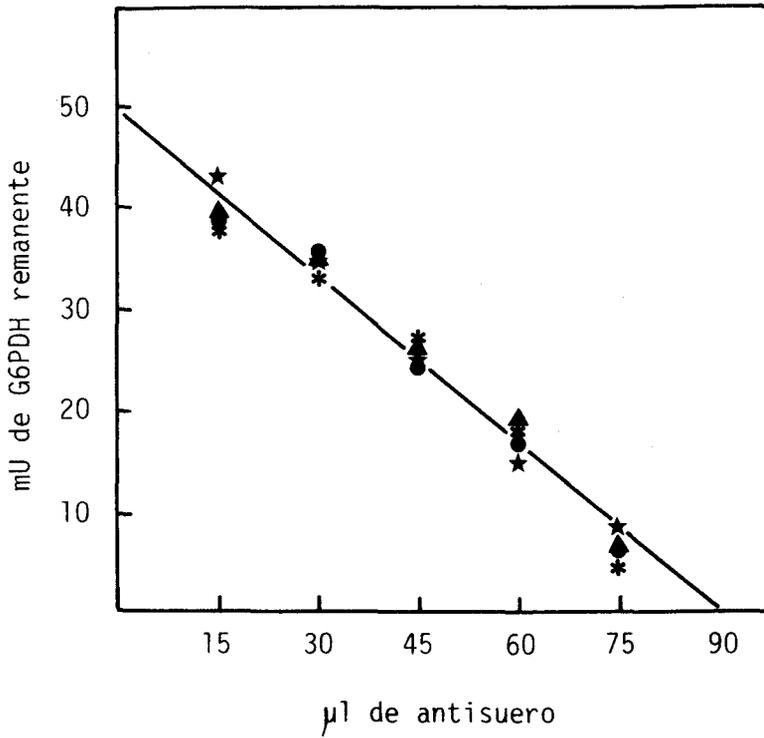


Figura 4.20. INMUNOPRECIPITACION DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA DE TEJIDO ADIPOSITO. Una cantidad fija de G6PDH (50 mU) se incubó con volúmenes crecientes de antisuero como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los tubos de reacción. Cada punto corresponde a 3 experimentos individuales. (▲) ratas tratadas con t-BHP, (●) ratas tratadas con t-BHP + BCNU, (*) ratas tratadas con Fenobarbital, (★) ratas tratadas con Bezafibrato.

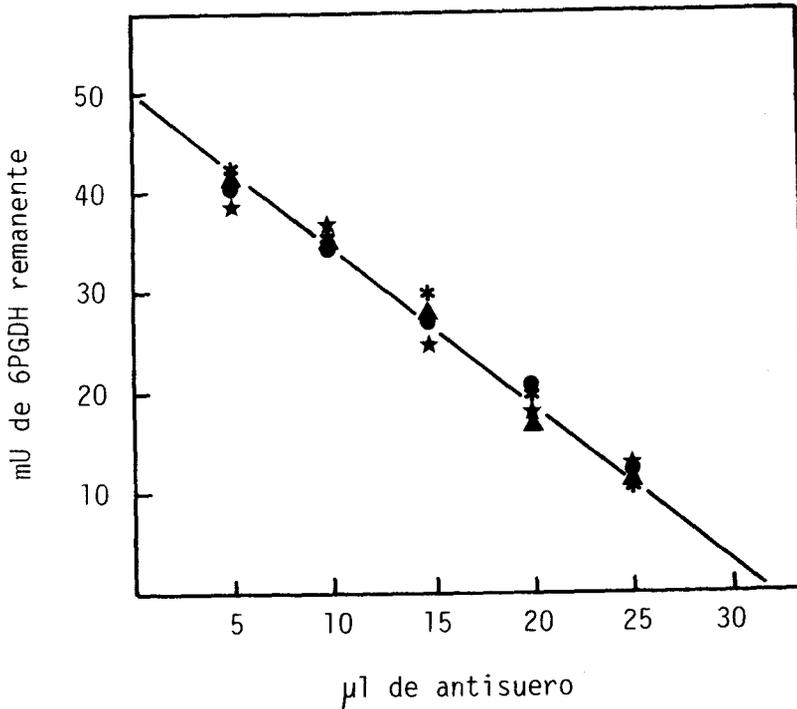


Figura 4.21. INMUNOPRECIPITACION DE 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA DE TEJIDO ADIPOSO. Una cantidad fija de 6PGDH (50 mU) se incubó con volúmenes crecientes de antisuero como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los tubos de reacción. Cada punto corresponde a 3 experimentos individuales. (▲) ratas tratadas con t-BHP, (●) ratas tratadas con t-BHP + BCNU, (*) ratas tratadas con Fenobarbital, (★) ratas tratadas con Bezafibrato.

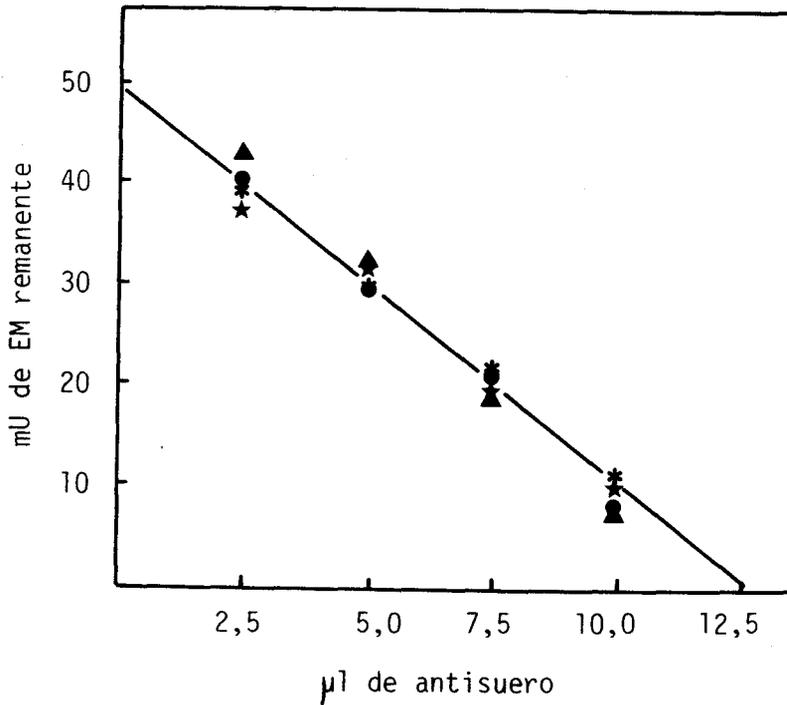


Figura 4.22. INMUNOPRECIPITACION DE LA ENZIMA MALICA DE TEJIDO ADIPOSEO. Una cantidad fija de EM (50 mU) se incubó con volúmenes crecientes de antisuero como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades enzimáticas se ensayaron en alícuotas del sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los tubos de reacción. Cada punto corresponde a 3 experimentos individuales. (▲) ratas tratadas con t-BHP, (●) ratas tratadas con t-BHP + BCNU, (*) ratas tratadas con Fenobarbital, (★) ratas tratadas con Bezafibrato.

