

REGULACION DEL METABOLISMO: EFECTO DE LAS DIETAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS

Raúl Paredes Medina¹

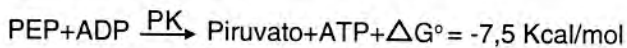
RESUMEN

Un grupo de ratas albinas fueron mantenidas en ayunas y otro grupo se sobrealimentaron para estudiar el efecto de las dietas sobre la actividad de las enzimas: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, Piruvato Quinasa, Málico Deshidrogenasa y la Fructosa 1;6 Difosfatasa, las que fueron obtenidas del hígado de los animales, mediante el homogenizado y una centrifugación, así el citosol que fue incubado y leído en un espectrofotómetro, de cuyas absorbancias se calcularon sus actividades que muestran un incremento para las ratas sobrealimentadas, mientras que en las mantenidas en ayunas, se incrementa la gluconeogénesis y se presenta un decremento en la actividad de ciertas enzimas glicolíticas y lipogénicas.

INTRODUCCION

Las enzimas: Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G6FD), Piruvato Quinasa (PK), Málico Deshidrogenasa y la Fructosa 1;6 Difosfatasa (FDPasa), intervienen en el metabolismo de los glúcidos.

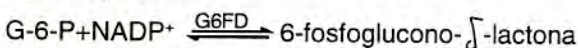
La enzima Piruvato Quinasa cataliza la conversión del fosfoenol piruvato (PEP) en piruvato:



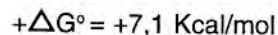
La Fructosa-Di-fosfatasa (FDPasa), llamada también como "Hexosadi-fosfatasa", cataliza la conversión de la fructosa-1;6-difostato en Fructosa-6-fosfato:



La Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6FD) cataliza la conversión de la Glucosa-6-fosfato (G-6-P) en 6-fosfogluconolactona, en la primera reacción de la ruta del fosfogluconato:



La enzima Malato Deshidrogenasa es dependiente del NADP, se encuentra en el citosol y convierte matato en piruvato (Pir):



MATERIAL Y METODOS

Se trabajó con ratas albinas aproximadamente de 200 gramos, divididas en dos grupos: un grupo fue sometido a ayunas por 48 horas y el otro grupo sometido a ayunos por 48 horas y luego sobrealimentadas con una dieta alta en calorías y baja en proteínas y grasas durante 7 días.

Se utilizaron: bisturí, tijeras, tubos de ensayo, pipetas, homogenizador, balanza analítica, centrifugadora, termostato, espectrofotómetro Gilford 240, pH-metro.

Se usaron: HC1 600 mM, dithioeritrol 0,48 mM, MgCl₂ 20 mM, EDTA 20 mM, TEA 5 mM, KOH, solución de Biuret, Buffer Tris HCL 0,05 M pH 8,8; NADP 7,5 mg/ml, MgCl₂ 0,1 m, G-6-P 11,3/2ml, NaCL, Buffer Tris-maleato 0,1 M pH7,2; ADP 4,6 x 10⁻² M, MgSO₄ 1,584 x 10⁻² M, KCL 1,35 M, DPNH 3 x 10⁻² M, LDH libre de PK 990 U/ml, PEP 1,56 x 10⁻² M; Buffer glicilglicerina 0,25 M pH 7,4; MgSO₄ 0,05 M, TPN 0,000675 M, Buffer Tris 0,5 M pH 7,5; NADP 0,2 mM (15,6 mg/ml), EDTA 10 uM/ml, MgCl₂ 500 uM/ml, (NH₄)₂SO₄ 1 M, fosfoexosa-isomerasa, FDP 4,20 mg/ml, agua bidestilada.

Los hígados de rata se pesan, se trituran y se homogenizan en una solución de 100 ml, preparada de la siguiente manera:

HCL	= 25 ml
Dithioeritritol 0,48 mM	= 25 ml
MgCL ₂ 20 mM	= 25 ml
EDTA 20 mM	= 25 ml

Se añade TEA = 92,80 mg/100 ml del medio salino (TEA = Trietanol amina hidrociorhídrico), luego se lleva a pH = 7,8 con KOH, así preparado el homogeneizado se centrifuga a 40 000 RPM durante 60 minutos. Luego se elimina la grasa del sobrenadante con papel filtro para obtener el citosol (sobrenadante).

