



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE CIÈNCIES
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA

"ALCOHOL DESHIDROGENASA I ALDEHID DESHIDROGENASA
DE PLACENTA HUMANA"

Tesi presentada per adquirir el Grau de Doctor
en Ciències Químiques per JAUME FARRÉS i VICEN,
Llicenciat en Ciències Químiques.

Treball realitzat en el Departament de Bioquímica,
Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona,
sota la direcció del Dr. XAVIER PARES i CASASAMPERA.

V. P.

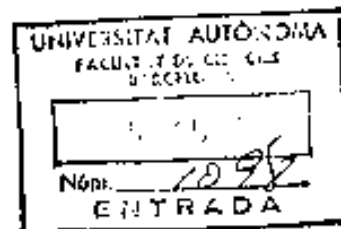
Jaume Farrés i Vicen

Dr. Xavier Parés i Casasampera

Bellaterra, 4 de novembre de 1985



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE CIÈNCIES
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA



"ALCOHOL DESHIDROGENASA I ALDEHID DESHIDROGENASA
DE PLACENTA HUMANA"



Tesi presentada per adquirir el Grau de Doctor
en Ciències Químiques per JAUME FARRÉS i VICEN,
Llicenciat en Ciències Químiques.

Treball realitzat en el Departament de Bioquímica,
Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona,
sota la direcció del Dr. XAVIER PARES i CASASAMPERA.

V. P.

Jaume Farrés i Vicen

Dr. Xavier Parés i Casasampera

Bellaterra, 4 de novembre de 1985

ÍNDEX GENERAL

	<u>Pàg.</u>
Capítol I : <u>INTRODUCCIÓ</u>	1
1. IMPORTÀNCIA SOCIAL, MÈDICA I CIENTÍFICA DEL CONSUM D'ALCOHOL EN LA POBLACIÓ HUMANA.....	2
1.1. Síndrome d'alcoholisme fetal.....	3
2. BIODQUÍMICA I FARMACOLOGIA DE L'ETANOL.....	5
2.1. Absorció, distribució i eliminació de l'etanol.....	5
2.2. Metabolisme oxidatiu de l'etanol.....	6
2.3. Efectes tòxics de l'etanol.....	9
2.4. Efectes tòxics de l'acetaldehid.....	9
2.5. Efectes tòxics de l'excessiva generació de NADH.....	10
3. ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH).....	12
3.1. Propietats generals de l'ADH.....	12
3.2. Mecanisme catalític de l'ADH.....	15
3.3. Mecanisme cinètic de l'ADH.....	15
3.4. Concepte d'isoenzim.....	17
3.5. Isoenzims de l'ADH humana.....	18
3.5.1. Isoenzims de la classe I.....	23
3.5.1.1. Variabilitat isoenzimàtica de l'ADH.....	27
3.5.1.2. Distribució tissular.....	29
3.5.2. Isoenzims de la classe II (π -ADH).....	29
3.5.3. Isoenzims de la classe III (χ -ADH).....	31

4. ALDEHID DESHIDROGENASA(ALDH).....	33
4.1. Propietats generals de l'ALDH.....	33
4.2. Mecanisme catalític de l'ALDH.....	34
4.3. Mecanisme cinètic de l'ALDH.....	35
4.4. Isoenzims de l'ALDH humana.....	35
4.4.1. Isoenzims de baixa Km.....	41
4.4.1.1. Isoenzim ALDH I.....	41
4.4.1.2. Isoenzim ALDH II.....	44
4.4.1.3. Comparació entre ALDH I i ALDH II.....	48
4.4.1.4. Mecanisme d'inhibició de l'ALDH pel disulfiram...	50
4.4.1.5. Variabilitat isoenzimàtica de l'ALDH.....	51
4.4.2. Isoenzims d'alta Km de l'ALDH.....	54
4.4.2.1. Isoenzim ALDH III.....	54
4.4.2.2. Isoenzim ALDH IV.....	55
4.4.2.3. Formes induïbles de l'ALDH en altres espècies....	55
4.5. Distribució subcel·lular de l'ALDH.....	56
4.5.1. Distribució subcel·lular de l'ALDH humana.....	57
4.5.2. Distribució subcel·lular de l'ALDH en altres espècies.....	58
5. ALCOHOL I FETUS.....	61
5.1. Fisiologia de la placenta humana.....	61
5.2. Desenvolupament fetal i postnatal de l'ADH i l'ALDH.....	62
5.2.1. Desenvolupament de l'ADH.....	62
5.2.2. Desenvolupament de l'ALDH.....	63
5.3. Antecedents sobre l'ADH i l'ALDH de placenta.....	64
6. IMPORTÀNCIA I LIMITACIONS DE L'ESTUDI CONJUNT DE L'ADH I L'ALDH....	66
Capítol II : <u>OBJECTIUS</u>	68

Capítol III : <u>MATERIALS I MÈTODES</u>	70
1. MÈTODES PREPARATIUS.....	70
1.1. Reactius.....	70
1.1.1. Procedència dels coenzims i substrats.....	70
1.1.2. Preparació dels substrats per a l'anàlisi enzimàtica.....	71
1.1.2.1. Destil·lació dels aldehids.....	71
1.1.2.2. Conservació dels aldehids.....	72
1.1.2.3. Mesura de la concentració de propanal.....	72
1.1.2.4. Mètodes de solubilització de substrats i	
inhibidors.....	73
1.1.2.5. Preparació del formaldehid.....	76
1.1.2.6. Preparació del malondialdehid.....	77
1.2. Solucions amortidores.....	77
1.2.1. Procedència dels reactius utilitzats per a la	
preparació de tampons.....	77
1.2.2. Efecte de la temperatura sobre el pH de tampons	
que contenen Tris.....	78
1.2.3. Desgasificació i saturació dels tampons amb nitrogen.....	78
1.2.4. Tampons emprats en la purificació de l'ADH de placenta....	78
1.2.5. Tampons emprats en la purificació de l'ALDH de placenta...	79
1.3. Obtenció i conservació del teixit.....	79
1.4. Aïllament i purificació dels enzims.....	80
1.4.1. Homogenització del teixit.....	80
1.4.2. Centrifugació i filtració.....	84
1.4.3. Diàlisi.....	84
1.4.3.1. Preparació dels sacs de diàlisi.....	84
1.4.3.2. Equilibració de la mostra.....	85
1.4.4. Cromatografia de bescanvi iònic.....	85
1.4.4.1. Preparació de la resina de bescanvi iònic.....	85
1.4.4.2. Empaquetament de la resina en la columna.....	87

1.4.4.3.	Aplicació de la mostra.....	87
1.4.4.4.	Elució de l'enzim.....	88
1.4.5.	Concentració per ultrafiltració.....	88
1.4.6.	Cromatografia d'afinitat.....	89
1.4.6.1.	Preparació de la columna d'afinitat.....	90
1.4.6.2.	Preparació de la mostra per a la cromatografia d'afinitat.....	90
1.4.6.3.	Aplicació de la mostra a la columna d'afinitat...	91
1.4.6.4.	Rentat amb tampó de força iònica més elevada.....	91
1.4.6.5.	Elució de l'enzim.....	92
1.4.6.6.	Recromatografia en la columna de 5'AMP-Sepharose.....	92
1.4.6.7.	Concentració de l'enzim pur.....	93
1.4.7.	Emmagatzement de l'enzim pur.....	93
1.4.8.	Cromatografia de gel filtració.....	94
1.4.8.1.	Cromatografia en Sephadex G-200 Superfine.....	96
1.4.8.2.	Cromatografia en Sephacryl S-300 Superfine.....	99
1.4.8.3.	Càlcul del volum buit de la columna (V_0).....	100
1.4.8.4.	Càlcul del volum d'elució (V_e).....	101
2.	METODES ESPECTROFOTOMÈTRICS.....	102
2.1.	Mesura de l'activitat enzimàtica.....	102
2.1.1.	Mesura de l'activitat ADH.....	103
2.1.1.1.	Mesura de l'activitat estàndard de l'ADH de placenta humana i de l'isoenzim χ -ADH.....	103
2.1.1.2.	Mesura de l'activitat dels isoenzims de les classes I i II de l'ADH de fetge humà i ADH de fetge de cavall.....	104
2.1.2.	Mesura de l'activitat deshidrogenasa de l'ALDH.....	104
2.1.2.1.	Mesura de l'activitat estàndard de l'ALDH de placenta humana.....	105
2.1.2.2.	Mesura de l'activitat dels isoenzims d'alta Km i de baixa Km de l'ALDH.....	105
2.1.3.	Mesura de l'activitat esterasa de l'ALDH.....	106

2.1.4.	Mesura de l'activitat lactat deshidrogenasa.....	106
2.1.5.	Origen de l'activitat "background".....	107
2.1.5.1.	Activitat "background" deguda a substrats endògens.....	107
2.1.5.2.	"Background" degut a la formació de complexos NAD-aldehid.....	108
2.1.5.3.	"Background" degut a l'absorbància del substrat o del producte.....	109
2.1.6.	Mesura de l'activitat enzimàtica en condicions especials..	109
2.1.6.1.	Barreges de reacció que presenten una absorbància elevada.....	109
2.1.6.2.	Barreges de reacció de poc volum.....	110
2.1.7.	Calcul de l'activitat específica d'una fracció enzimàtica.....	110
2.1.8.	Calcul de la concentració total d'enzim.....	110
2.2.	Mètodes d'estudi cinètic.....	111
2.2.1.	Variació de l'activitat en funció del pH.....	111
2.2.1.1.	Oxidació d'alcohols per l'ADH de placenta humana.....	111
2.2.1.2.	Oxidació d'aldehids per l'ALDH de placenta humana.....	111
2.2.2.	Determinació i significat de les constants cinètiques Km, kcat i kcat/Km.....	112
2.2.3.	Inhibició per substrat.....	114
2.2.4.	Determinació del coeficient de Hill.....	114
2.2.5.	Determinació del mecanisme cinètic i de la constant d'equilibri de l'ADH de placenta humana.....	115
2.2.6.	Mètodes dels estudis d'inhibició.....	116
2.2.6.1.	Inhibició de l'ADH de placenta humana amb derivats del pirazole.....	116
2.2.6.2.	Inhibició de l'ADH de placenta humana amb agents quelants de metalls.....	116
2.2.6.3.	Inhibició de l'ALDH de placenta humana amb disulfiram.....	119
2.3.	Metodes d'estudi de l'estabilitat tèrmica de l'ALDH.....	119
2.4.	Estudi de l'efecte dels ions divalents sobre l'ALDH de	