Paralelamente a estos efectos y como puede observarse en la tabla 4.13, el tBHP causó una disminución de la razón NADPH/NADP de aproximadamente 7 veces, disminución que fue prevenida, en gran medida, por la administración conjunta de BCNU + tBHP, pero sin llegar a reestablecerse los valores normales.

Las figuras 4.20, 4.21 y 4.22 representan, respectivamente, las inmunoprecipitaciones de G6PDH, 6PGDH y EM de tejido adiposo bajo estas condiciones. Como puede verse, las actividades de las enzimas fueron dependientes de las cantidades presentes de proteínas.

En cuanto al efecto del Fenobarbital sobre estas enzimas del tejido adiposo, los resultados obtenidos son muy semejantes a los obtenidos en el hígado. Así, la actividad de la EM fue significativamente aumentada, sin cambios paralelos en las actividades de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato (tabla 4.12). El Bezafibrato, en cambio, no afectó a ninguna de las enzimas estudiadas. En ambos casos, se produjo una disminución en la razón NADPH/NADP (tabla 4.13).

En estas dos últimas condiciones, las inmunoprecipitaciones de las enzimas con antisueros específicos indicaron que las cantidades de enzimas presentes fueron proporcionales a las actividades enzimáticas (figuras 4.20, 4.21 y 4.22).

4.9 EFECTO DE LA DIETA POBRE EN PROTEINAS SOBRE LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH, SOBRE LOS SISTEMAS DE DESTOXIFICACION Y SOBRE EL CONTENIDO DE GLUTATION EN HIGADO DE RATA: EFECTO DE LA SUPLEMENTACION DE LA DIETA POBRE EN PROTEINAS CON DISTINTOS AMINOACIDOS SOBRE LA INDUCCION DE LA EM EN ESTAS CONDICIONES.

En la tabla 4.13 están representadas las actividades específicas de las enzimas productoras de NADPH hepáticas de ratas alimentadas con diferentes dietas. En estos experimentos, como ya había sido descrito por Frenkel y col. (1.972), se observa que la actividad de la EM aumentó muy marcadamente (aproximadamente 20 veces) cuando las ratas se alimentaron durante 25 días con una dieta pobre en proteínas (dieta PP), en comparación con las ratas controles, que en este caso recibieron también una dieta en polvo con un 18% de proteínas. Por el contrario, las actividades de las otras enzimas productoras de NADPH no experimentaron cambios apreciables con la deprivación de las proteínas de la dieta.

Los resultados de esta misma tabla indican que esta inducción de la EM se previno en parte con la suplementación de la dieta de bajo contenido proteico con distintos aminoácidos. Como puede verse, el aminoácido que tiene más influencia sobre la inducción de esta enzima fue la metionina, ya que la no administración de este aminoácido conllevó a una inducción de la EM semejante a la encontrada con la dieta PP (grupo 7). En ninguno de los casos la inducción de esta enzima se previno totalmente, ni incluso en el grupo 6,

Grupo	EM	G6PDH	6PGDH	IDH
1	5,5 ± 0,6 (4)	19,1 ± 1,5 (4)	24,9 ± 1,6 (4)	192,2 ± 15,7 (4)
2	91,9 ± 3,9 ^h (4)	21,1 ± 1,7 ⁱ (4)	26,2 ± 2,0 ⁱ (4)	127,7 ± 3,5 ^e (4)
3	45,5 ± 8,3 ^f (4)	22,0 ± 2,0 ⁱ (4)	23,9 ± 3,4 ⁱ (4)	152,7 ± 5,9 ^a (4)
4	44,4 ± 3,9 ^h (4)	24,0 ± 1,7 ^a (4)	30,0 ± 2,3 ⁱ (4)	157,1 ± 4,6 ^a (4)
5	36,4 ± 3,0 ^h (4)	25,1 ± 1,1 ^d (4)	32,7 ± 2,3 ^b (4)	227,9 ± 11,6 ⁱ (4)
6	23,3 ± 3,6 ^f (4)	17,7 ± 1,6 ⁱ (4)	32,1 ± 2,3 ^b (4)	217,2 ± 12,7 ⁱ (4)
7	85,9 ± 4,0 ^h (4)	26,8 ± 4,2 ⁱ (4)	33,9 ± 4,8 ⁱ (4)	192,9 ± 9,9 ⁱ (4)
8	55,6 ± 3,2 ^h (4)	26,8 ± 2,4 ^a (4)	29,4 ± 1,8 ⁱ (4)	211,3 ± 6,6 ⁱ (4)

Tabla 4.14. EFECTO DE LA DIETA POBRE EN PROTEINAS SOBRE LAS ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH HEPATICAS: EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON DISTINTOS AMINOACIDOS. Las actividades especificas, medidas como se describe en la seccion de Materiales y Métodos, se expresan como nmol de NADPH/mg de proteinas/min. Grupo 1: ratas controles (18% de proteinas); grupo 2: ratas alimentadas con dieta PP (0,5% de proteinas); grupo 3: ratas alimentadas con dieta PP + cisteina; grupo 4: ratas alimentadas con dieta PP + cisteina, glicina y glutámico; grupo 5: ratas alimentadas con dieta PP + metionina, isoleucina, treonina y valina; grupo 6: ratas alimentadas con dieta PP + aminoácidos esenciales; grupo 7: ratas alimentadas con dieta PP + todos los aminoácidos esenciales salvo metionina; grupo 8: ratas alimentadas con dieta PP + metionina. Los resultados son medias ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. Los análisis estadísticos se basaron en comparaciones realizadas con ratas controles usando la t de Student. a, p < 0,05; b, p < 0,025; c, p < 0,0125; d, p < 0,01; e, p < 0,005; f, p < 0,0025; h, p < 0,0005; i, p > 0,05.

el cual se alimentó con dieta PP más todos los aminoácidos esenciales. Tampoco en ninguno de los grupos estudiados se apreció variación en las actividades específicas de las otras enzimas productoras de NADPH.

Al mismo tiempo, hemos medido también en todos estos estados nutricionales las actividades de los sistemas de detoxificación, así como la concentración de glutatión total hepático. Como puede apreciarse en la tabla 4.14, la máxima inducción de la EM en los grupos 2 (PP) y 7 (PP+aa-met) tuvo lugar paralelamente a una importante disminución de la concentración de glutatión total y a una inducción de aproximadamente 2 veces de la GR y NADPH-citocromo c reductasa. En la tabla 4.15 está representada la correlación entre las actividades específicas de las enzimas de detoxificación y la de la EM.