Las determinaciones enzimáticas y lecturas de absorbancia se realizaron tal como se indica:

a) Para la Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa: para una cubeta de 3,00 ml, se emplearon dos tubos de ensayo, colocando en cada uno los reactivos:

Buffer Tris-HCL 0,05 M pH 8,8	= 0,50 ml
NADP 7,5 mg/ml	= 0,10 ml
MgCL ₂ 0,1 M	= 0,40 ml
Enzima (citosol)	= 0,10 ml
H ₂ O bidestilada	= 0,80 ml

Se mezclan y se incuban a 30° por cinco minutos, luego se añade G-6-P (11,3/2 ml) más 0,10 ml sal de sodio para iniciar la reacción. Se vierte en una cubeta de 3,00 ml y se lee en el espectrofotómetro a 340 nm con filtro azul, obteniéndose así las absorbancias.

b) Para la Piruvato Quinasa: se prepara el medio de ensayo con los siguientes reactivos:

Buffer Tris-maleato 0,1 M pH 7,2	= 5,00 ml
ADP 4,6 x 10 M	= 0,50 ml.
MgSO ₄ 1,584 x 10 M	= 0,50 ml.
KCL 1,35 M	= 0,50 ml.

Para una cubeta de 1,00 ml, se mezclan en un tubo de ensayo los siguientes reactivos:

Medio (lo preparado anteriormente)	= 0,65 ml
DPNH 3 x 10 M	= 0,05 ml
LDH libre de PK 990 U/ml	= 0,01 ml
Enzima (citosol)	= 0,01 ml
H ₂ O bidestilada	= 0,18 ml

(LDH=láctico deshidrogenasa, PK=piruvato quinasa)

Se incuban a 30°C por cinco minutos. La reacción empieza al añadir PEP (1,56 X 10⁻²M)=0,05 ml. Se vierte en una cubeta de 1,00 ml y se lee el cambio de absorbancia, a 340 nm con filtro azul.

c) Para la Fructosa 1;6 Difosfatasa: para un volumen de 1,00 ml, el medio de ensayo se prepara de la siguiente manera:

Buffer Tris 0,5 M pH 7,5	= 1,00 ml
NADP 0,2 mM (15,6 mg/ml)	= 0,10 ml
EDTA (10 uM/ml)	= 0,10 ml
MgCL ₂ (500 uM/ml)	= 0,10 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ 1 M	= 0,40 ml
Fosfoexosa-isomerasa	= 0,02 ml
FDP (4,20 mg/ml)	= 0,10 ml

Toda la mezcla se ajusta a pH 7,5 y se completa con agua bidestilada hasta un volumen de 10 ml.

En otro tubo de ensayo se ponen los reactivos:

Medio de ensayo (anterior preparado)	= 0,95 ml
Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa	= 0,005 ml
H ₂ O bidestilada	= variable

Se incuban a 30°C por cinco minutos. La reacción se inicia añadiendo la enzima (citosol) de 5 a 10 lambdas (0,005 y 0,010 ml, respectivamente). Se vierte en una cubeta y se leen sus absorbancias a 340 nm en un espectrofotómetro de filtro azul.

d) Para la Málico Deshidrogenasa (NADP dependiente): para una cubeta de 3,00 ml se colocan en un tubo de ensayo los reactivos:

Buffer glicilglicerina 0,25 M pH 7,4	= 0,30 ml
MgSO ₄ 0,05 M	= 0,10 ml
TPN 0,000675 M	= 0,20 ml
Enzima (citosol)	= 0,20 ml
H ₂ O bidestilada	= 2,19 ml

Se incuban a 30°C por cinco minutos. La reacción se inicia al añadir 0,05 ml de L-malato 0,030 M. Se vierte en una cubeta y junto con otra cubeta sin TPN que sirve de blanco, se leen sus cambios de absorbancia en un espectrofotómetro de filtro azul a 340 nm.