placenta.....	120
2.5. Determinació de la concentració de proteïna.....	120
2.5.1. Estimació per mesura de l'absorbància a 280 nm.....	120
2.5.2. Determinació quantitativa de proteïnes pel mètode de Lowry.....	121
2.5.3. Determinació quantitativa de proteïnes pel mètode de Bradford.....	122
2.6. Determinació quantitativa de zinc en l'ADH de placenta humana per espectrofotometria d'absorció atòmica.....	123
2.6.1. Tractament del material.....	123
2.6.2. Tractament de l'aigua i del tampó.....	123
2.6.3. Tractament de l'enzim.....	124
2.6.4. Preparació de les solucions-patró de zinc.....	125
2.6.5. Estandarització del mètode amb ADH comercial de fetge de cavall.....	125
2.6.6. Mesura de l'absorció atòmica en un espectrofotòmetre de flama.....	125
3. METODES ELECTROFORETICS.....	127
3.1. Electroforesi en gel de midó.....	127
3.1.1. Electroforesi d'alt voltatge.....	127
3.1.1.1. Preparació del motllo per al gel.....	127
3.1.1.2. Preparació del gel.....	127
3.1.1.3. Preparació del tampó d'electroforesi.....	128
3.1.1.4. Aplicació de les mostres.....	128
3.1.1.5. Tinció del gel per activitat enzimàtica.....	130
3.1.2. Electroforesi de baix voltatge.....	132
3.2. Electroforesi en gel de poliacrilàmida amb SDS.....	133
3.2.1. Preparació de les solucions.....	134
3.2.2. Preparació de les plaques.....	134
3.2.3. Preparació dels gels.....	135
3.2.4. Preparació de les proteïnes-patró.....	136
3.2.5. Aplicació de les mostres.....	136
3.2.6. Tinció del gel per proteïna.....	137

3.2.6.1.	Tinció amb Coomassie Blue.....	137
3.2.6.2.	Tinció amb sals de plata.....	137
3.2.7.	Determinació del pes molecular de les proteïnes.....	139
3.3.	Electrofocalització analítica en gels ultrafins de poliacrilamida.....	139
3.3.1.	Preparació de l'acrilamida.....	139
3.3.2.	Preparació de les plaques de vidre.....	139
3.3.3.	Preparació del gel.....	140
3.3.4.	Preparació de l'aparell d'electrofocalització.....	141
3.3.5.	Aplicació de les mostres.....	142
3.3.6.	Determinació del gradient de pH. Càlcul del punt isoelectric.....	142
3.3.6.1.	Electrode de pH de superfície.....	142
3.3.6.2.	Redissolució de l'amfòlit.....	142
3.3.6.3.	Càlcul del punt isoelectric.....	143
3.3.7.	Tinció del gel.....	143
3.4.	Fotografia dels gels.....	144
3.5.	Conservació dels gels.....	145
4.	MÈTODES ESPECIALS.....	146
4.1.	Fraccionament subcel·lular.....	146
4.1.1.	Obtenció del teixit per al fraccionament.....	146
4.1.2.	Homogenització isotònica del teixit.....	146
4.1.3.	Centrifugació diferencial.....	148
4.1.4.	Mesura de l'activitat enzimàtica.....	149
4.1.4.1.	Mesura de l'activitat d'enzims marcadors de les fraccions subcel·lulars.....	149
4.2.	Mètodes dels estudis en sang.....	151
4.2.1.	Obtenció i tractament dels eritròcits.....	151
4.2.2.	Mesura de la concentració d'hemoglobina total.....	152
4.3.	Mètodes per als estudis en fetge de fetus i placenta de rata....	152
4.3.1.	Animals i dieta.....	152
4.3.2.	Obtenció i conservació dels teixits.....	152
4.3.3.	Homogenització i centrifugació dels teixits.....	153

4.3.4.	Mesura de l'activitat ADH.....	153
4.3.5.	Anàlisi dels isoenzims de l'ADH per electroforesi en gel de midó.....	153
Capítol IV : <u>RESULTATS</u>		154
1.	ALCOHOL DESHIDROGENASA DE PLACENTA HUMANA.....	154
1.1.	Capacitat d'oxidació d'etanol de la placenta humana.....	155
1.2.	Aïllament i purificació de l'ADH de placenta humana.....	157
1.3.	Estabilitat de l'ADH de placenta.....	157
1.4.	Anàlisi dels isoenzims de l'ADH de placenta.....	158
1.5.	Caracterització físico-química de l'ADH de placenta.....	158
1.5.1.	Pes molecular de l'enzim natiu.....	158
1.5.2.	Pes molecular de les subunitats.....	159
1.5.3.	Nombre d'àtoms de zinc.....	159
1.5.4.	Inhibició de l'activitat ADH amb agents quelants de metalls.....	159
1.6.	Caracterització cinètica preliminar de l'ADH de placenta.....	159
1.6.1.	pH òptim per a l'oxidació d'alcohols.....	159
1.6.2.	Especificitat de coenzim.....	160
1.6.3.	Oxidació dels alcohols alifàtics de cadena curta.....	160
1.6.4.	Inhibició amb derivats del pirazole.....	161
1.7.	Identitat de les propietats de l'ADH de placenta amb les de l'isoenzim χ -ADH de fetge.....	161
1.8.	Aprofundiment en l'estudi cinètic de l'isoenzim χ -ADH.....	163
1.8.1.	Especificitat de substrat.....	163
1.8.1.1.	Oxidació d'alcohols.....	163
1.8.1.2.	Reducció d'aldehids.....	166
1.8.2.	Mecanisme cinètic i constant d'equilibri.....	168
1.9.	Localització intracel·lular de l'isoenzim χ -ADH.....	171
1.10.	Desenvolupament de l'activitat ADH en el fetge.....	171

2.	ALDEHID DESHIDROGENASA DE PLACENTA HUMANA.....	175
2.1.	Capacitat d'oxidació d'acetaldehid i de propanal de la placenta humana.....	175
2.2.	Purificació de l'ALDH de placenta humana.....	176
2.3.	Estabilitat de l'ALDH de placenta.....	179
2.4.	Anàlisi dels isoenzims de l'ALDH de placenta.....	179
2.5.	Caracterització físico-química de l'ALDH de placenta.....	182
2.5.1.	Pes molecular de l'enzim natiu.....	182
2.5.2.	Pes molecular de les subunitats.....	182
2.5.3.	Punt isoelèctric.....	183
2.5.4.	Estabilitat tèrmica.....	185
2.6.	Caracterització cinètica de l'ALDH de placenta.....	185
2.6.1.	pH òptim.....	185
2.6.2.	Especificitat de coenzim.....	186
2.6.3.	Especificitat de substrat.....	186
2.6.3.1.	Oxidació dels aldehyds alifàtics.....	186
2.6.3.2.	Oxidació del semialdehid succínic.....	188
2.6.3.3.	Oxidació dels aldehyds aromàtics.....	189
2.6.3.4.	Inhibició de l'activitat ALDH amb 4-hidroxibenzaldehid.....	190
2.6.4.	Activitat esterasa de l'ALDH de placenta.....	191
2.6.5.	Inhibició de l'ALDH de placenta amb disulfiram.....	192
2.6.6.	Efecte dels ions divalents sobre l'activitat ALDH.....	194
2.7.	Localització intracel·lular de χ -ADH i de l'ALDH de placenta....	194
Capítol V : <u>DISCUSSIÓ</u>		197
1.	COMPARACIÓ DE L'ADH DE PLACENTA AMB L'ISOENZIM χ -ADH DE FETGE I AMB ISOENZIMS ANÀLEGS PRESENTS EN ALTRES ESPÈCIES.....	197

1.1.	L'ADH de placenta presenta propietats similars als isoenzims de l'ADH de mamífer.....	197
1.2.	L'ADH de placenta és idèntica a l'isoenzim χ -ADH de fetge.....	197
1.3.	χ -ADH és l'únic isoenzim de l'ADH present en placenta.....	198
1.4.	χ -ADH és l'isoenzim de l'ADH amb una especificitat de substrat més restringida.....	199
1.5.	χ -ADH és un isoenzim de l'ADH humana.....	200
1.6.	Un isoenzim anàleg a χ -ADH és comú a diverses espècies de mamífer.....	201
1.7.	La placenta de rata posseeix un isoenzim de l'ADH anàleg al de la placenta humana.....	202
1.8.	χ -ADH és el primer isoenzim de l'ADH humana que s'expressa en el fetge durant el desenvolupament.....	203
1.9.	Ubiquïtat de χ -ADH.....	204
1.10.	χ -ADH és un enzim citoplasmàtic.....	205
2.	COMPARACIÓ DE L'ALDH DE PLACENTA AMB ELS ISOENZIMS DE L'ALDH DE FETGE I ALTRES ALDH MÉS ESPECÍFIQUES.....	206
2.1.	L'ALDH de placenta presenta propietats diferents als altres isoenzims de l'ALDH humana.....	206
2.2.	L'ALDH de placenta és un isoenzim de baix pes molecular i estructura dimèrica.....	206
2.3.	L'ALDH de placenta presenta una elevada especificitat de substrat.....	209
2.4.	L'ALDH de placenta posseeix propietats similars a l'isoenzim hepàtic ALDH IV.....	210
2.5.	La placenta humana posseeix majoritàriament un sol isoenzim de l'ALDH.....	211
2.6.	L'ALDH de placenta és un isoenzim majoritàriament mitocondrial..	213
2.7.	Un isoenzim mitocondrial anàleg a l'ALDH de placenta és comú	

a vàries espècies de mamífer.....	215
2.8. L'ALDH de placenta podria considerar-se una semialdehid succínic deshidrogenasa.....	217
3. CAPACITAT GLOBAL DE METABOLITZACTI� DE L'ALCOHOL DE LA PLACENTA HUMANA.....	220
3.1. L'ADH de placenta no pot protegir al fetus enfront de l'etanol que es troba en la sang materna.....	220
3.2. L'ALDH de placenta no pot protegir al fetus enfront de l'acetaldehid que es troba en la sang materna.....	221
4. POSSIBLE PAPER FISIOLÒGIC DE L'ADH I DE L'ALDH EN EL METABOLISME DE LA PLACENTA.....	224
4.1. Possible funció de l'isoenzim χ -ADH.....	226
4.2. Possible funció de l'ALDH de placenta.....	227
Capitol VI : <u>CONCLUSIONS</u>	230
Capitol VII : <u>BIBLIOGRAFIA</u>	235

CAPITOL I

INTRODUCCIO

Capítol I : INTRODUCCIÓ

1. IMPORTÀNCIA SOCIAL, MÈDICA I CIENTÍFICA DEL CONSUM D'ALCOHOL EN LA POBLACIÓ HUMANA

El consum d'alcohol, ja sigui en forma de begudes fermentades o destil·lades, és un hàbit secular en la nostra civilització, però sobretot en els pobles de l'àrea mediterrània. Espanya es el tercer productor mundial de vi (84) i ocupa el tercer lloc dels països consumidors d'alcohol a Europa, després de França i Luxemburg, amb un consum de 18,8 l per habitant i per any (15).