Grupo	GR	cit. c red.	GSH + GSSG
1	38,4 ± 1,6 (4)	84,7 ± 3,6 (4)	2008,0 ± 84,8 (4)
2	78,9 ± 3,1 ^h (4)	157,2 ± 9,9 ^h (4)	540,2 ± 45,6 ^h (4)
3	47,9 ± 1,8 ^e (4)	118,5 ± 12,7 ^b (4)	2217,3 ± 95,3 ⁱ (4)
4	48,8 ± 3,6 ^b (4)	100,5 ± 8,1 ⁱ (4)	2269,3 ± 65,1 ^a (4)
5	53,1 ± 5,3 ^b (4)	109,4 ± 8,3 ^b (4)	2156,7 ± 79,2 ⁱ (4)
6	46,9 ± 1,2 ^e (4)	83,5 ± 1,5 ⁱ (4)	2044,3 ± 52,6 ⁱ (4)
7	85,6 ± 8,2 ^f (4)	130,2 ± 12,5 ^d (4)	347,9 ± 29,6 ^h (4)
8	40,6 ± 2,4 ⁱ (4)	127,3 ± 8,3 ^f (4)	2398,7 ± 68,9 ^d (4)

Tabla 4.15. EFECTO DE LA DIETA POBRE EN PROTEINAS SOBRE LAS ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE LAS ENZIMAS DE DESTOXIFICACION Y SOBRE LOS NIVELES DE GLUTATION TOTAL HEPATICOS: EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON DISTINTOS AMINOACIDOS. Las actividades especificas y el glutation total se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades especificas se expresan como nmoles de sustrato transformado por minuto y por mg de proteínas. Los resultados de glutation total se expresan en ug/g de tejido. Grupo 1: ratas controles (18% de proteínas) ; grupo 2: ratas alimentadas con dieta PP (0,5% de proteínas) ; grupo 3: ratas alimentadas con dieta PP + cisteína; grupo 4: ratas alimentadas con dieta PP + cisteína, glicina y glutámico; grupo 5: ratas alimentadas con dieta PP + metionina, isoleucina, treonina y valina; grupo 6: ratas alimentadas con dieta PP + aminoácidos esenciales; grupo 7: ratas alimentadas con dieta PP + todos los aminoácidos esenciales salvo metionina; grupo 8: ratas alimentadas con dieta PP + metionina. Los resultados son medias ± S.E.M. para el número de animales indicado entre paréntesis. Los análisis estadísticos se basaron en comparaciones realizadas con ratas controles usando la t de Student. a, p < 0,05; b, p < 0,025; c, p < 0,0125; d, p < 0,01 ; p < 0,005; f, p < 0,0025; h, p < 0,0005; i, p > 0,05.

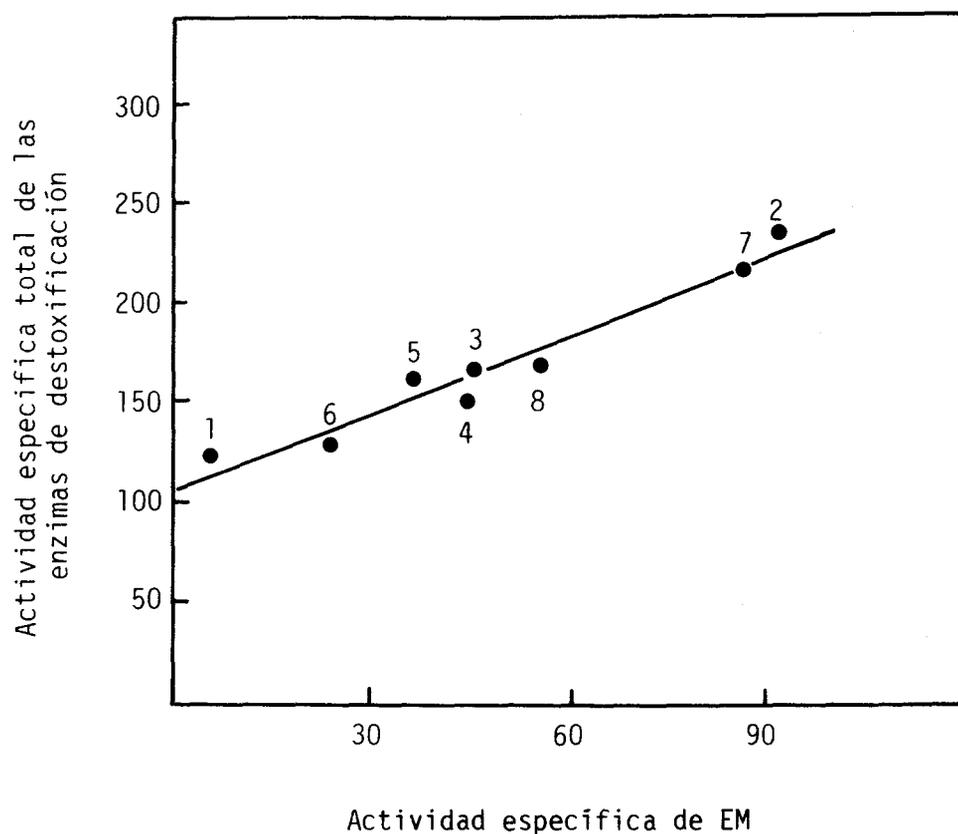


FIGURA 4.23. CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA ENZIMA MALICA Y LAS ACTIVIDADES ESPECIFICAS DE LAS ENZIMAS DE DESTOXIFICACION ENCONTRADA EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS DE BAJO CONTENIDO PROTEICO SUPLEMENTADAS CON DIFERENTES AMINOACIDOS. En los ejes de abscisas y ordenadas se representan respectivamente las actividades específicas de la enzima málica y la suma de las actividades específicas de GR y NADPH citocromo c reductasa. Los números indican los grupos de ratas listados en las tablas 4.13 y 4.14. $r = 0,969$.

5. DISCUSSION

Como ya se ha mencionado previamente, en este trabajo se intenta elucidar la posible implicación del requerimiento de NADPH en la regulación a largo plazo de las enzimas productoras de NADPH.

Desde un punto de vista general, se conoce que ciertos cambios en el metabolismo dan lugar a la inducción de determinadas proteínas como consecuencia de la actuación de una señal metabólica específica. Actualmente, se conocen muy pocas de estas señales que sean la causa primaria de la inducción de una proteína en seres superiores. Algunas hormonas, como los glucocorticoides, son las únicas causas que hasta hoy se han descrito como inductores específicos de proteínas.

En el caso de las enzimas productoras de NADPH (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y enzima málica), la inducibilidad por una serie de estímulos nutricionales y hormonales se conoce desde 1.960 (Fitch y Chaikoff, 1.960), y si bien existe una extensa bibliografía acerca de los mecanismos que regulan a largo plazo las actividades de estas enzimas, los factores implicados en esta inducción permanecen aun sin identificar.