En la determinación de la proteína, se empleó el método de Biuret. Para ello, se colocan en tres tubos de ensayo los siguientes componentes:

COMPONENTES	CANTIDAD (ml)		
	1	2	3
Enzima (citosol)	0,10	0,20	---
H ₂ O bidestilada	0,90	0,80	1,00
Biuret	4,00	4,00	4,00

Se dejaron en reposo por 30 minutos, luego se leyeron los cambios de absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm.

RESULTADOS

CUADRO No.01: Cambios de absorbancia.

ENZIMA (TIPO)	CITOSOL (ml)	$\Delta A/\text{min}$ RATAS EN AYUNAS	$\Delta A/\text{min}$ RATAS SOBREALIM.
Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa	0,10 0,20	0,05 0,09	0,05 0,09
Piruvato Quinasa	0,025 0,050	0,012 0,022	----- 0,018
Málico Deshidrogenasa	0,10 0,15	0,005 -----	----- 0,006
Fructosa 1;6 Diifosfatasa	0,005 0,010	----- 0,032	0,014 0,020

CALCULO

La concentración de las proteínas se ha calculado mediante la relación:

$$C = \frac{\Delta A \times Fc}{V}$$

C = concentración de la proteína (mg/ml)

ΔA = cambio de absorbancia

Fc = 20 (factor de calibración)

V = volumen de enzima (citosol)

CUADRO No.02: Concentración de proteínas.

RATAS EN AYUNAS (A)		RATAS SOBREALIMENTADAS (B)	
$\Delta A/\text{min}$	Concentr. Prot. (mg/ml)	$\Delta A/\text{min}$	Concentr. Prot. (mg/ml)
0,054	10,80	0,045	9,00
0,114	11,40	0,056	11,20
		0,100	10,00
		0,099	9,90
PROMEDIO	11,10		10,00

La Actividad de las enzimas se han calculado mediante la siguiente relación:

$$\text{Act.} = \frac{\Delta A/\text{min}}{\epsilon \times V}$$

ϵ = coeficiente de extinción molar (2,07 para cubeta de 3 ml; 6,22 para cubeta de 1,00 ml)

V = volumen (alícuotas de enzima)

CUADRO No.03: Promedio de las actividades.

ENZIMA	ACT. RATAS (A)	ACT. RATAS (B)	PROMEDIO
	(U/ml)	(U/ml)	(U/ml)
G-6-P Deshidr.	0,22945	0,22945	0,22945
Pir-Quinasa	0,07395	0,05790	0,06592
Málico Deshidr.	0,02410	0,01930	0,02170
F-1;6-DiPasa	0,51050	0,38585	0,45020

La Actividad Específica de las enzimas en μ moles/min/mg de proteína y en $m \mu$ moles/min/mg de prot. se calcularon mediante la relación:

$$\text{Act. Esp.} = \frac{\Delta A/\text{min}}{\epsilon \times V \text{ mg prot.} \times \text{ml}}$$

CUADRO No.04: Promedio de las actividades específicas.

ENZIMA	$m \mu$ moles / min / mg de proteína		
	RATAS (A)	RATAS (B)	PROMEDIO
G-6-P Deshidr.	21,00	22,945	21,97
Pir-Quinasa	6,66	5,79	6,22
Málico Deshidr.	2,20	1,93	2,06
F-1;6-DiPasa	46,35	38,585	42,47

También se han calculado las actividades en Unidades por mililitro (U/ml) y en Unidades por gramo de tejido (U/g tej.). Los resultados y la comparación se dan en el siguiente cuadro:

CUADRO No. 05: Comparación de actividades.

ENZIMA	RATAS EN AYUNAS (48 HORAS)			RATAS SOBREALIMENTADAS		
	U/ml	U/g tej.	ΔA	U/ml	U/g tej.	ΔB
G-6-P Deshidr.	0,229	2,031	21,97	0,782	6,647	57,70
Pir-Quinasa	0,066	0,581	6,22	2,994	25,451	220,85
Mál. Deshidr.	0,022	0,191	2,06	0,058	0,496	4,30
FDPasa	0,450	3,968	42,47	0,165	1,400	12,10

ΔA y ΔB se refieren a las actividades de las ratas en ayunas y de las sobrealimentadas, respectivamente, como promedio en $m \mu$ moles / min / mg prot.