Les propietats úniques de l'alcohol, com ser fàcilment obtenible i ser capaç de modificar l'estat d'ànim i el comportament, varen atorgar-li ben aviat un gran prestigi social. Les seves propietats beneficioses tals com l'aportació calòrica aparent o l'efecte tònic es posen de manifest quan es consumit en dosis moderades. Malgrat tot, com en totes les drogues i moltes substàncies nutritives comunes, la ingestió d'alcohol en quantitats que s'aproximen o excedeixen la capacitat de la seua eliminació metabòlica, s'ha mostrat molt perjudicial, comportant greus problemes de toxicitat, sensibilitat, tolerància i dependència.

A Espanya, més de la meitat de la població adulta consumeix diàriament begudes alcohòliques (84), calculant-se que existeixen aproximadament uns 2.000.000 de malalts alcohòlics (219, 295). A Catalunya, d'un 9 a un 11 % de la població de 16 a 65 anys consumeix més de 80 g d'alcohol pur per dia, quantitat que es considera altament nociva per al fetge (110). La població infantil (4-14 anys) de Barcelona i província ha consumit alguna vegada alcohol en un 94,9 %, el que facilita la primerenca adquisició de l'hàbit (219).

El cost social dels problemes derivats de l'abús de l'alcohol és molt elevat, posant-se de relleu com a problema de primera magnitud. Es per

aquesta raó que l'estudi del metabolisme de l'etanol i dels seus efectes fisiològics en l'home és avui una àrea prioritària i multidisciplinària d'interès social, mèdic i científic.

En els darrers anys ha augmentat el consum d'alcohol en la dona, en part provocat pel canvi del seu paper en la societat. En 20 anys s'ha passat d'una dona per cada 10 homes alcohòlics a dues o tres dones, inclús sis en algunes regions del país (68). Cal dir que la dona apareix generalment més susceptible als efectes tòxics de l'alcohol (212). A Espanya, hi ha unes 800.000 dones alcohòliques, de les quals les dues terceres parts es troben en edat fèrtil (68). Les dones alcohòliques presenten una incidència menor d'embarassos que les dones no alcohòliques. Per altra banda, és corrent que moltes dones prenguin dosis d'alcohol que es consideren moderades durant l'embaràs, confiades en la inoquïtat d'aquesta ingestió. Diversos estudis realitzats en diferents països, sobretot en els que tenen un índex de consum d'alcohol prou important, han demostrat que una ingestió diària de 15 a 30 g d'alcohol és suficient per a provocar alteracions importants en el fetus, amb afectació ulterior neurològica, intel·lectual i física (212).

1.1. Síndrome d'alcoholisme fetal

La síndrome d'alcoholisme fetal (F.A.S.), definida per primera vegada per Jones i col. (161), constitueix un conjunt d'anomalies que afecten al fetus, i posteriorment al nou-nat, fill d'una mare que ha ingerit dosis importants d'alcohol durant l'embaràs (263, 264). Algunes d'aquestes anomalies són deficiències en el creixement, desenvolupament tardà, retard mental, microcefàlia, conducta irritable i hiperactiva durant la infantesa i un cert nombre de defectes morfològics facials, cardíacs i en les extremitats (161). Dins del mateix quadre clínic són freqüents també els avortaments espontanis, parts prematures i sovint la mort perinatal. Cal afegir que un elevat percentatge de les placentes provinents de nens amb F.A.S. presenta també lesions de tipus morfològic, amb un desenvolupament anormal de les microvellositats placentàries (17) (veure

1.5.1.).

Un de cada mil nens neix amb aquesta síndrome (1, 2), constituint una de les causes principals de subnormalitat i apareixent en un 30 % dels embarassos de dones alcohòliques (162). La variabilitat observada en la patologia de la síndrome sembla estar relacionada amb diferències en els estadis crítics de l'embaras, en termes de les concentracions màximes d'etanol en sang, freqüència de la ingestió, tipus de begudes, estat nutricional i grau de funcionalitat hepàtica materns, diferències genètiques o adquirides en la susceptibilitat enfront de l'alcohol (263) (veure 1.4.4.1.5.) i possiblement en la capacitat de metabolitzar alcohol per part del fetus o de la placenta. Entre les setmanes 4a. i 10a. després de la concepció, el sistema nerviós central del fetus apareix especialment vulnerable a l'acció nociva de l'alcohol (212).

Malgrat tot, no es coneix encara amb certesa quin és l'agent teratogènic directament responsable de la síndrome ni el paper desintoxicador que poden jugar-hi els sistemes enzimàtics de la placenta o del fetus. En estudis realitzats amb animals model, tant l'etanol com el seu derivat metabòlic, l'acetaldehid, han demostrat ser compostos teratogènics (25, 47, 56, 237, 286, 313). La comprensió dels efectes tòxics i farmacològics d'aquestes dues substàncies durant la gestació requereix l'estudi a nivell molecular dels enzims que participen en el seu catabolisme en el sistema fetoplacentari. El coneixement dels mecanismes de protecció que ofereix la "barrera placentaria" enfront de l'etanol i de l'acetaldehid podria contribuir a l'establiment de noves estratègies terapèutiques i de prevenció.

2. BIOQUÍMICA I FARMACOLOGIA DE L'ETANOL

2.1. Absorció, distribució i eliminació de l'etanol

Quan es consumit, l'etanol és absorbit ràpidament al llarg de tot el tub digestiu, principalment a l'intestí prim, i en menor grau a l'estómac i l'intestí gruixut. L'absorció de l'etanol varia segons el tipus de beguda alcohòlica ingerida, essent inferior en el cas de la cervesa i el vi, comparats amb les begudes destil·lades. També depèn de la quantitat i tipus de menjar ingerit, així com de la velocitat d'eliminació gàstrica. Després de l'absorció intestinal, l'etanol entra en la vena porta i travessa el fetge, abans d'assolir la circulació perifèrica a través de la vena hepàtica.

L'etanol es una substància polar i miscible amb l'aigua en totes les proporcions. Degut al petit tamany d'aquesta molècula i a la seva liposolubilitat, travessa fàcilment la membrana cel·lular per simple difusió. L'etanol difon també ràpidament a través dels capilars i altres membranes i es distribueix en els diferents teixits en estreta proporcionalitat amb la quantitat d'aigua present en el teixit. Així, la concentració en sang serà una mica més elevada que la del múscul, fetge o cervell. L'etanol passa també al líquid ocular, fluïds cerebrospinal i ascític, bilis, saliva, orina i alè (111). En les dones embarassades, travessa lliurement la placenta, trobant-se en el líquid amniòtic, cordó umbilical i en la sang i teixits fetals en la mateixa concentració que en la sang materna (255, 320, 322). Aquestes observacions coincideixen amb les realitzades en animals model que han sigut intoxicats amb etanol: 5 min després de l'administració de l'etanol, les concentracions d'aquesta droga en sang materna i sang fetal són idèntiques (26, 46, 120, 176, 269). A les 3,5 h de la ingestió, quan l'etanol ha sigut pràcticament eliminat de la sang materna, el líquid amniòtic presenta una concentració 10 vegades superior, amb el que el fetus restaria exposat als efectes tòxics de l'etanol més temps de l'esperat (46). Durant el període d'al·letament, l'etanol també apareix en la llet materna (269).

L'etanol no és un component habitual dels fluids corporals. Hom creu que les traces d'etanol trobades en l'organisme provenen de les fermentacions de la flora bacteriana intestinal (184). L'etanol es eliminat activament per l'organisme. D'un 2 a un 10 % és excretat directament en l'aire expirat pels pulmons, l'orina i la suor (201). La major part del seu metabolisme té lloc en el fetge, responsable de més del 75 % de la seva eliminació. El valor màxim de capacitat d'oxidació de l'etanol del fetge humà és de 2 mmol etanol/min, mentre que el metabolisme extrahepàtic s'ha calculat en només 0,4 mmol etanol/min (197).

2.2. Metabolisme oxidatiu de l'etanol

L'etanol, com moltes substàncies tòxiques, és eliminat principalment per oxidació. La cèl·lula hepàtica disposa de tres sistemes enzimàtics per a oxidar l'etanol. Cada un d'ells està localitzat en un compartiment subcel·lular diferent i genera acetaldehid: l'alcohol deshidrogenasa (ADH) en el citoplasma, el sistema microsomal d'oxidació d'etanol (M.E.O.S.) en el reticle endoplasmàtic llis, i la catalasa en els peroxisomes (200). Els dos últims no semblen contribuir significativament al metabolisme de l'etanol en l'home, al menys en situacions normals (65, 74, 134).

La via metabòlica que segueix majoritàriament l'etanol s'indica en la Fig. 1. L'etanol s'oxida primerament a acetaldehid per acció de l'alcohol deshidrogenasa (ADH), utilitzant NAD^+ com a coenzim. A continuació, l'acetaldehid s'oxida a acetat en reacció catalitzada per l'aldehid deshidrogenasa (ALDH), que també utilitza NAD^+ . Per acció de l'acetil-CoA sintetasa, l'acetat s'activa a acetil-CoA, que pot entrar en el cicle de Krebs, on es produirà l'oxidació completa de la molècula, obtenint-se energia metabòlica.

