

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Estudio del comportamiento de la Glutamato  
Deshidrogenasa en diferentes poblaciones mitocondriales del  
cerebro de rata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Paloma Abad Ortega**

DIRECTOR:

**Pilar González González**

Madrid, 2015

TP  
1984  
032

Paloma Abad Ortega



\* 5 3 0 9 8 6 3 1 5 9 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-225191-1

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA  
EN DIFERENTES POBLACIONES MITOCONDRIALES DE CEREBRO DE RATA

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Farmacia  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

32/84

© Paloma Abad Ortega .

Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía

Noviciado, 3 Madrid-8

Madrid, 1984

Xerox 9200 XB 480

Depósito Legal: M-42387-1984

**FACULTAD DE FARMACIA DE MADRID**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA**

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA**  
**EN DIFERENTES POBLACIONES MITOCONDRIALES**  
**DE CEREBRO DE RATA.**

**Memoria presentada por la Lda.**  
**Paloma Abad Ortega, para**  
**aspirar al grado de doctor.**

**Madrid, 1981.**



I

Este trabajo ha sido realizado, en su totalidad, en el laboratorio de enzimología del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Pilar González González.



## II

Mi sincero agradecimiento al Profesor Santos Ruiz que me acogió en el Departamento de Bioquímica que dirige, orientando y supervisando este trabajo.

A la Dra. Pilar González González que no se ha limitado a dirigirme científicamente durante estos años. Su constante ayuda y comprensión en el aspecto humano, junto a su valioso criterio, han hecho posible este trabajo.

Al Dr. Angel Jiménez Solvés que, además de acercarme a la Dra. González, depositó su confianza en mis intenciones científicas que él mismo alimentó.

Al Profesor Trigo y a M<sup>a</sup> Teresa Esteban que enriquecieron mi espíritu y depositaron en mí la necesidad de superación profesional.

Al Dr. Alberto Martínez, Jefe del Servicio de Bioquímica de la C.S. 1<sup>o</sup> de Octubre, cuyo contacto y ejemplo diarios me hacen ser más exigente conmigo misma.

A Miguel Fernández Ramil por su colaboración.

Por último a todo el personal del Departamento de Bioquímica por su apoyo.



III

**A mi madre con todo mi amor y gratitud.**



IV

ABREVIATURAS

<b>ACH-asa</b>	<b>Acetil-colinesterasa.</b>
<b>ADP</b>	<b>Adenosin-difosfato</b>
<b>AMP</b>	<b>Adenosin-monofosfato</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosin-trifosfato</b>
<b>EDTA</b>	<b>Etilen-diamino-ettraacético</b>
<b>G</b>	<b>Glutamato</b>
<b>GABA</b>	<b>Acido gamma-aminobutírico</b>
<b>GDH</b>	<b>Glutamato deshidrogenasa</b>
<b>GTP</b>	<b>Guanosin-trifosfato</b>
<b><math>\alpha</math>KG</b>	<b>Alfa-ceto-glutarato</b>
<b>LDH</b>	<b>Lactato deshidrogenasa</b>
<b>MDH</b>	<b>Malato deshidrogenasa</b>
<b>NAD</b>	<b>Nicotinamida-adenosin-dinucleótido</b>
<b>NADH</b>	<b>Nicotinamia-adenosin-dinucleótido reducido</b>
<b>NADP</b>	<b>Nicotinamida-adenosin-dinucleótido-fosforilado</b>
<b>NADPH</b>	<b>Nicotinamida-adenosin-dinucleótido-fosforilado reducido</b>
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	<b>Amonio</b>
<b>TRIS</b>	<b>Tri-hidroxi-metil-amino-metano</b>



INDICE

1. INTRODUCCION .....	1
1.1.— Antecedentes históricos .....	2
1.2.— Objetivos del presente trabajo .....	4
2. PARTE TEORICA .....	6
2.1.— Breve exposición de los datos publicados acerca del conocimiento actual sobre los distintos aspectos de la GDH .....	8
2.2.— Modelo del metabolismo del glutamato en cerebro .....	26
3. MATERIAL Y METODOS .....	40
3.1.— Obtención de tejido cerebral .....	41
3.2.— Fraccionamiento subcelular .....	41
Obtención de M.L. y M.S. ....	41
Obtención de M.S. de subfracciones sinaptosomales .....	44
3.3.— Preparación de extractos enzimáticos .....	45
Solubilización de GDH .....	45
3.4.— Valoración de actividades enzimáticas .....	47
Fumarasa .....	47
MDH .....	48
LDH .....	48
ACH-asa .....	49
GDH .....	49
3.5.— Valoración de proteínas .....	51
3.6.— Cálculo de la Km para los distintos sustratos .....	51
Km para el glutamato .....	52
Km para el NAD .....	53
Km para el NADH .....	54

## VI

Km para el acetato amónico .....	55
Km para el $\alpha$ -cetoglutarato .....	56
3.7.— Electrofóresis en gel de poliacrilamida .....	57
Preparación de geles .....	57
Migración electroforética .....	57
Teñido de los geles .....	58
4. PARTE EXPERIMENTAL .....	59
4.1.— Localización y solubilización de la GDH de cerebro de rata .....	60
Introducción .....	61
Resultados y discusión .....	61
Conclusiones .....	63
Bibliografía .....	73
4.2.— Comportamiento de la GDH procedente de distintas fracciones mitocondriales .....	74
Introducción .....	75
Resultados y discusión .....	76
Conclusiones .....	80
Bibliografía .....	87
4.3.— Efecto de nucleótidos sobre la GDH de cerebro de rata y mecanismo de acción del ADP sobre las M.L. ....	89
Introducción .....	90
Resultados y discusión .....	91
Conclusiones .....	95
Bibliografía .....	106
4.4.— Parámetros cinéticos de la GDH procedente de mitocondrias libres y sinaptosomales .....	107
Introducción .....	108
Resultados y discusión .....	109
Conclusiones .....	109
Bibliografía .....	115

**VII**

4.5.— Conclusiones generales .....	116
5. BIBLIOGRAFIA GENERAL .....	120



**I. INTRODUCCION**

## 1.- INTRODUCCION

### 1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

Los diferentes tejidos animales difieren considerablemente en su capacidad para formar amonio. El cerebro pertenece a un grupo de organos que en adecuadas condiciones lo forman a gran velocidad.

Numerosos investigadores (1-5), han encontrado una íntima relación entre la actividad nerviosa y la formación de amonio y es bien conocida su liberación por excitación de nervios periféricos, así como por estimulación eléctrica, mientras que existe una depresión del mismo por escisión del nervio y durante el sueño (6,7).

El contenido de amonio en el cerebro vivo es también significativamente elevado, antes y durante las convulsiones producidas, por la administración de diferentes farmacos tales como, la picrotoxina (2), el fluoroacetato (3), el pentametilnotetrazol (8) o el telodrin (9); por estimulación eléctrica del cerebro; por prolongado estímulo androgénico (10) o por anoxia (2, 11).

De estas observaciones se deduce que el nivel de amonio en cerebro está estrechamente relacionado con la actividad nerviosa; es decir, que se incrementa en cerebro en estado de excitación de las células neuronales y decrece en estados inhibitorios.

En el aspecto clínico, el interés de la concentración de amonio en sangre y su relación con disturbios neuropsiquiátricos, ha sido ampliamente estudiado en casos de enfermedades hepáticas (12, 13). Las hiperamonemias, frecuentemente demostradas, dan lugar a ciertos defectos específicos en comportamientos motores, así como a numerosos casos de encefalopatías (14, 16).

Se ha descrito (17) una alta correlación entre los niveles de amonio en sangre y las perturbaciones de los estados mentales. Por otra parte son características de movimientos involuntarios en pacientes con hiperamonemia.

Cuando los niveles de amoníaco en sangre son elevados a causa de enfermedades hepáticas. Su captación por el cerebro es proporcional a su concentración arterial. El uso de sustancias tales como

$\alpha$ -cetoglutarato o glutamato, en la terapia del coma hepático, parece reducir la tasa de amonio libre en sangre, aunque las experiencias clínicas no son demasiado favorables (18).

Como ya hemos mencionado, la importancia de los iones amonio en las actividades del sistema nervioso, se conoce desde hace varios años, pero el origen de su formación en cerebro "in vivo" no ha sido esclarecido hasta el momento. Se considera que el amonio es metabolizado activamente en el tejido nervioso y contribuye así a una función fisiológica específica en el mismo.

La naturaleza del origen del amonio en el tejido nervioso es de gran interés, pero el problema está aún por resolver. Se ha demostrado que el tejido cerebral contiene varios sistemas de enzimas desaminantes, tales como la glutaminasa (19), la glutamato deshidrogenasa (20), la aminooxidasa (21), la adenílico deaminasa (22, 23), la adenosina deaminasa (22, 24), la NAD-deaminasa (25), la glucosamina-6-fosfato-deaminasa (26), etc.

Es bien conocido que el contenido de ácido glutámico en cerebro es alto, encontrándose fundamentalmente en forma libre. Cuando se adiciona ácido glutámico a cortes de cerebro respirantes, se transforma en glutamina, esto es, no hay liberación de amonio. Por otra parte el equilibrio de la reacción de la GDH está en favor de la aminación reductora del  $\alpha$ KG (27). Según esto, parece que el glutamato no es un candidato como precursor de amonio, si bien es posible que su metabolismo intrínseco en el tejido cerebral, sea diferente del adicionado "in vitro".

De acuerdo con el concepto clásico (28), el nitrógeno de los aminoácidos pasa al glutamato mediante aminotransferencias y el amonio libre se formaría por la acción de la GDH. Esta teoría, no obstante, ha sido ampliamente disentida en el caso del cerebro (29) y se ha visto que la adición de ácido glutámico a homogenados cerebrales da lugar a la formación de aspartato (30). Por tanto, se acepta como un hecho bastante probable que el primer paso en el metabolismo del glutamato en tejido cerebral sea una transaminación que no involucre la liberación de amonio. La racionalidad de este mecanismo se explica por el hecho de ser la GDH una enzima reversible cuyo equilibrio se desplaza en favor de la aminación reductora (27, 31, 32).

Según esto, quizá el aumento de amonio podría detener la reacción en el sentido de una desaminación oxidativa. Numerosos experimentos han sido realizados con el fin de lograr dilucidar el papel de la GDH en la formación de amonio (30) llegándose, con todos ellos, a la idea de que el glutamato endógeno parece ser que se desamina mayoritariamente por la citada enzima.

Hasta el momento, la hipótesis de que la GDH es la enzima terminal en el proceso de formación de amonio en el cerebro, está apoyada por estudios de inhibición. Los inhibidores de la formación de amonio se dividen en tres grupos:

- aquellos que actúan sobre el transporte de electrones entre la deshidrogenasa y el oxígeno.
- los inhibidores de la transaminación.
- los inhibidores específicos de la GDH.

A todos éstos se pueden añadir aquellos sustratos tales como la glucosa, manosa y piruvato, los cuales afectan al "Steady state" de los niveles de  $\alpha$ KG y oxalacetato y, por tanto, regulan la dirección y velocidad de las aminotransferencias, desaminaciones y aminaciones. Finalmente, hay algunos inhibidores tales como la D-glutamina y el D-aspartico (33) cuyo mecanismo de acción es totalmente desconocido.

Inhibidores del primer grupo (a), han sido estudiados por varios autores (34, 36). Por otra parte, los estudios sobre los del segundo grupo (b) han demostrado que sus efectos inhibidores son variables (37). Resultaron de interés especial los inhibidores específicos de la GDH (c): El ácido D-glutámico, ácido glutárico, triyodotironina ( $T_3$ ), etc., que presentan inhibición sobre la GDH purificada a partir de tejido hepático (38, 39) y que también interfieren la formación de amonio en cortes de cerebro (37, 40).

A pesar de todos los estudios realizados, sobre la formación de amonio con intervención de la GDH, hasta el momento, no se ha llegado a una conclusión clara, posiblemente debido a la gran heterogeneidad cerebral y a la compartimentación del glutamato. Por ello y en el presente trabajo, nos hemos marcado unos objetivos concretos con la intención de poder aportar algunos datos más al esclarecimiento del problema.

## 1.2 OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Dado que durante el impulso nervioso, y por excitación nerviosa, se incrementa la producción

de amonio en cerebro, y puesto que la GDH es una de las enzimas que parecen estar implicadas en su formación, nos proponemos conocer las características de dicha enzima en las mitocondrias procedentes de las terminaciones nerviosas (sinaptosomas) y en las libres (procedentes de pericarión neural y de células gliales). Puesto que el metabolismo del glutamato en cerebro está compartimentado, el estudio de la glutamato deshidrogenasa en los diferentes tipos de mitocondrias ofrece un particular interés. De esta forma se intenta cubrir tres objetivos:

- 1) Si la GDH de mitocondrias sinaptosomales y libres, difieren en la actividad enzimática en uno y otro sentido. Ello podría dar idea de si sus respectivas funcionalidades, en lo que a la GDH se refiere, van dirigidas hacia la síntesis o hacia la degradación del glutamato.
- 2) Si existe una heterogeneidad de comportamiento, respecto a la GDH, no sólo entre mitocondrias libres y sinaptosomales, sino entre diferentes subpoblaciones de las últimas.
- 3) Si las diferencias de comportamiento de la GDH en las distintas subpoblaciones subcelulares pueden, de alguna manera, esclarecer los problemas de la compartimentación del glutamato en el cerebro.

Para ello se pone a punto una técnica de separación de mitocondrias libres (M.L.) y sinaptosomales (M.S.); se investiga el grado de "binding" de la enzima con la mitocondria (solubilización de la enzima). Asimismo se analiza la actividad enzimática de la GDH en ambos sentidos de la reacción y en los dos tipos de mitocondrias con referencia a la relación de la actividad en ambos sentidos y al efecto del ADP en dichas actividades, así como la  $K_m$  para los diferentes sustratos.

Por último, se procura separar distintas subpoblaciones de sinaptosomas y se intenta conocer en cada una de ellas las características de la GDH.

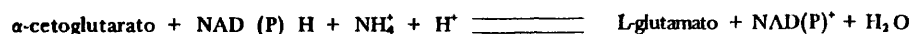
2.- PARTE TEORICA

**2.1 BREVE EXPOSICION DE LOS DATOS PUBLICADOS ACERCA DEL CONOCIMIENTO ACTUAL SOBRE LOS DISTINTOS ASPECTOS DE LA GDH.**

**2.2 MODELO DEL METABOLISMO DEL GLUTAMATO EN CEREBRO.**

## 2.1 BREVE EXPOSICION DE LOS DATOS PUBLICADOS ACERCA DEL CONOCIMIENTO ACTUAL SOBRE LOS DISTINTOS ASPECTOS DE LA GDH

La enzima L-glutamato deshidrogenasa o GDH (E.C. 1.4.1.2.4.) cataliza la siguiente reacción:



es decir, la interconversión de  $\alpha$ -cetoglutarato y ácido L-glutámico. Aunque el equilibrio de la reacción está desplazado a favor de la formación de L-glutamato, la reacción inversa (desaminación oxidativa) es importante en algunos organismos, así como en determinadas funciones de tejidos especializados.

La GDH es una enzima de gran interés, debido a la posición clave que el  $\alpha$ -cetoglutarato y el glutamato, ocupan en el metabolismo, ya que participan en numerosas e importantes rutas metabólicas. Esta enzima proporciona pues una vía de incorporación de nitrógeno a compuestas que no poseen este elemento químico y enlaza así el metabolismo glucídico con el proteico. La acción catalítica de la GDH no se limita al ácido glutámico, sino que interviene igualmente en la interconversión de otros  $\alpha$ -aminoácidos y sus correspondientes  $\alpha$ -cetoácidos (41, 42). Concretamente la interconversión de  $\alpha$ -alanina y piruvato ha sido ampliamente estudiada (43).

Se conocen, al menos, tres tipos de GDH que difieren, tanto en su especificidad por el coenzima (NAD, NADP, o ambos) como por sus características moleculares y funcionales. La GDH se halla ampliamente distribuida en la naturaleza y solamente unos pocos organismos carecen de ella. Ha sido extraída y purificada a partir de muy variadas fuentes: bacterias, hongos, plantas y numerosos tejidos animales (44). La enzima procedente de tejidos animales puede utilizar como coenzima tanto NAD (H) como NADP (H), mientras que la obtenida de otras fuentes es específica para uno u otro (45, 46, 47). Además, la capacidad de la GDH para utilizar NAD (H) o NADP (H), varía según la especie animal de que procede.

Los niveles de GDH en los mamíferos, varía mucho de unos tejidos a otros. Normalmente es el hígado el órgano más rico en ella (54 U.I/g) seguido del riñón (11 U.I/g), y se encuentran valores más bajos en cerebro, mucosa gástrica, nódulos linfáticos, pulmón, placenta, médula y tejido muscular

(48). Las distintas GDH, procedentes de diferentes órganos de una misma especie, son similares y en ocasiones idénticas. A este respecto se producen reacciones cruzadas completas entre extractos enzimáticos obtenidos a partir de bazo, cerebro y corazón bovinos y anticuerpos inducidos por GDH de hígado bovino (49). Por otra parte, las enzimas de hígado, cerebro, riñón, corazón y músculo esquelético, responden de la misma forma a la acción de purin-nucleótidos (50).

La localización subcelular de la GDH de origen animal, reside fundamentalmente en mitocondrias (51, 52). Algunos autores, sobre todo en lo que respecta a la GDH hepática, sugieren su presencia en la matriz basándose en su fácil solubilización, aunque estudios más recientes parecen confirmar la hipótesis de que, al menos una parte del total, se encuentra ligada a las membranas mitocondriales. Existen también trabajos, aunque contradictorios, sobre la presencia de GDH en los núcleos de células hepáticas de rata (53, 54, 55) y, más recientemente, Di Prisco (56, 57) ha aportado datos sobre diferencias cinéticas y estructurales entre las enzimas mitocondrial y nuclear. Asimismo se ha encontrado GDH en la fracción citosólica de algunos hongos. Tanto la GDH-NAD-dependiente como la GDH-NADP-dependiente de *Sacharomyces Carlsbergensis* y *Cerevisiae* son citosólicas (58, 59) y en *Dictiostelium Discoideum* existen 2 GDH, una mitocondrial, que es NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> dependiente y otra extramitocondrial sólo NAD<sup>+</sup> dependiente (60).

Respecto a su composición, el contenido en aminoácidos de las diferentes GDH es bastante semejante aunque difiere del de otras deshidrogenasas; por ejemplo, su proporción en arginina y lisina es más elevada. Apella y Tomkins (61), detectaron cuatro restos de triptófano por subunidad en la enzima de hígado bovino, mediante análisis espectral y titulación con N-bromosuccinimida, mientras que en la determinación secuencial, sólo se localizaron tres restos (62, 63). No se han encontrado puentes disulfuro en ninguna GDH pero sí aparecen seis restos de cisteína en la enzima bovina y siete en la de hígado de pollo (62, 63, 64). Sucesivos estudios de hidrólisis de la GDH con tripsina y pepsina (66, 67, 68), así como con bromuro de cianógeno (69, 70) y con hidroxilamina (62), han permitido determinar la secuencia de GDH hepática (bovina y de pollo) (65) así como de GDH, NADP dependiente, de *Neurospora* (71) y también la secuencia de algunos péptidos en la de hígado de rata (72). De todos estos estudios se desprende que la cadena polipeptídica de la enzima consta de 500 aminoácidos, que corresponden a un Pm de 55.390. La secuencia de la GDH de pollo es significativamente similar a la bovina con sólo 27 aminoácidos diferentes entre los 500 que ambas poseen. Además de los tres restos adicionales que la primera tiene en su extremo amino. La secuencia incompleta de la enzima del hígado de rata indica, asimismo, una gran similitud con las

anteriores.

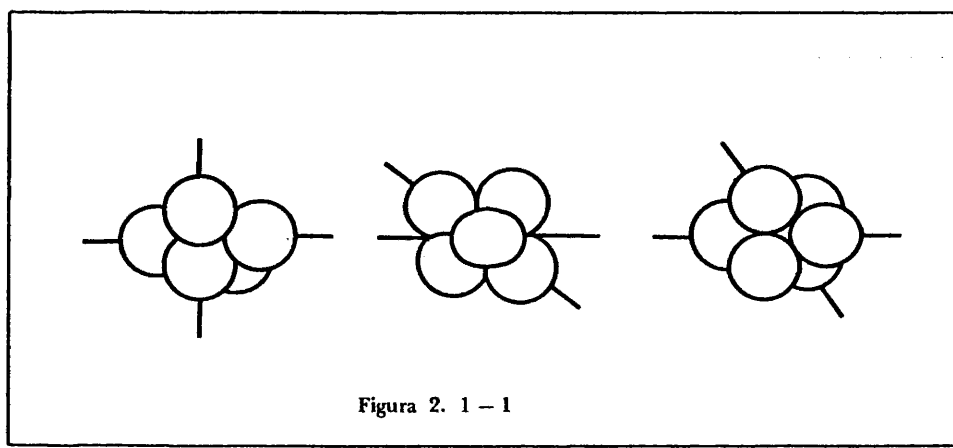
El estudio de la secuencia de las enzimas bovina y de pollo, ponen de manifiesto que el resto N-terminal de la cadena (alanina y ácido cisteico, respectivamente) es bastante polar, mientras que el extremo C-terminal es relativamente hidrofóbico (treonina). Los aminoácidos que constituyen ambas enzimas son normales, con la excepción del ácido cisteico N-terminal de la GDH de pollo (65, 65).

Los estudios sobre la GDH-NADP dependiente, de *Neurospora*, revelan que, aunque posee 48 restos de aminoácidos menos que la bovina, existe una gran analogía entre ambas; particularmente en los 200 primeros aminoácidos de la cadena, donde están incluidos dos restos de lisina que se suponen implicados en la unión con el sustrato (71). Como veremos posteriormente, se ha demostrado que los restos de aminoácidos que intervienen en la unión con moduladores alostéricos, se sitúan en la región -COOH terminal. Según esto y como la enzima de *Neurospora* no presenta propiedades alostéricas frente a ADP y GTP, a diferencia de la de los vertebrados, podría anticiparse que las diferencias secuenciales deberán ser más pronunciadas en esta zona. Es curioso señalar que los restos de cisteína, histidina, metionina y triptófano de la enzima de *Neurospora* no coinciden con los de la de vertebrados. Ello no excluye que dichos restos estén localizados en el centro activo, ya que al no poseer las cadenas la misma longitud, podrían establecerse en la misma disposición en la estructura tridimensional, a pesar de sus diferencias en la secuencia. Cabe también destacar 21 restos de glicocola en posición análoga en la secuencia de la GDH de vertebrados y la de *Neurospora*; lo que sugiere el que puedan estar implicados más bien en mantener la conformación tridimensional que en el mecanismo catalítico.

Otro dato estructural se refiere a la posibilidad o no de que la GDH sea una Zn-proteína. En un principio se pensó que efectivamente de ello se trataba puesto que la espectroscopía de emisión detectaba un átomo de Zn por mol de proteína; no obstante, este dato no ha sido confirmado posteriormente (73). A esto puede añadirse que observaciones más recientes (74) han planteado la duda de que sea o no el Zn esencial para la actividad enzimática. Lo que sí parece ser un hecho es el que la GDH posee alta afinidad por tal elemento químico y se postula que éste podría actuar sobre la actividad enzimática como modulador alostérico (75). Por otra parte, la enzima bovina está constituida por cuatro oligómeros (*subunidades activas*), cada uno de los cuales está, a su vez, formado por seis cadenas polipeptídicas iguales (*subunidades inactivas*). Estas cadenas contienen,

por su parte, un centro catalítico para el nucleótido, un centro regulador para el mismo y uno o varios sitios implicados en la asociación-disociación del oligómero.

El equilibrio reversible de asociación-disociación (que veremos más adelante), de la GDH, originó grandes dificultades en la determinación correcta de su peso molecular, así como del número de subunidades que forma el oligómero activo. Se han dado pesos moleculares para la enzima bovina que oscilan entre 280.000 (76) y 400.000 (77). En la actualidad se admite como cierta la cifra de 332.000, como consecuencia del estudio de la secuencia de aminoácidos de las seis cadenas idénticas que forman el dímero (62). La GDH de hígado de pollo posee 4 oligómeros que constan también de 6 cadenas polipeptídicas, aunque cada una de éstas poseen tres restos de aminoácidos adicionales (64), mientras que las cadenas de la GDH-NADP dependiente, de *Neurospora*, poseen 50 restos menos y la enzima es similar a la de *E. coli*, levadura y posiblemente a la de hígado de rata. Por su parte la GDH-NAD dependiente también de *neurospora*, es muy diferente a las anteriores ya que posee un peso molecular de 48 0000 y cuatro subunidades enzimáticamente activas de casi doble tamaño que aquéllas (78). Eisemberg y Reisler (79) han propuesto un modelo para la estructura del oligómero de la GDH de hígado bovino y han estudiado las diferentes formas de asociación, de las seis subunidades que lo integran, en una configuración simétrica. El modelo presenta simetría diédrica y la polimerización se efectúa en la dirección del eje ternario. Los modelos que se corresponden con los que fueron obtenidos por micrografía (80) con diferentes orientaciones aparecerían como indica la figura 2.1 - 1.

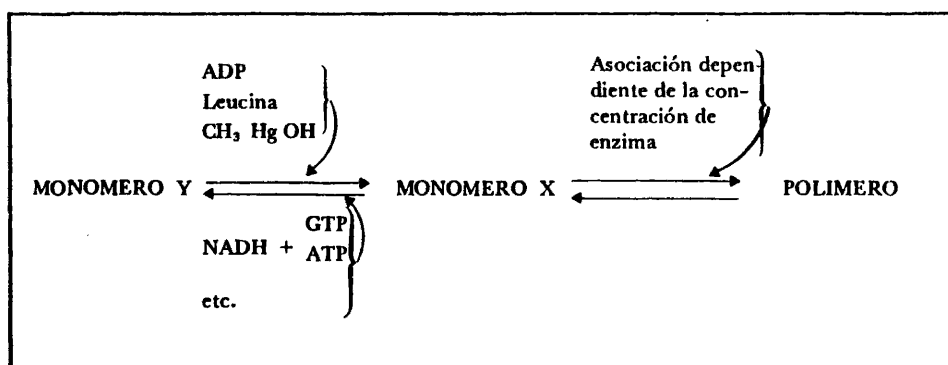


Parece ser que en diferentes condiciones las subunidades del oligómero pueden interaccionar y asociarse dando lugar a dímeros o trímeros. Estas formaciones han sido descritas en presencia de SDS, si bien las condiciones no han sido indicadas con detalle (81).

El microscopio electrónico ha revelado la presencia de trímeros (82, 80, 83) cuyas subunidades dispuestas en triángulo se pueden aproximar mediante la adopción de formas elipsoides. El oligómero estaría en tal caso constituido por dos trímeros superpuestos. No obstante, no ha sido posible la separación de trímeros catalíticamente activo.

También se han realizado estudios inmunológicos para adquirir mayor información acerca de la estructura del oligómero. Lehman observó (84) que la enzima de hígado humano y la de hígado bovino probablemente no poseen antígenos determinantes en el centro activo, ni en su inmediato entorno. Asimismo, postula que los sitios de unión del anticuerpo no son fácilmente accesibles al complejo enzimático polimérico. Smith (63) mediante tripsinización de la enzima, previo marcado del centro activo con PLP radioactivo, obtuvo el péptido Gli-123-Lis-134, observando que no contenía fenil-alanina, triptófano ni tiroxina. La ausencia de aminoácidos aromáticos en esta parte de la molécula podría indicar la falta de determinantes antigénicos. Por otra parte, una preponderancia de aminoácidos aromáticos en la región que permanece oculta durante la polimerización, explicaría la misión que tienen los hidrocarburos aromáticos en el incremento de la polimerización. Además los complejos de la GDH con anticuerpos retienen la actividad enzimática o interfieren con la acción de los moduladores alostéricos ADP y GTP. No existe evidencia de competición alguna entre unos y otros, pero aquellos pueden dar lugar a cambios conformacionales que interfieren la regulación (43).