Sin embargo, teniendo en cuenta, primero, la correlación existente entre la actividades de estas enzimas y la actividad de determinados procesos consumidores de NADPH (Goodridge, 1.975; Collins y Korn, 1.980; Collins y Korn, 1.981; Mackall y col., 1.976; Rognstad y Katz, 1.979; Miksicek y Towle; 1.982) y, segundo, los estudios sobre la regulación a corto plazo de estas enzimas por la razón NADPH/NADP (Fabregat y

col., 1.985; Fabregat y col., 1.986), sugerimos que a largo plazo las actividades de G6PDH, 6PGDH y EM podrían estar reguladas a través de un mecanismo que implicase cambios en el requerimiento de NADPH. De esta forma, un aumento o disminución durante suficiente tiempo en el requerimiento de NADPH produciría, respectivamente, un aumento o disminución en las cantidades de las enzimas G6PDH, 6PGDH y EM, independientemente de la identidad de la vía consumidora de NADPH.

El abordaje experimental de esta hipótesis se ha realizado mediante el estudio sistemático del efecto de las variaciones en el flujo a través de diferentes vías consumidoras sobre las actividades específicas y las cantidades de estas enzimas, midiendo al mismo tiempo los valores de la razón NADPH/NADP en todas estas condiciones, valores estos últimos que se presentan como una medida del consumo de NADPH. Así, hemos estudiado, primeramente, el efecto sobre los niveles de estas enzimas del aumento del consumo de NADPH y, en segundo lugar, el efecto de la inhibición de la vía consumidora de NADPH.

En una etapa inicial, el aumento en el requerimiento de NADPH se llevó a cabo mediante la activación de dos vías consumidoras de NADPH, como son la síntesis de ácidos grasos y determinadas reacciones de detoxificación catalizadas por enzimas que requieren NADPH como cofactor: glutatión reductasa y NADPH-citocromo P-450 reductasa. A continuación, se determinó el efecto de la inhibición de estas vías consumidoras mediante el uso de inhibidores específicos: Bezafibrato, un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos, y BCNU, un inhibidor de la glutatión reductasa.

5.1 EFECTO SOBRE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH DEL AUMENTO O DISMINUCION EN EL REQUERIMIENTO DE NADPH PROVOCADO POR LA ACTIVACION E INHIBICION DE LA SINTESIS DE ACIDOS GRASOS.

La síntesis de ácidos grasos es una de las vías consumidoras de NADPH, inducible por diferentes condiciones metabólicas, tales como el ayuno-realimentación con una dieta rica en hidratos de carbono o el tratamiento con insulina (Young y col., 1.964; Timmers y Knittle, 1.980; Alexander y col., 1.982). Como puede verse en la tabla 4.4, esta inducción se produjo tanto en el hígado como en el tejido adiposo, y fue bastante marcada. Al mismo tiempo, en el hígado se encontró una gran correlación entre las actividades de las enzimas productoras de NADPH y la velocidad de síntesis de los ácidos grasos. En este tejido y en estas condiciones, como ya había sido descrito anteriormente (Tepperman y Tepperman, 1.963; Rudak y col., 1.971), observamos un aumento en las actividades específicas de estas tres enzimas, que se correspondieron con aumentos en las cantidades presentes de proteínas enzimáticas (figuras 4.11a, 4.12a y 4.13a). Este efecto hormonal y nutricional fue paralelo a una disminución en el valor de la razón NADPH/NADP (tabla 4.6), debido al aumento en el consumo de NADPH. Estos resultados están de acuerdo con nuestra hipótesis ya que, bajo estos estímulos, al incrementarse el requerimiento de NADPH se produjo un aumento en las cantidades de G6PDH, 6PGDH y EM. Nuestra sugerencia está apoyada también por el efecto del Bezafibrato sobre estas enzimas y sobre la razón NADPH/NADP.

El Bezafibrato es un fármaco usado en el tratamiento de los desórdenes del metabolismo lipídico, cuya acción sobre las vías biosintéticas de los lípidos no está muy bien establecida. En la tabla 4.4 se encuentran los resultados del efecto del Bezafibrato sobre la velocidad de síntesis de los ácidos grasos en hígado y tejido adiposo. Como puede verse, el Bezafibrato previno totalmente la inducción de la síntesis de ácidos grasos provocada por el ayuno-realimentación o por la administración de insulina.

Este efecto del Bezafibrato sobre la incorporación de agua tritiada en los ácidos grasos, fue debido fundamentalmente a una inhibición de la síntesis más que a un aumento del catabolismo lipídico ya que: 1) El tratamiento con Bezafibrato durante 3 días no produce una gran inducción del sistema de β -oxidación peroxisomal (Harrison, 1.984). 2) La β -oxidación peroxisomal está principalmente implicada en el acortamiento de los ácidos grasos de cadena larga, que son pobres sustratos para las mitocondrias (Christiansen, 1.978; Christiansen y col., 1.979; Osmundsen y col., 1.980). 3) La oxidación de los ácidos grasos por las mitocondrias está reducida en condiciones lipogénicas: ayuno-realimentación y tratamiento con insulina (McGarry y Foster, 1.980). 4) En estas condiciones, el Bezafibrato podría producir una variación en la proporción ácidos grasos de cadena larga/ácidos grasos de cadena corta, pero esto no cambiaría la medida de la velocidad de síntesis de ácidos grasos usando agua tritiada, ya que todos los ácidos grasos son extraídos. 5) El Bezafibrato inhibe la síntesis de los ácidos grasos cuando se adiciona al

medio de incubación de hepatocitos, adipocitos y acinis (Villanueva, 1.986).

Los resultados indican que el Bezafibrato previno al mismo tiempo el aumento del consumo de NADPH provocado por la activación de la biosíntesis de los ácidos grasos (tabla 4.6) y la inducción de las dos deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato (tabla 4.6), lo cual está muy de acuerdo con nuestra hipótesis, ya que al no estar aumentado el consumo de NADPH no se produce el aumento en la síntesis de estas enzimas (figuras 4.11b y 4.12b) y, por tanto, de sus actividades específicas.

El comportamiento de la EM hepática en ratas ayunadas-realimentadas y tratadas con Bezafibrato y en ratas tratadas conjuntamente con insulina y Bezafibrato fue totalmente diferente. Así, la administración de Bezafibrato aumentó la síntesis de esta enzima en ratas ayunadas-realimentadas (tabla 4.13b) y no afectó la acción inductora de la insulina sobre esta enzima. Este resultado, que será discutido más adelante, podría ser debido a la existencia de distintos depósitos de NADPH, de forma que el NADPH usado como sustrato en la biosíntesis de los ácidos grasos pudiera ser algo distinto al usado para los mecanismos de detoxificación.

La actividad de la isocitrato deshidrogenasa-NADP no parece estar regulada a largo plazo por los requerimientos de NADPH. Esta enzima, que presenta un perfil de desarrollo totalmente diferente al de las otras enzimas estudiadas (Andrés y col., 1.980), no sufre variación alguna en su actividad ante los cambios

en la dieta que afectan a la lipogénesis (Veech y col., 1.969), lo que hace suponer que para esta enzima no existe la regulación a largo plazo que conlleva un aumento en la cantidad de enzima.