Dos compostos de la via d'oxidació de l'etanol s'han demostrat tòxics

L'etanol no és un component habitual dels fluids corporals. Hom creu que les traces d'etanol trobades en l'organisme provenen de les fermentacions de la flora bacteriana intestinal (184). L'etanol es elimina activament per l'organisme. D'un 2 a un 10 % és excretat directament en l'aire expirat pels pulmons, l'orina i la suor (201). La major part del seu metabolisme té lloc en el fetge, responsable de més del 75 % de la seva eliminació. El valor màxim de capacitat d'oxidació de l'etanol del fetge humà és de 2 mmol etanol/min, mentre que el metabolisme extrahepàtic s'ha calculat en només 0,4 mmol etanol/min (197).

2.2. Metabolisme oxidatiu de l'etanol

L'etanol, com moltes substàncies tòxiques, és eliminat principalment per oxidació. La cèl·lula hepàtica disposa de tres sistemes enzimàtics per a oxidar l'etanol. Cada un d'ells està localitzat en un compartiment subcel·lular diferent i genera acetaldehid: l'alcohol deshidrogenasa (ADH) en el citoplasma, el sistema microsomal d'oxidació d'etanol (M.E.O.S.) en el reticle endoplasmàtic llis, i la catalasa en els peroxisomes (200). Els dos últims no semblen contribuir significativament al metabolisme de l'etanol en l'home, al menys en situacions normals (65, 74, 134).

La via metabòlica que segueix majoritàriament l'etanol s'indica en la Fig. 1. L'etanol s'oxida primerament a acetaldehid per acció de l'alcohol deshidrogenasa (ADH), utilitzant NAD^+ com a coenzim. A continuació, l'acetaldehid s'oxida a acetat en reacció catalitzada per l'aldehid deshidrogenasa (ALDH), que també utilitza NAD^+ . Per acció de l'acetil-CoA sintetasa, l'acetat s'activa a acetil-CoA, que pot entrar en el cicle de Krebs, on es produirà l'oxidació completa de la molècula, obtenint-se energia metabòlica.

Dos compostos de la via d'oxidació de l'etanol s'han demostrat tòxics

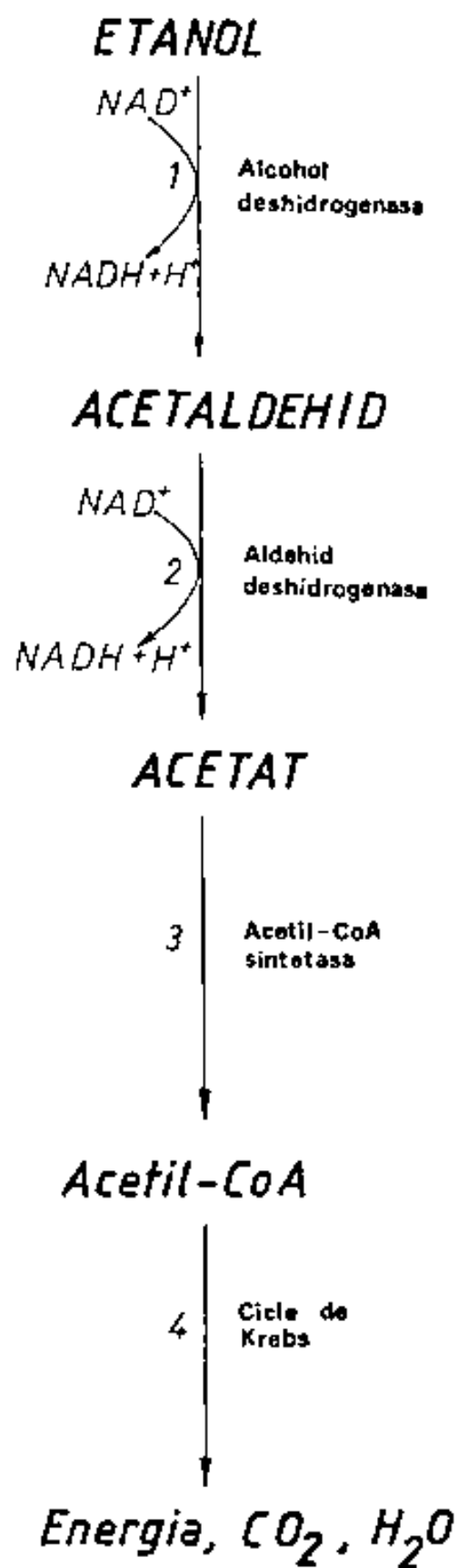


FIGURA 1. Via metabòlica d'oxidació de l'etanol.

per a l'home i responsables dels trastorns ocasionats per l'abús de l'alcohol: el mateix etanol, i l'acetaldehid. La importància i duració dels efectes tòxics dependrà de la concentració d'aquests compostos en la sang i de la velocitat de la seva degradació en les reaccions 1 i 2 de la via metabòlica (Fig. 1). Per altra banda, aquestes reaccions produeixen elevades quantitats de NADH, canviant el potencial d'oxidació-reducció de la cèl·lula, el que pot comportar importants alteracions metabòliques (200).

2.3. Efectes tòxics de l'etanol

Els nivells d'etanol en sang, o alcoholèmia, típics de l'estat d'embriaguesa són de 20-30 mM, si bé es pot arribar a una concentració de 100 mM en casos d'intoxicació molt greu (201). Aquests nivells d'etanol s'assoleixen entre 20 i 120 minuts després de la ingestió d'alcohol.

Com ja s'ha dit, l'etanol és una substància liposoluble, pel que pot desestructurar fàcilment les membranes cel·lulars, implicant l'adequada difusió de nutrients o alterant la funció dels enzims o receptors de membrana (119, 268, 273). Així, l'etanol pot afectar la correcta absorció i digestió dels aliments a nivell intestinal, provocant diversos graus de malnutrició en els alcohòlics (14, 87, 201, 257). En les dones embarassades, pot alterar el transport de les substàncies necessàries per al correcte desenvolupament del fetus a través de les microvellositats placentàries (163, 175, 202, 321). L'etanol s'ha associat amb variacions en la qualitat i quantitat dels fosfolípids que constitueixen les membranes (67, 187, 265, 267). La interacció de l'etanol amb les membranes neuronals s'ha postulat com a possible desencadenant de fenòmens tals com la tolerància o dels efectes sedants de l'alcohol (67, 115, 119, 187, 288).

El consum crònic d'etanol produeix ademés una proliferació de les membranes del reticle endoplasmàtic llis, incrementant-se la capacitat de metabolització d'algunes drogues, entre elles la del propi etanol. Així,

en aquest cas, l'etanol seria oxidat, ademés de per l'ADH, a través d'una segona via, la del sistema microsomal d'oxidació d'etanol (M.E.O.S.), constituint una adaptació metabòlica (199).

2.4. Efectes tòxics de l'acetaldehid

L'acetaldehid es distribueix paral·lelament a l'etanol per tot el medi extracel·lular i intracel·lular de l'organisme, si bé els nivells d'acetaldehid que es poden trobar en la sang d'individus normals després de la ingestió de begudes alcohòliques són 10.000 cops més baixos que els d'etanol. Així, quan la concentració d'etanol en sang és de 25 mM, els nivells d'acetaldehid són inferiors a 2 µM (101, 208, 233, 323), valor situat en el límit de detecció dels mètodes de determinació d'acetaldehid més sensibles. L'acetaldehid s'ha mostrat, però, de 10 a 30 vegades més tòxic que l'etanol i amb poder mutagènic i teratogènic (56, 120).

L'acetaldehid, com la majoria dels aldehids, és un compost extremadament reactiu, unint-se als grups amino i als grups cisteïna lliures de les proteïnes (45). Dins del metabolisme cel·lular, pot afectar a la síntesi i secreció de proteïnes (160), desencadenar la formació de cataractes al cristal·lí (66) i promoure la peroxidació de lípids a través de la seva unió al glutatió reduït (160, 316). Igualment, s'ha descrit que pot induir alteracions morfològiques i funcionals en els mitocondris, minvant la seva capacitat respiratòria. Lieber i col. (201) han postulat un cercle viciós com a mecanisme de deterioració de la funció mitocondrial i dany posterior de la cèl·lula hepàtica en alcohòlics, en el que hi jugarien un paper primordial l'aldehidisme crònic i una activitat ALDH disminuïda (201, 324) (veure I.4.4.1.4.).

Entre els nombrosos efectes fisiològics de l'acetaldehid cal esmentar un conjunt de símptomes d'origen al·lèrgic, coneguts amb el nom de "vermellor facial" o "flushing", com són un augment de la temperatura dèrmica, vasodilatació perifèrica, acceleració del ritme cardíac, nàusees i mal d'estómac (114).

L'acetaldehid, transportat fins al cervell, podria actuar a dos nivells : inhibint competitivament l'oxidació dels aldehids derivats de les amines biògenes i provocant la seva acumulació, o bé reaccionant no enzimàticament amb les amines biògenes. En ambdós casos es formarien productes de condensació anomenats tetrahidroisoquinolines (tetrahidropapaverolina i saolsinol), amb una estructura molt semblant a la de substàncies psicoactives o al·lucinògenes com la morfina. Fenòmens tals com l'addicció o la tolerància a l'alcohol i la síndrome d'abstinència poden tenir el seu origen en els efectes neuroquímics de l'acetaldehid, sobretot en alcohòlics crònics, que generalment presenten una acetaldehidèmia més elevada (veure 1.4.4.1.4.). Malgrat tot, els nivells d'acetaldehid detectats en cervell són molt baixos (303).

Alguns efectes farmacològics de l'acetaldehid són antagonistes dels efectes directes de l'etanol, com el cas de l'alliberació de catecolamines (3), contrarrestant els efectes sedants de l'alcohol (324).

2.5. Efectes tòxics de l'excessiva generació de NADH

Les reaccions catalitzades per l'ADH i l'ALDH, al augmentar la relació $NADH / NAD^+$, produeixen un notable desequilibri en l'estat red-ox de la cèl·lula, sobretot en el fetge dels individus que pateixen alcoholisme crònic. Per tal de contrarrestar aquest efecte, molts metabolits veuen alterades les seves concentracions normals. Dos fenòmens són especialment interessants: l'augment de lactat i l'estimulació de la síntesi de triglicèrids.