La actividad enzimática puede estar estrechamente relacionada con el estado de agregación de las subunidades al constituir el oligómero, según el siguiente esquema (38):



Las tres formas son catalíticamente activas, aunque la especificidad por el sustrato varía de unas a otras. De esta forma, mientras el monómero X es específico para el glutamato y puede polimerizarse, el monómero Y no lo hace y tiene mayor actividad frente a ciertos aminoácidos monocarboxílicos, como la alanina por ejemplo. Las tres formas están en equilibrio y diversos agentes conocidos afectan al desplazamiento del equilibrio de la enzima en uno u otro sentido, como indica el esquema. También diversas sustancias, que influyen sobre la velocidad catalítica, afectan a la reacción de polimerización. El GTP (85), la tiroxina (86) y el dietil-estilbestrol (87) que inhiben a la GDH, favorecen la degradación de la enzima en presencia de NADH. Por otro lado, el ADP que estimula la actividad enzimática, ayuda a la agregación de la enzima en presencia de NADH (88) y a la formación del monómero X a partir del Y.

La concentración de GDH, en numerosos órganos, está a niveles en los cuales pueden darse formas polimerizadas. Sin embargo, se sabe que la GDH de distintas procedencias cambia notablemente su capacidad polimérica. Por ejemplo, la GDH de hígado de cerdo (89) y humano (90) se polimerizan en soluciones concentradas al igual que la enzima de hígado bovino, mientras que la de hígado de pollo y de sapo (91, 92) se agregan en soluciones de menor concentración. La enzima purificada de hígado y riñón de rata, así como las de procedencia no animal, no se polimerizan (55, 94).

Sobre el mecanismo de polimerización se han emitido teorías varias. Colman y Frieden (77) proponen la existencia de un equilibrio, sin etapas intermedias, entre el oligómero y el polímero. La existencia de este tipo de equilibrio, supondría la formación de dos picos por ultracentrifugación, y

según los datos de Olson y Anfinsen (95) sólo se forma uno. Sund y Buchard (76) han sugerido una asociación por pasos y el polímero así formado estaría limitado a ocho oligómeros. Por su parte Chun y Kim (96), basándose en trabajos anteriores de Eisemberg y Tomkins (97), se inclinan por la posibilidad de formación de un polímero de indefinido número de oligómeros.

Experimentos sobre viscosidad (98), difracción de rayos X (99) y microscopía electrónica (100, 101) han evidenciado que la enzima se agrega formando polímeros lineales. La polimerización, que es reversible y dependiente de la concentración, se ha estudiado por medida del esparcimiento de la luz (*light scattering*) y por equilibrio de sedimentación (102) y se llega a la conclusión de que el peso molecular aumenta paralelamente al incremento de concentración. La energía libre de adición de cada unidad sucesiva es independiente del grado de polimerización y el proceso puede describirse como una condensación lineal abierta de oligómeros funcionales. La energía de activación, a distintas concentraciones de proteína, es la misma. Mayor evidencia la proporciona el que las etapas bimoleculares, que dan lugar a polímeros lineales, poseen la misma constante de equilibrio; si bien hay que señalar datos contradictorios (103). Las fuerzas implicadas en la reacción de polimerización no han sido aún bien caracterizadas. La influencia del pH (a pH 7,8 se favorece la forma X y a pH 9 la forma Y) (104), de la fuerza iónica y de la temperatura sobre el grado de agregación permiten suponer que en la polimerización están implicadas interacciones electrostáticas (103, 105). El efecto del dioxano, que rompe las formas poliméricas, indicaría la participación de formas hidrofóbicas (90), aunque ésto no implica cambio alguno en el entorno de los residuos aromáticos (106).

Los hidrocarburos aromáticos, como el benceno y el tolueno, aumentan la polimerización, aunque sin efecto sobre la actividad específica de la enzima, lo que parece indicar que ésta pueda ser independiente del grado de agregación.

La sección de coenzimas nucleotídicos sobre la GDH tiene un gran efecto sobre el equilibrio de polimerización de la enzima (107). La importancia de estas interacciones, asociadas en algunos casos a cambios en la actividad enzimática, se debe a que los niveles metabólicos de ciertos nucleótidos controlan estos mecanismos (108).

Tomkins (43) ha investigado acerca de la influencia de los nucleótidos sobre los efectos catalíticos, relacionándolos con el equilibrio de polimerización. Como se ha indicado en el esquema

de la pág. 13, el GTP, en presencia de NADH, inactiva a la enzima (109) y presenta mayor afinidad por la forma desagregada del mismo, que para la polimérica (108). Sin embargo, otros ligandos que inhiben a la GDH, favorecen su despolimerización. Por su parte el ADP en presencia de NADH aumenta la actividad enzimática y favorece la polimerización. Todos estos hechos inducen a pensar que los purin-nucleótidos actúan sobre la GDH y cambian el equilibrio entre una forma polimérica, enzimáticamente activa, y otra oligomérica de poca actividad.

Estudios posteriores realizados a altas concentraciones de enzima y en presencia de inhibidores, no han aportado datos significativos que indiquen correlación alguna entre especificidad y grado de polimerización (110). Fisher (111) ha supuesto que el GTP influye en la polimerización y que compete, posiblemente, con el lugar de unión del oligómero impidiendo, de esta forma, la agregación del mismo. El GTP podría unirse a la enzima en presencia de NADH o NADPH mientras que el ADP tal vez interfiere.

Se ha postulado también, la forma de unión del NADH a los oligómeros, indicándose que en cada una de ellas el coenzima se une en dos lugares diferentes: el "sitio catalítico" que parece estar relacionado con la despolimerización, y el "sitio regulador" que estaría implicado en la protección de la enzima frente a la disociación. Esta idea parece confirmarse por el hecho de que si la enzima es incubada con NADH (en ausencia de NADH) antes de la adición de GTP, la despolimerización es más lenta. Por último, se han apuntado notables variaciones en las velocidades de despolimerización, dependientes del purin-nucleótido utilizado en la reacción (112). Se admite la posibilidad de un control por medio de diferentes formas de la enzima, con distinta capacidad de actuación frente a los diversos coenzimas.

Respecto a la estabilidad de la GDH, cabe señalar, que la procedente de tejidos animales, es más estable en tampones que contengan aniones polivalentes como el fosfato, que con cationes monovalentes como el Tris (113). Cuando se utiliza Tris, la pérdida de actividad va acompañada de un cambio conformacional considerable, que puede estudiarse en relación con el aumento de reactividad de los grupos sulfhidrilo, así como con la pérdida de fluorescencia intrínseca. La desnaturalización puede prevenirse con ClNa (114), lo que le permite suponer que las fuerzas electrostáticas ayudan a mantener la integridad de la molécula de la enzima.

Los coenzimas reducidos producen sobre la desnaturalización, efectos dobles. A concentracio-

nes por debajo de  $10^{-5}$  M, el NADH y el NADPH incrementan la velocidad de inactivación. Por el contrario, a concentraciones superiores actúan con un efecto desestabilizador sobre la proteína (113).

En presencia de NADH, el dietilestilbestrol, el GTP y los cationes  $Zn^{++}$ , aumentan la velocidad de desnaturalización, (114) mientras que el ADP protege a la enzima en la mayor parte de las condiciones suavemente inactivantes (113). En tampón fosfato potásico 0,2 M pH 7,6 la GDH de hígado bovino es estable durante una hora a  $41^{\circ}$  C, incluso irreversiblemente (115), sino se añade al tampón sulfato sódico 0,5 M (90).

La disociación en subunidades de la GDH de hígado bovino va acompañada de pérdida de actividad. Cuando los valores de pH aumentan de 10 a 12 o disminuyen de 5 a 2, la disociación se acompaña de cambios en el espectro ultravioleta, característicos de la perturbación de cromóforos tirosilo (116, 117). También muestran la misma dependencia a los cambios de pH, las variaciones del peso molecular y pueden ajustarse a curvas de titulación teórica para grupos inoizantes con valores de pK de 3,7 a 10,8.

Una interpretación de estos resultados supondría que, algunas de las fuerzas que mantienen subunidades juntas, podrían implicar uniones de tipo puente de hidrógeno entre grupos hidroxilo fenólicos y la cadena de grupos carboxilo (116, 117). Por el contrario, la desagregación de las formas poliméricas de la proteína a la forma de hexámero activo, no va unida a ningún cambio espectral (109). El clorhidrato de guanidina a concentraciones de, al menos 2 M, disocia a la enzima hepática bovina, aunque a veces estas preparaciones enzimáticas están contaminadas por una proteasa que es activa en estas condiciones (103). También se ha observado que se produce disociación de la enzima en subunidades, a concentraciones 4 M de urea (90).

En cuanto al centro activo, los primeros ensayos realizados para llegar a su identificación, se realizaron con GDH de hígado bovino (93) y establecieron que algunos ácidos dicarboxílicos, como el glutarato y el isoftalato, así como un grupo de m-halobenzoatos, son potentes inhibidores competitivos. La característica común a estos compuestos es la presencia de dos grupos carboxilo o bien, de un grupo carboxilo y un componente muy electronegativo. La estructura tridimensional de los inhibidores cíclicos más efectivos muestra que los dos sustituyentes, que separan los electrones, están a una distancia de 7,5 Å y parece ser que la cadena recta de los dicarboxilatos posee una

conformación similar. El isoftalato, inhibidor muy potente para la enzima bovina (93) tiene sus dos grupos carboxilo separados por 7,5 Å. Por todo ello se postuló que el sitio de unión del sustrato debe contener dos grupos cargados positivamente y separados entre sí 7,5 Å.

Fisher (42) ha propuesto que la unión del glutamato, para que sea de máxima eficacia, requiere no sólo los grupos  $\alpha$  y  $\gamma$  carboxilo, sino también el grupo  $\alpha$ -amino y los hidrógenos  $\alpha$  y  $\gamma$ . No obstante, posteriormente, se comprobó que con  $\gamma$ -monofluoro-glutamato como sustrato, la enzima posee la misma  $K_m$  que el glutamato, de lo que se deduce que los hidrógenos  $\alpha$  y  $\gamma$  no deben ser esenciales.

La GDH de hígado bovino cataliza también la desaminación oxidativa de ciertos L-aminoácidos tales como la L-leucina, L-norvalina y L-gamma-aminobutirato (118), lo que indica que el centro activo presenta mayor aptencia para el grupo  $\alpha$ -carboxilo. La sustitución de este grupo, en el glutamato, por tetrazol, disminuye la fuerza de unión en grado superior que en el caso de un reemplazo del grupo  $\gamma$ -carboxilo (119).

En lo referente al sitio del coenzima, Cross y Fisher (120) lo han dividido en dos subsitios: uno específico para la porción amídica de la nicotinamida y otro para la adenosina-difosfato. La unión del coenzima en el subsitio de la amida, perturba las regiones de absorción de la tiroxina y del triptófano (121).

Kaplan y sus colaboradores (122) han demostrado que, análogos del NAD tales como 3-acetilpiridina y piridina-3-aldehído, son utilizados por la enzima bovina con mayor eficacia. Esto parece atribuirse al hecho de que ni la 3-acetilpiridina, ni la piridina-3-aldehído, pueden unirse en el subsitio de la amida. Asimismo, la sustitución de la porción 5'AMP del coenzima, por formicina, 2-aminopurina-ribonucleosido o 7-deazopurin-ribonucleosido, disminuye pero no inhibe totalmente la actividad catalítica; lo que corresponde a una baja especificidad de la GDH respecto al subsitio adenosin-difosfato (120, 123).

El NMN no es un cofactor para la GDH bovina (124), pero la sustitución de adenina por hipoxantina, citosina o nicotinamida da lugar a derivados que funcionan como coenzimas, si bien su efectividad es de 93, 53 y 3% menor respectivamente, comparada con la del NAD. Todos estos resultados demuestran una falta de especificidad en el subsitio del adenosin-difosfato; sí como que, a

pesar de que esta porción del coenzima pueda estar modificada de distintas maneras, debe contruir de algún modo a que funcione como cofactor.

Rossmán y sus colaboradores (44) señalan que, en cierto número de deshidrogenasas y quinasas, la conservación de una porción de la estructura tridimensional es responsable de la unión del coenzima. Esta porción consistiría en un cierto número de fracciones cortas y alternantes de láminas  $\beta$ -plegadas y  $\alpha$ -hélice. A pesar de que aún hay dudas sobre la estructura tridimensional de las distintas GDH, sí se conoce la homología en la secuencia lineal entre los restos de aminoácidos 245 a 280 de la GDH bovina y de pollo, así como los restos implicados en la unión del coenzima con deshidrogenasas de lactato, etanol y 3-P-gliceraldehído. Por todo ello es bastante probable que la porción del subsitio adenilato del coenzima, se sitúe entre los restos 245 a 280 de la GDH bovina y de pollo.

Por otra parte, la GDH-NADP dependiente, de *Neurospora*, se inactiva rápidamente por acción del tetranitrometano (125) el cual modifica el resto de tiroxina de la porción 168. Este resto de tiroxina no forma parte de la secuencia implicada en la porción adenilato del coenzima, pero sí entra en la fracción correspondiente a la enzima de hígado bovino y de pollo. Otros trabajos realizados con 1,2-ciclohexanodiona (125) que inhibe tanto la GDH-NADP dependiente, de *Neurospora*, como la de hígado bovino, informan que la arginina forma parte o está próxima al subsitio de unión de la nicotinamida.

En cuanto a la especificidad de la GDH, ya hemos indicado que su acción catalítica no se limita al ácido glutámico, sino que se amplía a otros aminoácidos tales como la  $\alpha$ -alanina (41, 42, 43). También se sabe que la enzima procedente de tejidos animales utiliza como coenzima NAD (H) o NADP (H) indistintamente, que, por el contrario, la CDH de otras fuentes es específica para uno u otro y que la capacidad para utilizar dichos coenzimas varía según la especie animal de la que procede (45, 46, 47).

Por otra parte se sabe que, como sucede para otras enzimas que pueden emplear el grupo amido de la glutamina o el amonio como dadores de nitrógeno, la GDH bovina y la GDH-NADP dependiente, de *Neurospora*, pueden utilizar la glutamina como dador de nitrógeno con un rendimiento del 40% respecto del amonio (126). La asparagina puede donar su grupo amido sólo con la GDH-NADP dependiente, de *Neurospora*, con un rendimiento del 10% respecto al amonio. La

velocidad óptima para el uso de las amidas se alcanza a pH 8,4 mientras que con el amonio se consigue en valores de pH entre 7,6 y 7,8. El ADP aumenta, alrededor de tres veces, la velocidad de la aminación del  $\alpha$ -cetoglutarato, con glutamina como dador, con la GDH bovina. Sin embargo, la GDH-NAD dependiente, de *Neurospora*, no actúa cuando el dador de nitrógeno es la glutamina o la asparragina.

La movilidad electroforética de la GDH de hígado bovino, en tampón fosfato a pH entre 6 y 9,5 ha sido estudiada por Olson y Anfinsen (95). Ambos autores excluyeron las electroforesis realizadas a altas concentraciones de hidrogeniones, debido a la insolubilidad e inestabilidad que presentan y dan como punto isoeléctrico valores entre 4 y 5. Debido a su composición, con un exceso de residuos catiónicos, cabe pensar en un punto isoeléctrico cercano a la neutralidad. Las movilidades electroforéticas de GDH de diferentes fuentes, dependen, al menos en parte, de su capacidad de polimerización (127, 128).

El coeficiente de extinción de la GDH bovina ha estado sujeto a múltiples discusiones. Olson y Anfinsen obtuvieron un valor a 279 nm de  $E = 0,97 \text{ cm}^2 \text{ Mg}^{-1}$  (95). Posteriormente este valor ha sido corregido por medida de esparcimiento de luz a  $E = 0,83 \text{ cm}^2 \text{ Mg}^{-1}$ . Otros autores (129) han dado un valor de  $E = 0,89 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ .

En lo que respecta a los estudios cinéticos de la GDH, hay que advertir sobre su complicación a causa del fenómeno de polimerización-despolimerización, del que hemos hablado anteriormente, y a los efectos alostéricos y polimerizantes de los coenzimas. La enzima de rata, que no se polimeriza, está sujeta a control alostérico por GTP y ADP (130, 54), lo que parece aclarar que el control alostérico y la polimerización son fenómenos físicos independientes.

Diversos nucleótidos, incluyendo NAD o NADH, ejercen diferentes efectos alostéricos sobre la reacción de la GDH, según que el sustrato sea glutamato o cualquier aminoácido monocarboxílico. Así, un efecto inhibitorio, con glutamato como sustrato, no lo es cuando éste es alanina y lo mismo sucede en el sentido inverso de la reacción. Los datos cinéticos señalan que estos efectos opuestos se deben a pasos limitantes de la velocidad, que son diferentes para ambas reacciones. Iwatsubo y Pantaloni (131) han sugerido el siguiente esquema para la desaminación oxidativa del glutamato, L-alanina, L-norvalina, etc., basándose en medidas cinéticas: (figura 2.1-2)

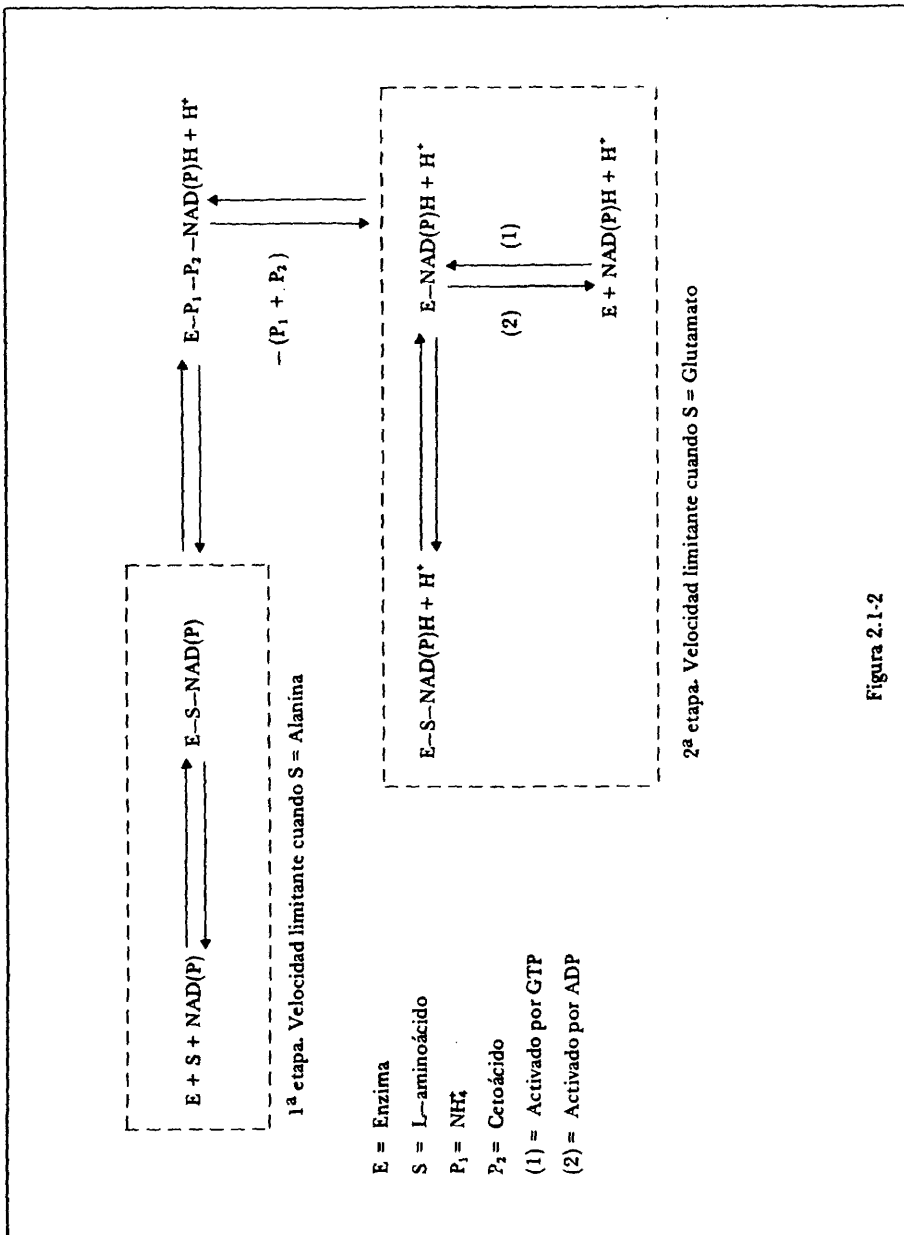
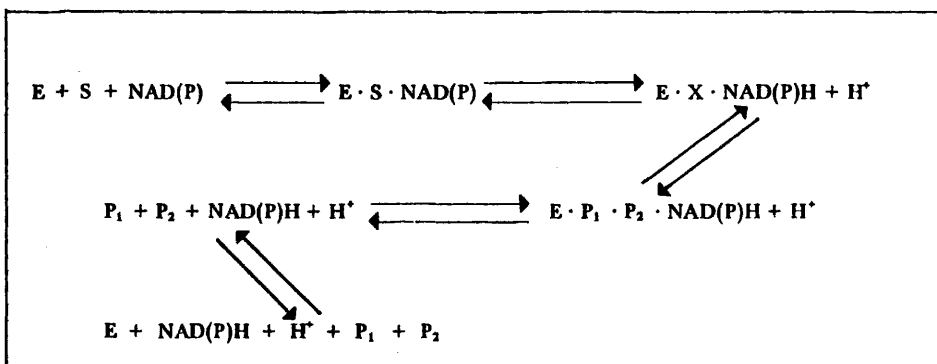


Figura 2.1.2

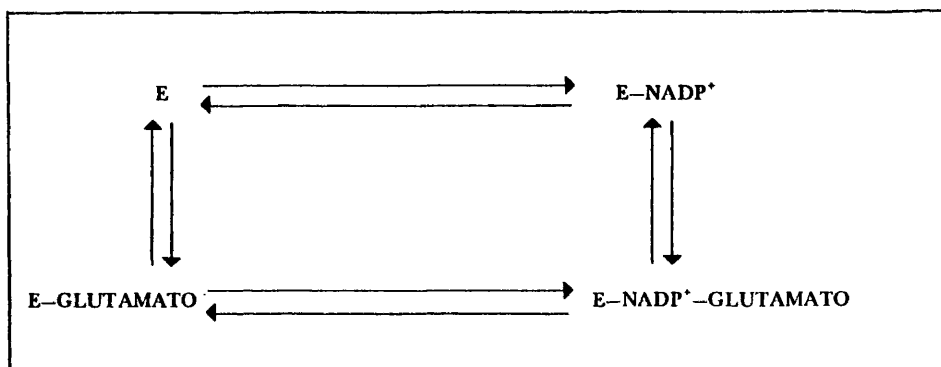
Este esquema fue modificado por Albis y Pantaloni (132), con la inclusión de una etapa adicional de desprotonización a partir de un complejo intermedio: E.X.NAD (P), donde X podría ser un iminoglutarato:



Según estos autores, la etapa de velocidad limitante en la oxidación del glutamato, es la disociación del complejo enzima-coenzima reducido (2ª etapa). El GTP favorece la unión del NADH a la enzima, por ello estabiliza el complejo enzima-coenzima reducido y provoca la inhibición de la reacción total. El ADP, que activa la reacción, desestabiliza dicho complejo. Los efectos recíprocos del GTP y del ADP sobre la reacción con alanina como sustrato, se originan en la primera etapa de la reacción antes de la disociación del coenzima reducido. Resulta así una activación por el GTP y, similarmente, una inhibición de la unión de la enzima al coenzima por el ADP. Esta inhibición en la primera etapa, resulta más importante que el efecto del ADP, en la segunda etapa, de incremento de disociación del coenzima reducido. Iwatsubo y Pantaloni (131) han concluido que la etapa inicial de activación por el GTP y de inactivación por el ADP, es independiente del sustrato utilizado, lo que explica el comportamiento cinético de la GDH así como su regulación por GTP y NADH, además de por otros efectores. Sin embargo, por medio de experimentos cinéticos, Markan y Steinhübel (133) piensan que el GTP puede comportarse como activador o inhibidor, en dependencia de la concentración de sustrato. Cross y Fisher (120) han intentado relacionar los resultados cinéticos con los ensayos espectroscópicos de complejos formados por la enzima y varios sustratos, coenzimas y productos de la reacción. Admiten como modelo estructural para la regulación de la actividad catalítica de la GDH, una región de superficie activa que contiene seis subsitios capaces de unirse al

grupo funcional. Los efectos recíprocos del GTP y del ADP, se atribuyen entonces a sus uniones mutuas, que se excluyen una a otra.

Colen y sus colaboradores (134) han demostrado que los complejos binarios enzima-glutamato y enzima-NADP<sup>+</sup> son importantes cinéticamente y se equilibran de manera rápida mediante un mecanismo desordenado. La interacción cooperativa entre coenzima y sustrato produce un complejo ternario:



Una conclusión parecida la obtuvieron Engel y Dalziel (135) y, de la misma forma, este esquema podría incorporarse a la etapa inicial del propuesto por Iwatsubo (131). También apoyan esta idea Bates y Frieden (137), pero estudios anteriores de Frieden (136) sugieren un mecanismo ordenado en el que se forma un complejo enzima-coenzima.

Los estudios sobre las velocidades de intercambio (138) de los pares (Glutamato- $\alpha$ -ceto-glutarato; NAD<sup>+</sup>-NADH y NADP<sup>+</sup>-NADPH) apoyan el concepto de un mecanismo parcialmente desordenado o alternante. Los sustratos y coenzimas, según tal mecanismo, se unirían en cualquier orden, pero se disociarían más libremente a partir de los complejos binarios que de los ternarios y, como las velocidades de cambio para estos complejos no son iguales, el mecanismo no sería completamente desordenado.

Hochreiter y Schelleberg (139, 140) en lo que respecta al mecanismo de la reacción, han propuesto el amino-glutarato como intermediario en la reacción de la GDH. La incubación de la

enzima con  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio, da lugar a la formación de  $\alpha$ -iminoglutarato, el cual es atrapado por reducción con hidruro de boro formándose L-glutamato. La formación de dicho iminoácido es un proceso enzimático, ya que los inhibidores competitivos previenen su síntesis.

Es interesante tener en cuenta la lisina-126 en la reacción que implica el  $\alpha$ -aminoglutarato ya que, según Brown y sus colaboradores (141), este aminoácido interviene en la unión del sustrato. Sin embargo, y puesto que su pK es del orden de 7,6 a 8,0 es poco probable que represente uno de los dos grupos catiónicos necesarios para la unión de los carboxilatos, puesto que estaría al 50% de protones en el pH óptimo para la reducción del  $\alpha$ -cetoglutarato y casi completamente desprotonizado en la concentración de hidrogeniones más favorable a la oxidación del glutamato.

Una hipótesis más atractiva supondría la condensación de un grupo  $\alpha$ -amino, no cargado, con  $\alpha$ -cetoglutarato para formar una base de Schiff con liberación de una molécula de agua. La acción del amonio sobre esta base de Schiff intermediaria daría lugar a la formación de  $\alpha$ -iminoglutarato, que se reduciría con NAD(P)H para formar glutamato. La reacción tendría así pasos separados de deshidratación y reducción. En el sentido contrario de la reacción, se formaría un ión hidruro, en la etapa inicial, a partir de glutamato. Es probable que intervenga una base enzimática que lo transfiera al coenzima para formar iminoglutarato, seguido de la reacción de éste con el grupo  $\epsilon$ -amino de lisina-126 para formar la base de Schiff con pérdida de amonio. La hidrólisis de la base de Schiff, que puede ser catalizada por un grupo protonado como el amino, podría originar  $\alpha$ -cetoglutarato: (figura. 2.1-3).

En (B) se forma la base de Schiff, intermediaria de la lisina-126 de la enzima, con el  $\alpha$ -cetoglutarato, lo que implica la formación de (C) iminoglutarato unido a la enzima y cuya reducción da lugar a la formación de glutamato (D).

Este hipotético mecanismo se basa en que el  $\alpha$ -iminoglutarato sea realmente un intermediario en la reacción. El que los  $\alpha$ -iminoácidos son compuestos intermediarios en reacciones catalizadas por ciertas oxidasas, está demostrado (142, 143) y, por otra parte, este mecanismo sería coherente con la existencia de distintos pH óptimos para las reacciones directa e inversa. El pH óptimo para la GDH de la mayor parte de las fuentes de procedencia, en el sentido de aminación del  $\alpha$ -cetoglutarato es del orden de 7,6 a 8,0, mientras que, en el sentido de la oxidación del glutamato, es de 8,5 a



9,0 (144, 145, 146). El pH óptimo para la oxidación del glutamato resultaría de la necesidad de un grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina 126 de la enzima, así como de la parcial desprotonización del grupo amino del glutamato, ya que se produciría una repulsión electrostática entre los grupos amino del sustrato y la enzima si ambos estuviesen cargados positivamente.