Que el efecto del Bezafibrato pudiera ser debido a la inhibición de la síntesis de proteínas se puede descartar, teniendo en cuenta el efecto de este fármaco sobre la enzima NADPH-citocromo c reductasa de ratas bajo condiciones lipogénicas, enzima a la que induce con respecto a ratas ayunadas-realimentadas, en las cuales ya estaba aumentada en comparación con los controles. (sección 4.5) Estos resultados podrían ser debidos a la posible implicación de esta enzima en el metabolismo del Bezafibrato, ya que la NADPH-citocromo c reductasa es una enzima inducible por diferentes compuestos xenobióticos (Conney, 1.967).

El comportamiento del tejido adiposo es al mismo tiempo diferente en relación al hígado. Así, el ayuno-realimentación sólo produjo un aumento en la síntesis de 6PGDH (figura 4.15a) y, por tanto, de su actividad específica (tabla 4.7). Esto podría ser debido a que la principal función de este tejido es la síntesis de ácidos grasos, lo cual pudiera ser la razón de que los procesos de diferenciación produzcan mayor actividad enzimática de las enzimas que intervienen en la síntesis de los ácidos grasos y de las enzimas productoras de NADPH, a fin de llevar a cabo este proceso en condiciones óptimas, siempre que el sustrato esté disponible, sin necesidad de una mayor inducción por la dieta. Como se puede observar en la tabla 4.5, en hígado la actividad de 6PGDH es similar a la de G6PDH, mientras

que en tejido adiposo la actividad de G6PDH es aproximadamente 5 veces mayor que la de 6PGDH. Esta diferencia sugiere que, al ser la 6PGDH la etapa limitante (Sapag-Hagar y col., 1.973), su incremento representaría el aumento de todo el proceso, como ocurre en ratas ayunadas-realimentadas.

En estas condiciones, se produjo también un descenso en la razón NADPH/NADP (tabla 4.8) y, por tanto, un aumento en el requerimiento de NADPH, lo cual podría ser responsable de la inducción de esta enzima, según nuestra hipótesis, que se apoya también en el efecto observado cuando a las ratas ayunadas-realimentadas se les administró Bezafibrato. En efecto, como puede observarse en la tabla 4.8, este compuesto al prevenir el aumento en el requerimiento de NADPH evitó también el aumento en la síntesis de 6PGDH (figura 4.15b).

El efecto de la insulina sobre las enzimas productoras de NADPH del tejido adiposo es similar al encontrado en hígado, en lo que se refiere tanto a la inducción de las enzimas G6PDH, 6PGDH y EM como a la disminución de la razón NADPH/NADP (tablas 4.7 y 4.8).

La administración conjunta de Bezafibrato e insulina, en cambio, no previno los aumentos en las actividades de las enzimas y, como puede observarse en la tabla 4.8, la razón NADPH/NADP no varió con respecto al valor encontrado en ratas tratadas solamente con insulina. Una vez más, este resultado indica una gran correlación entre los niveles de estas enzimas y el requerimiento de NADPH, y está de acuerdo con nuestra

hipótesis, ya que al no producirse la eliminación de la señal propuesta por nosotros, que es el requerimiento de NADPH, las enzimas permanecen inducidas.

5.2 EFECTO DE LA ACTIVACION E INHIBICION DE LOS SISTEMAS DE DESTOXIFICACION QUE CONSUMEN NADPH SOBRE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE NADPH.

Otras condiciones usadas en nuestros experimentos han sido las producidas por la administración de compuestos xenobióticos (t-butil hidroperóxido, Fenobarbital y Bezafibrato), que son metabolizados a través de procesos de destoxificación catalizados por enzimas que requieren NADPH (glutation reductasa y NADPH-citocromo P-450 reductasa), y la producida por la administración de BCNU, un inhibidor de la GR (Frischer y Ahmad, 1.977) en conjunción con t-BHP.

Cuando el t-BHP se les administró a las ratas hubo un incremento en las actividades específicas de las enzimas de destoxificación GR y NADPH-citocromo c reductasa (tabla 4.9), produciéndose de esta forma un aumento en el requerimiento de NADPH (tablas 4.11 y 4.13) . El efecto sobre la GR es debido a que el t-BHP es metabolizado a través de la oxidación de GSH (Lotscher y col., 1.979). Estos resultados fueron más significativos en hígado, debido presumiblemente a su mayor capacidad de destoxificación.

Al mismo tiempo, el tBHP provocó el aumento de las actividades específicas de las enzimas G6PDH, 6PGDH y EM en ambos tejidos (tablas 4.10 y 4.12), aumento que se

correspondió en todos los casos con los incrementos respectivos en la síntesis de estas enzimas (figuras 4.17, 4.18 , 4.19, 4.20, 4.21 y 4.22). Alternativamente, no se puede descartar rigurosamente una protección frente a la degradación de estas enzimas por estos compuestos. Todos estos resultados apoyan también nuestra hipótesis de la implicación del requerimiento de NADPH en la inducción de las enzimas productoras de NADPH.

El efecto del BCNU también está de acuerdo con nuestra hipótesis. La administración de este compuesto al mismo tiempo que el t-BHP previno el aumento del requerimiento de NADPH que tiene lugar cuando sólo se administra tBHP (ésto es debido a la inhibición de la glutathion reductasa (tabla 4.9)) en ambos tejidos (tablas 4.11 y 4.13). Cuando ambos compuestos se administraron conjuntamente, se previnieron los aumentos en las cantidades y actividades de las enzimas estudiadas, probablemente debido a una disminución en el consumo de NADPH causada por el BCNU. El mayor efecto encontrado en el tejido adiposo podría ser también debido a la fuerte inhibición por el BCNU de las enzimas consumidoras de NADPH.

El BCNU podría tener otro importante efecto, puesto que el incremento de GSSG bajo estas condiciones podría producir la inhibición de la síntesis de proteínas (Ochoa y Haro, 1.979). Para establecer que este efecto no fue responsable de los resultados encontrados, hemos medido el efecto de BCNU sobre la EM de ratas ayunadas-realimentadas. En esta situación, se produce un aumento en la actividad de esta enzima y el BCNU no

afecta la vía consumidora de NADPH (síntesis de ácidos grasos). En este caso, el BCNU no previno la inducción de la enzima málica (control: $8,9 \pm 0,4$ (4); ratas ayunadas-realimentadas: $22,1 \pm 4,6$ (4); ratas ayunadas-realimentadas + BCNU: $20,2 \pm 3,2$ (4). Resultados expresados en nmoles de NADPH/min/mg de proteínas. Entre paréntesis se indica el número de animales)

5.3 POSIBLE PARTICIPACION DE LA ENZIMA MALICA EN LOS PROCESOS DE DESTOXIFICACION.

Otra situación metabólica que también produce una fuerte inducción de la EM es la alimentación con una dieta de bajo contenido proteico, observación descrita previamente por Frenkel y col. (1.972). Esta condición se diferencia de todas las demás estudiadas con anterioridad, las cuales eran fundamentalmente condiciones lipogénicas (Mackal y col., 1.976; Kuri-Harcuch y Green, 1.977; Rognstad y Katz, 1.979) o inducciones producidas por hormonas (Drake y col., 1.983; Towle y col., 1.980; Magnuson y Nikodem, 1.983). El descubrimiento de este aumento de la actividad de la EM durante la adaptación a una dieta pobre en proteínas, sin cambios paralelos de otras enzimas productoras de NADPH (G6PDH y 6PGDH) ni de las enzimas lipogénicas, hizo pensar en la posibilidad de que otras funciones pudieran estar relacionadas con la actividad de esta enzima, a parte de la producción de NADPH para la síntesis de ácidos grasos.