- L'augment de la relació lactat / piruvat redueix la disponibilitat de piruvat per a la gluconeogènesi, produint-se hipoglucèmia. L'excessiva producció de lactat també causa hiperlacticèmia, que contribueix a l'acidosi. Per altra banda, el lactat interfereix en l'excreció renal de l'acid úric, provocant hiperuricèmia. S'ha postulat que la sobreproducció de lactat per part del fetge podria

jugar un paper important en el desenvolupament de la fibrogènesi hepàtica, ja que el lactat és un conegut activador de la peptidil prolina hidroxilasa, enzim implicat en la síntesi de col.lagen. La formació de dipòsits de col.lagen en el fetge podria trobar-se en l'origen de la cirrosi alcohòlica.

- S'afavoreix la síntesi de α -glicerol-fosfat i d'àcids grassos, precursors dels triglicèrids, propiciant el desenvolupament del fetge gras. L'excés de triglicèrids al fetge és compensat en part per una alliberació de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) a la sang, causant una lleugera hiperlipèmia. L'excés d'àcids grassos també contribueix a formar cossos cetònics, única font d'energia per al cervell en cas de hipoglucèmia, els quals al ésser segregats a la sang produeixen cetosi (20).

Malgrat els dos tipus de mecanismes esmentats per al manteniment de l'equilibri red-ox, quan la producció de NADH és massa elevada, la cèl.lula, per tal d'oxidar el NADH, entra en estat hipermetabòlic en el que es produeix un gran consum d'oxigen. Si la cèl.lula es troba en una regió del teixit poc irrigada, pot sofrir un seriós dèficit d'oxigen, o hipoxia, que pot desembocar en la mort de la cèl.lula, o necrosi cel.lular (20). Aquest és el cas de les cèl.lules hepàtiques de la zona perivenular o pericentral, que en molts alcohòlics crònics presenten signes de necrosi (49, 299).

3. ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH)

3.1. Propietats generals de l'ADH

L'alcohol deshidrogenasa (alcohol:NAD oxidoreductasa, EC 1.1.1.1) és un enzim NAD(H)-dependent que catalitza la interconversió de l'etanol i altres alcohols amb els aldehids corresponents.



La reducció dels aldehids està molt més afavorida termodinàmicament que no pas l'oxidació dels alcohols. Malgrat tot, ha sigut aquesta darrera la reacció més estudiada. L'etanol és oxidat eficientment per l'enzim "in vivo", gràcies a la ràpida desaparició del seu producte, l'acetaldehid, per acció de l'aldehid deshidrogenasa (197).

L'activitat ADH ha sigut detectada en tots els organismes en que ha sigut investigada, havent-se aïllat l'enzim en éssers vius de diferent nivell de complexitat, tals com bacteris, fongs, llevats, insectes, plantes i animals (42, 289). La majoria de les ADH conegudes, a excepció de l'ADH de Drosophila melanogaster, pertanyen a la família de les "deshidrogenases de cadena llarga" i són metalloenzims que requereixen zinc per a la seva activitat (165). En general, són oligòmers amb un pes molecular que oscil·la entre 50.000-60.000 en les plantes i 150.000 en els llevats, contenen un o dos àtoms de zinc per subunitat i uneixen una molècula de NADH per centre actiu.

En els mamífers, l'enzim es localitza principalment en el fetge, on representa aproximadament entre el 3 i el 10 % de la proteïna soluble total (51, 76), el que suggereix una important funció de l'ADH, fins ara desconeguda, en el metabolisme intermediari. L'ADH també es troba en altres teixits en concentracions que no superen mai el 10 % de l'activitat hepàtica (256). En ordre decreixent, els teixits que presenten més activitat ADH en l'home són fetge, intestí, ronyó, pulmó,

estómac, retina, prostata i melsa (185, 228). Moltes cèl·lules especialitzades de certs teixits contenen elevades concentracions d'ADH tot i que l'activitat total del teixit és petita. S'ha suggerit que molts teixits podrien sofrir directament els efectes tòxics de l'acetaldehid o de l'increment de NADH, per l'augment local del metabolisme de l'etanol, malgrat que les concentracions d'acetaldehid en sang o en la resta de cèl·lules del teixit fossin baixes (256, 324). Aquest fenomen explicaria la degeneració preferent de certs teixits, com el fetge, i de certes regions del teixit, com les zones pericentrals hepàtiques, en casos d'alcoholisme greu (49) (veure I.2.5.).

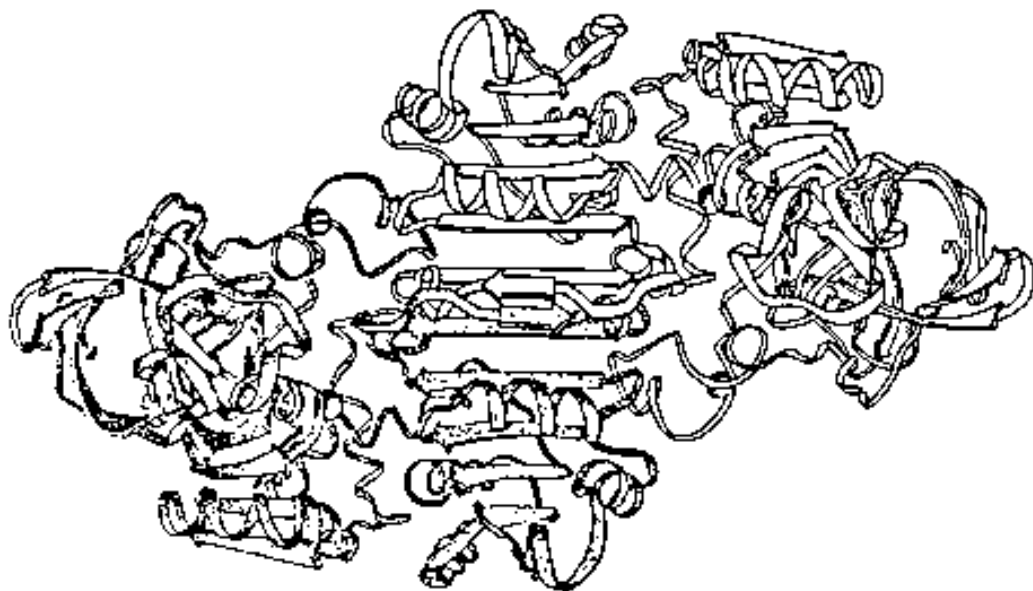
En general, l'ADH de mamífer és una proteïna dimèrica d'uns 80.000 dalton de pes molecular, amb dues subunitats idèntiques de 40.000 dalton unides no covalentment. L'enzim utilitza NAD(H) com a coenzim. Cada molècula d'enzim és capaç d'unir dues molècules de NADH. Cada subunitat conté dos àtoms de zinc, un dels quals es troba en el centre actiu i es essencial per a l'activitat enzimàtica, mentre que l'altre sembla intervenir en el manteniment de l'estructura terciària.

L'ADH de fetge de cavall ha sigut la més estudiada, coneixent-se des de fa temps la seva seqüència d'aminoàcids (164) i l'estructura tridimensional, determinada per cristal·lografia de raigs X (41). Cada subunitat està formada per un domini de fixació del coenzim (amb una conformació similar a la d'altres deshidrogenases NAD⁺-depenents) i un domini catalític. El domini de fixació del coenzim conté el seti d'unió dels anions o lloc on interacciona el grup pirofosfat del NAD⁺(H). Els dos dominis de fixació del coenzim formen conjuntament el nucli de la molècula i estan separats dels dos dominis catalítics per dues llargues i profundes esclletxes (Fig. 2a i 2b). Quan el coenzim s'uneix a l'enzim, el centre actiu resta només accessible a través d'un llarg túnel hidrofòbic d'una longitud de 15-20 Å, que pot albergar una cadena alifàtica de 9 a 11 carbonis (Fig. 2c) (100, 246). La disminució de la Km dels alcohols primaris alifàtics i aldehids alifàtics al augmentar la longitud de la cadena carbonada posa de relleu la importància de les interaccions hidrofòbiques en la fixació del substrat (76, 190).

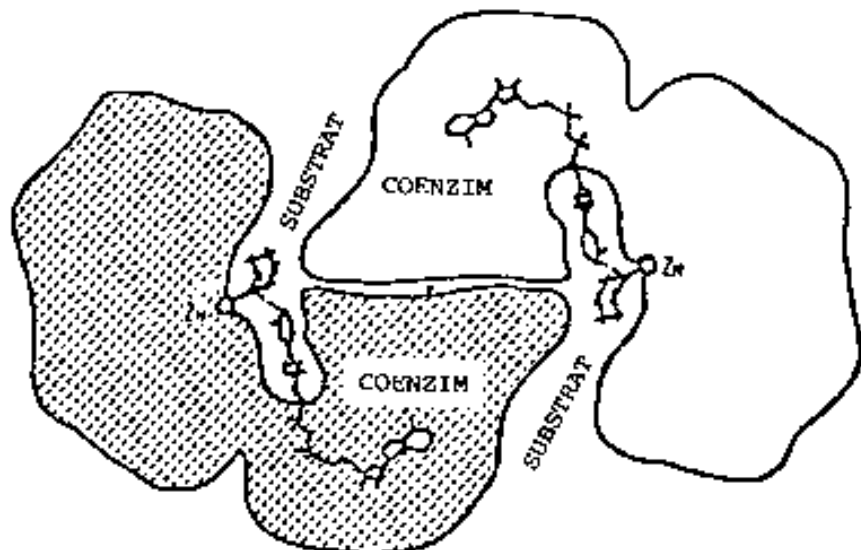
- FIGURA 2**
- a) Estructura tridimensional de la molècula dimèrica de l'ADH de fetge de cavall. Les fletxes representen estructures β . Les esferes són els àtoms de Zn. La molècula és un el·lipsoide de dimensions 45 x 60 x 110 Å .
 - b) Esquema de la matcixa molècula mostrant els dominis catalític i de fixació del coenzim.
 - c) Esquema del centre actiu de l'enzim i del túnel hidrofòbic.

Reproduït de Eklund (100) i Pietruszko (246).