Al referirnos a la acción enzimática y a la composición de la GDH, se ha citado la regulación que ejercen los mecanismos de polimerización-despolimerización y la presencia de nucleótidos, no obstante se resumen conjuntamente todos los mecanismos y sustancias que intervienen en la regulación de la GDH y se sintetizan en los siguientes puntos:

a) Mecanismos de polimerización-despolimerización.

b) Efectos de inducción-represión (en hongos, bacterias y algunas plantas existe un control entre algunos aminoácidos o precursores de nitrógeno y metabolitos de glucosa).

c) Efectores alostéricos, que pueden subdividirse en tres clases:

c<sub>1</sub>.— Purin nucleósidos di y trifosforilados.

c<sub>2</sub>.— Sustratos y coenzimas.

c<sub>3</sub>.— Algunos lípidos y hormonas esteroídicas.

c<sub>1</sub>.— Purin-nucleótidos: Todas las GDH de los vertebrados estudiados, presentan inhibición por el GTP y también, excepto la GDH de hígado de sapo, son activadas por el ADP. La interacción de nucleótidos sobre el equilibrio de polimerización y sus efectos sobre la reacción enzimática, ya han sido expuestos anteriormente (pág. 14).

c<sub>2</sub>.— Sustratos y coenzimas: Altas concentraciones de L-glutamato inhiben la reacción de la GDH en el sentido de la desaminación del glutamato. La causa se atribuye a la formación de un complejo terciario E-NAD(P)H-L-glutamato (147) en el que los ligandos están más estrechamente unidos que en el complejo binario. También la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato y de amonio ejercen un papel regulador de la reacción.

En cuanto a los coenzimas, ya se ha indicado (109) que Frieden propuso dos sitios de unión por cadena peptídica, uno activo y uno regulador. El activo es igualmente accesible para la NADH y el NADPH, pero el segundo posee unas diez veces mayor afinidad por el NADH (148). La unión de los coenzimas oxidados  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$  a la GDH ha sido poco analizada, pero existe algún trabajo en el que se señala que la máxima capacidad corresponde a una molécula por subunidad enzimática (149). También parece ser que la concentración del coenzima afecta a la actividad enzimática. A elevadas concentraciones de NADH, se inhibe la reacción en el sentido de aminación del  $\alpha$ -cetoglutarato.

c<sub>3</sub>.— Lípidos y hormonas esteroídicas: Los lípidos mitocondriales, como las fosfatidil-colinas, fosfatidil-etanolaminas, fosfatidil-serinas y cardiolipina son inhibidores (150). Igualmente ciertos esteroides como el dietil-bestrol inactivan la reacción, si bien hay que hacer constar que su efecto se ha ensayado con cantidades superiores a las efectivas "in vivo" como hormona.

## 2.2 MODELO DEL METABOLISMO DEL GLUTAMATO EN CEREBRO

Durante mucho tiempo, el metabolismo y el papel del glutamato, en cerebro, ha captado el interés de numerosos investigadores, habiéndosele atribuido funciones realmente beneficiosas en pacientes epilépticos. Sin embargo, y a pesar de su larga historia todavía se siguen haciendo preguntas sobre cuál será la verdadera función de este metabolito en el cerebro.

Al ser, el glutamato, una molécula extraordinariamente simple, es de esperar que juegue un papel limitado en los procesos metabólicos. Como se sabe, está implicado en varias reacciones de aminotransferencia, también su grupo amino puede transformarse en amonio y éste puede incorporarse al 2-oxoglutarato para transformarlo en glutamato mediante la intervención de la GDH. Por otra parte la descarboxilación del mismo origina ácido gamma-aminobutírico (GABA), compuesto localizado muy preferentemente en el S.N.C. de los mamíferos. La amidación del grupo  $\gamma$ -carboxílico del glutamato da lugar a la formación de glutamina. Finalmente el glutamato es utilizado en la síntesis de péptidos y proteínas. Con la excepción de la formación del GABA, todas estas reacciones se efectúan en, prácticamente, todas las células vivas, aunque la cuantía y distribución difiere de unas a otras.

El hecho de que, en el cerebro, el glutamato intervenga en la síntesis del GABA, es suficiente razón para examinar intensamente el metabolismo de este aminoácido en dicho tejido. Además, el amonio es tóxico para el cerebro y la conversión del glutamato en glutamina es probablemente, bien un factor que contribuye a la toxicidad del amonio o un agente importante en el proceso de su destoxificación. Generalmente se acepta que el sistema glutamato-glutamina en el cerebro controla los niveles de amonio; el exceso de glutamina abandona el cerebro y así el amonio tóxico es transportado a otros órganos capaces de eliminarlo.

Además del papel que juega el glutamato en todas estas transformaciones metabólicas, existe una gran evidencia de que, tanto el GABA como él mismo y también el aspartato, son aminoácidos neurotransmisores, lo cual es otro dato a favor del enorme interés experimental por el estudio del glutamato.

Desde el año 1969 y debido a los trabajos de Berl y sus colaboradores (151), se sospecha que existen en el cerebro, al menos, dos compartimentos para el metabolismo del glutamato, uno denominado "compartimento pequeño" caracterizado por un intenso metabolismo y otro llamado "compartimento grande" con un ritmo de metabolismo más lento (152, 156).

Los experimentos que llevaron a postular la compartimentación del glutamato (151) pusieron de manifiesto que, cuando se inyecta glutamato marcado, la mayor radiactividad específica se encuentra en la glutamina y que la velocidad de marcaje de ésta, es mucho más rápida de lo que cabría esperar si sólo existiera un lugar para el metabolismo del glutamato. También se observó que tanto el bicarbonato marcado como el amonio, se incorporan preferentemente en la glutamina. Mediante el uso de precursores del glutamato, tales como acetato y glucosa marcados en distintas posiciones, se ha intentado establecer la idea de su compartimentación así como la probable existencia de dos ciclos tricarbóxicos en el cerebro (157). La hipótesis propuesta se resume en la figura 2.2-1. En ella los números indican  $\mu\text{moles/gramo/minuto}$  de flujo a través de los dos ciclos cítricos.

Las principales conclusiones que se han obtenido de estos estudios (157, 158) son las siguientes:

- 1) Una gran cantidad del glutamato formado a partir del acetato que entra en el ciclo de la derecha (compartimento pequeño), se transforma en glutamina.

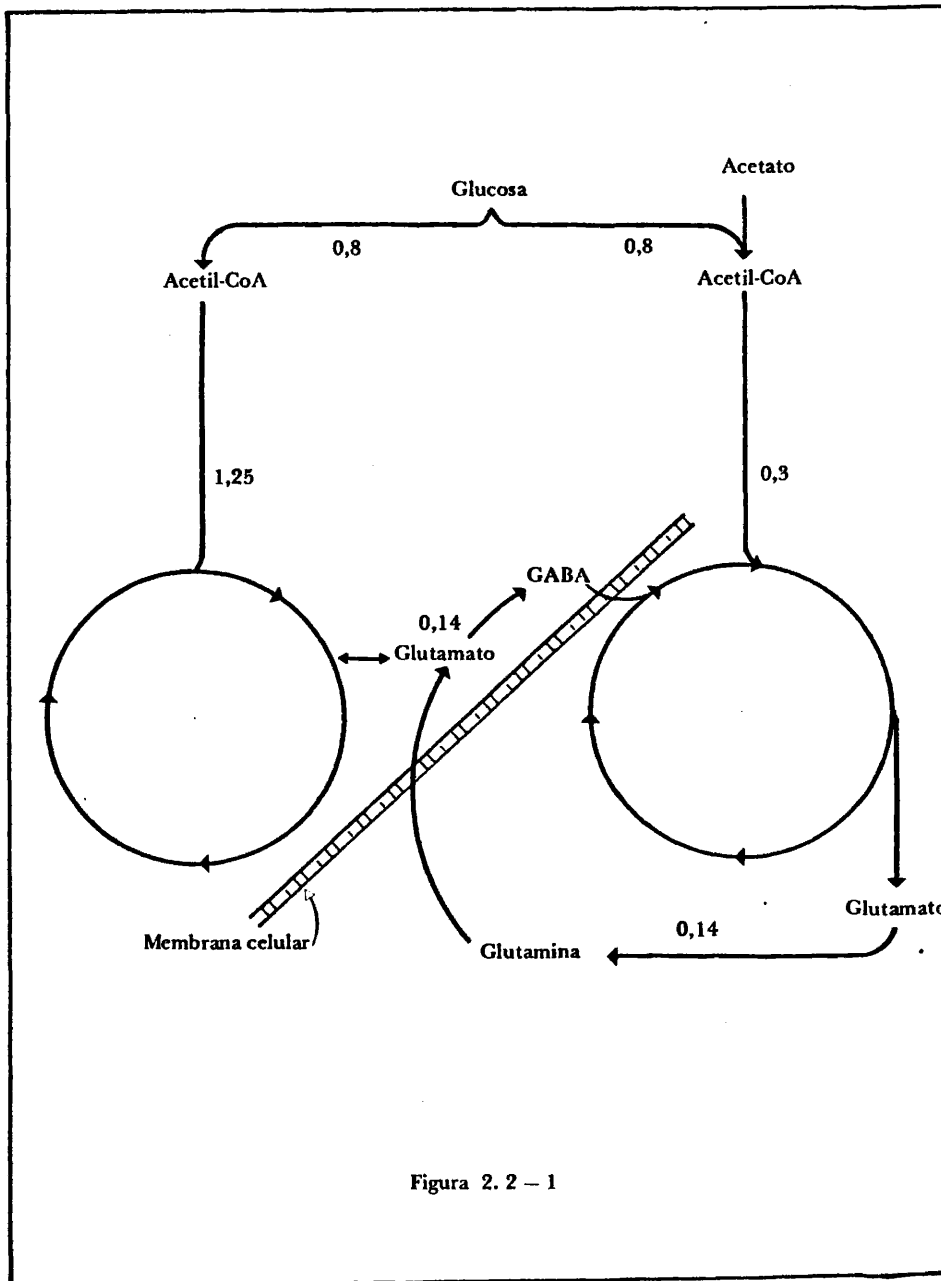


Figura 2.2 - 1

2) Esta glutamina se transporta hacia el ciclo cítrico del compartimento grande, donde se transforma en glutamato.

3) En el compartimento grande se sintetiza GABA a partir del glutamato.

4) El GABA sintetizado es transportado al compartimento pequeño donde se degrada, vía ciclo tricarbóxico, previa transformación en semialdehído succínico. Al mismo tiempo, y en este mismo compartimento, se forma glutamato por aminotransferencia entre el GABA y el  $\alpha$ -cetoglutarato con el concurso de la GABA-T.

5) El flujo de la glutamina desde el compartimento pequeño al grande, es semejante al del GABA en la dirección inversa, lo cual es necesario para mantener la tasa de compuestos carbonados.

6) En el compartimento pequeño, una gran parte del  $\alpha$ -cetoglutarato formado, abandona el ciclo cítrico transformándose en glutamina vía glutamato. El déficit de ácido succínico a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato se suple por la formación del mismo vía GABA.

Esta hipótesis metabólica puede comprobarse fácilmente manipulando la velocidad y el tamaño de los pools, mediante el empleo de precursores marcados. Existen sin embargo diversas consideraciones que pueden inducir a pensar que este modelo no se verifique "in vivo". La más importante considera que el GABA se forma, en su totalidad, en el compartimento grande del glutamato y que sólo un 25% de este glutamato forma GABA. Si el GABA se sintetizase al azar en dichas neuronas a partir del glutamato de las mismas, solamente un 25% de éste originaría dicho GABA. El glutamato está presente también en las células gliales, luego, según esto, el GABA se formaría a partir de un 25% de un "pool" y no de la totalidad. A pesar de las distintas consideraciones que se han hecho a este respecto, la idea de que la formación del GABA se realiza en el compartimento grande del glutamato, sigue siendo válida. La que pudiera no serlo tanto es la que supone que el flujo de la glutamina desde el compartimento pequeño hacia el grande, sea del mismo orden que el del GABA en el sentido contrario; esta última hipótesis tendría que demostrarse.

El modelo bicompartimental para el glutamato en cerebro, es muy lógico debido a la existencia de dos tipos de células en el mismo: neuronas y gliales. Balazs y sus colaboradores (159) han propuesto un modelo tricíclico con el fin de acomodar alguna heterogeneidad a las cinéticas del

GABA. Este modelo considera tres compartimentos: las células gliales, el pericarion neural y las terminaciones nerviosas.

Se ha intentado también relacionar la compartimentación del glutamato a nivel de la heterogeneidad mitocondrial en el cerebro. Esta heterogeneidad ha sido demostrada claramente en distintas células mediante microscopía electrónica. Donde las demandas metabólicas de una célula son simples, como puede ser el requerimiento de ATP, solamente se requiere un uniforme y simple tipo de mitocondrias. Este pudiera ser el caso del cerebro en el que son necesarias grandes demandas de ATP, cubiertas casi totalmente por la glucosa. Este punto de vista es compatible con el hecho de que el cerebro es una compleja red de membranas que propagan, generan y distribuyen mensajes eléctricos que requieren gran aporte energético.

Quizás sea mejor considerar en primer lugar, que el cerebro es, en cada nivel, un conjunto de fenómenos y de moléculas heterogéneas y ordenadas dinámicamente. Esta heterogeneidad puede funcionar dentro de un contexto puramente metabólico, como ocurre a gran escala en el hígado, o dentro de una dinámica "organización molecular" como puede ser el caso del cerebro. Nunca, sin embargo, deben separarse estos dos aspectos.

Después de estos planteamientos teóricos, vamos a comentar algunos datos obtenidos experimentalmente.

El que las mitocondrias cerebrales son heterogéneas se deduce de las observaciones de algunos investigadores (160, 161) los cuales han observado que la GDH y la GABA-T, en un gradiente de densidad de glucosa, se encuentran en distinto lugar que la citocromo-oxidasa, glutaminasa y succinato-dehidrogenasa. Como todas estas enzimas son mitocondriales, el hallazgo anterior significa que existen, al menos, dos poblaciones de mitocondrias en el cerebro. Estas observaciones se han corroborado más tarde con los trabajos de Neidle y sus colaboradores (162) los cuales han observado que la acetil-CoA-sintetasa y la GDH tienen la misma distribución. Puesto que el acetato, el amonio y el GABA son precursores del compartimento pequeño del glutamato, puede pensarse que el cerebro contiene dos poblaciones de mitocondrias, cada una de ellas implicada en uno de los dos compartimentos (162, 157, 158). Debido a que los trabajos de la medida de actividades enzimáticas en experimentos de separación mediante gradiente de densidad de sacarosa no implica solapamiento de dichas actividades, hay autores que consideran una mayor heterogeneidad mitocondrial (163).

Con todos estos estudios se ha llegado a la conclusión de que el compartimento pequeño del glutamato es también heterogéneo. Otra conclusión que puede también obtenerse de los datos anteriores es la de que, las mitocondrias del cerebro son muy heterogéneas (164).

Los análisis de los perfiles de sedimentación en un campo gravitatorio, son muy difíciles incluso para moléculas muy homogéneas. Estas dificultades son aún mayores cuando las partículas son grandes y su composición compleja; por lo tanto, un tratamiento cuantitativo de los datos es imposible si bien estos estudios nos proporcionan alguna evidencia sobre esta heterogeneidad mitocondrial.

La heterogeneidad del compartimento pequeño del glutamato se deduce, no sólo de los estudios sobre heterogeneidad mitocondrial sino también de estudios realizados con precursores marcados tanto "in vivo" como "in vitro". Cheng y sus colaboradores (165) fueron los primeros en apreciar esta heterogeneidad. Sus evidencias se basan en estudios comparativos de la incorporación de acetato y de citrato en glutamato, glutamina y GABA, realizados en cortes de cerebro. Tanto el primero como el segundo se incorporan aproximadamente en la misma proporción en glutamina y glutamato mientras que el marcaje del GABA por citrato es mucho menor que el obtenido con acetato. Si, como ya se ha indicado, la glutamina se transporta del compartimento pequeño al grande, donde se sintetiza el GABA, esto será cierto para la glutamina marcada por acetato pero no para la marcada con citrato. Existe pues, un pool de glutamina marcada por citrato que no es transportada al lugar de síntesis del GABA, por lo que puede deducirse que el compartimento pequeño del glutamato está al menos bicompartimentado.

Otros datos que confirman la evidencia de la heterogeneidad del compartimento pequeño son los realizados usando amonio marcado. Desde los inicios de la hipótesis de la compartimentación del glutamato, se sabe que el amonio es un precursor del compartimento pequeño (166, 167) y se ha observado que incrementa la velocidad de síntesis de la glutamina en el cerebro (168, 169) aunque hay alguna diferencia según la fuente de carbono que se administre. De los datos expuestos anteriormente se deduce que la GDH se encuentra presente sólo en una pequeña fracción de las mitocondrias cerebrales. Como la primera reacción de incorporación de amonio en el cerebro es, probablemente la de la GDH, varios autores han estudiado el efecto del amonio sobre la incorporación de acetato y propionato a los aminoácidos. También se ha considerado interesante utilizar GABA puesto que la GDH y la GABA-T no tienen la misma distribución y por el posible papel de la

glutamina en la síntesis del mismo.

En el cerebro de ratón adulto, el amonio incrementa los niveles de glutamina cuando la fuente de carbono es el propionato pero no cuando es el acetato, en cambio en ratas jóvenes (10 días de vida) el amonio incrementa por igual los niveles de glutamina en presencia de propionato o acetato. Por lo tanto, en el cerebro adulto del ratón, el amonio tiene claramente distinto efecto sobre el metabolismo de los dos precursores del pequeño compartimento, lo cual indica la presencia de dos subcompartimentos dentro de él. En este modelo se supone que la glutamina marcada, a partir del acetato, es transportada al compartimento grande donde se transforma en glutamato.

La evidencia sobre la heterogeneidad del compartimento pequeño del glutamato se confirma también mediante estudios farmacológicos. El ácido amino-oxiacético, que es inhibidor de las transaminasas, inhibe apreciablemente la incorporación del acetato en el glutamato mientras que la glutamina es mucho menos afectada (170). Esto indica que, bajo las condiciones de este experimento, la mayoría del glutamato se forma mediante reacciones de aminotransferencia y que la mayoría del glutamato utilizado para la síntesis de glutamina, se forma mediante la reacción de la GDH lo cual indica que la localización de esta enzima no es idéntica a la de las transaminasas. Por otra parte, el fluoroacetato (1 mM) inhibe, aproximadamente en un 50%, la transformación del acetato en glutamato y sin embargo no afecta a su transformación en aspartato y GABA aunque sí inhibe la incorporación de acetato, aspartato y GABA en glutamina (171). El efecto sobre la incorporación del acetato podría explicarse en el caso de que el fluoroacetato inhibiera a la aconitasa tras su conversión en fluorocitrato, vía fluoroacetil-CoA, reacción que catalizaría la acetil-CoA-sintetasa. La ausencia de un efecto del fluoroacetato sobre la conversión del aspartato y del GABA en glutamina, significaría que estas transformaciones no tienen lugar en un compartimento que contenga acetil-CoA-sintetasa. Si el fluoroacetato actúa como tal, sin conversión inicial vía acetil-CoA-sintetasa, actuaría claramente de distinta forma sobre los dos pasos metabólicos implicados en la transformación del aspartato, del GABA y del acetato en glutamato y glutamina. De todo esto se deduce que existen dos espacios metabólicos encargados de la degradación del GABA, uno que es afectado por el fluoroacetato y el otro que es independiente de él. El primero (GABA-1) da lugar a la formación de glutamina y el segundo (GABA-2) no.

En realidad, se cree que existen al menos tres, y probablemente cuatro, espacios metabólicos para el acetato:

1) En el que el acetato se transforma en glutamina, el cual no es inhibido por el ácido amino-oxiacético y sí por el fluoroacetato (ACET-1).

2) En el que el acetato se transforma en glutamato y que es inhibido tanto por el fluoroacetato como por el ácido amino-oxiacético (ACET-2).

3) En el que no se realiza su conversión en glutamina y en el que el "turnover" del glutamato es aumentado por el amonio (ACET-3).

4) Espacio con rápido marcaje de la glutamina y que no obstante sólo es visible en los primeros minutos (ACET-4).

Todos los datos expuestos nos conducen a la conclusión final de una gran heterogeneidad en el metabolismo de los aminoácidos en el cerebro especialmente del GABA y del glutamato si bien, hasta el momento, no se puede contestar a la pregunta de "cuántos espacios metabólicos existen en el cerebro". Si se observa, se comprueba que todos los datos se han obtenido partiendo de estudios de incorporación de precursores marcados y de medidas de actividades enzimáticas localizadas en distintas subpoblaciones de mitocondrias, pero no se ha realizado ningún estudio, al menos en lo que a nuestros conocimientos concierne, sobre el comportamiento de las enzimas implicadas en la síntesis y degradación de estos aminoácidos. La falta de estos estudios ha sido una de las razones que nos ha impulsado al planteamiento experimental del presente trabajo. A la vista de todos los datos expuestos anteriormente, nos hemos planteado la siguiente pregunta: "¿Estará implicada la regulación de estas enzimas en la compartimentación metabólica?" Y también "¿Podría una misma enzima presentar distinto comportamiento en cada uno de los distintos compartimentos?" Para nuestro estudio elegimos la GDH por ser una enzima regulable y por intervenir, no sólo en la síntesis y degradación del glutamato sino también, en la formación y eliminación del amonio. De nuestros datos se deduce que el comportamiento de esta enzima es distinto en mitocondrias libres (procedentes de células gliales y pericarion neural) que en las sinaptosomales (procedentes de las terminaciones nerviosas), ya que en ausencia de ADP las ML no sintetizan glutamato mientras que las MS sí lo sintetizan. Por lo tanto si es en la región sináptica donde se sintetiza fundamentalmente el GABA, éste o parte de éste GABA podría proceder de un pool de glutamato sintetizado por la vía de la GDH.

De nuestros datos parece también deducirse que, respecto al comportamiento de la GDH en las mitocondrias sinaptosomales, existe una gran variabilidad, lo que podría indicar una heterogeneidad sinaptosomal. De cualquier forma, los resultados que hemos obtenido, serían un dato a tener en cuenta aunque nunca podrían considerarse definitivos debido a la propiedad de la GDH de presentar un discutido mecanismo de regulación mediante procesos de polimerización-despolimerización, ya que una confirmación definitiva sobre la heterogeneidad sinaptosomal requeriría la realización de medidas de la actividad de la GDH a igualdad de concentración proteica. Por otra parte, esta heterogeneidad debería de ser probada mediante microscopía electrónica para poder asegurar que las cuatro subpoblaciones que se suponen sinaptosomales, lo son realmente y no se trata en ningún caso de mitocondrias libres.

Hasta ahora se ha hablado de la compartimentación del metabolismo del glutamato en cerebro sin mencionar ningún dato que indicase dónde están localizados los distintos compartimentos. En principio no hay prioridad para considerar que un cierto espacio metabólico esté presente en un sólo tipo de células. Un espacio metabólico cerebral es un lugar en este órgano con algunas propiedades comunes. Se han dado diferentes criterios para dividir el cerebro en espacios que puedan distinguirse metabólicamente. Por ejemplo, los diferentes compartimentos definidos anteriormente para el acetato y el GABA, no tienen por qué ser espacios muy diferentes ya que podría haber solapamiento entre ellos. Muchos espacios metabólicos diferentes pueden coexistir dentro de la célula y puede decirse que, en general, la estructura de cada célula está estrictamente organizada y no es un fluido homogéneo. Si, como se ha indicado antes, una parte del espacio metabólico con las propiedades del compartimento "grande" del glutamato, está implicado en la síntesis del GABA y está presente, por definición, en las células que lo sintetizan, no quiere decir que este espacio metabólico se encuentre en estas células solamente pues podría existir, por ejemplo, en otras células en las que el glutamato no se utilice para sintetizar GABA.

La idea más fácil de barajar, en cuanto a la localización de compartimentos, es partiendo del GABA y especialmente desde que Robertis y otros autores (172, 174, 161, 162) establecieron distinta localización para la GAD y la GABA-T. Según ellos, la primera de estas enzimas estaría localizada en las terminaciones nerviosas (sinaptosomas) mientras que la GABA-T lo está en mitocondrias no sinaptosomales. Respecto a la localización de esta última, Van Celder (175, 172) mediante experimentos histoquímicos ha comprobado que se encuentra en neuronas. Otros estudios realizados en retina (176) indican su localización en células gliales. Esto parece confirmar que el GABA se

metaboliza tanto en células gliales como en las neuronas y, por ello, el espacio metabólico atribuido al compartimento "pequeño" del glutamato no está confinado a un sólo tipo de células.

No se conoce la localización de la acetil-CoA-sintetasa mientras que la GDH parece que se encuentra en todo tipo de mitocondrias (180, 181). Wilson y sus colaboradores (178) así como Nicklas (179) han encontrado GAD en células gliales de la cepa C<sub>6</sub> y ha comprobado que en dichas células la GABA-T se encuentra en muy pequeña cantidad. Por su parte Bardakjian y sus colaboradores (182) han hallado esta última enzima en eritrocitos así como una pequeña proporción de GAD. Desde luego parece claro que el compartimento "grande" del glutamato se caracteriza por sintetizar GABA por lo que parece estar confinado en las terminaciones nerviosas y el hecho de haberse encontrado una pequeña proporción de GAD en células gliales podría deberse a que este tipo de células fuera tumoral. Lo que no está tan claro es si se sintetiza o no GABA en el pericardion neural ya que de confirmarse dicha síntesis, podrían confirmarse igualmente los dos lugares de síntesis del GABA (GABA-1 y GABA-2).

Otro dato que puede aportarse, para apoyar la idea de que el compartimento grande del glutamato se halla localizado en las terminaciones nerviosas, se debe a Rose (183) que ha encontrado GS en neuronas y en neuropilis que contenían células gliales, así como a Nicklas y sus colaboradores (179) que la han hallado en gliomas C<sub>6</sub> y han comprobado que los sinaptosomas no la contienen o la poseen en pequeña cuantía, mientras que la glutaminasa está presente a concentraciones muy elevadas (184).

Todos los datos expuestos pueden ser resumidos en los siguientes puntos:

- 1) Existencia de un compartimento "grande" y otro "pequeño".
- 2) El compartimento "grande" se caracteriza por:
  - a) Ser marcado por la Glucosa.
  - b) Poseer un metabolismo más lento.
  - c) Transformar la glutamina en glutamato y éste en GABA.
  - d) La posibilidad de estar bicompartimentado, ya que sintetiza GABA con dos pool distintos (GABA-1 y GABA-2) uno de los cuales es inhibido por el fluoracetato y el

otro no.

3) El compartimento "pequeño" se caracteriza por:

- a) Formar glutamina a partir de glutamato.
- b) Formar glutamina a partir de acetato y de citrato.
- c) Degradar al GABA.
- d) Formar glutamato y glutamina a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato.
- e) La posibilidad de estar bicompartimentado ( $P_1$  y  $P_2$ ).

4) El compartimento "pequeño"  $P_1$  se caracteriza por:

- a) Formar glutamina a partir de acetato pero no de citrato.
- b) Formar glutamina con amonio pero con acetato como fuente de carbono y no con propionato.
- c) La inhibición de la síntesis de la glutamina con ácido amino-oxiacético en presencia de acetato.
- d) Formar la glutamina que va al compartimento "grande" para dar lugar a la formación de glutamato y GABA.

5) El compartimento "pequeño"  $P_2$  se caracteriza por:

- a) Formar glutamina a partir de citrato.
- b) Formar glutamina con amonio y propionato como fuente de carbono.
- c) Formar glutamato y glutamina a partir de acetato, en presencia de ácido amino-oxiacético.

De todo ello se puede sacar la conclusión de que en el compartimento  $P_2$  el glutamato se forma fundamentalmente por la vía de la GDH mientras que en el  $P_1$  se hace por la de las aminotransferasas.

Según Balazs y sus colaboradores (185) la compartimentación metabólica del tejido nervioso podría esquematizarse como se indica en la figura 2.2-2.

Herzt (184) ha establecido un tipo de interrelaciones entre células neurales y gliales que se esquematizan en la figura 2.2-3.

Como conclusión de todo lo expuesto, podemos apuntar:

1) Existen muchos pools de glutamato en el cerebro, cada uno de ellos con un ciclo tricarboxílico y otras rutas metabólicas propias. Algunas de estas rutas son cualitativamente iguales pero distintas desde el punto de vista cuantitativo y otras son diferentes en ambos aspectos. Respecto a cuántas de estas vías existen, es difícil de determinar partiendo de las evidencias hasta ahora obtenidas.