El estudio de esta inducción ha sido efectuado principalmente por Frenkel y col. (1.972), quienes han

demostrado que en estas condiciones el aumento de la actividad específica de esta enzima es debido a un aumento en la síntesis, sin cambios apreciables en la degradación (Stark y Frenkel, 1.978), lo cual es semejante a los mecanismos de inducción de las demás enzimas productoras de NADPH en determinadas condiciones (Sun y Holten, 1.978; Miksicek y Towle, 1.982; Drake y col., 1.983).

En relación a la posible función de la EM durante la adaptación a la dieta pobre en proteínas, ha sido propuesto por Frenkel (1.975) que la inducción de la EM está condicionada por la disminución de glutatión necesario para el sistema de transporte de aminoácidos por el ciclo de Meister (Meister, 1.973). Nosotros hemos realizado el estudio de esta inducción, suplementando la dieta con distintos aminoácidos con el fin de delimitar la influencia relativa de cada uno de ellos. De nuestros resultados podemos indicar lo siguiente: a) Que, como ha sido descrito previamente, los cambios en la dieta ya pueden producir una modificación en las actividades de las enzimas. Esto se ve claramente al comparar los animales controles, alimentados con una dieta estándar en polvo, con los alimentados con la dieta pobre en proteínas suplementada con todos los aminoácidos esenciales en los que, como se puede apreciar en la tabla 4.13, la actividad de la EM permanece aún aumentada. Este aumento podría ser debido exclusivamente a la composición de la dieta, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que a veces cambios en las marcas de las dietas causan variaciones en las actividades enzimáticas. b) Como era de esperar, el aminoácido que tiene la máxima influencia en la inducción de la EM es

la metionina, ya que la no administración de este aminoácido conlleva a una inducción de la EM semejante a la encontrada con la dieta de bajo contenido proteico (tabla 4.13). Sin embargo, la administración de metionina sin todos los demás aminoácidos esenciales no sólo no previene la inducción de la EM, sino que además la actividad de esta enzima en este grupo es aproximadamente el doble de la encontrada en el grupo 6 (PP+met+aa), lo que sugiere la posible influencia de aminoácidos distintos a la metionina o cisteína.

Como puede apreciarse en la tabla 4.14, parece, al menos en parte, que en la inducción de la EM pudiera estar implicada la disminución de glutatión producida por la dieta pobre en proteínas. Sin embargo, no creemos que la posible relación entre la EM y la disminución de glutatión pueda estar en el mecanismo de transporte de aminoácidos por el ciclo de Meister, como sugirió Frenkel (1.975), ya que en este mecanismo no se produce un consumo de NADPH. Ahora bien, si tenemos en cuenta las enormes implicaciones que el glutatión tiene en los mecanismos de detoxificación (Lotscher y col., 1.979) y en los procesos de oxidación celulares, podríamos pensar que la inducción de esta enzima en estas condiciones sería debida a que, como consecuencia de la disminución de glutatión, se produce la activación de otros mecanismos de detoxificación que consumen NADPH, y este aumento del requerimiento de NADPH sería, según nuestra hipótesis, la causa de la inducción.

Nosotros hemos estudiado en estas condiciones las actividades de las enzimas de detoxificación GR y NADPH-citocromo c reductasa. Como puede apreciarse en

las tablas 4.13 y 4.14, en las ratas alimentadas con una dieta de bajo contenido proteico y en ausencia de metionina se produce un gran aumento en las actividades de estas enzimas, lo que conlleva logicamente a un aumento en el consumo de NADPH. En la tabla 4.14 puede observarse también que en aquellos grupos en los que el aumento de la actividad de la enzima málica es mayor (grupos 2 y 7) se produce una disminución en la concentración de glutatión, así como una fuerte inducción de GR y NADPH-citocromo c reductasa. Este aumento en las actividades de las enzimas de detoxificación podría ser debido al hecho de que una dieta deficiente hace al animal más susceptible a los agentes tóxicos procedentes de su normal metabolismo.

El aumento de la actividad de la GR es un tanto sorprendente, teniendo en cuenta que la concentración de uno de sus sustratos está disminuido. Esta inducción podría ser debida a la necesidad de producir un aumento en la eficiencia de la actuación enzimática, disminuida por falta de glutatión.

Otras situaciones experimentales estudiadas en las que se produce un incremento en la actividad y cantidad de la EM hepática, que no es acompañado por cambios en la actividad de otras enzimas lipogénicas, son el tratamiento con Fenobarbital y Bezafibrato (tablas 4.10 y 4.12), compuestos que inducen la NADPH-citocromo c reductasa (tabla 4.9). Estas situaciones tienen en común con la producida por la privación de las proteínas en la dieta que el aumento en los niveles de EM se acompañaron tanto por cambios paralelos en las actividades de las enzimas de detoxificación (tabla

4.9) como por la disminución de glutathion (glutathion en ratas tratadas con Bezafibrato : $1.549,7 \pm 51,9$; en ratas tratadas con Fenobarbital: $1.411 \pm 97,6$. Valores en μg de glutathion/g de tejido. Número de animales=6). En estos casos la disminución de los niveles de glutathion fue menor que con la dieta pobre en proteínas, probablemente debido al menor tiempo de tratamiento. Una posible explicación del aumento de la actividad de GR en estas ratas podría ser la implicación de la glutathion peroxidasa citosólica en el metabolismo del peróxido de hidrógeno formado por el sistema citocromo P-450 monooxigenasa (Sies y col., 1.972.

En el tejido adiposo los resultados son similares pero muy poco marcados y no significativos, salvo en el caso del aumento de la EM en ratas tratadas con Fenobarbital.

En estas condiciones, y de acuerdo con nuestra hipótesis, el aumento en el requerimiento de NADPH para los sistemas de detoxificación (tablas 4.11 y 4.13) podría ser la causa de la inducción de la EM.

Teniendo en cuenta estos resultados, que sugieren la existencia de una gran correlación entre la EM y las enzimas de detoxificación (figura 4.23), podemos afirmar que la EM podría desempeñar un papel importante en los procesos de detoxificación.

Como puede apreciarse a lo largo de este trabajo, parece haber una relación directa entre las necesidades de NADPH y su producción, ya que en cada caso un aumento o disminución en el consumo de NADPH, en respuesta a

diferentes estímulos, fue acompañado por un incremento o disminución paralelos en las cantidades de las enzimas productoras de NADPH, con la única excepción de la IDH, enzima que parece ser constitutiva, para la cual se ha descrito con anterioridad que no se modifica su actividad en forma de cantidad de enzima en ninguna de las condiciones estudiadas (Veech y col., 1.969; Andrés y col., 1.980) Esto no excluye el que esta enzima pueda estar regulada a corto plazo por cambios en la actividad de la enzima preexistente.