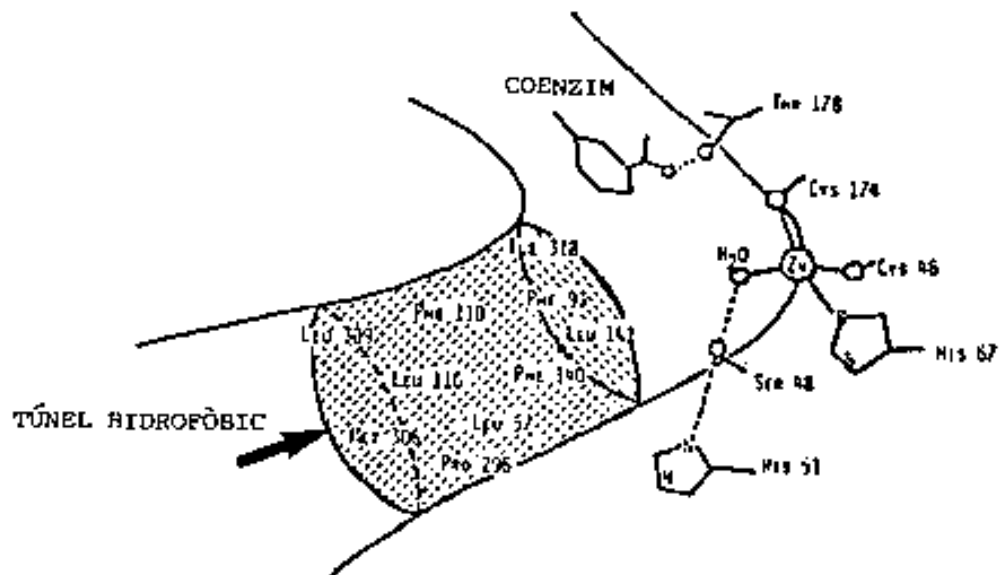
a



b



c



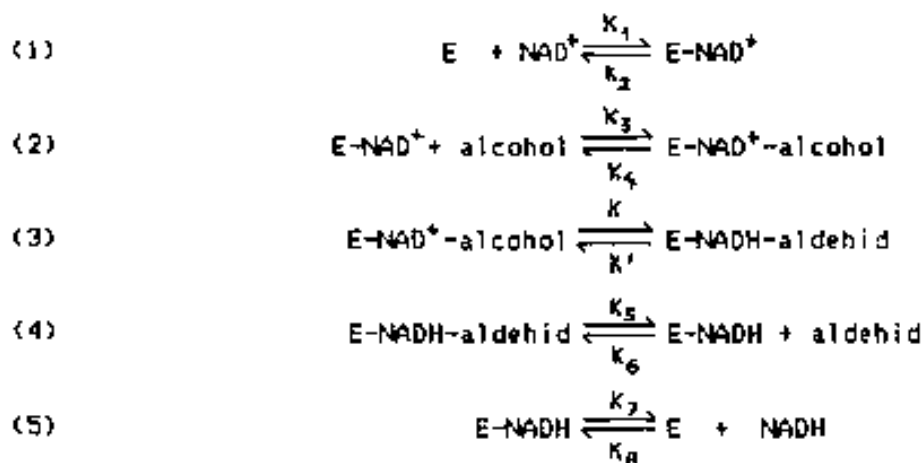
3.2. Mecanisme catalític de l'ADH

L'àtom de zinc del centre actiu de l'enzim està unit per enllaços coordinats als grups tiol de les Cys-46 i Cys-174 i a l'imidazole de la His-67. El quart lligam és una molècula d'aigua ionitzable que interacciona per un pont d'hidrogen amb el grup hidroxil de la Ser-48, la qual a la vegada està unida per un altre pont d'hidrogen a la His-51, formant un sistema d'alliberació de protons (Fig. 2c). L'àtom d'oxigen de l'alcohol o l'aldehid es fixa directament a l'ió Zn desplaçant la molècula d'aigua i amb la cadena carbonada dirigida cap al túnel hidrofòbic. El coenzim actua com a àcid o base alliberant o captant un protó (43).

3.3. Mecanisme cinètic de l'ADH

L'ADH, com altres deshidrogenases NAD^+ -depenents, requereix la unió de dues molècules per a l'activitat enzimàtica: alcohol o aldehid, i el coenzim.

La reacció reversible catalitzada per l'ADH té lloc en cinc passos:



$k_1, k_2, k_3, k_4, k_5, k_6, k_7, k_8, k$ i k' són constants de velocitat.

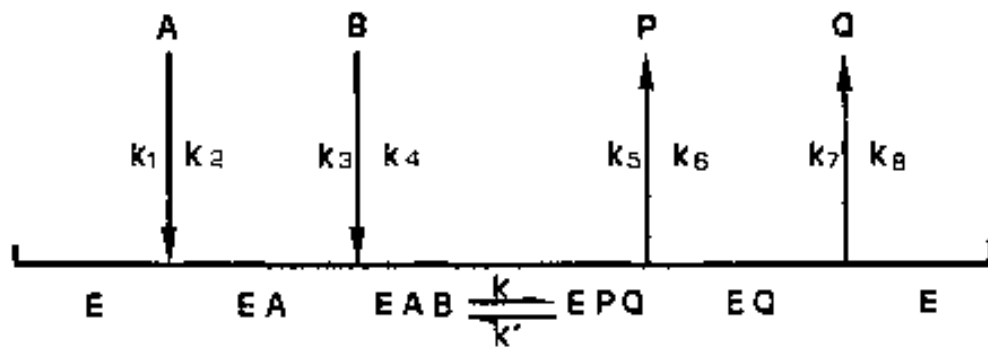


FIGURA 3 Esquema del mecanisme seqüencial ordenat BiBi.
 En el cas de l'ADH, E = enzim, A = NAD⁺,
 B = alcohol, P = aldehid i Q = NADH.

L'enzim segueix un mecanisme seqüencial ordenat BiBi, en el que primer s'uneix el coenzim i després el substrat. La unió prèvia del coenzim produeix un canvi conformacional que facilita la posterior unió del substrat (veure 1.3.1.). Una vegada realitzat el canvi red-ox, el producte es dissocia en primer lloc seguit pel coenzim (96, 245, 272, 335) (Fig. 3).

Amb l'etanol i la majoria d'alcohols primaris alifàtics, i amb concentracions saturants tant de substrat com de coenzim, el pas limitant de la reacció és la dissociació del coenzim (pas 5). Es a dir, $k_{cat} = k_7$ (245).

$k_{cat} = v_{max} / [E]_t =$ constant catalítica

$v_{max} =$ velocitat màxima

$k_7 =$ constant de velocitat de dissociació del NADH

(Per a una definició més àmplia de les constants cinètiques K_m , k_{cat} i k_{cat}/K_m , veure III.2.2.2.).

3.4. Concepte d'isoenzim

Segons les darreres recomanacions de la "IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature", els isoenzims són formes múltiples d'enzims que catalitzen la mateixa reacció bioquímica i que difereixen en la seva estructura primària com a conseqüència d'un origen genètic diferent, i no de la modificació posttraduccional d'una única seqüència (155).

Els isoenzims poden ser al·lèlics o no al·lèlics, depenent de si les diferents formes moleculars són codificades per un sol locus genètic o per més d'un. En el cas dels isoenzims al·lèlics, o al·lelozims, es presenta polimorfisme o diferents variants al·lèliques en la població (224).

Moltes vegades, variacions en la seqüència proteica impliquen diferències en la càrrega elèctrica dels isoenzims, el que possibilita la seva separació i identificació per tècniques tals com la cromatografia de bescanvi iònic, l'electroforesi o l'electrofocalització.

3.5. Isoenzims de l'ADH humana

L'electroforesi en gel de midó d'un homogenat de fetge humà revela la presència de 9-18 bandes d'activitat ADH, variant el seu nombre i abundància relativa d'individu a individu segons la dotació genètica, edat, estat de salut i estat de conservació de la mostra hepàtica (Fig. 4).

Smith i col. (282) i Adinolfi i col. (5) han postulat un model genètic en el que l'ADH ve codificada per al menys 5 loci genètics, anomenats ADH_1 , ADH_2 , ADH_3 , ADH_4 , i ADH_5 . Els productes dels tres primers gens, les subunitats α , β i γ , es combinen a l'atzar formant els isoenzims dimèrics (homodímers i heterodímers) fisiològicament actius de la classe I. ADH_2 i ADH_3 presenten ademés varis al·lels en la població (ADH_2^1 , ADH_2^2 , ADH_2^{int} , ADH_3^1 i ADH_3^2), donant lloc a subunitats β_1 , β_2 , β_{int} , γ_1 i γ_2 , que incrementen notablement la complexitat del sistema. La freqüència dels diferents fenotips varia àmpliament entre els diversos grups ètnics i racials. ADH_4 i ADH_5 codifiquen, respectivament, per als isoenzims de les classes II (π -ADH) i III (χ -ADH) (Fig. 5).

Recentment, s'ha iniciat l'anàlisi dels gens ADH, aïllant-se un cDNA que codifica per a la subunitat β_1 (90, 148). Aquest cDNA ha sigut utilitzat per a localitzar el gen ADH_2 en el braç llarg del cromosoma 4 (90).

En l'home, a part dels isoenzims hepàtics, existeix un isoenzim d'estómac, no detectat en fetge, que migra lentament cap el càtode a pH 8,2 (135, 282, 285).