2) Para algunos aspectos del metabolismo de los aminoácidos, la heterogeneidad del mismo se establece, no sólo con experimentos basados en estudios con isótopos radiactivos, sino también con otros basados en la localización de diferentes enzimas, lo que nos permite establecer principios estructurales sobre la heterogeneidad metabólica.

3) Se han obtenido datos para iniciar análisis preliminares, con la utilización del amonio y de agentes farmacológicos.

4) Se han descrito algunos aspectos sobre la localización celular de distintos espacios metabólicos del glutamato. Asimismo se ha deducido que no puede atribuirse un espacio metabólico determinado a un solo tipo de células.

5) Las mitocondrias del cerebro son extraordinariamente heterogéneas y esta heterogeneidad parece estar relacionada con la compartimentación metabólica.

6) El estudio de las características de las enzimas en los distintos compartimentos, pueden ser de gran utilidad en el entendimiento de la compartimentación del glutamato.

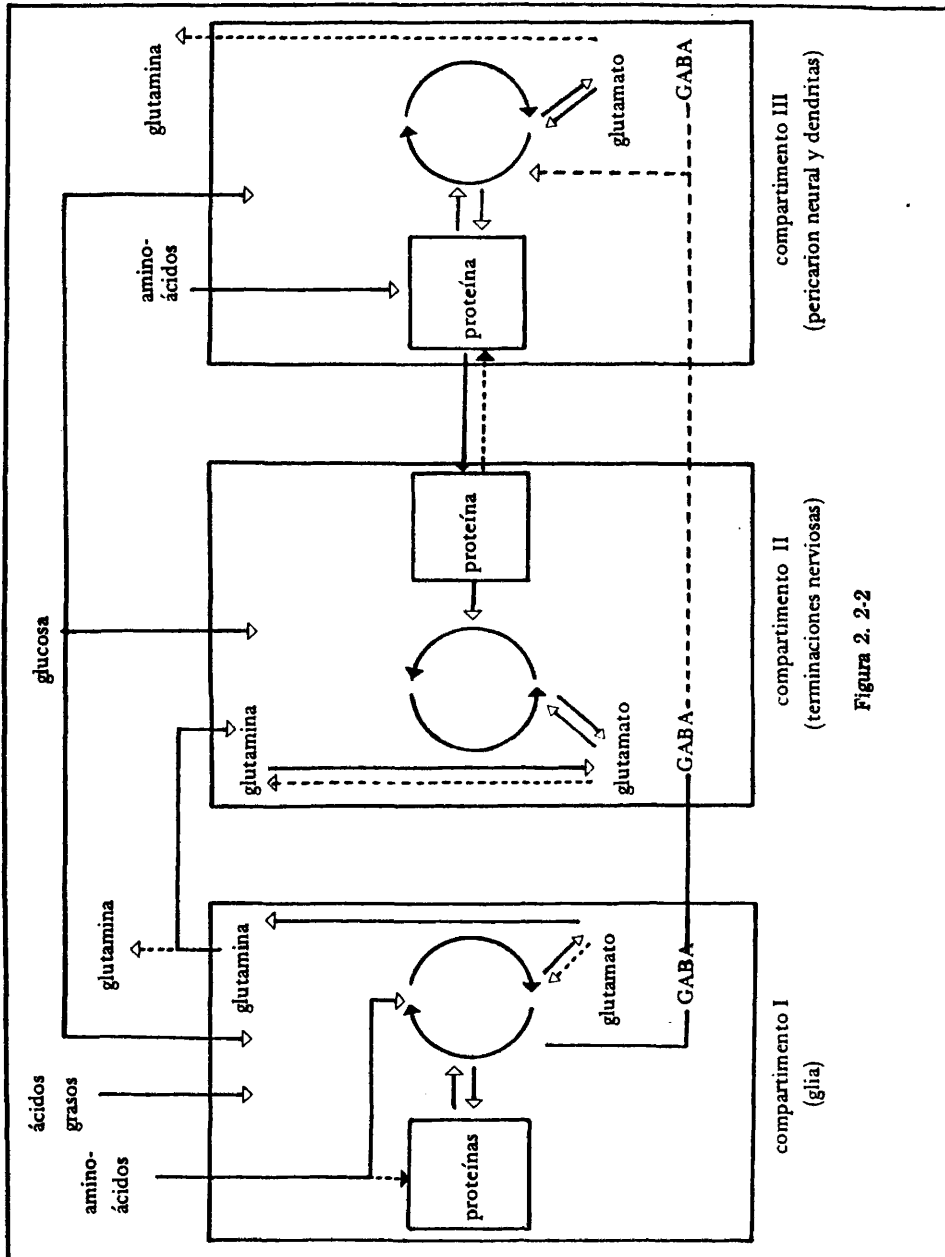
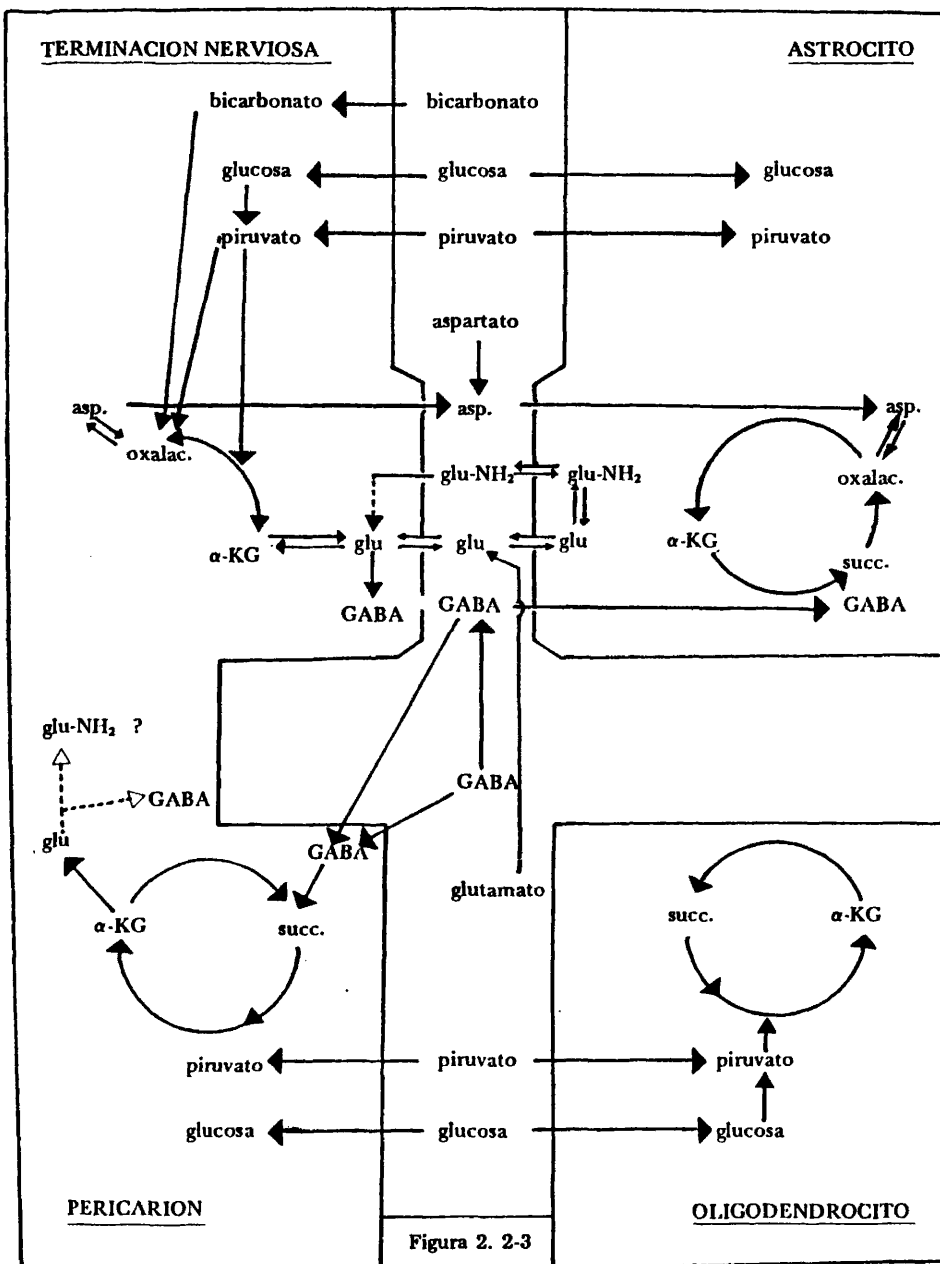


Figura 2. 2-2



**3.- MATERIAL Y METODOS**

### 3.- MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 OBTENCION DE TEJIDO CEREBRAL

En todos nuestros experimentos utilizamos ratas adultas de la raza Wistar, cuyo peso oscila entre los 200 y 300 gramos, procedentes del criadero instalado en la Facultad.

La forma de sacrificio a que fueron sometidas las ratas consistió en la extracción del corazón, bajo anestesia con vapores de éter sulfúrico. La extracción del cerebro se realizó siempre, inmediatamente a la del corazón, practicando cortes en distintas áreas del cráneo (Figura 3.1-1) a fin de dejar a descubierto la masa encefálica. Cada cerebro fue lavado a continuación, en solución fisiológica a 4° C y secado sobre papel de filtro. Por último se pesaron todos los cerebros extraídos (6 a 8 por ensayo).



Figura 3.1-1

El éter sulfúrico utilizado fue de la casa MERCK y la solución fisiológica se preparó con ClNa también Merck.

#### 3.2 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

##### 3.2-1 Obtención de ML y MS

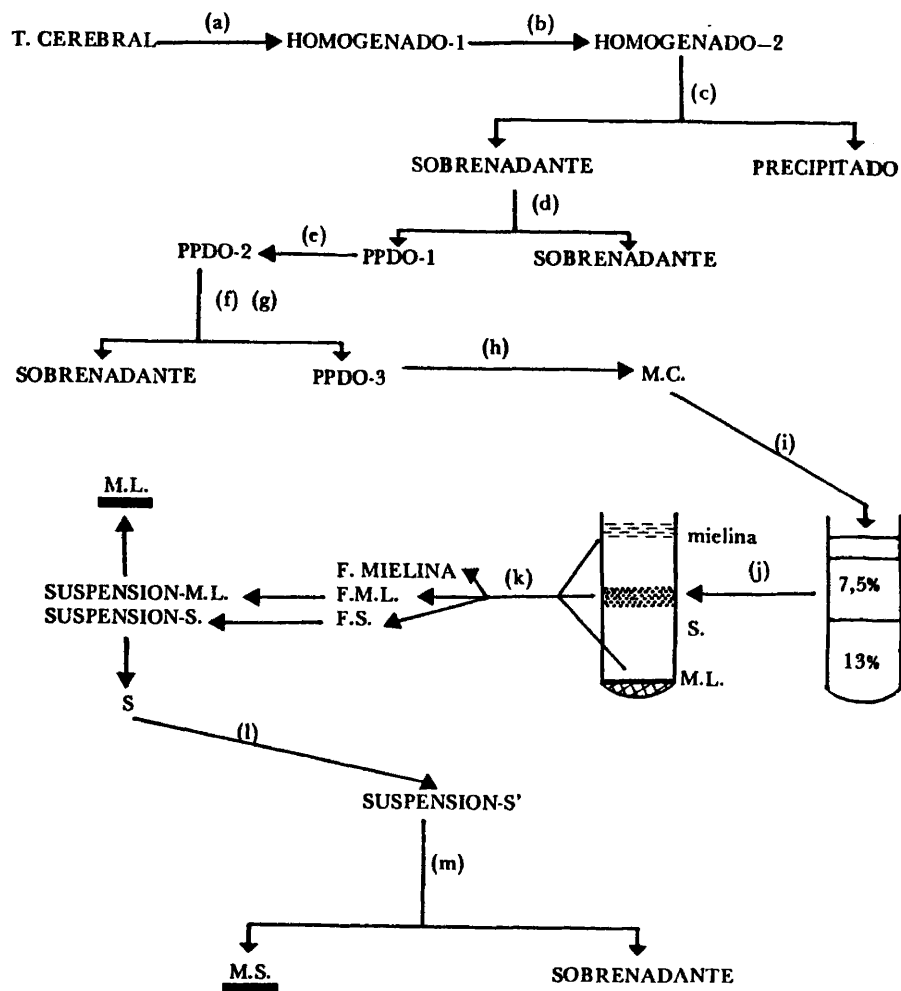
Nuestra técnica es una modificación de la descrita por Clark, J. H. Nicklas (188) y se realizó según el siguiente protocolo:

(a) Los cerebros se sometieron a la acción mecánica de un Potter de vidrio con pistilo de Teflón, a 4.000 r.p.m./ 8 veces/ cada vez; utilizando como vehículo de homogeneización 15 ml. de Medio A (M.A.) por gramo de cerebro. La composición del M.A. fue la siguiente (187):

Sacarosa (0,32 M.)

Cl<sub>2</sub>Mg (3 mM.)

Tampón Cacodilato-K (1 mM.), pH 6,4



(b) El homogenado-1 se filtró a través de una tela de gasa con el fin de separar restos de tejido.

(c) Se centrifugó el homogenado-2 a 1.500 r.p.m. durante 10 minutos y a 4° C, en una centrífuga refrigerada SORVALL-RC-5, a fin de precipitar la fracción nuclear.

(d) El sobrenadante se centrifugó durante 20 minutos a 12.500 r.p.m. y a 4° C en la misma

centrífuga, con el fin de separar un precipitado que constaba de mitocondrias libres (M.L.) y sinaptosomas. Este precipitado (PPDO-1), prácticamente todas las veces que fue repetida la técnica, apareció contaminado de glóbulos rojos.

(e) Se eliminaron los glóbulos rojos del PPDO-1 manualmente -----> PPDO-2.

(f) Se suspendió el PPDO-2 en M.A. (3 veces/vol.).

(g) Se centrifugó durante 10 minutos a 17.000 r.p.m. y a 4° C en SORVALL-RC-5.

(f) y (g) Se lavó el PPDO-2 -----> PPDO-3.

h) Se suspendió el PPDO-3 en 10 ml. de M.A. con lo que se obtuvo una suspensión de M.L. y sinaptosomas: (M.C.).

i) Se prepararon seis tubos con un gradiente discontinuo de Ficoll con los siguientes volúmenes en cada uno de ellos: 6 ml. de M. Ficoll al 13%, 6 ml. de M. Ficoll al 7,5% y 2 ml. de M.C.

La composición de los medios Ficoll fue la siguiente (188):

M. Ficoll 13%: Sacarosa (0,32 M.); EDTA-K (1mM.), pH 7,4; Tris-ClH (10 mM.), pH 7,4.

M. Ficoll 7,5%: Sacarosa (0,32 M.); EDTA-K (1 mM.), pH 7,4; Tris-ClH (10 mM.), pH 7,4 y Ficoll al 7,5%.

(j) Se sometieron a ultracentrifugación los tubos de gradiente, durante 30 minutos a 23.000 r.p.m. en ultracentrífuga Beckman modelo L-5-50 con rotor SW-27-1. Se obtuvieron así tres fracciones: la superior correspondía a la mielina, la intermedia (S) a los sinaptosomas y la inferior a las M.L.

(k) Se separaron las fracciones correspondientes a mielina y sinaptosomas con pipetas Pasteur. La fracción M.L. quedaba pegada al fondo de los tubos, para separarla se decantó el resto de M. Ficoll y se obtuvo una suspensión de M.L., agitando con M.A. (doble de su volumen). Se suspendió la fracción correspondiente a los sinaptosomas en M.A. (doble de su volumen). Por último, se centrifugaron ambas suspensiones M.L. y S. en SORVALL-RC-5 durante 10 minutos a 17.000

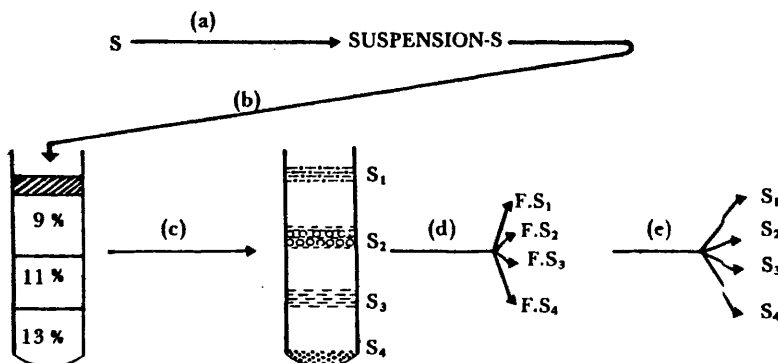
r.p.m. y a 4° C. Se consiguió así un *pellet* correspondiente a mitocondrias libres y otro a los sinaptosomas.

(l) El *pellet* de la fracción sinaptosomal (S), se agitó con tampón Tris-CLH (0,02M.), pH 7,4 (aproximadamente el doble de su volumen) durante 20 minutos, a fin de romper los sinaptosomas por *shock* osmótico.

(m) La suspensión, producto del *shock*, se centrifugó en SORVALL-RC-5 a 4° C durante 20 minutos y a 20.000 r.p.m. El precipitado correspondía a la fracción de mitocondrias sinaptosomales (M.S.).

### 3.2-2 Obtención de M.S. de subfracciones sinaptosomales

La técnica utilizada en este caso, fue la misma que para la obtención de M.L. y M.S (2.2.1) hasta (k). A partir de este punto y con el *pellet* correspondiente a los sinaptosomas, se obtuvieron distintas subfracciones sinaptosomales, y de ellas las mitocondrias correspondientes según el siguiente protocolo:



a) Se suspendió el pellet S en 10 ml. de Medio A, utilizado en 3.2-1 (pág. 43).

b) Se prepararon seis tubos con un gradiente discontinuo de Ficoll con los siguientes volúmenes en cada uno de ellos: 5 ml. de M. Ficoll al 13% + 5 ml. de M. Ficoll al 11% + 5 ml. de M. Ficoll al 9% + 2 ml. de SUSPENSION-S.

La composición de los diferentes M. Ficoll fue la siguiente:

M. Ficoll al 13% visto en 3.2-1 (pág. 43);

M. Ficoll al 11%: Sacarosa (0,32 M.) + EDTA-K (1 mM.), pH 7,4 + Tris-ClH (10 mM.), pH 7,4 + Ficoll al 11%;

M. Ficoll al 9%: Sacarosa (0,32 M.) + EDTA-K (1 mM.), pH 7,4 + Tris-ClH (10 mM.), pH 7,4 + Ficoll al 9%.

c) Se sometió el gradiente a ultracentrifugación durante 30 minutos en una ultracentrífuga Beckman modelo L5-50 con rotor SW-27-1 y a 23.000 r.p.m. (90.000 X G). Se consiguieron de esta forma cuatro fracciones de sinaptosomas que denominamos S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> y S<sub>4</sub>.

d) Se separaron S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> y S<sub>4</sub> con pipetas Pasteur.

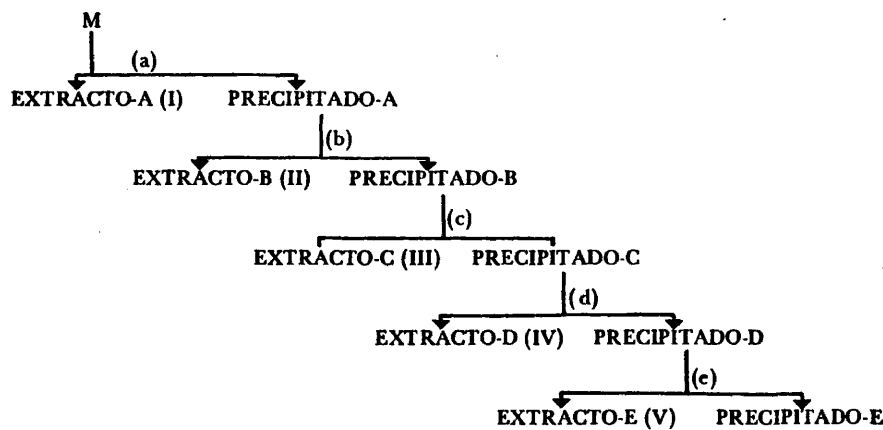
e) Se lavó con M.A. (doble de su volumen) cada una de las fracciones y se centriguó en SORVALL RC-5 a 4° C durante 15 minutos a 20.000 r.p.m. (40.000 X G). Se obtuvieron así cuatro pellets correspondientes a las subfracciones sinaptosomales S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> y S<sub>4</sub> que los denominamos MS<sub>1</sub>, MS<sub>2</sub>, MS<sub>3</sub> y MS<sub>4</sub> respectivamente.

### 3.3 PREPARACION DE EXTRACTOS ENZIMATICOS

#### 3.3-1 Solubilización de GDH

Las mitocondrias obtenidas, según los anteriores apartados, fueron sometidas a distintos medios de solubilización de la GDH con el fin de establecer cual de ellos era el más idóneo.

1) Primeramente, las mitocondrias se sometieron a congelación y descongelación sucesiva, después a distintos medios de solubilización de la siguiente manera:



a) Las mitocondrias congeladas (M) se suspendieron en tampón Tris-ClH 0,02 M., pH 7,4 (aproximadamente cuatro veces su volumen) y se pasaron suavemente por un potter esmerilado manual (cuatro a seis veces). Se dejaron a 4° C durante 30 minutos y se centrifugaron en SORVALL-RC-5 a 4° C durante 20 minutos y a 17.000 r.p.m. (30.000 XG). El sobrenadante correspondía al primer extracto enzimático (EXTRACTO-A) (I).

b) EL PRECIPITADO-A se suspendió en (cuatro veces su volumen) tampón fosfato-potásico 0,004 M., pH 7,4 y se dejó durante 30 minutos a 4° C, centrifugándose en SORVALL-RC-5 durante 20 minutos a 4° C y a 17.000 r.p.m. (30.000 XG).

c) EL PRECIPITADO-B se suspendió en tampón fosfato potásico 0,02 M., pH 7,4 (cuatro veces su volumen), se dejó durante 30 minutos a 4° C en la misma centrífuga. El sobrenadante correspondía al EXTRACTO-C.

d) El PRECIPITADO-C se suspendió en tampón fosfato potásico 0,2 M., pH 7,4 (cuatro veces su volumen), se dejó igualmente a 4° C durante el mismo tiempo y se centrifugó en idénticas condiciones. El sobrenadante correspondía al extracto D.

e) El PRECIPITADO-D se suspendió en tampón fosfato potásico 0,02 M., pH 7,4 con Tritón-X-100 al 1% (cuatro veces su volumen). Después de dejarlo 30 minutos a 4° C se centrifugó de la misma forma que en los casos anteriores. El sobrenadante correspondía al extracto E.

II) Las mitocondrias fueron tratadas con tampón fosfato potásico 0,02 M., pH 7,4 con Tritón-X-100 de distintas concentraciones, a fin de establecer la más idónea para la solubilización de la GDH. Las concentraciones de Tritón-X-100 utilizadas fueron: 0,1%; 0,3%; 0,5%; 0,7% y 1%.

Con todas ellas se operó de la misma forma. Se suspendió en cada una un *pellet* de mitocondrias descongeladas, se agitó, se dejaron durante 15 minutos a 4° C y por último se centrifugaron a 4° C durante 30 minutos y a 20.000 r.p.m. (40.000 XG) en SORVALL-RC-5. Los sobrenadantes correspondieron a los extractos enzimáticos.

### 3.4 VALORACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

En los extractos enzimáticos conseguidos según 2.3, se valoró la actividad de enzimas marcadoras de mitocondrias, de fracción soluble y de membranas plasmáticas (fumarasa, MDH, LDH y ACH-asa) además de la GDH en los dos sentidos de la reacción, primero sin ADP y después con ADP, para conocer el efecto de éste sobre la actividad enzimática.

Todas las valoraciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro, marca PYE UNICAM, modelo S.P.-1.800.

#### 3.4-1 Fumarasa (189)

##### a) *Reactivos*

Coctail de fumarasa: Tampón fosfato sódico (50 mM.), pH 7,4 + L-malato 50 mM.

##### b) *Valoración*

1 ml. de coctail

10 µl. de extracto enzimático

Volumen total: 1,01 ml.

Lectura a 250 nm.

**3.4-2 MDH****a) Reactivos**

Tampón Glicocola (0,12 M.), pH 10

L-malato (0,85 M.)

NAD (37,5 mM.)

**b) Valoración**

1 ml. de tampón glicocola (0,12 M.), pH 10

100  $\mu$ l. de NAD (37,5 mM)

100  $\mu$ l. de L-malato (0,85 M)

20-50  $\mu$ l. de extracto enzimático

Volumen total: 1,2 ml. completando con agua destilada.

Lectura a 340 nm.

**3.4-3 LDH****a) Reactivos**

Piruvato (0,08 M), pH 7,4

NADH (2 mg./ml.)

Tampón tris-ClH (1 M), pH 7,4

**b) Valoración**

50  $\mu$ l. de piruvato (0,08 M), pH 7,4

100  $\mu$ l. de NADH (2 mg./ml.)

50  $\mu$ l. de tris-ClH (1 M), pH 7,4

0,8 ml. de agua destilada

10  $\mu$ l. de extracto enzimático

Volumen total: 1,01 ml.

Lectura a 340 nm.

**3.4-4 ACH-asa (190)****a) Reactivos**

Tampón fosfato potásico (0,1 M), pH 8.

Reactivo coloreado (5-5'-dinitro-bis-ácido-2-nitrobenzoico en tampón fosfato potásico (0,1 M) pH 8.)

Yoduro de acetil-tiocolina (20 mM) en tampón fosfato potásico (0,1 M), pH 8.

**b) Valoración**

1 ml. de tampón fosfato potásico (0,1 M), pH 8

50  $\mu$ l. de reactivo coloreado

25  $\mu$ l. de extracto enzimático

25  $\mu$ l. de agua destilada

Incubación a 37° C durante 5 minutos, al cabo de los cuales se adicionaron 0,1 ml. de yoduro de acetil-tiocolina

Volumen total: 1,2 ml.

Lectura a 412 nm.

**3.4-5 GDH**

I) Sentido:  $\alpha$  KG  $\longrightarrow$  G (biosíntesis de glutamato)

**a) Reactivos**

Tampón fosfato potásico (0,2 M), pH 7,4

NADH (0,01 M)

Acetato amónico (3 M)

$\alpha$ -cetoglutarato (0,4 M)

ADP (26  $\mu$ moles/ml.)

**b) Valoración**

Sin ADP

1 ml. de tampón fosfato potásico (0,2 M), pH 7,4

50  $\mu$ l. de NADH (0,01 M)

50  $\mu$ l. de acetato amónico (3 M)

50  $\mu$ l. de extracto enzimático

50  $\mu$ l. de agua destilada

Primera lectura a 340 nm.

Adición de 50  $\mu$ l. de  $\alpha$ -cetoglutarato (0,4 M)

Segunda lectura a 340 nm.

*Con ADP*

De forma idéntica a la anterior pero añadiendo a la cubeta, antes de la primera lectura, 50  $\mu$ l. de ADP (26 moles/ml.)

II) Sentido: G  $\longrightarrow$   $\alpha$  KG (degradación del glutamato)

a) *Reactivos*

Coctail de GDH:

T. Fosfato potásico (0,2 M) pH 7,4 ... 13 ml.

NAD (12 mM) ... .. 14 ml.

Glutamato (1 M) ... .. 2 ml.

Agua destilada hasta 60 ml.

ADP (26  $\mu$ moles/ml.)

b) *Valoración*

*Sin ADP*

1 ml. de coctail de GDH

50  $\mu$ l. de extracto enzimático

50  $\mu$ l. de agua destilada

Volumen total: 1,1 ml.

Lectura a 340 nm.

*Con ADP*

1 ml. de coctail de GDH

50  $\mu$ l. de ADP (26  $\mu$ moles/ml.)

50  $\mu$ l. de extracto enzimático.

Volumen total: 1,1 ml.

Lectura a 340 nm.

### **3.5 VALORACION DE PROTEINAS**

El método utilizado para la cuantificación de proteínas, fue el de Lowry (192).

### **3.6 CALCULO DE LA Km PARA LOS DISTINTOS SUSTRATOS**

Las medidas de actividad para calcular la Km para los distintos sustratos fueron realizadas en un espectrofotómetro PYE-UNICAM, modelo SP-1.800.