Otro hecho importante a tener en cuenta es que, si bien las dos deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato y la EM están relacionadas por sus requerimientos de NADPH y su capacidad para generar NADPH como un producto común de sus acciones catalíticas para la síntesis de ácidos grasos, es necesario admitir algún tipo de compartimentación por la que el NADPH usado como sustrato para la biosíntesis de ácidos grasos es algo diferente al usado en los mecanismos de detoxificación, de forma que el descenso en los niveles de NADPH causado por la activación de las reacciones de detoxificación es solamente reconocido por la EM, la cual es inducida para mantener la razón NADPH/NADP en el citosol, necesaria para la óptima actividad del sistema citocromo P-450 monooxigenasa. Esto permitiría justificar las diferencias encontradas entre esta enzima y las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato.

Basados en todas estas observaciones, nosotros proponemos que el requerimiento de NADPH podría ser un factor implicado en la inducción de las enzimas

productoras de NADPH. Este mecanismo de control permitiría que las enzimas productoras de NADPH estuviesen reguladas, tanto a corto como a largo plazo, por los requerimientos de NADPH, independientemente de la identidad de la reacción consumidora que haya sido activada. Es, por tanto, un mecanismo que atendería completamente a las necesidades de NADPH, sin la necesidad de otro tipo de señal. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las reacciones consumidoras de NADPH se encuentran, como es lógico, bajo el control de una señal individual para cada una de ellas.

6. CONCLUSIONES

1. Las condiciones metabólicas que aumentan la capacidad lipogénica de las ratas, tales como el ayuno-realimentación o la administración de insulina, producen la disminución de la razón NADPH/NADP y el aumento tanto de las actividades específicas como de las cantidades de las enzimas productoras de NADPH hepáticas (EM, G6PDH y 6PGDH).
2. La inhibición de la síntesis de los ácidos grasos por el Bezafibrato impide la disminución de la razón NADPH/NADP y la inducción de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato hepáticas producidas por el ayuno-realimentación o por la administración de insulina.
3. En el tejido adiposo el ayuno-realimentación y la administración de insulina produjeron una disminución de la razón NADPH/NADP. En este tejido, el ayuno-realimentación sólo produjo un incremento en la actividad y cantidad de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, mientras que la administración de insulina causó la inducción de las tres enzimas estudiadas.
4. En el tejido adiposo, el Bezafibrato, a las dosis administradas, previno en su totalidad la activación de la síntesis de los ácidos grasos causada por la dieta o por la insulina, sólo inhibió la inducción de la 6PGDH, producida por el ayuno-realimentación, y no produjo variación considerable sobre la inducción de G6PDH, 6PGDH y EM. En este tejido, el Bezafibrato sólo previno el descenso de la razón NADPH/NADP en ratas ayunadas-realimentadas y no en ratas tratadas con insulina.

5. La administración de t-butil hidroperóxido, cuyo metabolismo es mediado por el sistema glutatión peróxidasa-glutatión reductasa, produjo un incremento significativo de las actividades específicas y de las cantidades, tanto de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato como de la enzima málica, de hígado y de tejido adiposo. Estos aumentos fueron acompañados por un descenso de la razón NADPH/NADP en estos tejidos.

6. La administración de BCNU, un inhibidor de la glutatión reductasa, suprimió la inducción de las enzimas productoras de NADPH, producida por el tBHP, en hígado y tejido adiposo, efecto que fue acompañado por un incremento en la razón NADPH/NADP, con respecto al valor encontrado en ratas tratadas exclusivamente con tBHP, pero sin llegar a alcanzar los resultados observados en ratas controles.

7. La administración de Fenobarbital y Bezafibrato, compuestos que inducen a la NADPH-citocromo c reductasa, causó un aumento en la actividad y cantidad de la EM hepática, sin cambios paralelos en las actividades y cantidades de las enzimas del ciclo de las pentosas fosfato, efecto que fue acompañado por una disminución tanto de la razón NADPH/NADP como de los niveles de glutatión. Cambios parecidos, pero menos marcados, se observaron en el tejido adiposo.

8. La suplementación de la dieta de bajo contenido proteico con distintos aminoácidos reveló que la metionina es el aminoácido con más influencia sobre

la inducción de la EM, que tiene lugar con la dieta pobre en proteínas.

9. En la inducción de la EM, en respuesta a la privación de proteínas en la dieta, podría estar implicada la disminución de glutatión en estas condiciones, a consecuencia de lo cual se produce la activación de los mecanismos de detoxificación que consumen NADPH.
10. La buena correlación entre la EM y las enzimas de detoxificación, nos permite afirmar que esta enzima podría desempeñar un papel importante en los procesos de detoxificación.
11. Nuestros resultados nos permiten suponer la existencia de algún tipo de compartimentación, por el que el NADPH usado como sustrato para la biosíntesis de los ácidos grasos es algo diferente al usado en los mecanismos de detoxificación, de forma que el descenso en los niveles de NADPH causado por la activación de las reacciones de detoxificación es solamente reconocido por la EM.
12. La isocitrato deshidrogenasa-NADP parece no estar regulada a largo plazo por cambios en la cantidad de proteína enzimática, lo que no excluye la posibilidad de que esté regulada por cambios en la actividad de la enzima preexistente
13. Basados en nuestras observaciones, proponemos que el requerimiento de NADPH podría ser un factor implicado en la inducción de las enzimas productoras de NADPH.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alexander, M.C., Palmer, J.L., Pointer, R.H., Howaloff, E.M., Koumjian, L.L. y Auruch, J. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2049-2055.
- Andrés, A., Satrústegui, J. y Machado. A. (1980) Biochem. J. 186, 799-803.
- Bensadoun, A. y Weinstein (1976) Anal. Biochem. 70, 241-250.
- Berdanier, C.D. y Shubeck, D. (1979) J. Nutr. 108, 1766-1771.
- Berdanier, C.D., Wurdeman, R. y Tobin, R.B. (1976) J. Nutr. 106, 1791-1800.
- Collins, J.H. y Korn, E.D. (1980) J. Biol. Chem. 255, 8011-8014.
- Collins, J.H. y Korn, E.D. (1981) J. Biol. Chem. 256, 2586-2595.
- Conney, A.H. (1967) Pharmacol. Rev. 19, 317-366.
- Chauser, J. (1972) en: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Work, T. y Work, E. eds.) pp. 423-465, Elsevier, Amsterdam, New York.
- Christiansen, R.Z. (1978) Biochim. Biophys. Acta 530, 314-320.
- Christiansen, E.N., Thomass, M.S., Christiansen, R.Z., Osmundsen, H. y Norum, K.R. (1979) Lipids 14, 829-835.