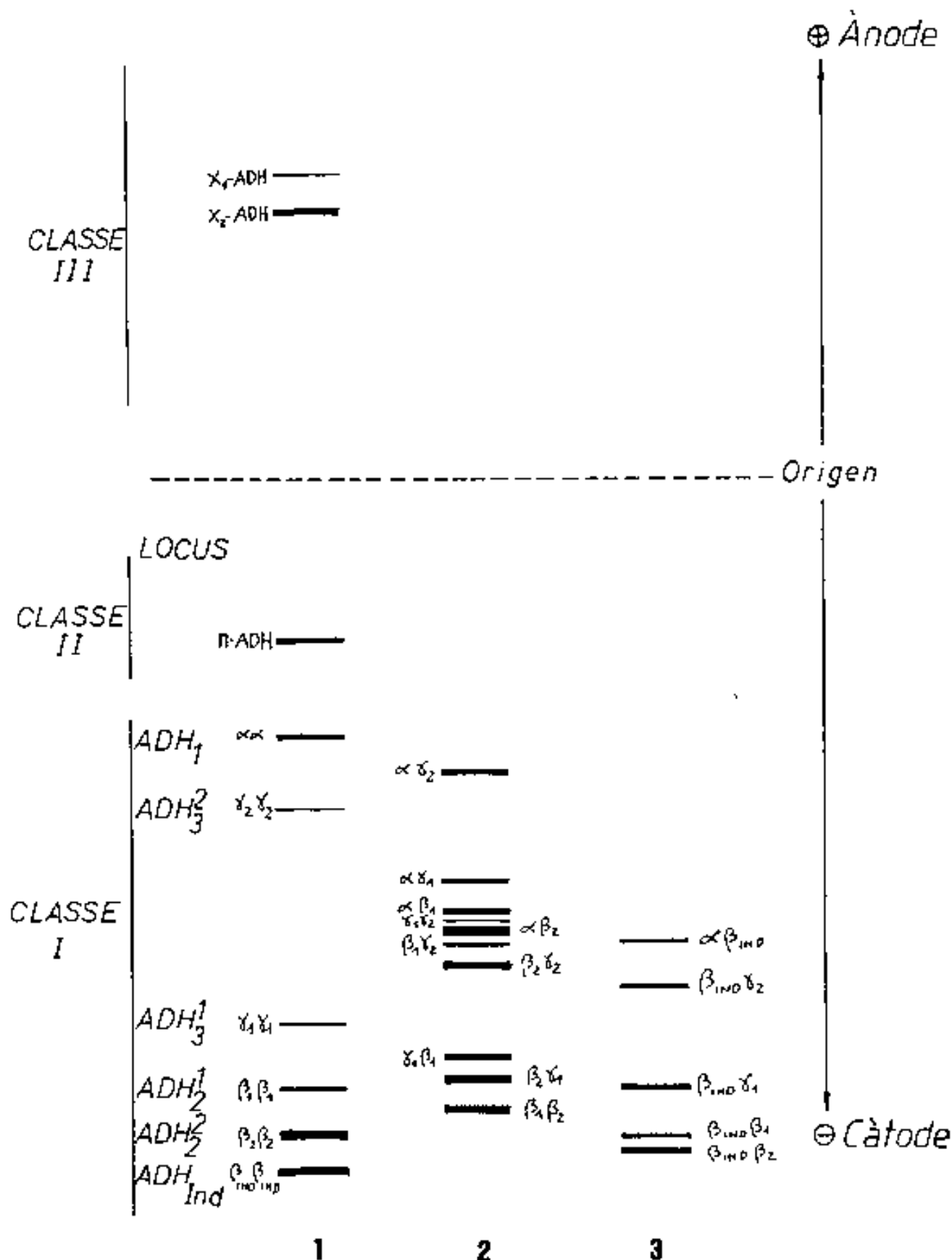


FIGURA 4 Esquema de l'electroforesi en gel de midó dels isoenzims de l'ADH humana a pH 8,2.

En total existeixen 24 bandes diferents. No s'ha observat mai l'isoenzim $\beta_2\beta_{Ind}$.

1. Homodimers
2. Heterodimers
3. Heterodimers amb β_{Ind}

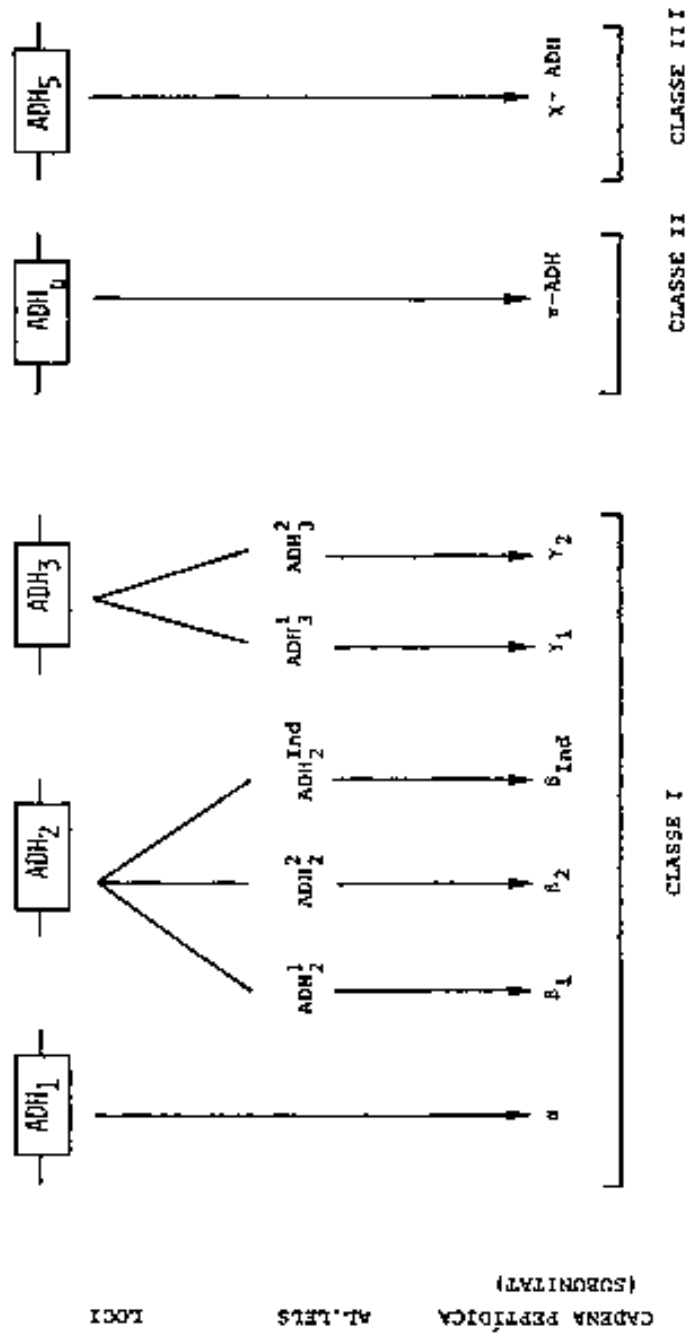


FIGURA 5 Origen genètic dels isoenzims de l'ADH humana.

TAULA I. Algunes propietats físico-químiques i cinètiques dels isoenzims de les classes I, II i III de l'ADH humana i de l'ADH de cavall^a.

Propietat	Classe Ib	Classe II	Classe III	ADH cavall ^c
pes molecular dímer	85.000	78.000-85.000	82.700	83.000
pes molecular monòmer	42.000	42.000	41.000	40.000
PI	9,3-11	8,6	6,4	B
n° Cys/subunitat	14	14	14	14
E280 (M-1,cm-1)	49.300	57.000	77.600	34.860
Zn (àtoms/molècula)	3,6-4,2	3,7	3,8	4
coenzim	NAD ⁺ (H)	NAD ⁺ (H)	NAD ⁺ (H)	NAD ⁺ (H)
mol NADH/mol enzim	2	2	2	2
pH òptim d'oxidació	10,5	10,4	11,0	10,0
mecanisme cinètic	seq. ord. BiBi	seq. ord. BiBi	n.d.	seq. ord. BiBi
especificitat de substrat	molt àmplia	- primaris alifàtics de cadena llarga - aromàtics	primaris alifàtics de cadena llarga	molt àmplia
Km etanol pH 7,5 (mM)	1-2	34	> 5.000	0,35
Km octanol pH 10,0 (µM)	5-20	7	400	14
kcat màxima alcohols				
primaris alifàtics,	440	500	440	600
pH 10,0 (min-1)				
Ki 4-metilpirazole (µM)	2	2000	> 50.000	0,13

^aveure referències 31, 37, 39, 85, 239, 312, 318, 319.

^bBerreja d'isoenzims retinguts per una columna de CapGapp-Sepharose.

^cADH comercial de fetge de cavall, majoritàriament l'isoenzim EE.

n.d., no determinat.

TAULA II. . Constants cinètiques per a l'etanol dels isoenzims homodímers de l'ADH humana a pH 7,5 i a pH 10,0^a.

	Classe I			Classe II			Classe III		
	Isoenzim			Isoenzim			Isoenzim		
	$\alpha\alpha$	$\gamma_2\gamma_2$	$\gamma_1\gamma_1$	$\beta_1\beta_1$ (ADH tipica)	$\beta_2\beta_2$ (ADH atípica)	$\beta_1\beta_2$ (ADH Ind)	$\beta_1\beta_2$ (ADH Ind)	π - ADH	X-ADH
pH 7,5									
coeficient Hill (h)	0,98	0,55	0,54	0,94	n.d.	1,0	1,01	n.d.	
Km o (S) _{0,5} (mM)	4,2	0,63	1,0	0,049	0,94	64	34	n.s.	
Ki (mM) _{0,5}	830	n.i.	n.i.	440	340	n.d.	n.i.	n.i.	
Vmax (U/ μ mol seti actiu)	27	35	87	9,2	400	560	20	n.s.	
pH 10,0									
Km (mM)	1,5	1,7	3,2	1,6	2,1 ^c	n.d.	120	n.s.	
kcat (min ⁻¹)	300	240	440	36	1520 ^c	1120 ^d	470	n.s.	
kcat/Km x 10 ⁻⁵ (M ⁻¹ .min ⁻¹)	2	1,4	1,4	0,2	7,2 ^c	n.d.	0,04	0,002 ^e	

^a Veure referències 31,32,34,35,37,38,318,319,336,337,338 .

^b Ki, constant d'inhibició per substrat definida per Cleland (64) .

^c Mesurada a pH 8,5

^d Mesurada a pH 7,5

^e Valor calculat a partir del pendent de la recta resultant de la representació de v enfront de (S) (veure III.2.2.2.) .

n.d., no determinat; n.s., no s'observà saturació de l'enzim; n.i., No s'observà inhibició per substrat.



Vallee i Bazzone han dividit els isoenzims coneguts de l'ADH humana en tres classes (I, II i III), d'acord amb el seu punt isoelèctric, la sensibilitat a l'inhibidor 4-metilpirazole i les propietats cinètiques (312) (Taula 1), no descartant-se l'existència de noves classes. Les anàlisis d'aminoàcids, dades dels pèptids tríptics (246), estudis immunològics (4, 5, 312, 319) i experiments de dissociació-recombinació de subunitats (34, 35, 50, 283) suggereixen ademés que les tres classes difereixen significativament en l'estructura primària, encara que el pes molecular es similar. Els estudis cinètics revelen que l'especificitat de substrat de cada classe és diferent i probablement indicativa de la seva funció metabòlica. Un fet que emergeix de l'anàlisi de les dades cinètiques és que l'etanol no apareix com el millor substrat en cap dels isoenzims de les tres classes (318, 319) (Taula II). Classes d'isoenzims amb propietats similars als humans s'han observat en altres espècies (10, 39, 70, 71, 72, 172, 292).