Los extractos enzimáticos, obtenidos según 2.3, fueron pasados previamente por una columna de Sephadex G-25 Coarse equilibrada con tampón fosfato potásico (0,02 M.), pH 7,4.

El protocolo que se siguió para determinar dichas Km se refleja en las páginas siguientes.



3.6.2.- Km para el NAD

Sentido de la reacción: G  $\longrightarrow$   $\alpha$  KG

Reactivos	Cubetas (Volumen total 1 ml. + extracto enzimático)				
	1	2	3	4	5
Tampón fosfato potásico (0,02 M.)	0,8 ml.	0,8 ml.	0,8 ml.	0,8 ml.	0,8 ml.
Glutamato (1 M.)	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.
NAD (0,01 M.)	100 $\mu$ l.	75 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	25 $\mu$ l.	10 $\mu$ l.
Agua destilada	—	25 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	75 $\mu$ l.	90 $\mu$ l.
ADP (26 $\mu$ moles/ml.)	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.
Extracto enzimático	x $\mu$ l.	x $\mu$ l.	x $\mu$ l.	x $\mu$ l.	x $\mu$ l.

3.6.3.- Km para el NADH

Sentido de la reacción:  $\alpha$  KG  $\longrightarrow$  G

Reactivos	Cubetas (Volumen total 1 ml. + extracto enzimático)					
	1	2	3	4	5	6
Tampón fosfato potásico (0,02 M.)	0,75 ml.	0,75 ml.	0,75 ml.	0,75 ml.	0,75 ml.	0,75 ml.
NADH (0,01 M.)	10 $\mu$ l.	20 $\mu$ l.	30 $\mu$ l.	40 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	60 $\mu$ l.
Acetato amónico (3 M.)	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.
Agua destilada	90 $\mu$ l.	80 $\mu$ l.	70 $\mu$ l.	60 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	40 $\mu$ l.
$\alpha$ -KG (0,4 M.)	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.
ADP (26 $\mu$ moles/ml.)	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.
Extracto enzimático	x $\mu$ l.	x $\mu$ l.	x $\mu$ l.	x $\mu$ l.	x $\mu$ l.	x $\mu$ l.





### 3.7 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRIL-AMIDA

Los extractos enzimáticos obtenidos según 2.3, fueron sometidos a migración electroforética en gel de poliacril-amida, con el fin de separar posibles isoenzimas de GDH.

#### 3.7.1 Preparación de geles

##### *Reactivos*

Solución A: 48 ml. de ClH (1 M); 36,6 g. de Tris; 0,46 ml. de tetrametil-etileno-diamina, y agua destilada hasta 100 ml.

Solución C: 30 g. de acrilamida; 0,8 g. de bis-acrilamida; 10 mg. de ferricianuro potásico y agua destilada hasta 100 ml.

Solución P: 140 mg. de persulfato amónico y agua destilada hasta 100 ml.

##### *Preparación*

Para preparar *ocho* geles mezclamos: 2 ml. de solución A, 2 ml. de agua destilada, 4 ml. de solución C y 8 ml. de solución P.

Los geles así obtenidos presentaba un grado de polimerización del 7,5% debido a la proporción de 30 a 0,8 entre la acrilamida y la bis-acrilamida en la solución C.

#### 3.7.2 Migración electroforética

En cada tubo fue depositada la misma cantidad de extracto enzimático (50  $\mu$ l.) mezclado con sacarosa, a fin de aumentar su densidad e impedir que difundiera al adicionar el tampón.

El tampón utilizado fue Tris-Glicina pH 8,5; 3 g. de Tris-hidroximetil-amino-metano y 14,4 g. de glicina, para 5  $\emptyset$  ml. (Antes de usarlo se diluyó al 1/10).

Las condiciones en las que se efectuó la migración fueron las siguientes:

Corriente aplicada	...	...	2 mA/tubo
Tiempo	...	...	2 h. 30'
Temperatura	...	...	4° C

### 3.7.3 Teñido de los geles

Según el método de Corman y sus colaboradores (186) con ligeras modificaciones.

#### *Reactivos*

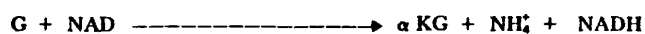
Tampón fosfato potásico (0,01 M), pH 7,4	...	...	21,3 ml.
Glutamato sódico (1 M)	...	...	2,0 ml.
NAD (30 mg./ml.)	...	...	0,6 ml.
Metasulfato de fenacina (5 g./ml.)	...	...	0,12 ml.
Azul de tetrazolio (10 g./ml.)	...	...	1,0 ml.

#### *Teñido*

Una vez realizada la electrofóresis, los geles se colocaron (fuera del soporte de vidrio) en un tubo, cada uno de ellos, y se adicionaron 3 ml. de la mezcla anterior. Se incubaron de 30 a 60 minutos a 37° C. Al cabo de ese tiempo las bandas donde existía actividad de GDH aparecieron de color azul.

Una vez teñidos, se fijó el colorante con ácido acético al 4%.

La reacción efectuada en los geles fue la siguiente:



El NADH cede su H<sup>+</sup> al metasulfato de fenacina y éste al azul de tetrazolio el cual pasa de color amarillo a azul.

**4.- PARTE EXPERIMENTAL**

#### **4.1.- LOCALIZACION Y SOLUBILIZACION DE LA GDH DE CEREBRO DE RATA**

**Esta parte del trabajo ha sido presentada en el VIII congreso de la SEB, celebrado en Murcia del 26 al 30 de septiembre del año 1979.**

✱

## INTRODUCCION

Se sabe que la glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.3) de las células animales, se encuentra localizada en las mitocondrias (1) y, dada su fácil solubilización, se pensó que se hallaba en la matriz mitocondrial y no unida a la membrana. Las enzimas procedentes de hígado bovino y de rata han sido las más estudiadas y no obstante casi nada se sabe acerca de la enzima de cerebro de rata, aunque algunos autores (2-4) sugieren que se trata de una enzima mitocondrial. Conocimientos precisos sobre la localización intramitocondrial. Conocimientos precisos sobre la localización intramitocondrial de la enzima de cerebro son interesantes, no sólo en lo referente a su funcionalidad, sino también para aportar datos que esclarezcan la compartimentación del glutamato en este tejido.

En esta parte de nuestro trabajo presentamos, no sólo información sobre la distribución subcelular y submitocondrial de la GDH de cerebro de rata, sino que aportamos algunas evidencias sobre el efecto regulador del ADP sobre la actividad de dicha enzima.

## MATERIAL Y METODOS

Se indican detalladamente en la parte general de esta tesis.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Según los resultados de la Tabla I, la GDH de cerebro de rata, al igual que la de hígado, está localizada en las mitocondrias. El que no se halla encontrado actividad enzimática en el homogenado ni en la fracción soluble  $S_1$  podría atribuirse a la presencia de un inhibidor de la enzima encontrado por González y sus colaboradores (5.7) en la fracción soluble de cerebro.

El hecho de que solamente una pequeña fracción de la enzima (aproximadamente 2 por ciento) sea extraída con tampón tris-ClH, sin fuerza iónica, parece indicar que la enzima no está en forma soluble en la matriz mitocondrial, sino que una gran proporción de ella, aproximadamente el 49%, se encuentra interaccionando con las membranas mitocondriales, (porción de la enzima

extraíble con tampón fosfato potásico de distintas fuerzas iónicas) y el resto, aproximadamente otro 49%, se halla unida fuertemente a la membrana mitocondrial (enzima extraíble con tritón X-100) (Tabla II). Estos resultados están de acuerdo con los estudios de Mc. Donnel y sus colaboradores (1) y con los de Duve y sus colaboradores (6).

Podemos observar que la relación de velocidades de la GDH, entre el sentido biosintético y degradativo de la reacción, es superior para la enzima extraíble con tampón tris-ClH (0,02 M.), pH 7,4 y con tampón fosfato potásico (0,2 M.) pH 7,4 (Tabla II). Dichos resultados podrían indicar que la localización submitocondrial de la enzima, presenta distinto comportamiento o bien que el medio de extracción ejerce algún tipo de influencia sobre su regulación.

De los resultados de las Tablas III y IV podemos deducir que la enzima, en el sentido biosintético, está fuertemente regulada por el ADP hasta el punto de que, en la mayoría de los casos no se encuentra actividad en ausencia del mismo, a excepción de la enzima extraída con tritón-X-100. También puede observarse que el tanto por ciento de activación del ADP es dependiente del medio de extracción que se haya utilizado.

La concentración más idónea de tritón X-100 para la extracción de la GDH de cerebro de rata, está comprendida entre el 0,5 y el 0,7%. Concentraciones superiores (1%) parece ser que inhiben ligeramente la actividad enzimática. La concentración de tritón X-100 no parece, sin embargo, influir en la relación de actividades en ambos sentidos de la reacción (Tabla V).

Cuando se midió la actividad de la GDH en el sentido de la degradación del glutamato, habiéndose efectuado la extracción en presencia de tritón X-100, el tanto por ciento de activación por el ADP fue muy similar para todas las concentraciones del detergente, a excepción de la del 5%. Lo mismo ocurrió cuando se midió la actividad de la enzima en el sentido de biosíntesis de glutamato. En cambio, y en ausencia de ADP, la concentración de tritón afectó al sentido de la reacción, lo cual podría indicar alguna modificación de la enzima por acción de este detergente (Tabla VI).

Al someter el extracto enzimático a electroforesis sobre gel de poliacrilamida, se han visualizado cinco bandas con actividad de GDH (Figura 4.1-1); esto, junto con el hecho de haberse encontrado diferencias en su comportamiento cuando se mide la actividad de los distintos extractos en

presencia de ADP, podría indicar que se trata de isoenzimas, probablemente localizadas en células distintas del cerebro. No obstante para confirmar esta hipótesis, serían necesarios muchos más ensayos.

## CONCLUSIONES

1.— La mayor actividad de la GDH se extrae de las mitocondrias crudas en presencia de tritón X-100, lo que parece indicar que una gran porción de la enzima se encuentra unida a la membrana (aproximadamente el 50%) (Tabla II).

2.— Una pequeña proporción de la enzima (aproximadamente el 2%) parece encontrarse libre en la matriz mitocondrial (fracción extraíble con tampón Tris-ClH) (Tabla II).

3.— Aproximadamente el 48% de la actividad enzimática es extraíble con tampón fosfato potásico de distintas fuerzas iónicas, lo que podría indicar que una parte del contenido total de la enzima pueda estar unida a la membrana mitocondrial mediante fuerzas electrostáticas (Tabla II).

4.— La relación de actividades entre el sentido biosintético y degradativo de la reacción, en presencia de ADP, depende del medio de extracción utilizado, encontrándose la relación más alta en la enzima procedente de la matriz mitocondrial (aproximadamente el 10%) y de la fracción extraída con la mayor fuerza iónica. La menor actividad se ha encontrado en las fracciones de enzima extraídas con fuerza iónica baja y con tritón X-100 (Tabla II).

5.— El factor de activación del ADP depende del medio de extracción que se utilice (Tabla III) y no es el mismo para uno y otro sentido de la reacción.

6.— La relación de actividades en el sentido biosintético y degradativo es diferente en presencia y en ausencia de ADP (1,3 mM) (Tabla IV), siendo mayor (aproximadamente el doble) en el primer caso (en presencia de ADP), lo que podría indicar un efecto modulador de este nucleótido para desplazar la actividad hacia el sentido biosintético y supondría su participación en la regulación del sentido de la actividad.

7.— La concentración idónea de tritón X-100, para la solubilización de la GDH, es la del 0,7% (Tabla VI).

8.— La relación de actividades en sentido biosintético y degradativo, en presencia de distintas concentraciones de tritón X-100, prácticamente no varía.

TABLA I

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA DE CEREBRO DE RATA

Fracción	Actividad
Homogenado ... ..	0,0
Sobrenadante (11.000 x G) ... ..	0,0
Mitocondrias ... ..	26,0

Actividad medida en el sentido de la degradación del glutamato y expresada en milimoles / minuto / miligramo.

TABLA II

SOLUBILIZACION DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA DE MITOCONDRIAS CRUDAS DE CEREBRO DE RATA

Fracción	Actividad total (nmoles / m)			Actividad específica (nmoles / m. / mg.)			Relación (αKG / G)		
	G → αKG	%	Activ.	G → αKG	%	Activ.			
I	18	2	188	7	3	1	29	3	9,7
II	109	10	257	9	5	1	11	1	2,2
III	129	12	242	8	177	46	331	33	1,9
IV	295	27	1.037	36	156	42	548	54	3,5
V	532	49	1.184	40	40	10	87	9	2,2

---

∑<sub>i=1</sub><sup>v</sup> Frac.i    1.083    100    2.908    100    381    100    1.006    100

TABLA III

EFFECTO DEL ADP SOBRE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA EXTRAIDA CON DIFERENTES TAMPONES

Actividad (n moles / m. / mg.)

$G \xrightarrow{\alpha KG} \alpha KG \xrightarrow{\alpha KG} G$

Fracción	Sin ADP		Con ADP		% de activ.		Sin ADP		Con ADP		% de activ.
	0,0	1,1	3,0	5,0	∞	455	0,0	0,0	29,0	∞	
I	0,0	1,1	3,0	5,0	∞	455	0,0	0,0	29,0	∞	∞
II	1,1	28,2	5,0	177,0	455	628	0,0	0,0	11,0	331,0	∞
III	28,2	8,0	177,0	156,0	628	1,950	0,0	0,0	331,0	548,0	∞
IV	8,0	18,8	156,0	40,0	1,950	213	0,0	223	87,0	382	∞
V	18,8		40,0		213		223				

TABLA IV

RELACION DE ACTIVIDADES ENTRE EL SENTIDO BIOSINTETICO Y DEGRADATIVO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ADP

Fracción	Relación: KG / G	
	Con ADP	Sin ADP
I	9,7	-
II	2,2	0,0
III	1,9	0,0
IV	3,5	0,0
V	2,2	1,2

TABLA V

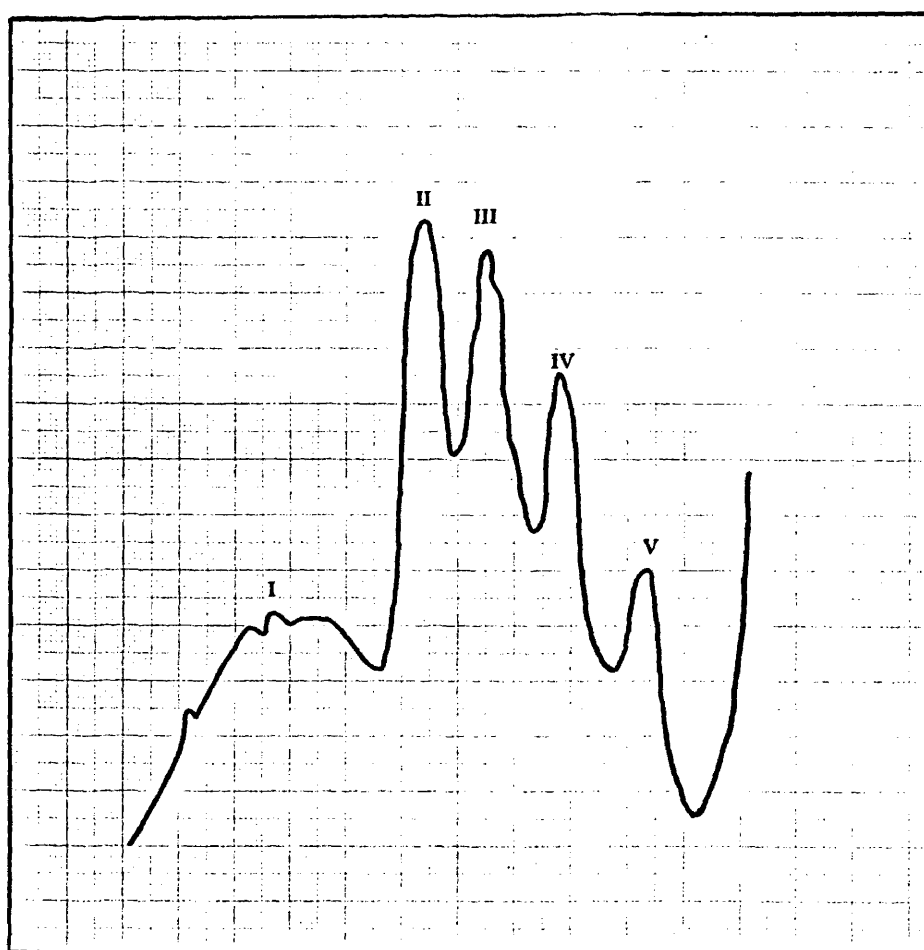
EFFECTO DEL TRITON X-100 SOBRE LA SOLUBILIZACION DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA DE  
MITOCONDRIAS CRUDAS DE CEREBRO DE RATA

Fracción	Actividad total (nmoles / m.)		Actividad específica (nmoles/ m./ mg.)		Relación
	G → αKG	αKG → G	G → αKG	αKG → G	
0,1% T. X-100	469	1.097	45	104	2,3
0,3% T. X-100	1.035	2.025	65	127	2,0
0,5% T. X-100	1.088	2.566	65	153	2,3
0,7% T. X-100	1.054	1.099	62	64	1,0
1 % T. X-100	676	1.563	55	128	2,3

**TABLA VI**  
**EFFECTO DEL ADP SOBRE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA DE MITOCONDRIAS CRUDAS DE CEREBRO DE**  
**RATA EN FUNCION DEL MEDIO DE EXTRACCION**

Fracción	G → α KG			α KG → G		
	Sin ADP	Con ADP	% de activ.	Sin ADP	Con ADP	% de activ.
0,1% Tritón X-100	5,9	45	763	0,0	104	∞
0,3% Tritón X-100	9,3	65	699	40,8	127	311
0,5% Tritón X-100	6,0	65	1.083	29,0	153	528
0,7% Tritón X-100	9,8	62	634	31,0	64	206
1 % Tritón X-100	7,8	55	705	0,0	128	∞

Las actividades se expresan en n moles/ m. / mg. de proteína.



<u>Banda</u>	<u>%</u>
I	15,5
II	28,5
III	20,2
IV	20,2
V	15,6

Figura 4. 1.- 1

**CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LA TABLA II**

- I Extracción con tampón tris-ClH (0,02 M) pH 7,4.
- II Extracción con tampón fosfato potásico (0,005 M) pH 7,4.
- III Extracción con tampón fosfato potásico (0,02 M) pH 7,4.
- IV Extracción con tampón fosfato potásico (0,2 M) pH 7,4.
- V Extracción con tampón fosfato potásico (0,02 M) pH 7,4, que contiene tritón X-100 al 1%.

Las actividades se midieron en presencia de ADP (1,3 mM)

G  $\longrightarrow$   $\alpha$ KG      Actividad medida en el sentido de degradación del glutamato.

$\alpha$ KG  $\longrightarrow$  G      Actividad medida en el sentido de la biosíntesis del glutamato.

(Los signos I, II, III, IV y V, tienen el mismo significado en la Tabla III).

**CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LA TABLA V**

El tritón X-100 estaba disuelto en tampón fosfato potásico (0,02 M) pH 7,4.

Las actividades se midieron en presencia de ADP (1,3 mM).

## BIBLIOGRAFIA

- 1.— Mc. DONNELL, P.C. y GREENGARD (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 644.
- 2.— REIJNIERSE, L.A.; VELDSTRA, H. y VAN DEN BERG, C.J. (1975) *Biochem. J.* **152**, 469 — 475.
- 3.— SALGANICOFF, L. y DE ROBERTIS, E. (1965) *J. Neurochem.* **12**, 287 — 309.
- 4.— VOGEL, W.H.; HEGINBOTHOM, S.D. y BOEHME, D.H. (1975) *Brain Res.* **88**, 131 — 135.
- 5.— GONZALEZ, M.P.; VENTURA, M.E. y CALDES, T. (1976) in "Urea Cicle" (Grisolía, S.; Mayor, F. y Báuena, R. eds.) J. Willey and Sons. pp. 73 — 81. New York, London, Sydney, Toronto.
- 6.— DE DUVE, C.; WATTIAUX, R. y BAUDHUIN, P. (1962) *Advan. Enzymol.* **24**, 291.
- 7.— GONZALEZ, M.P.; VENTURA, M.E.; CALDES, T. y ALONSO, C. (1979) *Ann. Real Acad. Far.* **45** (3), 337 — 346.

**4.2.- COMPORTAMIENTO DE LA GDH PROCEDENTE DE DISTINTAS  
FRACCIONES MITOCONDRIALES**

Esta parte del trabajo ha sido enviada al 12th FEBS Meeting, celebrado en Dresde del 2 al 8 de julio del año 1978.

## INTRODUCCION

No hace mucho que ha sido puesta de manifiesto la evidencia sobre la heterogeneidad mitocondrial en el tejido nervioso y algunos autores como Papay y sus colaboradores (1) han demostrado que en el pericarion neural, en las células gliales, en las dendritas y en las terminaciones nerviosas, existen mitocondrias de distinta forma y tamaño. Esta heterogeneidad morfológica ha sido confirmada mediante observaciones, al microscopio electrónico, de fracciones mitocondriales aisladas del cerebro (2,3). Por medio de centrifugaciones diferenciales de homogenados de cerebro en gradiente de sacarosa y/o Ficoll-sacarosa, se han identificado poblaciones de mitocondrias caracterizadas por la distribución de enzimas marcadoras a lo largo del gradiente, considerándose como mitocondrias libres (M.L.) aquellas que proceden de pericarion neural y de células gliales, y como sinápticas (M.S.) las procedentes de terminaciones nerviosas (4-10). Blaschko (11) ha sugerido que las mitocondrias del cerebro, en los diferentes estados de su vida, tienen que realizar diferentes funciones.

El glutamato es un aminoácido sujeto, en el cerebro, a un metabolismo grande y rápido (12) estando presente en dicho órgano a concentraciones muy altas (13). Se han realizado numerosas investigaciones sobre la síntesis y el metabolismo en general del glutamato en cerebro, con el fin de tratar de esclarecer su función como neurotransmisor putativo (14, 15); su aportación regulando la eliminación del amonio cerebral (16, 17) así como la bien establecida compartimentación del metabolismo del glutamato y sus derivados (18). La propuesta existencia de, al menos, dos ciclos tricarboxílicos separados en el cerebro (18, 19) y su asociación con un compartimento "grande" y otro "pequeño" para el glutamato, se ha explicado en parte por las observaciones a la heterogeneidad mitocondrial y recientemente se ha avanzado un poco más en estos conocimientos, con la puesta a punto de técnicas que permiten separar mitocondrias libres y sinaptosomales. Los trabajos más completos en este sentido son los abordados por Dennis y sus colaboradores (20-22) los cuales observaron que la síntesis de glutamato se realiza tanto en un tipo como en el otro de mitocondrias (M.L. y M.S.) (20), y apoyan la tesis de que la glutamato deshidrogenasa en cerebro está relativamente limitada y que la principal ruta del metabolismo del glutamato es la transaminación (21). En estos trabajos Dennis y sus colaboradores han estudiado el comportamiento de la GDH de ambos tipos de mitocondrias, fundamentalmente en el sentido biosintético y siempre en presencia de ADP que, como es sabido, es un potente regulador de la enzima hepática (23). El estudio del comportamiento de la GDH en las diferentes poblaciones mitocondriales del cerebro, ofrece un especial interés ya que al encontrarse esta enzima fuertemente implicada, no sólo en el metabolismo del

glutamato, sino que podría estar además involucrada en la regulación de los niveles de amonio en cerebro, su estudio podría dar alguna luz sobre el esclarecimiento de la compartimentación del glutamato en cerebro y sobre la regulación del ión amonio en el mismo.

En el presente trabajo hemos abordado el problema desde dos vertientes. En primer lugar hemos puesto a punto técnicas de separación, no sólo de mitocondrias libres y sinaptosomales sino que además hemos separado distintas subpoblaciones de mitocondrias sinaptosomales. Seguidamente hemos estudiado el comportamiento de la GDH en todos los tipos de mitocondrias, analizando dicho comportamiento en uno y otro sentido de la reacción y, en ambos casos, en ausencia y en presencia de ADP, asimismo damos datos sobre la hipótesis de la posible presencia de isoenzimas de la GDH, lo cual podría explicar de alguna manera el extraño comportamiento del glutamato en el cerebro.

## **MATERIAL Y METODOS**

Expuestos en la parte general de esta tesis.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

Los estudios realizados que hemos expuesto en la parte anterior (4.1) de nuestra tesis, se llevaron a cabo con la enzima procedente de mitocondrias crudas, pero nos interesaba conocer si las diferencias de comportamiento frente al ADP podrían deberse al diferente origen de las mitocondrias: sinaptosomales (como prototipo de mitocondrias procedentes de terminaciones nerviosas) y mitocondrias libres (aquellas que proceden de pericarion neural y de células gliales). En primer lugar nos interesaba conocer la separación idónea de ambos tipos de mitocondrias y para ello estudiamos enzimas marcadoras de fracciones mitocondriales y citosólicas.

De los resultados de la Tabla VI podemos deducir que la concentración de lactato deshidrogenasa (enzima marcadora de la fracción citosólica) en mitocondrias libres (M.L.) es mucho menor que en sinaptosomales, lo cual es un dato a favor de la pureza de dichas fracciones. La menor actividad de acetil-colinesterasa (enzima marcadora de membranas celulares y por tanto de sinaptosomas) así

como el que la relación acetil-colinesterasa/lactato deshidrogenasa sea pequeña en M.L. con respecto a M.S., son otros datos que apoyan la no contaminación de las M.L. con sinaptosomas. De los resultados de esta tabla podemos también deducir que la citocromo-oxidasa es más activa en mitocondrias libres que en las sinaptosomales, lo cual está de acuerdo con los trabajos de Gayet y sus colaboradores (24). Si observamos los resultados obtenidos para estas enzimas en mitocondrias sinápticas, podemos observar que tanto la actividad de LDH como de la ACH-asa y las relaciones ACH-asa/LDH son muy superiores que las halladas en M.L., lo cual podría indicar que ésta sea una fracción de sinaptosomas. Podemos observar también que esta fracción es más activa en fumarasa que la correspondiente a M.L. lo que está en desacuerdo con los trabajos de Lai y sus colaboradores (9) que encuentran lo contrario.

Respecto a la glutamato deshidrogenasa, encontramos mayor actividad enzimática específica en las mitocondrias libres que en las sinaptosomales, cuando ésta se mide en el sentido degradativo, es decir, en el de la desaminación oxidativa, tanto si la actividad enzimática se mide en presencia de ADP como si se hace en su ausencia, si bien el grado de actividad en el primer caso es superior cuando se trata de mitocondrias sinaptosomales lo que podría indicar un distinto comportamiento de la enzima de ambas procedencias (Tabla VIII). Estos resultados están de acuerdo con los estudios de Dennis y sus colaboradores (21) que encuentran distinto tipo de comportamiento cinético respecto a diferentes concentraciones de ADP en mitocondrias libres y sinaptosomales, aunque dichos autores no han realizado ningún estudio comparativo entre los dos sentidos de reacción de la enzima. Cuando la actividad enzimática se mide en el sentido biosintético (aminación reductora) encontramos que la actividad enzimática específica es mayor en M.S. que en M.L. cuando el coenzima era el NADH, ocurriendo lo contrario si se trataba de NADPH, lo cual podría indicar la fuerte regulación por parte del coenzima (Tabla VIII). La regulación del sentido de la reacción por el ADP está también apoyada por los resultados encontrados en esta misma tabla, donde podemos observar que, en presencia de ADP, la enzima procedente de los sinaptosomas desplaza la reacción hacia la síntesis de glutamato (relación  $\alpha$ -KG/G = 3,2). Igualmente ocurre en M.L. en presencia de ADP, donde se encuentra la misma relación pero con la diferencia de que en éstas, no se encuentra actividad en ausencia de ADP para la enzima medida en el sentido biosintético de glutamato. Por otra parte puede observarse que en ausencia de ADP la GDH de M.L. está fuertemente inclinada hacia la degradación del glutamato, mientras que en las M.S. esta relación ligeramente favorecida hacia dicha degradación (relación sentido biosintético/degradativo = 0,9).