- Drake, R.L., Parks, W.C. y Thompson, E.W. (1983) J. Biol. Chem. 258, 6008-6010.
- Eggleston, L.V. y Krebs, H.A. (1974) Biochem. J. 138, 425-435.
- Estabrook, R.W., Cooper, D.Y. y Rosenthal, O. (1963) Biochem. Z. 338, 741-755.
- F-Lobato, M., Ros, M., Moreno, F.J. y García-Ruiz, J.P. (1986) Biochem. J. 236, 441-445.
- Fabregat, I., Vitorica, J., Satrústegui, J. y Machado, A. (1985) Arch. Biochem. Biophys. 236, 110-118.
- Fabregat, I., Revilla, E. y Machado, A. (1986) Mol. Cell. Biochem. En prensa.
- Fitch, W.M. y Chaikoff, I.L. (1960) J. Biol. Chem. 235, 554-557.
- Frenkel, R. (1975) Curr. Top. Cell. Regul. 9, 157-181.
- Frenkel, R., Stark, M.J. y Stafford, J. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 1684-1689.
- Frischer, H. y Ahmad, T. (1977) J. Lab. Clin. Med. 89, 1080-1085.
- González, A.M. y Lagunas, R. (1977) Mol. Cell. Biochem. 17, 147-149.

- Goodridge, A.G. (1975) *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 34, 117-123.
- Goodridge, A.G. y Adelman, T.G. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 3027-3032.
- Goodridge, A.G., Fisch, J.E. y Glynias, M.J. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 228, 54-63.
- Harrison, E.H. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 796, 163-168.
- Hashimoto, T., Isano, H., Iritani, N. y Numa, S. (1971) *Eur. J. Biochem.* 24, 128-139.
- Hashimoto, T. y Numa, S. (1971) *Eur. J. Biochem.* 18, 319-331.
- Hazelton, G.A. y Lang, C.A. (1980) *Biochem. J.* 188, 25-30.
- Hutchison, J.S. y Holten, D. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 52-57.
- Jump, D.B., Narayan, P., Towle, H. y Oppenheimer (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2789-2797.
- Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H., Noguchi, T. y Tanaka, T. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112, 176-182.
- Klimek, J., Schaap, P. y Kimura, T. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 499-505.
- Kuri-Harcuch, W. y Green, H. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2159-2160.

- Lawrence , R.A. y Burk, R.F. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952-958.
- Lazarow, P.B., Shio, H. y Leroy-Houyet, M.A. (1982) *J. Lipid. Res.* 23, 317-326.
- Lotscher, H.R., Winterhalter, K.H., Carafoli, E. y Ritcher, C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4340-4344.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lu, A.Y.H. y West, S.B. (1980) *Pharmacol. Rev.* 31, 277-295.
- Luu-The, V., Cumps, J. y Dumont, P. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93, 776-781.
- Mackall, J.C., Student, A.K., Polakis, S.E. y Lane, M.D. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 6462-6464.
- Magnuson, M.A. y Nikodem, V.M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 12712-12717.
- Maizel, J.V. jr. (1971) en: *Methods in Virology* (Maramoroch, K. y Koprowski, H. eds.) vol. 5, pp. 179-246, Academic Press, London.
- Mariash, C.N., Kaiser, F.E., Schwartz, H.L., Towle, H.C. y Oppenheimer, J.H. (1980) *J. Clin. Invest.* 65, 1126-1134.
- Matsuhashi, M., Matsuhashi, S. y Lynen, F. (1964) *Biochem. Z.* 340, 263-289.

McGarry, J.D. y Foster, D.W. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 395-420.

Meister, A. (1973) *Science* 180, 33-39.

Miksicek, R.J. y Towle, H.C. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 11829-11835.

Moss, J., Yamagishi, M., Kleinschmidt, A.K. y Lane, M.D. (1972) *Biochemistry* 11, 3779-3786.

Nepokroeff, C.M., Lakshmanan, M.R., Ness, G.C., Muesing, R. A. y Porter, J.W. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 162, 340-344.

Ochoa, S. y Haro, C. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48, 549-580.

Ochoa, S., Mehler, A.H. y Kornberg, A. (1948) *J. Biol. Chem.* 174, 979-1000.

Osmundsen, H., Christiansen, R.Z. y Bremer, J. (1980) en: *Carnitine Biosynthesis, Metabolism and Functions* (Frenkel, R. A. y McGarry, J.D. eds.) pp. 127-139, Academic Press, New York.

Ouchterlony, D. (1953) *Acta Path. Microbiol. Scan.* 32, 231-240.

Plaut, G.W.E. y Aogaishi, T. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 5572-5583.

- Revilla, E., Fabregat, I. Santamaria, C. y Machado, A. (1986). Enviado a *Biochim. Biophys. Acta*.
- Rognstad, R. y Katz, J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11969-11972.
- Rudack, D., Davie, B. y Holten, D. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 7823-7824.
- Sapag-Hagar, M., Lagunas, R. y Sols, A. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 179-185.
- Sies, H., Gerstenecker, C., Menzel, H. y Flohe, L. (1972) *FEBS Lett.* 27, 171-175.
- Silpananta, P. y Goodridge, A.G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5754-5761.
- Stansbie, D., Brownsey, R.W., Crettaz, M. y Denton, R.M. (1976) *Biochem. J.* 160, 413-416.
- Stark, M.J. y Frenkel, R. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 520, 452-459.
- Sun, J.D. y Holten, D. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6832-6836.
- Tepperman, H.M. y Tepperman, J. (1963) *Adv. Enzyme. Regul.* 1, 121-136.
- Thomas, P.E., Reik, L.M., Ryan, D.E. y Levin, W. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4590-4598.
- Timmers, K.I. y Knittle, J.L. (1982) *Enzyme* 28, 66-70.

- Towle, H.C., Mariash, C.N. y Oppenheimer, J.M. (1980) *Biochemistry* 19, 579-585.
- Valope, J.J. y Vagelos, P.R. (1976) *Physiol. Rev.* 56, 339-417.
- Vaxman, D.J. y Walsh, C. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10446-10457.
- Veech, R.L., Eggleston, L.V. y Krebs, H.A. (1969) *Biochem. J.* 115, 609-619.
- Vermilion, J.L. y Coon, M.J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2694-2704.
- Villanueva, C. (1986) Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.
- Wakil, S.J., Stoops, J.K. y Joshi, V.C. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* 52, 537-579.
- Wiebel, F.J., Leutz, J.C., Diamond, L. y Gelboin, H.V. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 144, 78-86.
- Worthington, D.J. y Rosemeyer, M.H. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48, 167-177.
- Young, J.W., Shrago, E. y Lardy, H.A. (1964) *Biochemistry* 3, 1687-1692.
- Zammit, V.A. y Corstorphine, C.G. (1982) *Biochem. J.* 208, 783-788.

FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral, de
D. _____
titulada _____

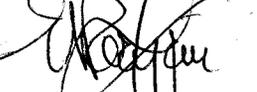
acordó otorgarle la calificación de _____

Sevilla, _____ de _____ de 1.9 _____

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

Presidente,

El Secretario,

El Doctorado.