DISCUSION

Las actividades de las enzimas Glucosa-6-

Fosfato Deshidrogenasa, Piruvato Quinasa y de la Málico Deshidrogenasa han experimentado un incremento (cuadro No. 05) en el grupo de ratas sobrealimentadas, con una dieta alta en carbohidratos y baja en proteínas y grasas. El mayor incremento ha experimentado la Piruvato Quinasa que, prácticamente, se ha elevado hasta unas 36 veces en su Actividad Específica, mientras que la enzima Gluconeogénica Fructosa-1;6-Di-fosfatasa experimentó un decremento en su actividad hasta en unas 3,5 veces. Los incrementos y decrementos en la Actividad Específica de las enzimas demuestran que, durante el ayuno, se produce en los animales un incremento de la gluconeogénesis y un decremento en la actividad de ciertas enzimas glicolíticas y lipogénicas, tal es así que las enzimas involucradas en la síntesis de los ácidos grasos como la Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa y la Malato Deshidrogenasa de los animales sobrealimentados aumentaron sus actividades en un poco más del doble; en cambio, la Piruvato Quinasa involucrada en la glicólisis fue la enzima que menos incremento experimentó. Por último, la enzima Fructosa-1;6-Difosfatasa, necesaria para la gluconeogénesis, cuadruplicó su actividad.

Ciertas condiciones gluconeogénicas como: el ayuno, la sobrealimentación, los ejercicios violentos y la administración de ciertas hormonas como la Triamcinolona, están asociados con el incremento de la gluconeogénesis y el decremento en la actividad

proteolítica de ciertas enzimas glicolíticas en el hígado de los animales. En el caso específico de la Fructosa-1;6-Difosfatasa, varios investigadores señalan que algunas condiciones gluconeogénicas como las mencionadas, están asociadas con la pérdida de una proteína en la periferie de los tejidos, así como el incremento de la actividad proteolítica en el hígado -por ayuno prolongado-, siendo mayores los incrementos en las actividades gluconeogénicas de las enzimas hepáticas. Estos, probablemente, involucran la intervención gluconeogénica de ciertas hormonas desde el incremento similar en la actividad lisosomal. Nuestros resultados son coincidentes con los reportados por Pérez y col. (1964), pues ellos demuestran que el efecto de la dieta sobre la Glucoquinasa y las otras enzimas, con una dieta rica en carbohidratos, incrementa sus actividades y con el ayuno vieron un decremento, tal como sucedió en el presente trabajo. Esto estaría en relación a una mayor o menor liberación de insulina según la dieta. Ashmore y Weber (1968) consideran que las enzimas glicolíticas, como las estudiadas, formarían una unidad génica, lo mismo que las gluconeogénicas, sujetas a inducción o represión según la hormona que, en nuestro caso, no se llegó a ver la regulación hormonal que sería muy interesante investigar al respecto. Pero Gunn y Taylor (1973) consideran que cada enzima es inducida en forma independiente, como consecuencia de los cambios en los metabolitos, después de la acción aguda de la hormona.

BIBLIOGRAFIA

- Ashmore, J. and Weber, G. (1968): **Carbohydrate Metabolic Disease**. Editado por Dickens, Academic Press. vol. 1: 336.
- Bohinski, R. C. (1978): **Bioquímica**. Ed. Fondo Educativo Interamericano S.A. USA. 368-373.
- Gunn, J. M. and Taylor, C. B. (1973): **Relationships between concentration of hepatic intermediary metabolites and induction of the key glycolytic enzymes in vivo**. *Biochem J.* 136: 455
- Harper, H. A. (1980): **Manual de Química Fisiológica**. Ed. El Manual Moderno S.A. México, 328-332; 364.
- Lehninger, A. L. (1978): **Bioquímica**. Ed. Omega S.A. Barcelona - España, 460 - 462; 475.
- Pérez, N.; Turri, C.; Rabayali, E. and Niemeyer, H. (1964): **Regulation of rat liver enzymes by natural component of the diet** *J. Biol. Chem* 239: 2420.