En las mitocondrias cerebrales existe una gran heterogeneidad (10) tanto de las M.L. como de las M.S. En nuestro trabajo hemos intentado separar subpoblaciones de mitocondrias procedentes de distintas fracciones subsinaptosomales (ver material y métodos) identificándolas con enzimas marcadoras de mitocondrias: fumarasa, malato deshidrogenasa y citocromo-oxidasa. Asimismo hemos estudiado su posible contaminación por fracciones citosólicas (lactato deshidrogenasa) así como su contaminación por membranas (acetil-colinesterasa). Los resultados se expresan en la Tabla IX. Obtuvimos cuatro fracciones, probablemente de sinaptosomas a juzgar por sus altos contenidos de LDH y ACH-asa respecto a los encontrados por M.L. (Tabla VIII). Observamos que la mayor actividad total para todas las enzimas marcadoras se encuentra en la fracción MS<sub>4</sub>, es decir, en aquella de mayor densidad. Esta fracción posee una relación alta de fumarasa/acetil-colinesterasa y de fumarasa/LDH, lo que podría indicar que no está muy contaminada por membranas plasmáticas ni por citosol (Tabla XI). De forma similar ocurre en el caso de la fracción MS<sub>3</sub>, mientras que la contaminación por membranas plasmáticas es mucho mayor en las fracciones MS<sub>1</sub> y MS<sub>2</sub> en las que la relación fumarasa/acetil-colinesterasa es menor (Tabla IX) al igual que respecto a la relación fumarasa/LDH. En las fracciones MS<sub>1</sub> y MS<sub>4</sub> la relación fumarasa/citocromo-oxidasa es muy similar y varía en las MS<sub>2</sub> y MS<sub>3</sub> lo que sugiere un comportamiento análogo de las mitocondrias de las fracciones MS<sub>1</sub> y MS<sub>4</sub> respecto a estas dos enzimas, mientras que en las de la MS<sub>2</sub> podría estar aumentada la actividad respiratoria (mayor actividad de citocromo-oxidasa) y en las de la MS<sub>3</sub> disminuida.

En lo que respecta al comportamiento de la GDH en estas subpoblaciones, nos encontramos que la fracción MS<sub>2</sub> no presenta actividad en ninguno de los dos sentidos, en ausencia de ADP (Tabla X) y en su presencia la relación de actividad entre el sentido biosintético y degradativo es menor que la del resto de las fracciones, lo que parece indicar que en esta fracción la degradación del glutamato, en presencia de ADP, está más favorecida que en las demás. En ausencia de ADP, parece ser que la reacción de la GDH está notablemente favorecida hacia la degradación del glutamato en la fracción MS<sub>1</sub>, mientras que en la MS<sub>3</sub> el sentido de la reacción se inclina ligeramente hacia la síntesis del glutamato y por último, en el caso de la fracción MS<sub>4</sub> se encuentra más o menos en equilibrio (Tabla X). En los resultados expuestos en esta tabla podemos observar de nuevo la fuerte regulación que ejerce el ADP en el sentido biosintético. Asimismo, en los resultados de la tabla XI observamos que el tanto por ciento de activación por el ADP es diferente en las distintas subpoblaciones sinaptosomales así como que el grado de activación es mayor para la enzima en el sentido de biosíntesis que en el de degradación del glutamato. Los datos que hemos encontrado podrían

aportar una pequeña luz al entendimiento de los problemas de la compartimentación del glutamato en el cerebro (25) ya que según los datos expuestos, en ausencia de ADP solamente el compartimento  $MS_1$  sería capaz de degradar dicho glutamato: Tablas X y XI), mientras que en el  $MS_3$  y  $MS_4$  el metabolismo del glutamato está inclinado ligeramente en favor de su síntesis. Esto puede interpretarse como que, cualquier molécula de glutamato que entre en estos compartimentos no se metaboliza por la vía de la GDH, lo cual estaría de acuerdo con los trabajos de Lajtha y sus colaboradores (26, 27) los cuales encontraron que el glutamato que entra en el cerebro, se convierte rápidamente en glutamina, y postulan que el GABA puede derivar de un pool muy pequeño de glutamato que, en nuestro caso podría identificarse con las fracciones  $MS_3$  y  $MS_4$ , donde se sintetizaría glutamato en ausencia de ADP o bien, con el compartimento  $MS_1$  fundamentalmente y con el  $MS_3$  y  $MS_4$  en presencia de ADP. De cualquier forma pensamos que sería interesante estudiar más a fondo la regulación de la GDH por el ADP en estas subfracciones y creemos que debería abordarse, en ellas, el estudio del comportamiento de las otras enzimas relacionadas con el metabolismo del glutamato (GAD, glutamina sintetasa y transaminasas — GOT y GPT). También pensamos que esta diferencia de comportamiento podría deberse a que la concentración de proteína enzimática (GDH) en estas fracciones sea distinta ya que, desde nuestro punto de vista, este podría ser un importante factor en la regulación de la enzima. Todo ello supone que, para confirmar nuestras hipótesis sobre esta compartimentación del glutamato, serían necesarios mayores controles, que constituyen para nosotros, el proyecto de un nuevo trabajo.

Según los resultados indicados en la tabla VIII, se deduce claramente el efecto regulador del ADP sobre el equilibrio de la reacción de la GDH en mitocondrias libres; siendo éste un efecto totalmente dependiente de la concentración del efector. Podemos observar que, a concentraciones de ADP que dan lugar a la velocidad máxima para la enzima, el equilibrio está mayoritariamente desplazado en el sentido de la biosíntesis, y al ser el ADP más activador de la velocidad en este sentido, éste favorece la síntesis de glutamato.

## CONCLUSIONES

1.— Se han separado M.L. y M.S. y a partir de estas últimas hemos obtenido cuatro subpoblaciones que hemos identificado mediante enzimas marcadoras.

2.— Tanto en ausencia como en presencia de ADP, la GDH (cuando se mide su actividad en el

sentido de la degradación del glutamato) posee mayor actividad en las M.L. que en las M.S.

3.— En ausencia de ADP no encontramos actividad en las M.L. y sí en las M.S.

4.— En presencia de ADP y con NADH como coenzima (midiendo la reacción en el sentido biosintético) las M.S. presentan una actividad ligeramente superior a las M.L. ocurriendo lo contrario cuando el coenzima es el NADPH.

5.— En ausencia de ADP, la actividad de GDH en la fracción  $MS_1$  está inclinada hacia la degradación del glutamato, mientras que en las fracciones  $MS_3$  y  $MS_4$  ocurre lo contrario.

6.— En presencia de ADP se favorece el sentido de la biosíntesis del glutamato en las subpoblaciones  $MS_1$ ,  $MS_3$  y  $MS_4$  pero no en las  $MS_2$ .

7.— El ADP parece regular el sentido de la actividad de GDH hacia la dirección de la síntesis de glutamato.

8.— El tanto por ciento de activación del ADP es diferente en las distintas fracciones; además el grado de activación es mayor en el sentido de la biosíntesis del glutamato.

9.— Sugerimos que hay que tener en cuenta la concentración proteica, a la hora de dar unos datos más precisos sobre el efecto activador del ADP.

**TABLAS VII, VIII, IX, X y XI**

TABLA VII

## DISTRIBUCION DE VARIAS ENZIMAS MARCADORAS EN MITOCONDRIAS LIBRES Y SINAPTOSOMALES

Enzima	Mitocondrias libres	Mitocondrias sinaptosomales
ACH-asa	0,024	4,90
MDH	3,50	59,70
Fumarasa	1,03	12,33
LDH	0,81	9,00
Citocromo-oxidasa	7,20	2,10
ACH-asa / LDH	0,03	0,55
LDH / Fumarasa	0,79	0,73

Las actividades están expresadas en  $\mu$ moles / m. / ml. excepto la citocromo-oxidasa que se expresa en  $\Delta$ OD / m. / ml.

TABLA VIII

ACTIVIDAD DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN MITOCONDRIAS LIBRES Y SINAPTOSOMALES

A. E. E. (n moles/mg.)

Fracción	G → α KG		α KG → G		Relación: KG / G	
	Sin ADP	Con ADP	Sin ADP	Con ADP	Sin ADP	Con ADP
M.L.	28,3 (100)	133,3 (471)	---	411,7	110,0	3,1
M.S.	22,7 (100)	129,2 (569)	---	418,0	88,8	0,9

En ausencia de ADP, las actividades se midieron con NAD y con NADH como coenzima; en presencia de ADP las medidas se realizaron NAD ó NADP y con NADH ó NADPH como coenzima.

TABLA IX

DISTRIBUCION DE VARIAS ENZIMAS MARCADORAS EN DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE SINAPTOSOMAS

Enzima	MS <sub>1</sub>		MS <sub>2</sub>		MS <sub>3</sub>		MS <sub>4</sub>	
	Total	A.E.E.	Total	A.E.E.	Total	A.E.E.	Total	A.E.E.
ACH-asa	1,80	0,39	2,80	0,47	2,40	0,28	19,80	0,49
MDH	7,80	1,60	9,10	4,80	25,20	2,90	252,00	6,20
Fumarasa	1,80	0,38	1,40	0,72	7,40	0,80	54,80	1,30
LDH	10,50	2,20	2,70	1,50	8,90	1,00	55,70	1,40
Citocromo-oxidasa	0,36	0,076	0,63	0,33	1,23	0,14	9,70	0,24
Fumarasa/ACH-asa	1,00		0,97		3,10		2,80	
ACH-asa/LDH	0,17		1,00		0,27		0,36	
Fumarasa/LDH	0,17		0,52		0,83		0,98	
Fumarasa/Citoc. Oxi.	5,00		2,20		22,40		5,60	

Todas las actividades están expresadas en  $\mu\text{moles/m.}$ , a excepción de la citocromo-oxidasa que lo está en  $\Delta\text{OD}$

TABLA X

DISTRIBUCION DE LA GDH EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE SINAPTOSOMAS

Condiciones	MS <sub>1</sub>		MS <sub>2</sub>		MS <sub>3</sub>		MS <sub>4</sub>	
	Total	A.E.E. Total	Total	A.E.E. Total	Total	A.E.E. Total	Total	A.E.E. Total
G $\longrightarrow$ $\alpha$ KG (-ADP)	22,4	4,7	-	-	75,0	8,6	757,5	18,6
$\alpha$ KG $\longrightarrow$ G (-ADP)	-	-	-	-	153,0	17,6	825,0	20,2
Relación: $\alpha$ KG/G	-	-	-	-	2,0	-	1,1	-
C $\longrightarrow$ $\alpha$ KG (+ADP)	50,4	10,6	227,5	120,4	717,0	82,4	6.900,0	69,0
$\alpha$ KG $\longrightarrow$ G (+ADP)	207,2	43,5	318,5	168,5	2.298,0	264,0	17.750,0	435,0
Relación: $\alpha$ KG/G	4,1	-	1,4	-	3,2	-	2,6	-
Proteínas (mg. / ml.)	1,70	-	0,54	-	2,90	-	5,4	-

Las actividades están expresadas en nmoles/m. en el volumen total o bien por mg. de proteína (A.E.E.)

Proteínas en la reacción: las equivalentes a 50  $\mu$ l. de extracto enzimático.

TABLA XI

EFFECTO DEL ADP SOBRE LAS ACTIVIDADES DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA PROCEDENTE  
DE LAS DISTINTAS FRACCIONES SINAPTOSOMALES

Fracción	G → α KG			α KG → G		
	Sin ADP	Con ADP	% Activación	Sin ADP	Con ADP	% Activación
MS <sub>1</sub>	4,7	10,6	226	—	43,5	—
MS <sub>2</sub>	—	120,4	—	—	168,5	—
MS <sub>3</sub>	8,6	82,4	958	17,6	264,0	1.500
MS <sub>4</sub>	18,6	69,0	371	20,2	435,0	2.153

## BIBLIOGRAFIA

1. PALAY, S.L. y CHAN-PALAY, V. (1974) "Cerebellar cortex Cytology and Organization". Springer Verlag. Berlín.
2. D'MONTE B.; MARKS, N.; DATTA, R.K. y LAJTHA, A. (1970) in "Protein Metabolism of the nervous system" (Lajtha, A., ed.) pp. 185-217. Plenum Press. New York.
3. MINN, A.; CAYET, J. y DELORME, P. (1975) *J. Neurochem.* **24**, 149-156.
4. BRETZ, U. BAGGLIOLINI, M.; HAUSER, R. y HODEL, C. (1974) *J. Cell. Biol.* **61**, 466-480.
5. VAN DEN BERG, C.J.; MATHESON, D.F.; RONDA, G.; REIJNIERSE, G.L.A.; BLOKHUIS, G.G.D.; KROON, M.C.; CLARKE, D.D. y GARFINKEL, D. (1975) in "Metabolic Compartmentation and Neurotransmission" (Berg, S., Clarke, D.D. y Schneider, D. eds.) pp. 515-543. Plenum Press. New York.
6. BARBERIS, C.; DURAND, M.; DELORME, P. y GAYET, J. (1977) *Brain Res.* **122**, 485-501.
7. DENNIS, S.C. y CLARKE, J.B. (1978) *Biochem J.* **172**, 155-162.
8. BOOTH, R.F.G. y CLARKE, J.B. (1978) *Biochem. J.* **176**, 365-370.
9. LAI, J.C.K.; WALSH, J.M.; DENNIS, S.C. y CLARKE, J.B. (1977) *J. Neurochem.* **28**, 625-631.
10. BLOKHUIS, C.C.D. y VELDSTRA, H. (1970). *FEBS Letters* **11** (3) 197-199.
11. BLASCHKO, H. (1975) *Biochem. Soc. Trans.* **3**, 27-37.
12. GUROFF, G. (1972) "Transport and Metabolism of Amino Acids" (Albers, R.W.; Siegel, G.J.; Katzhn, R. y Agranoff, B.W., eds.) pp. 191-206 Churchill Livingstone.
13. BENJAMIN, A.M. y QUASTEL, J.H. (1975) *J. Neurochem.* **25**, 197-206.

14. CURTIS, D.R. (1975) *Metabolic Compartmentation and Neurotransmission* (Berl, S.; Clarke, D.D. y Schneider, D., eds.) pp. 11-36, Plenum Press. New York.
15. WALSH, J.M. y CLARKE, J.B. (1976) *Biochem. J.* **160**, 147-157.
16. BERL, S.; TAKAGAKI, G.; CLARKE, D.D. y WAELSH, H. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 2562-2569.
17. BENJAMIN, A.M. y QUASTEL, J.H. (1972) *Biochem. J.* **128**, 631-646.
18. BERL, S.; CLARKE, D.D. y SCHNEIDER, D. (1975) eds. *Metabolic Compartmentation and Neurotransmission*. Plenum Press. New York.
19. BALAZS, R. y CREMER, J.E. (1973) ed. *Metabolic Compartmentation in the Brain*. Macmillan. London.
20. DENNIS, S.G.C. y CLARKE, J.B. (1978) *J. Neurochem.* **31**, 673-680.
21. DENNIS, S.G.C.; LAI, J.C.K. y CLARKE, J.B. (1977) *Biochem. J.* **164**, 727-736.
22. DENNIS, S.C. y CLARKE, J.B. (1978) *Biochem J.* **172**, 155-162.
23. GODINOT, C. y GAUTHERON, D. (1971) *FEBS Letters*, **13** (4) 235-240.
24. GAYET, J. y DURAND, M. (1977) *Metabolism Regulation and Special Function of Protein in the Brain* (Roberts, E. et al. eds.) Elsevier North Holand. Biomedical Press.
25. BERL, S. (1973) en "Compartmentation in the Brain (Balazs, R. y Cremer, J.E. eds.) Willian Claves and Sons. London Becches. Cap. 1.
26. LAJTHA, A.; BERLS, S. y WAELSCH, H. (1959) *J. Neurochem.* **3**, 322-382.
27. LAJTHA, A.; BERLS, S. y WAELSCH, H. (1960) en "Inhibition of the Nervous System and GABA (Roberts, E. ed.) Pergamon Press. New York pp. 460.

**4.3.— EFECTO DE NUCLEOTIDOS SOBRE LA GDH DE CEREBRO DE RATA Y MECANISMO DE ACCION DEL ADP SOBRE LAS MITOCONDRIAS LIBRES.**

Trabajo presentado en el I Congreso Hispano-Portugués de Bioquímica, celebrado en Coimbra del 23 al 26 de Septiembre del año 1980.

## INTRODUCCION

Olson y Anfinsen (1) han observado la degradación de la glutamato deshidrogenasa en soluciones salinas y estudios de dispersión de luz han demostrado que la GDH se polimeriza a concentraciones de proteína alrededor de 0,1 mg./ml. (2). La actividad enzimática de la GDH parece estar relacionada estrechamente con el estado de agregación que presenten las subunidades (3) según el esquema:



Las tres formas indicadas en el esquema son enzimáticamente activas si bien difieren en su especificidad por el sustrato, así el monómero X puede polimerizarse y es específico del glutamato, en cambio el monómero Y no se polimeriza y presenta mayor actividad cuando actúan como sustrato determinados aminoácidos monocarboxílicos como la alanina. Las tres formas se encuentran en equilibrio y varias sustancias afectan a la enzima, desplazando dicho equilibrio en un sentido o en otro. Por ejemplo, la concentración enzimática (concentración protéica) elevada favorece la polimerización y cuando esta concentración es baja, se favorece la formación del monómero X. Efectores como el NADP y el GTP favorecen la formación del monómero Y, mientras que el ADP y la leucina desplazan el equilibrio hacia la del monómero X. Agentes como el GTP (4), la tiroxina (5) y el dietil-estilbestrol (6), inhibidores de la GDH hepática, favorecen además la degradación de la enzima, en presencia del coenzima reducido, mientras que el ADP, que es activador de la GDH, favorece la agregación en presencia de NADH (7) así como la formación del monómero X.

En muchos órganos la concentración de GDH está a niveles en los que pueden darse formas polimerizadas, por ello se sugirió que los efectos de modificadores sobre la polimerización podrían tener significado biológico. Sin embargo, se sabe que la GDH de distintas procedencias varía notablemente su capacidad polimérica; por ejemplo, la procedente de hígado de cerdo (8) y de hombre (2) se polimeriza en soluciones concentradas al igual que la enzima bovina, en tanto que la de pollo (9) y sapo (10) se agregan en menor proporción y la obtenida de hígado y riñón de rata (11, 12), hígado de pez perro (13) y de atún, no se polimerizan, lo mismo que ocurre con las enzimas de procedencia no animal. No existe pues certeza de que el fenómeno de polimerización-despolimerización juegue un papel fisiológico destacado ya que la GDH procedente de hígado de rata y bovino que son cinéticamente y hasta estructuralmente similares, presentan distinto comportamiento frente

a la polimerización.

En los apartados 4.1 y 4.2 de esta tesis, hemos apuntado la posibilidad del efecto regulador del ADP sobre la GDH de cerebro de rata así como la posible presencia de isoenzimas. En el presente apartado hemos creído interesante estudiar con mayor detenimiento, el efecto del ADP sobre la GDH procedente de los dos tipos de mitocondrias cerebrales: sinaptosomales y libres. Hemos llevado a cabo el trabajo, estudiando el efecto que ejerce este metabolito sobre la actividad enzimática, medida en los dos sentidos de la reacción con el propósito de esclarecer nuestra hipótesis anterior de que el ADP regulaba el sentido de actuación de la enzima. Asimismo hemos tratado de estudiar cuál sería el mecanismo por el que el ADP ejerce su acción reguladora sobre las mitocondrias libres.

## MATERIAL Y METODOS

Expuestos en la parte general de esta tesis.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Según los resultados de la Tabla XII el ATP, el ADP y el AMP son activadores de la glutamato deshidrogenasa de cerebro de rata, tanto de las mitocondrias libres como de las sinaptosomales, si bien el grado de activación de estos nucleótidos es mayor en las primeras. Podemos observar que ninguno de los nucleótidos mencionados, afectan al sentido de la reacción ya que las relaciones entre las actividades, en el sentido biosintético y degradativo, no son afectadas por ellos, hecho que atribuimos a la concentración de proteínas utilizada: 0,39 mg./ml. y 0,61 mg./ml. para mitocondrias libres y sinaptosomales respectivamente. Dicha relación de actividades es mayor en M.L. que en M.S. lo que podría indicar que el comportamiento de la GDH en ambas poblaciones, es diferente respecto al sentido de la reacción aunque bien podría pensarse que la concentración de enzima juega un importante papel en la orientación de dicho sentido. El GTP, a las concentraciones utilizadas (0,16 mM), inhibe totalmente a la enzima de ambos tipos de mitocondrias. Por su parte el ADP y el ATP protegen ligeramente a la GDH frente al efecto inhibitor del GTP si bien, el ATP presenta mayor efecto protector para la enzima procedente de M.S. que para la obtenida de M.L. siendo ello debido tal vez, a que dicho efecto protector no sea específico del ATP, sino que se deba al ADP procedente

del mismo por acción de la ATP-asa del medio, o bien a que el comportamiento de la enzima de ambas procedencias sea distinto.

A la vista de estos resultados y centrando el tema en el efecto del ADP, pensamos que el mecanismo de activación de este nucleótido podría ser el siguiente:

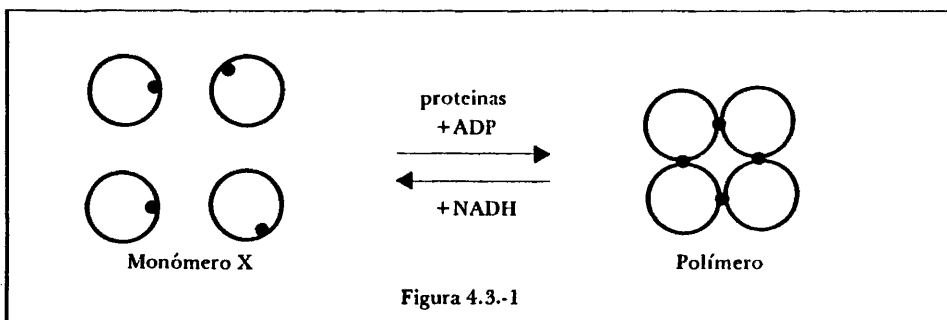
Consideremos que la GDH procedente del cerebro fuese una enzima semejante en su regulación a la hepática, ya que los resultados que hemos encontrado apuntan esta posibilidad por un gran número de evidencias. Si esto es así, el ADP podría actuar a dos niveles:

- a) ejerciendo un efecto alostérico sobre la actividad enzimática.
- b) favoreciendo la formación del oligómero, es decir, favoreciendo la polimerización de la enzima.

Para dilucidar estas posibilidades hemos realizado una serie de experimentos. En primer lugar hemos estudiado el efecto de la concentración de ADP sobre la actividad de la GDH en ambos sentidos de la reacción que nos han conducido a las observaciones siguientes (Tabla XIII): se puede apreciar en esta tabla que, la concentración de ADP activa a la enzima procedente de M.L. en ambos sentidos pero que esta activación es mucho menor cuando la medida se realiza en el sentido degradativo, hasta el punto que dicha actividad no varía en concentraciones de ADP que oscilan entre 0,16 mM y 0,32 mM (0,15 a 0,40  $\mu$ moles en los 1,2 ml.), en cambio cuando se mide en el sentido biosintético, la actividad se incrementa extraordinariamente a medida que aumenta la concentración de ADP. Este efecto parece ser alostérico en el sentido biosintético, a la vista de los resultados expresados en la gráfica de la figura 4.3-2, sin embargo, cuando la actividad se midió en el sentido de la degradación del glutamato, la forma de la curva es hiperbólica y no sigmoideal, lo que descarta en parte el efecto alostérico, al menos de un sistema K de la enzima, en este sentido de la reacción. Esto conduce a una variación en la relación de actividades entre el sentido biosintético y degradativo encontrándose dichas relaciones comprendidas entre 0,25 y 9,6, lo que podría significar un potente efecto regulador del ADP frente al sentido de la reacción puesto que, de estar marcadamente inclinada hacia la degradación del glutamato en ausencia de ADP, en su presencia la reacción se inclinaría muy acusadamente hacia la síntesis del mismo. Hemos visto que cuando la concentración de proteína es alta (0,4 a 0,7 mg./ml.) (forma polimerizada de la enzima), el ADP no ejerce efecto alguno sobre el sentido de la reacción (Tabla XII) aunque sí activa a la GDH, en cambio

cuando la concentración de proteínas disminuye (forma probablemente despolimerizada), el ADP influye en la actividad y en el sentido de la reacción (Tabla XIII). Con el propósito de comprobar todo esto, hemos estudiado cómo influye la concentración de la enzima sobre el efecto del ADP. En los resultados expuestos en la Tabla XIV, sobre la GDH procedente de mitocondrias libres, podemos observar que el ADP a concentraciones de 1,3 mM. ejerce un efecto activador más acusado cuanto menor es la concentración de proteínas, tanto si la actividad se mide en el sentido biosintético como si se realiza en el degradativo, aunque el efecto es mayor en el primer caso.

Se sabe que, en el caso de la GDH, la concentración proteica favorece la polimerización (7). Según nuestros resultados, en ausencia de ADP, a medida que aumenta la concentración proteica, lo hace también la actividad enzimática específica lo que indica que la forma polimérica favorece la reacción en el sentido biosintético (Tabla XIV). El ADP, según Frieden (7), se une a la enzima en el lugar del NADH, justamente en el sitio de unión reguladora. Cuando el NADH se encuentra unido a la enzima en ese sitio, está presente una forma enzimática menos activa por disgregación del oligómero y cuando dicho sitio es ocupado por el ADP, se favorece la formación de la estructura oligomérica (Figura 4.3.-1).



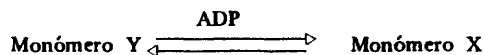
Cuando la reacción se mide en el sentido biosintético, existe gran cantidad de NADH en el medio y dicha cantidad, en relación a la concentración de enzima, resulta más elevada cuanto menor es ésta, por lo tanto, el efecto del ADP sobre la actividad enzimática, tendría que ser mayor a menor concentración proteica, lo que está de acuerdo con nuestros resultados (Tabla XIV).

Cuando la reacción se mide en sentido degradativo, la concentración proteica no afecta a la actividad de la enzima. Esto podría indicar que la forma más polimerizada (polímero) tiene la

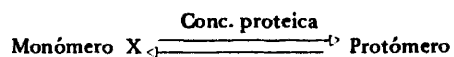
misma actividad que el monómero X para la degradación del glutamato. El hecho de que el ADP influya en la actividad en el sentido degradativo en función inversa a la concentración proteica, pudiera ser otro dato en favor de la posibilidad de que el ADP favorezca el paso del monómero Y a monómero X.

Todo lo anteriormente expuesto podría resumirse en los siguientes puntos;

a) El ADP podría favorecer el paso del monómero Y a monómero X, de acuerdo con el esquema indicado en la introducción y aumentar así la actividad enzimática, es decir;



y que la concentración proteica favorecería la polimerización, es decir:



y además: 1) el monómero X presenta mayor actividad que el Y en ambos sentidos de la reacción, si bien dicha actividad es mayor para el sentido biosintético.

2) El monómero Y es más activo que el X en el sentido degradativo que en el biosintético.

3) El protómero es la forma más activa de la enzima cuando la actividad de ésta se mide en el sentido biosintético.

Concretando, la forma monómero Y actuaría en el sentido de la degradación del glutamato, mientras que el monómero X y el polímero serían las formas más activas en los dos sentidos de la reacción aunque con predominio del sentido biosintético.

b) El ADP podría además ejercer un efecto alostérico sobre la actividad enzimática, cuando ésta se mide en presencia de NADH, es decir en el sentido de la biosíntesis del glutamato, hecho que estaría de acuerdo con las teorías de Frieden (7) y que sería la razón del desplazamiento de la actividad hacia el sentido de la biosíntesis.

Los resultados de la Tabla XV parecen indicar que, en ausencia de ADP, la concentración de proteínas y, por tanto, el mecanismo de polimerización-despolimerización, regulan el sentido de la

reacción de manera que el de la síntesis del glutamato se ve favorecido tanto más cuanto mayor es dicha concentración (forma más polimerizada). El ADP favorecería el mismo sentido de la reacción y en igual cuantía (nótese que los incrementos de actividad con y sin ADP son prácticamente del mismo orden). Esto podría indicar que realmente el efecto de activación del ADP se ejerce por un mecanismo alostérico. Esta última suposición parece estar apoyada por los resultados de la Tabla XVI y de la Fig. 4.3.-3 donde puede observarse que, a concentraciones de ADP que oscilan entre 0,08 mM y 0,32 mM, el efecto activador del ADP se incrementa en función de la concentración en ambos sentidos de la reacción y que el tanto por ciento de activación es mayor al aumentar dicha concentración lo cual no apoya la hipótesis del efecto sobre la polimerización-despolimerización y sí la del efecto alostérico. Cuando representamos los datos de la Tabla XVI (Fig. 4.3.-3), podemos observar que los perfiles gráficos nos ofrecen una curva sigmoideal (indicativa del efecto alostérico) cuando la actividad de la enzima se mide en el sentido de la síntesis del glutamato, mientras que la curva es hiperbólica cuando es medida en el sentido de la degradación (Fig. 4.3.-3). Esto podría indicar que el ADP no ejerce un efecto alostérico, al menos de tipo K, para la enzima, cuando se mide su actividad en este último sentido.

Siguiendo con los resultados de la Tabla XVI observamos que, a concentraciones de 0,38 mM y 0,64 mM la enzima presenta mayor actividad cuando la medida se realiza en el sentido biosintético y cuando la concentración proteica es menor, pero cuando se efectúa en el sentido degradativo no se encuentran variaciones respecto a los resultados anteriores. Este dato por ser único, aunque comprobado por triplicado, no le comentamos puesto que pensamos, debería estudiarse más detenidamente con el fin de comprobar si concentraciones elevadas de ADP pudieran, efectivamente, favorecer la polimerización.

Por otra parte, el ADP no afecta al pH óptimo de la enzima (Fig. 4.3.-4) de lo que se deduce que no actúa a nivel de la ionización de los aminoácidos del centro activo.

De todo lo expuesto en esta parte del trabajo, podemos extraer las siguientes conclusiones:

i 1.- Los nucleótidos ATP, ADP y AMP activan a la glutamato deshidrogenasa procedente de mitocondrias libres y sinaptosomales y el GTP la inhibe.

2.- Tanto el ADP como el ATP protegen ligeramente a la enzima, frente al efecto inhibitor

del GTP.

3.— El ADP parece regular el sentido de la reacción, siendo su mecanismo probablemente de tipo alostérico.

4.— La glutamato deshidrogenasa, procedente de mitocondrias libres, parece ser semejante a la de origen hepático, presentando un tipo de regulación basado en mecanismos de polimerización-despolimerización.

TABLA XII

EFFECTO DE DIFERENTES NUCLEOTIDOS SOBRE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA PROCEDENTES DE MITOCONDRIAS LIBRES Y SINAPTOSOMALES

Condiciones	Mitochondrias libres				Mitochondrias sinaptosomales				
	Activ.	% Activ.	Activ.	% Activ.	Relac.	G	αKG	αKG	Relac.
Control	9,2	100	1,9	100	0,21	25,2	100	3,5	100
ATP	19,3	210	4,1	216	0,21	37,2	147	5,1	148
ADP	18,3	199	3,9	205	0,21	43,8	174	6,0	174
AMP	16,3	177	3,4	179	0,21	31,9	126	4,4	126
GTP	0,0	-	0,0	-	-	0,0	-	0,0	-
GTP ADP	0,0	-	0,0	-	-	37,2	147	5,1	148
GTP ATP	5,1	55	1,1	57	0,21	17,3	68	2,4	69

Condiciones experimentales:

TABLA XIII

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ADP SOBRE LA ACTIVIDAD DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA  
 PROCEDENTES DE MITOCONDRIAS LIBRES

ADP moles	Actividad (nmoles / m. / mg. de proteína)		Relación $\alpha$ KG/G
	G $\rightarrow$ $\alpha$ KG	$\alpha$ KG $\rightarrow$ G	
0,0	77,2 (100)	19,2 (100)	0,25
0,05	115,8 (150)	96,4 (502)	0,83
0,10	135,0 (175)	173,6 (904)	1,29
0,15	135,0 (175)	366,6 (1.909)	2,72
0,20	114,6 (187)	463,0 (2.411)	3,20
0,30	114,6 (187)	983,8 (5.124)	6,80
0,40	114,6 (187)	1.389,0 (7.234)	9,60

Condiciones experimentales: Las indicadas en Material y métodos de la parte general, a excepción de que el volumen total fue de 1,2 ml. y la concentración de proteínas, de 0,05 mg. en la relación.

TABLA XIV

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA ACCION ACTIVADORA DEL ADP SOBRE LA GLUTAMATO  
DESHIDROGENASA DE MITOCONDRIAS LIBRES

Actividad (nmoles / m. / mg. proteína)

mg. de proteína	αKG → G		G → αKG		% Activación
	Sin ADP	Con ADP	Sin ADP	Con ADP	
0,29	55,5	271	15,3	26,9	176
0,22	62,3	311	18,5	33,9	183
0,15	22,0	346	20,8	41,3	198
0,07	16,6	434	19,4	46,5	239
0,03	27,3	480	16,6	61,8	372

Condiciones experimentales: La concentración de ADP utilizada fue 1,3 mM, en el medio de incubación.

TABLA XV

## RELACION DE ACTIVIDADES DE GDH EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA DE MITOCONDRIAS LIBRES

mg. de proteína	Relación KG/G		(Con ADP) - (Sin ADP)
	Sin ADP	Con ADP	
0,29	3,6	10,0	6,4
0,22	3,4	9,3	5,9
0,15	1,1	7,7	6,6
0,07	0,8	9,0	8,2
0,03	1,7	8,0	6,3

Condiciones experimentales: Las M.L. de las tablas XV y XVI se prepararon de la siguiente forma: Una vez obtenidas como se indica en material y métodos de la parte general, se extrajeron con tampón fosfato potásico (0,02 M.), pH 7,4 que contenía 0,7% de tritón X-100. Se centrifugó durante 20 minutos a 30.000 x G y al sobrenadante se le adicionaron 5 g. de sulfato sódico anhidro / 100 ml. de extracto y se calentaron a 45° C, 5 minutos. Se centrifugó como la vez anterior. Sobrenadante = extracto enzímico.

TABLA XVI

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA ACCION DEL ADP EN LA ACTIVIDAD DE LA GDH DE M.L.

ADP (mM)	% Activación					
	α KG	→ G	0,25 mg.	G	→ G	α KG
0,00	0,5 mg.	—	0,25 mg.	0,5 mg.	0,25 mg.	100
0,08	100	100	100	150	134	134
0,16	180	100	100	175	150	150
0,24	380	200	200	175	150	150
0,32	480	200	200	187	167	167
0,48	1.021	1.200	1.200	187	167	167
0,64	1.441	1.799	1.799	187	134	134

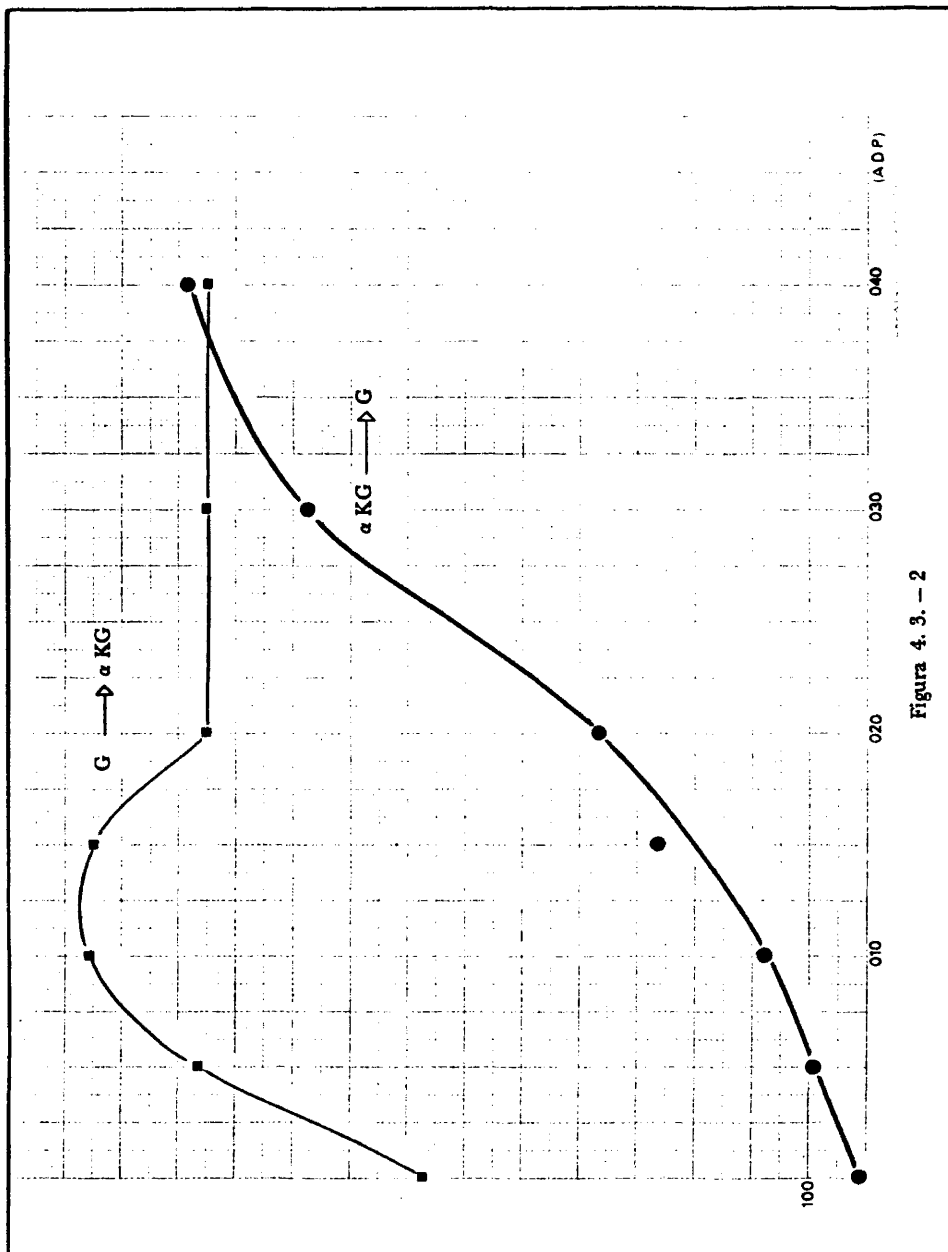
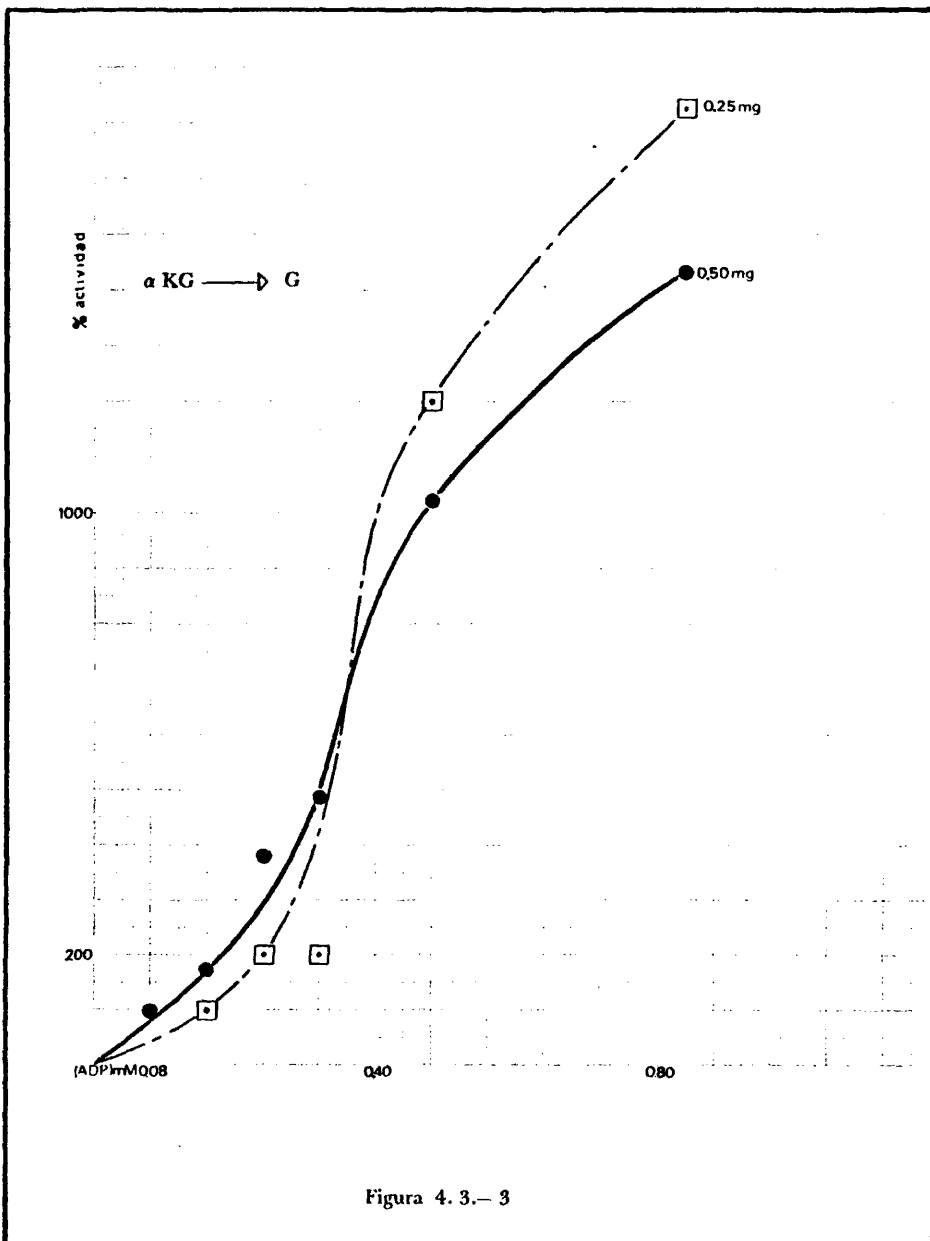
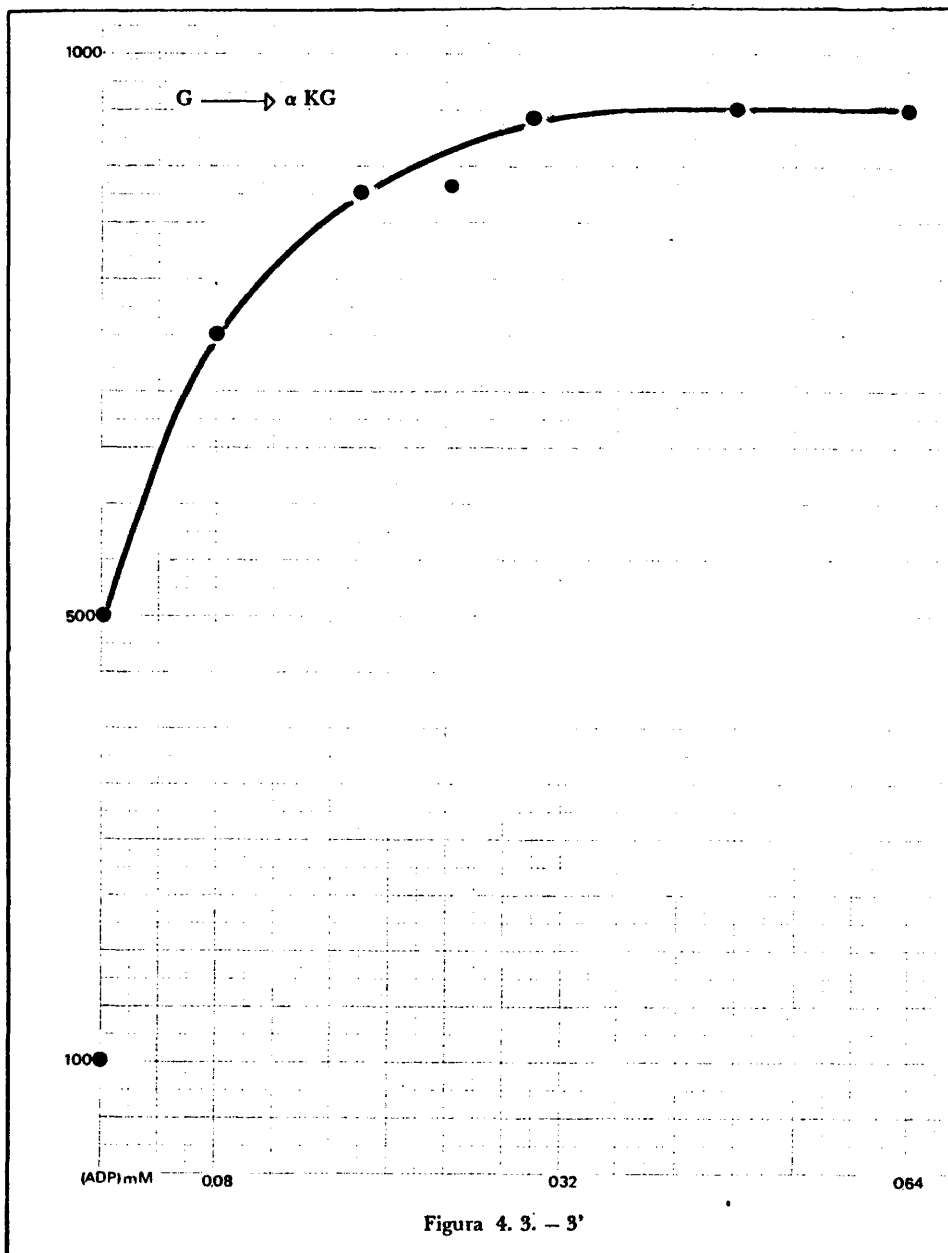
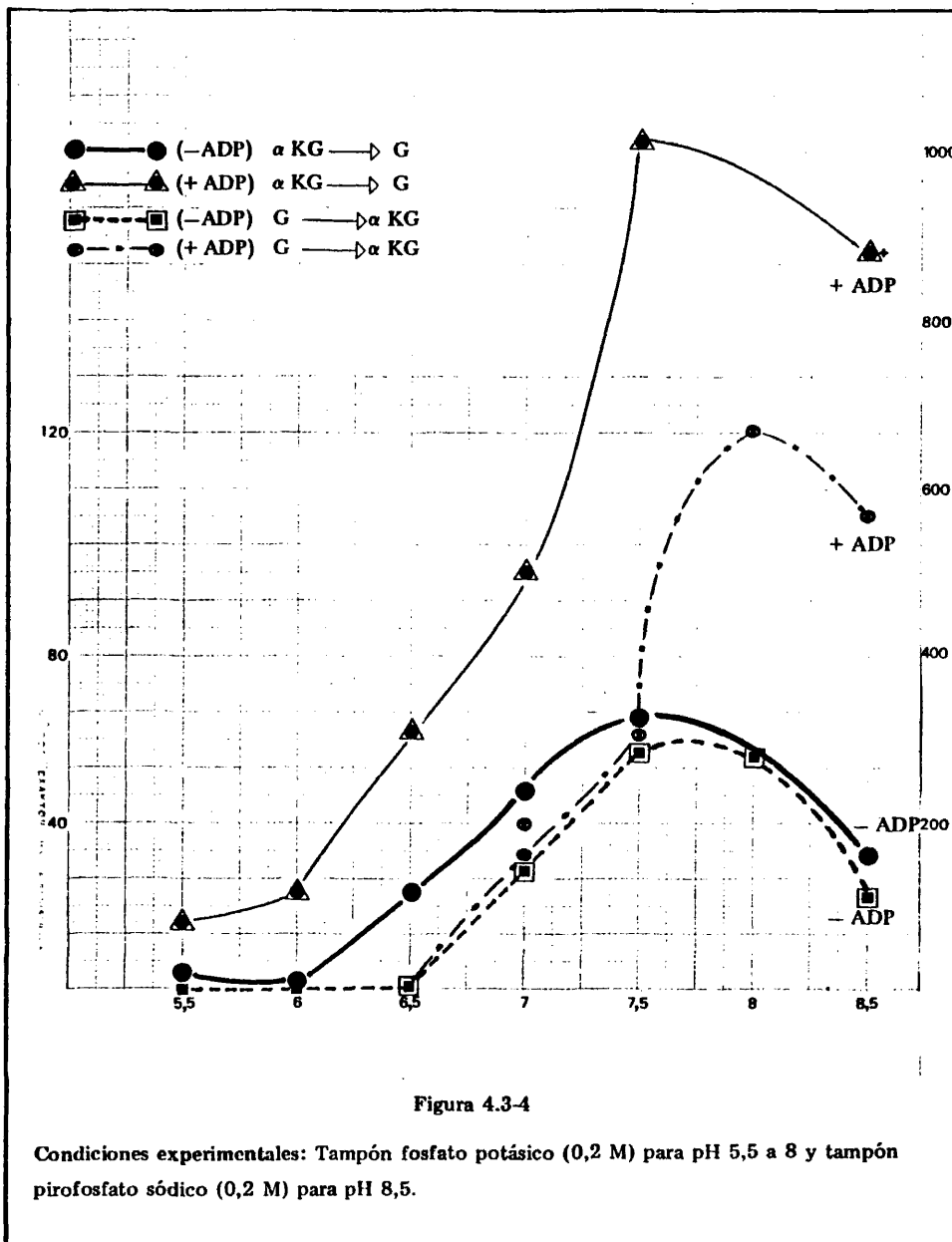


Figura 4. 3. - 2







## BIBLIOGRAFIA

1. OLSON, J.A. y ANFINSEN, C.B. (1952) *J. Biol. Chem.* **197**, 67.
2. KUBO, H.? IWATSUBO, M.; WATARI, H. y SOYAMAT, T. (1959) *J. Biochem. (Tokio)* **46**, 1171-1178.
3. TOMKINS, G.M.; YIELDING, K.L.; CURRAN, J.F.; SUMMERS, M.R. y BITENSKY, M.W. (1965), **240**, 3793.
4. WOLFF, J. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 336.
5. WOLFF, J. (1957) *Biochem. Biophys. Acta* **26**, 387.
6. TOMKINS, G.M.; UIELDING, K.R. y CURRAN, J.F. (1961) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 270.
7. FRIEDEN, C. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 815.
8. DESSEN, P. y PANTALONI, D. (196—) *Eur. J. Biochem.* **8**, 292.
9. FIRDEN, C. (1962) *Biochem. Biphys. Acta* **62**, 423.
10. FAHIEN, L.A.; WIGGERT, B.D. y COHEN, P.P. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 1083.
11. DI PRISCO, G. y STRECKER, H.J. (1970) *Eur. J. Biochem.* **12**, 483-489.
12. SEYAMA, S.; SAEKI, T. y KATUNUMA, N. (1973) *J. Biochem (Tokio)* **73**, 39-42.
13. CORMAN, L.; PRESCOTT, L.M. y KAPLAN, N.O. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 1383—

**4.4.— PARAMETROS CINETICOS DE LA GDH PROCEDENTES DE MITOCONDRIAS LIBRES Y  
SINAPTOSOMALES.**



## RESULTADOS Y DISCUSION

De los resultados comparativos presentados en las Tablas XIX y XX, sobre los parámetros cinéticos de la GDH procedente de M.L. y M.S., en ausencia y en presencia de ADP, podemos deducir que:

1) Si el ADP disminuye la afinidad de la enzima por el glutamato en las mitocondrias libres, quiere decir que la presencia de este nucleótido y a concentraciones bajas de glutamato, el compartimento encargado de degradar este glutamato por la vía de la GDH, estaría identificado con las M.S. mientras que en ausencia de ADP lo estaría con las M.L. Esta idea está apoyada por los resultados que se muestran en la Tabla XX en la que se observa que las relaciones de velocidades máximas entre el sentido biosintético y degradativo, en ausencia de ADP, es menor en el caso de las M.L. que en el de las M.S. mientras que cuando la reacción se realiza en presencia de ADP, las relaciones son muy semejantes.

En los resultados mostrados en la Tabla XIX se puede apreciar una diferencia de comportamiento entre la enzima de mitocondrias libres y sinaptosomales ya que, en ausencia de ADP, las M.L. presentan mayor velocidad máxima para la reacción en el sentido degradativo que en el biosintético y, por el contrario, en el caso de las M.S. la relación está ligeramente desplazada hacia el sentido biosintético del glutamato.

Otro dato, a favor de la diferencia de comportamiento de la GDH de ambas subpoblaciones mitocondriales, consiste en que, en ausencia de ADP, las M.L. presentan mayor actividad de GDH en ambos sentidos en comparación con las M.S., mientras que en presencia de ADP ocurre lo contrario. Este resultado está de acuerdo con los encontrados por Dennis y sus colaboradores (5).

Concluyendo, el ADP disminuye la afinidad de la GDH para el glutamato en las M.L. y la aumenta ligeramente en las M.S.

2) El ADP aumenta la afinidad (disminuye la  $K_m$ ) para el NAD tanto en las M.L. como en las M.S. (Tabla XIX).

3) El ADP disminuye intensamente la afinidad para el NADH en las M.L. y la incrementa en

las M.S. (Tabla XIX).

4) El ADP disminuye intensamente la afinidad para el  $\alpha$ -cetoglutarato( $\alpha$ KG) y ligeramente para el amonio, en el caso de las M.S. (Tabla XIX).

5) En ausencia de ADP, las M.L. presentan una Km menor (mayor afinidad) para el glutamato que las M.S. y sucede lo contrario en presencia de ADP (Tabla XIX).

6) La Km para el NAD es muy semejante en el caso de las ML. que en el de las M.S. tanto en ausencia como en presencia de ADP (Tabla XIX).

7) En ausencia de ADP las M.L. presentan mayor afinidad para el NADH que las M.S. ocurriendo lo contrario en presencia del mismo (Tabla XIX).

8) En ausencia de ADP la actividad de GDH en ambos sentidos de la reacción, es mayor en el caso de las M.L. que en el de las M.S. sucediendo lo contrario en presencia de ADP.

9) El ADP desplaza el equilibrio de la reacción hacia la síntesis de glutamato en ambos tipos de mitocondrias (Tabla XX) ejerciendo mayor efecto de desplazamiento en el caso de las M.L.

De esta serie de conclusiones podemos extraer ciertas hipótesis extrapolables al nivel fisiológico aunque lo que parece realmente evidente, es que el ADP afecta con gran intensidad al equilibrio de la reacción.

TABLA XVII

Km Y Vm PARA LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA GDH DE CEREBRO DE RATA EN  
MITOCONDRIAS SINAPTICAS (M.S.)

Sustrato	Km (mM)		Vm (nmol. / m. / mg.)	
	Sin ADP	Con ADP	Sin ADP	Con ADP
Glutamato	1,48	1,17	7,2	41
NAD	0,44	0,25		
$\alpha$ KG	0,018	0,24		
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	13,50	16,60	12,60	91
NADH	0,24	0,12		

Concentración de proteína: 0,3 mg./ml.



TABLA XVIII  
 Km Y Vm PARA LOS DISTINTOS SUSTRATOS DE LA GDH PROCEDENTE DE MITOCONDRIAS LIBRES (M.L.)  
 DE CEREBRO DE RATA

Sustrato	Km (mM)		Vm (nmol. / m. / mg.)	
	Sin ADP	Con ADP	Sin ADP	Con ADP
Glutamato	0,37	4,78	59,8	17,9
NAD	0,50	0,24		
$\alpha$ KG	—	2,26		
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	—	4,64	29,8	50,9
NADH	0,017	0,20		

TABLA XIX

COMPARACION DE  $K_m$  Y  $V_m$  ENTRE M.L. Y M.S. EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ADP

Sustrato	$K_m$ (mM)				$V_m$ (nmol. / m. / mg.)			
	M. L.	M. S.	M. L.	M. S.	M. L.	M. S.	M. L.	M. S.
Glutamato	Sin ADP 0,37	Con ADP 4,78	Sin ADP 1,48	Con ADP 1,17	Sin ADP 59,8	Con ADP 17,9	Sin ADP 7,2	Con ADP 41
NAD	0,50	0,24	0,44	0,25				
$\alpha$ KG	-	2,26	0,018	0,24				
$NH_4^+$	-	4,64	13,50	16,6	29,8	50,9	12,6	91
NADH	0,017	0,20	0,24	0,12				

TABLA XX  
 COMPARACION DE LAS  $K_{eq}$  Y RELACIONES DE  $V_m$  ENTRE EL SENTIDO BIOSINTETICO Y DEGRADATIVO

Fracción	$K_{eq}$		$V_m$ ( $\mu$ KG/G)	
	Sin ADP	Con ADP	Sin ADP	Con ADP
M.L.	—	1,56 (0,64)	0,5	2,8
M.S.	20 (0,05)	1,35 (0,74)	1,8	2,2

**BIBLIOGRAFIA**

1. GOLDIN, B. R. y FRIEDEN, C. (1971) *Cur. Top. Cell. Regul.* **4**, 77 — 81.
2. KING, H. S. y FRIEDEN, C. (1979) *J. Biol. Chem.* **245**, 4391.
3. YWATSUBO, M. y PANTALONI, D. (1967) *Bull. Soc. Clin. Biol.* **49**, 1563—1567.
4. D'ALBIS, A. y PANTOLONI, D. (1972) *Eur. J. Biochem.* **30**, 553.
5. DENNIS, S.C.; LAI, J. C. K. y CLARK, J. B. (1977) *J. Biochem.* **164**, 727—736.

**4.5.- CONCLUSIONES GENERALES**

#### 4.5.- CONCLUSIONES GENERALES

1ª) La mayor actividad de la GDH se extrae de las mitocondrias crudas en presencia de tritón X-100, lo que parece indicar que una gran proporción de la enzima se encuentra unida a la membrana (aproximadamente el 50%). Una pequeña proporción de la enzima (aproximadamente el 2%) parece encontrarse libre en la matriz mitocondrial (fracción extraíble con tampón Tris-ClH). Aproximadamente el 48% de la actividad enzimática es extraíble con tampón fosfato potásico de distintas fuerzas iónicas, lo que podría indicar que una parte del contenido total de la enzima pueda estar unida a la membrana mitocondrial mediante fuerzas electrostáticas (Tabla II).

2ª) La relación de actividades entre el sentido biosintético y degradativo de la reacción, en presencia de ADP, depende del medio de extracción utilizado, encontrándose la relación más alta en la enzima procedente de la matriz mitocondrial (aproximadamente el 10%) y de la fracción extraída con la mayor fuerza iónica. La menor actividad se ha encontrado en las fracciones de enzima extraídas con fuerza iónica baja y con tritón X-100. (Tabla II).

3ª) El factor de activación de ADP depende del medio de extracción que se utilice, y no es el mismo para uno y otro sentido de la reacción. (Tabla III).

4ª) La relación de actividades en el sentido biosintético y degradativo es diferente en presencia y en ausencia de ADP (1,3 mM), siendo mayor (aproximadamente el doble) en el primer caso (en presencia de ADP), lo que podría indicar un efecto modulador de este nucleótido para desplazar la actividad hacia el sentido biosintético y supondría su participación en la regulación del sentido de la actividad (Tabla IV).

5ª) La relación de actividades en sentido biosintético y degradativo, en presencia de distintas concentraciones de tritón X-100, prácticamente no varía.

6ª) A partir de las mitocondrias sinaptosomales se obtienen cuatro subpoblaciones que hemos identificado mediante enzimas marcadoras.

7ª) Tanto en ausencia como en presencia de ADP, la GDH (cuando se mide su actividad en

el sentido degradativo) posee mayor actividad en las M.L. que en las M.S. y en ausencia de ADP no encontramos actividad en las M.L. y sí en las M.S.

8ª) En presencia de ADP y con NADH como coenzima (midiendo la reacción en el sentido biosintético) las M.S. presentan una actividad ligeramente superior a las M.L. ocurriendo lo contrario cuando el coenzima es el NADPH.

9ª) En ausencia de ADP, la actividad de GDH en la fracción MS<sub>1</sub> está inclinada hacia la degradación del glutamato, mientras que en las fracciones MS<sub>3</sub> y MS<sub>4</sub> ocurre lo contrario. En presencia de ADP se favorece el sentido de la biosíntesis del glutamato en las subpoblaciones MS<sub>1</sub>, MS<sub>3</sub> y MS<sub>4</sub>, pero no en la MS<sub>2</sub>.

10ª) El ADP parece regular el sentido de la actividad de GDH hacia la dirección de la síntesis de glutamato.

11ª) Los nucleótidos ATP, ADP y AMP activan a la GDH procedente de mitocondrias libres y sinaptosomales y el GTP la inhibe.

12ª) Tanto el ADP como el ATP protegen ligeramente a la enzima, frente al efecto inhibitor del GTP.

13ª) La GDH procedente de mitocondrias libres, parece ser semejante a la de origen hepático, presentando un tipo de regulación basado en mecanismos de polimerización - despolimerización.

14ª) El ADP disminuye la afinidad de la GDH para el glutamato en las M.L. y la aumenta ligeramente en las M.S.

15ª) El ADP aumenta la afinidad (disminuye la K<sub>m</sub>) para el NAD tanto en las M.L. como en las M.S. (Tabla XIX).

16ª) El ADP disminuye intensamente la afinidad para el  $\alpha$ -cetoglutarato y ligeramente para el amonio, en el caso de las M.S. (Tabla XIX).

17ª) En ausencia de ADP las M.L. presentan mayor afinidad para el NADH que las M.S.

ocurriendo lo contrario en presencia del mismo (Tabla XIX).

18ª) En ausencia de ADP la actividad de GDH en ambos sentidos de la reacción, es mayor en el caso de las M.L. que en el de las M.S., sucediendo lo contrario en presencia de ADP.

19ª) El ADP desplaza el equilibrio de la reacción hacia la síntesis de glutamato en ambos tipos de mitocondrias, ejerciendo mayor efecto de desplazamiento en el caso de las M.L. (Tabla XX).

**BIBLIOGRAFIA GENERAL**

## BIBLIOGRAFIA GENERAL

1. WEIL—MALHERBE, H. (1950) *Physiol. Rev.* **30**, 549-568.
2. RICHTER, D. y DAWSON, R. M. C. (1948) *J. Biol. Chem.* **176**, 1199—1210.
3. BENITEZ, D.; RSCHEIDT, G.R. y STONE, W.E. (1954) *Amer. J. Physiol.* **176**, 483-487.
4. WEIL-MALHERBE, H. (1962) in *Neurochemistry* (K.A.C. ELLIOT; I.H. PAGE; J.H. QUASTE, eds.) 2 nd. ed. pp. 321-330.
5. TSUKADA, Y. (1969) *Prog. Brain, Res.* **21 A**, 268-291.
6. TASHIRO, S. (1922) *Amer. J. Physiol.* **60**, 519-543.
7. WINTERSTEIN, H. (1933) *Naturwissenschaften* **21**, 22-23.
8. TORDA, C. (1953) *J. Pharmacol.* **107**, 197-203.
9. HATHWAY, D. E. y MALLISON, A. (1964) *Biochem. J.* **90**, 51-60.
10. LEONARD, B.E. (1965) *Biochem, Pharmacol.* **14**, 1293-1298.
11. THORN, W. y HEIMANN, J. (1958) *J. Neurochem.* **2**, 166-177.
12. BARAONA, E.; SALINAS, A.; NAVIA, E. y ORREGO, H. (1965) *Clin. Sci.* **28**, 201-208.
13. SULLIVAN, J.F.; LINDER, H.; HOLDENER, P. y ORTMEYER, L. (1961) *Amer. of Med.* **30**, 893-898.
14. COHN, R. y CASTELL, D.C. (1966) *J. Lab. Clin. Med.* **68**, 195-205.
15. BOOTH, C.B.; SWADEY, J.G.; CLEIN, B. y HALL, J.C. (1963) *Arch. Neurol.* **8**, 257-263.
16. EICHLER, M. (1964) *Science* **144**, 886-888.
17. CLARK, G.M. y EISEMAN, B. (1958) *New England, J. Med.* **259**, 178 — 180.
18. BESSMAN, S.P. y BESSMAN, A.N. (1958) *J. Clin. Invest.* **34**, 622 - 628.
19. KREBS, H.A. (1935) *Biochem. J.* **30**, 665 - 676.
20. WEIL-MALHERBE, H. (1936) *Biochem. J.* **29**, 1951 - 1969.
21. PUCH, C.E.M. y QUASTEL, J.H. (1937) *Biochem. J.* **31**, 2.306 - 2.321.
22. CONWAY, E.J. y COOKE, R. (1939).
23. SCHULTZ, V. y LOWENSTEIN, M. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, (2) 485 - 492.
24. WEIL—MALHERBE, H. y GREEN, R.H. (1955) *Biochem. J.* **61**, 218 - 224.
25. BUNIATIAN, G. Kh. y MOVSESIAN, S.G. (1966) *Vop. Bickhim Mozga, Akad, Nauk, Arm. S.S.R.* **2**, 5 - 22.
26. FAULKNER, P. y QUASTEL, J.H. (1956) *Nature* **177**, 1.216 - 1.218.
27. STREECKER, H.J. (1953) *Arch. Biochem. Biophys.* **46**, 128 - 140.
28. BRAUNSTEIN, A.E. (1957) *Adv. Enzymol.* **29**, 335 - 389.
29. WEIL-MALHERBE, H. (1974) *Mol. Cel. Biochem.* **4**, 31 - 44.
30. HASLAM, R.J. y KREBS, H.A. (1963) *Biochem. J.* **88**, 566 - 578.

31. EULER, H.; ADLER, E.; GENTHER, G. y DAS, N.B. (1938) *Z. Physiol. Chem.* **254**, 61 - 103.
32. ENGEL, P.C. y DALZIEL, K. (1967) *Biochem. J.* **105**, 691 - 695.
33. MINARD, F.N. y DAVIS, R.V. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 1.283 - 1.289.
34. WEIL - MALHERBE, H. y GREEN, R.H. (1955) *Biochem. J.* **61**, 210 - 218.
35. GUHA, S.R.; GHOSH, B.N. y GHOSH, J.J. (1959) *Biochem. Exp. Med.* **19**, 255 - 264.
36. TAKAGAKI, G.; HIRANO, S. y TSUKADA, Y. (1957) *Arch. Biochem. Biophys.* **68**, 196 - 205.
37. WEIL - MALHERBE, H. y GORDON, J. (1971) *J. Neurochem.* **18**, 1.659 - 1.672.
38. CAUGHEY, W.S.; SHILEY, J.D. y HELLERMAN, L. (1957) *J. Biol. Chem.* **224**, 591 - 607.
39. ROGERS, K.S. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 2.004 - 2.009.
40. TAKAGAKU, G.; HIRANO, S. y NAGATA, Y. (1959) *J. Neurochem.* **4**, 124 - 134.
41. SUND, H. "Biological oxidations" T.P. Singer ed. pp. 603 y 641. Wiley Interscience New York (1968).
42. FISHER, H.F. "The mechanism and action of dehydrogenases" (G.W. Schwert and A.D. Winers eds.) pp. 221, University Press, Lexington, Kentucky (1969).
43. TOMKINS, G.M.; YIELDING, K.L.; CURRAN, J.F.; SUMMERS, M.R. y BITENSKY, M.W. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 3.793.
44. ROSSMAN, M.G.; LILJAS, A.; BRANDEN, C.I. y BANASZEK, L.J. "The enzymes". Vol. 11, Cap. 2, Boyer ed. (1975).
45. HOLZER, H. y SCHENEIDER, S. (1957) *Biochem.* 329 - 361.
46. SANVALL, B.D. (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 377.
47. SANVALL, B.D. y LATA, M. (1961) *Can. J. Microbiol.* **7**, 319.
48. SCHMIDT, E. "Method of enzymatic analysis" Bergmeyer, H.U. ed. pp. 752, Academic Press. New York (1965).
49. TALAL, N. y TOMKINS, G.M. (1964) *Science* **146**, 1.309.
50. FRIEDEN, C. "The role of nucleotides for the function and conformation of enzymes" Kalckar, H.M. and col. eds. pag. 194 Academic Press, New York (1970).
51. Mc. DONNELL, P.C. y GREENGARD, O. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 644.
52. DE DUVE, C.; WATTIAUX, R. y BAUDHUIN, P. (1962) *Advan. Enzymol* **24**, 291.
53. BANAY - SCHWARTZ, M. y STRECKER, H.J. (1970) *J.N.T. Biochem.* **1**, 371.
54. KING, H.S. y FRIEDEN, C. *J. Biol. Chem.* **245**, 4391. (1979).
55. DI PRISCO, G. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 148.
56. DI MATTEO, G. y DI PRISCO, G. *Biochem. Biophys. Acta* **429**.
57. DI PRISCO, G. y CASOLA, L. (1975) *Biochem.* **14**, **21**, 4.679.

58. HOLLEMBERG, C.P.; RILEY, W.F. y BORST, P. (1970) *Biochem. Biophys. Acta* **201**, 13.
59. PERLMAN, P.S. y MANLER, H.R. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* **136**, 245.
60. DE TOMA, F.J. y LANGRIDGE, W.H.R. (1974) *Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol.* **33**, 1427.
61. APELLA, E. y TOMKINS, G.M. (1966) *J. Biol. Chem.* **18**, 77.
62. MOON, K.; PISZKIEWICK, D. y SMITH, E.L. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 3.082.
63. SMITH, E.L.; LANDON, M.; PISZKIEWICK, D.; BRATTIN, W.J.; LANGLEY, T.J. y MELAMED, M.D. (1970) *Proc. Nat. Acad. Scien. U.S.* **67**, 724.
64. MOON, K.; PISZKIEWICK, D. y SMITH, E.L. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 3.093.
65. MOON, K.; PISZKIEWICK, D. y SMITH, E.L. (1972) *Proc. Nat. Acad. Scien. U.S.* **69**, 1.380.
66. LANDON, M.; MELAMED, M.D. y SMITH, E.L. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 2.360.
67. LANDON, M.; PISZKIEWICK, D. y SMITH, E.L. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 2.374.
68. PISZKIEWICK, D.; LANDON, M. y SMITH, E.L. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 3.067.
69. LANDON, M.; LANGLEY, T.J. y SMITH, E.L. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 3.082.
70. LANGLEY, T.J. y SMITH, E.L. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 3.789.
71. WOOTTON, J.C.; CHAMBERS, G.R.; HOLDER, A.A.; BARON, A.J.; TAILOR, J.G.; FINCHAM, J.R.S.; BLUMENTHAL, K.M.; MOON, K.E. y SMITH, E.L. (1974) *Proc. Nat. Acad. Scien. U.S.* **71**, 4.361.
72. COFFEE, C.J. y FRIEDEN, C. (Comunicación personal).
73. ADELSTEIN, S.J. y VALLEE, B.L. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 589.
74. YIELDING, K.L. y TOMKINS, C.M. (1962) *Biochem. Biophys. Acta.* **62**, 327.
75. COLMAN, R.F. y FOSTER, D.S. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 6.190.
76. SUND, H. y BURCHARD, W. *Eur. J. Biochem.* **6**, 202 (1968).
77. COLMAN, R.F. y FRIEDEN, C. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 3.661.
78. VERONESE, F.M.; NYC, J.F.; DECANI, Y.; BROWN, D.M. y SEMITH, E.L. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 7.922.
79. EISEMBERG, H. y REISLER, E. (1970) *Biopolymers* **9**, 113.
80. JOSEPHS, R. (1971) *J. Biol. Chem.* **55**, 47.
81. KRAUSE, J.; MARKAN, K.; MONSEN, M. y SUNO, H. (1970) "Pyridine Nucleotide-dependent dehydrogenases" (H. Sund. ed. pag. 279) Springer. Verlag. Berlin y New York.
82. GREVILLE, D.J. y HOME, R.W. (1963) *J. Biol. Chem.* **6**, 509.
83. VALENTINE, R. (1968) "Precongress abstracts of the fourth european regional congress" (Bocciarelli, D.S. ed. pag. 3) Roma.
84. LEHMAN, F.G. (1971) *Biochem. Biophys. Acta*, **235**, 259.
85. WOLFF, J. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 236.
86. WOLFF, J. (1957) *Biochem. Biophys. Acta*, **26**, 387.

87. TOMKINS, G.M.; YIELDING, K.L. y CURRAN, J.F. (1961) *Proc. Nat. Acad. Scien. U.S.* **47**, 270.
88. FRIEDEN, C. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 815.
89. DESSEN, P. y PANTALONI, D. (1969) *Eur. J. Biochem.* **8**, 292.
90. KUBO, H.; IWATSUBO, M.; WATARI, H. y SOYAMA, T. (1959) *J. Biochem (Tokio)* **46**, 1171.
91. FRIEDEN, C. (1962) *Biochem. Biophys. Acta*, **62**, 423.
92. FAHIEN, L.A.; WIGGERT, B.O. y COHEN, P.P. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 1.083.
93. GAUGHEY, W.S.; SMILEY, J.D. y HELLERMAN, L. (1957) *J. Biol. Chem.* **224**, 591.
94. SEYAMA, S.; SAEKI, T. y KATUNUMA, N. (1973) *J. Biochem. (Tokio)* **73**, 39.
95. OLSON, J.A. y ANFINSEN, C.B. (1952) *J. Biol. Chem.* **197**, 67.
96. CHUN, P.W. y KIM, S.J. (1969) *Biochemistry* **8**, 1.633.
97. EISEMBERG, H. y TOMKINS, C.M. (1968) *J. Biol. Chem.* **31**, 37.
98. REISLER, E. y EISEMBERG, H. (1970) *Biopolymers* **9**, 877.
99. SUND, H.; PILZ, I. y HERBST, M. (1969) *Eur. J. Biochem.* **7**, 517.
100. JOSEPHS, R. y BORISY, G. (1972) *J. Biol. Chem.* **65**, 127.
101. MUNN, E.A. (1972) *Biochem. Biophys. Acta*, **285**, 301.
102. REISLER, E.; EISEMBERG, H. y POUYET, J. (1970) *Biochem* **9**, 3.095.
103. CASSMAN, M. y SCHACHMAN, H.K. *Biochem.* **10**, 1.015 (1971).
104. CHAPELLE, S. y SCHOFFENIELS, E. (1972) *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **80**, 1.
105. FRIEDEN, C. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 2.396.
106. CROSS, D.G.; Mc. GREGOR, L.L. y FISHER, H.F. (1965) *Biochem. Biophys.* **110**, 222.
107. FRIEDEN, C. "The Enzymes" Academic Press. New York 2<sup>a</sup> ed. vol. 7, pag. 3. (1963).
108. FRIEDEN, C. y COLMAN, R.F. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 1.705.
109. FRIEDEN, C. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 3.286.
110. FISHER, H.F.; CROSS, D.G. y Mc. GREGOR, L.L. (1965) *Biochem. Biophys. Acta*, **99**, 165.
111. FISHER, H.F. (1973) *Advan. Enzymol.* **36**, 369.
112. HUANG, C.Y. Y FRIEDEN, C. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 3.638.
113. FRIEDEN, C. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 146.
114. BITENSKY, M.W.; YIELDING, K.L. y TOMKINS, G.M. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 1.077.
115. OLSON, J.A. y ANFINSEN, C.B. (1953) *J. Biol. Chem.* **202**, 841.
116. FISHER, H.F.; Mc. GREGOR, L.L. y POWER, U. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 402.
117. FISHER, H.F.; Mc. GREGOR, L.L. y CROSS, D.G. (1962) *Biochem. Biophys. Acta*, **65**, 175.

118. STRUCK, J. y Sizer, I. W. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 260.
119. ELWOOD, J.K.; HERBST, R.M. y KILGOUR, G.L. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 2.073.
120. CROSS, D.G. y FISHER, H.F. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 2.612.
121. CROSS, D.G.; FISHER, H.F. y Mc. GREGOR, L.L. (1972) *Biochem. Biophys. Acta*, **289**, 28.
122. KAPLAN, N.O.; CIOTTI, M.M. y STOLZEUBACH, F.E. (1959) *J. Biol. Chem.* **221**, 993.
123. WARD, D.C.; HORN, T. y REICH, E. (1972) *J. Biochem.* **247**, 4.014.
124. PFLEIDERER, G.; Sann, E. y ORTANDERL, F. (1963) *Biochem. Biophys. Acta*, **73**, 39.
125. BLUMENTHAL, K.M. y SMITH, E.L. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 3.644.
126. BLUMENTHAL, K.M. y SMITH, E.L. (1975) *Biochem. Biophys. Res Comm.* **62**, 78.
127. ARNOLD, H. y MAIER, K.P. *Biochem. Biophys. Acta*, **251**, 133 (1971).
128. CORMAN, L.; PRESCOTT, L.M. y KAPLAN, N.O. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 1.383.
129. EGAN, R.R. y DALZIEL, K. (1971) *Biochem. Biophys. Acta*, **250**, 47.
130. GOLDIN, B.R. y FRIEDEN, C. (1971) *Curr. Top. Cell. Regul.* **4**, 77.
131. YWATSUBO, M. y PANTALONI, D. (1967) *Bull., Soc., Chem. Biol.* **49**, 1.563.
132. D'ALBIS, A. y PANTALONI, D. (1972) *Eur. J. Biochem.* **30**, 553.
133. MARKAN, K. Y STEINHUBEL, J. (1972) *Febs. Lett.* **28**, 115.
134. COLEN, A.L.; PROUGH, R.A. y FISHER, H.F. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 7.905.
135. ENGEL, P.C. y DALZIEL, K. (1970) *118*, 409.
136. FRIEDEN, C. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 2.891.
137. BATES, D.J. y FRIEDEN, C. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 7.885.
138. ROSEN, N.L. "Review submitted for the degree of B.A. in biochemical Sciences". Harvard College. Cambridge. Mass. (1972).
139. GONZALEZ, M.P.; VENTURA, M.E. y CALDES, T. "The urea cycle: Discovery and present Status" (Grisolia S.; Mayor, F. and Baguena, R. eds.). Johnwiley and Sons. New York, London, Toronto, pag. 73 (1967).
140. HALDANE, J.B.S. "Enzymes", London., Longman Green and col. eds. (1930).
141. BROWN, A.; CULVER, J.M. y Fisher, G.F. (1973) *Biochem.* **12**, 4.367.
142. HAFNER, E.W. y WELLNER, D. (1971) *Proc. Nat. Acad. Scien. U.S.* **68**, 987.
143. HELLERMAN, L. y COFFEY, D.S. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 582.
144. SANNER, T. (1971) *Biochem. Biophys. Acta*, **250**, 297.
145. SMITH, E.L. y PISZKIEWICK, D. (1973), *J. Biol. Chem.* **248**, 3.089.
146. STRECKER, H.J. (1953). *Arch. Biochem. Biophys.* **46**, 128.
147. ENGEL, P.C. y DALZIEL, K. (1969) *Biochem. J.* **115**, 621.

148. KRAUSE, J.; BUCHNER, M. y SUND, H. (1974) *Eur. J. Biochem.* **41**, 593.
149. DALZIEL, K. y EGAN, R.R. (1972) *Biochem. J.* **126**, 975.
150. JUILLARD, J.H. y GAUTERON, D.C. (1972) *Febs. Lett.* **25**, 343.
151. BERL, S. y CLARKE, D.D. (1969) "Handbook of Neurochemistry" (Lajtha, A. ed.) Vol. 2, pag. 447 - 472. Plenum Press. New. York.
152. CREMER, J.E. (1964) *J. Neurochem.* **11**, 165 - 185.
153. GAITONDE, M.K.; DAHL, D.R. y ELLIOTT, K.A.C. (1965) *Biochem. J.* **94**, 345 - 352.
154. GAITONDE, M.K.; (1965) *Biochem. J.* **95**, 803 - 810.
155. O'NEAL, R.M. y KOEPPE, R.E. (1966) *J. Neurochem.* **13**, 835 - 847.
156. VAN DEN BERG, C.J.; KRZALIC, L.J.; MELA, P. y WEALSCH, H. (1969) *Biochem. J.* **113**, 281 - 290.
157. VAN DEN BERG, C.J. y GARFINKEL, D. (1971) *Biochem. J.* **123**, 211 - 218.
158. VAN DEN BERG, C.J. (1973) in "Metabolic compartmentation in the brain" (BALAZS, R. y CREMER, J.E. Eds.) pp. 137 - 166 Mcmillan, London.
159. BALAZS, R.; MACHIYAMA, Y. y PATEL, A.J. (1973) "Metabolic compartmentation in the brain" (BALAZS, R. y CREMER, J.E. eds.) pp. 57 - 70, Mcmillan, London.
160. SALGANICOFF, L. y DE ROBERTS, E. (1965) *J. Neurochem.* **12**, 287 - 309.
161. VAN KEMPEN, G.M.J.; VAN DEN BERG, C.J.; VAN DER HELM, H.J. y VELDSTRA, H. (1965) *J. Neurochem.* **12**, 581 - 588.
162. NEIDLE, A.; VAN DEN BERG, C.J. y GRYNBAUM, A. (1969) *J. Neurochem.* **16**, 225 - 234.
163. BLOKHUIS, G.G.D. y VELDSTRA, H. (1970) *Febs. Letters* **11**, 197 - 199.
164. KROON, M.C. y VELDSTRA, H. (1972) *Febs. Letters* **24**, 173 - 176.
165. CHENG, S.C.; KUMAR, S. y CASELLA, G.A. (1972) *Brain Res.* **42**, 117 - 128.
166. BERL, S.; TAKAGAKI, G.; CLARKE, D.D. y WAELSCH, H. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 2.562 - 2.569.
167. BERL, S.; TAKAGAKI, G.; CLARKE, D.D. y WAELSCH, H. (1972) *J. Biol. Chem.* **237**, 2.570 - 2.573.
168. BERL, S. (1971) *Exp. Biol. Med.* **4**, 71 - 84.
169. JAWKINS, R.A.; MILLER, A.L.; NIELSEN, R.C. y VEECH, R.L. (1973) *Biochem. J.* **134**, 1.001 - 1.008.
170. BERL, S.; CLARKE, D.D. y NICKLAS, W.J. (1970) *J. Neurochem.* **17**, 999-1.007.
171. CLARKE, D.D.; MICKLAS, W.J. y BERL, L. (1970) *Biochem. J.* **120**, 345 - 351.
172. ROBERTS, E. (1973) Fourth Int. Meet. Int. Soc. Neurochem. Tokyo.
173. McLAUGHLIN, B.J.; WOOD, J.G.; SAITO, K.; BARBER, R.; VAUGHN, J.E.; ROBERTS, E. y WU, J.Y. (1974) *Brain Res.* **76**, 377 - 391.

174. SAITO, K.; BARBER, R.; WU, J.Y.; MATSUDA, T.; ROBERTS, E. y WAUGHN, J.E. (1974) *Proc. Nat. Acad. Scien. U.S.A.* **71**, 269 - 273.
175. VAN GELDER, N.M. (1965) *J. Neurochem.* **12**, 239 - 244.
176. SIMS, K.L.; WEITSEN, H.A. y BLOOM, F.E. (1971) *J. Histochem. Cytochem.* **19**, 405 - 415.
177. HYDE, J.C. y ROBINSON, N. (1974) *Nature (London)* **248**, 432 - 433.
178. WILSON, S.H.; SCHRIER, B.K.; FARBER, J.L.; THOMISON, E.J.; ROSEMBERG, R. N.; BRUME, A. y NIREMBERG, M. W. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 3.159 - 3.169.
179. NICKLAS, W.J. y BROWNING, E.T. (1978) *J. Neurochem.* **30**, 955 - 963.
180. LAI, J.C.K. y Clark, J.B. (1976) *Biochem. J.* **154**, 423 - 432.
181. ABAD, P. y GONZALEZ, M.P. (Presente tesis doctoral).
182. BARDAKDJIAN, J.; TARDY, M.; PIMOULE, C. y GONNARD, P. (1979) *Neurochem. Res.* **4**, 517 - 527.
183. ROSE, S.P.R. (1973) "Metabolic compartmentation in the brain" (BALAZS, R. y CREMER, J.E. eds.) pp. 287 - 304. Mcmillan, London.
184. HERTZ, L. (1979) "Progress in neurobiology" (Vol. 13 pp. 277 - 323, Pergamon Press. Printed in Great Britain.
185. BALAZS, R. (1970) in "Handbook of Neurochemistry" Vol. 3, pg. 1. (Lajtha, A. ed.) New York.
186. CORMAN, L.; PRESCOTT, L.M. y KAPLAN, N. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, (7) 13851390.
187. AUSTOKER, J.; COX, D. y MATHIAS, A.P. (1972) *Biochem. J.* **129** (5) 1.139-1.115.
188. CLARK, J.H. y NICKLAS, W.J. (1970) *J. Biol. Chem.* **245** - **418** 4.724 - 4.731.
189. HILL, R.L. y BRADSHAW, R.A. (1969) in "Methods in enzymology" (Lowestein, J.M. ed. Vol. XIII, pp. 91 - 99). Academic Press. New York and London.
190. HAWKINS, K.I. y KNITTLE, C.E. (1972) *Anal. Chem.* **44**, 416 - 417.
191. ENGLARD, S. y SIEGEL, L. (1969). "Methods in enzymology" (Lowestein, J.M. ed. Vol. XIII, pp. 99 - 106) Academic Press. New York and London.
192. LOWRY, O.H.; ROSENBOUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.