3.5.1. Isoenzims de la classe I

Aquests isoenzims migren ràpidament cap al càtode en electroforesi en gel de midó a pH 7,7-8,6 (Fig. 4), tenyint-se preferentment amb etanol. El seu punt isoelèctric és superior a 10. Són inhibits per 4-metilpirazole, inhibidor competitiu del substrat, a una concentració de l'ordre de 10^{-6} M ($K_i = 2 \mu\text{M}$), el que ha possibilitat la seva purificació mitjançant cromatografia d'afinitat en CapGapp-Sepharose (189, 190).

- Oxidació dels alcohols

Els 10 isoenzims formats per la combinació de les subunitats α , β_1 , γ , i β_2 presenten perfils similars d'activitat d'oxidació dels alcohols en funció del pH, amb un màxim situat a pH 10,0-10,5 (33), encara que les seves constants cinètiques varien de forma desigual amb el pH (35).

L'especificitat de substrat de la classe I és la més àmplia, doncs tots els isoenzims són capaços d'oxidar alcohols alifàtics primaris, cíclics, aromàtics i ω -hidroxiàcids. Metanol i 1,2-etanodiol, encara que

pòbrament, també són oxidats (318) (Taula III). Les Km per a l'etanol, que és un dels pitjors substrats, són de l'ordre de 10^{-3} M i pràcticament idèntiques per a tots els isoenzims, a excepció dels isoenzims amb subunitats $\beta_1\beta_1$ (Taula II). Malgrat tot, els isoenzims de la classe I serien els principals responsables de l'eliminació de l'etanol en l'organisme després de la ingestió d'aquesta droga en dosis moderades.

$\alpha\alpha$, $\beta_1\beta_2$ i $\beta_2\beta_2$, però no $\gamma_1\gamma_1$ ni $\gamma_2\gamma_2$, presenten inhibició per substrat, amb una Ki per a l'etanol a pH 10,0 de 830 mM, 440 mM i 340 mM, respectivament, el que es reflecteix en la corba de saturació amb etanol que presenta la barreja d'isoenzims de la classe I (Fig. 6). Els isoenzims que contenen la subunitat α tenen una elevada eficiència catalítica (Kcat/Km) amb tots els substrats examinats, contràriament als que contenen la subunitat β_1 . En general, els millors substrats són l'octanol, l'àcid 16-hidroxihexadecanoic, ciclohexanol i alcohol benzílic (318). El valor de kcat es manté pràcticament constant enfront dels alcohols primaris alifàtics de diferent longitud de cadena, el que reflecteix probablement un mateix pas limitant en l'oxidació d'aquests alcohols: la dissociació del NADH.

- Reducció dels aldehids

En quant a la reducció dels aldehids, l'octanal apareix com el millor substrat per a tots els isoenzims (Taula III). En aquest cas, l'alliberació del coenzim sembla ser també el pas limitant del mecanisme cinètic. La velocitat de dissociació del NAD^+ és més elevada que la del NADH, resultant normalment més ràpida la reacció de reducció de l'aldehid que no pas la d'oxidació del corresponent alcohol (76).

- Propietats cinètiques generals

Les constants cinètiques per a un heterodímer determinat no són generalment la mitjana dels valors obtinguts per als dos homodímers constituïts per cada una de les subunitats de l'heterodímer, el que indica efectes cooperatius entre les subunitats. Aquest fenomen constitueix la base d'una forma de regulació del metabolisme per mitjà d'una gran quantitat d'enzims dimèrics, que podrien tenir funcions metabòliques diverses i que es formarien per combinació d'uns pocs

TAULA III. Constants cinètiques dels isoenzims de la classe I de l'ADH humana

<u>Alcoholes^a</u>	<u>K_m (μM)</u>	<u>k_{cat} (min⁻¹)</u>	<u>k_{cat}/K_m (x 10⁻⁵ M⁻¹ min⁻¹)</u>
metanol ^b	150.000	12	0,0008
etanol ^c	2.700	240	0,9
pentanol ^c	40	240	60
octanol ^b	8	260	320
ciclohexanol ^b	8	180	230
alcohol benzílic ^b	12	280	230
1,2-etanodiol ^b	50.000	72	0,01
àcid hidroxihexa- -decanoic ^b	10	100	120

<u>Aldehids^d</u>			
formaldehid ^{c,e}	24.000	20	0,008
acetaldehid ^b	1.300	1.100	8,5
pentanal ^b	23	1.800	780
octanal ^b	1-2	1.300	8.700
ciclohexanona ^b	130	230	18
benzaldhid ^b	30	280	93

^a Activitat mesurada en tampó glicina-NaOH 0,1 M , pH 10,0 , NAD⁺ 2,4 mM.

^b Activitat mesurada amb l'isoenzim QY₁ (76 ,318).

^c Activitat mesurada utilitzant una barreja d'isoenzims, de la classe I,(190).

^d Activitat mesurada en tampó TES 50 mM, pH 7,0 , NADH 0,213 mM (76).

^e Activitat mesurada en tampó fosfat monossòdic 50 mM, pH 6,8 , NADH 0,26mM.

TES : Àcid N-(tris (hidroximetil) metil)-2-aminoetasulfònic.

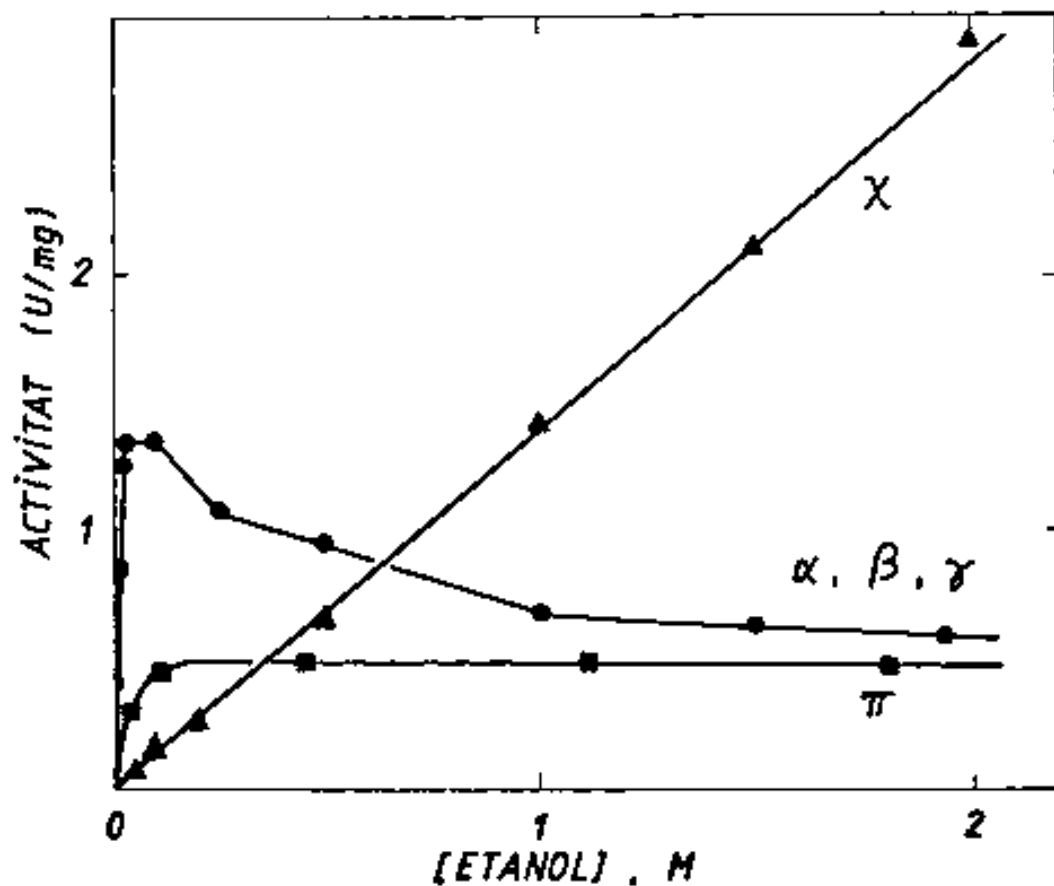


FIGURA 6 Variació de l'activitat d'oxidació de l'etanol en funció de la concentració de substrat per als isoenzims de l'ADH humana: l'activitat dels isoenzims de la classe I (-●-) i de la classe II (-■-) va ser mesurada a pH 7,5 , mentre que la de χ -ADH (classe III) (-▲-) va ser mesurada a pH 10,0 . Reproduït de Vallee i Bazzone (312).

monòmers (35, 76, 318).

Estudis preliminars realitzats amb $\beta_1\beta_1$ havien suggerit un mecanisme cinètic seqüencial ordenat BiBi per als isoenzims de la classe I (88). Recentment, s'ha confirmat que els isoenzims $\alpha\alpha$, $\beta_1\beta_1$ i $\beta_2\beta_2$ semblen seguir aquest mecanisme, però no $\gamma_1\gamma_1$ i $\gamma_2\gamma_2$, que a pH 7,5 presenten cooperativitat negativa (35, 336).

- Propietats estructurals

Malgrat pertànyer a la mateixa classe d'isoenzims, les subunitats β_1 i γ_1 difereixen en 21 posicions en la seva estructura primària (53, 139). La Ser-48 del centre actiu de γ_1 d'home i E de cavall és substituïda per una treonina en la subunitat β_1 (Fig. 2), distorsionant el sistema d'alliberació de protons (veure 1.3.2.), alterant-se els requeriments estèrics del substrat, l'eficiència catalítica (Taula 11) i el grau d'activació per clorurs (54, 55). Les diferències estructurals observades suggereixen que les duplicacions gèniques que donaren lloc als gens ADH₂ i ADH₃ en l'home i als gens que codifiquen per a les subunitats E i S en el cavall són dos successos diferents i separats evolutivament (54). Per altra banda, cal tenir en compte que encara que γ_1 i E són les formes més properes estructuralment, i per tant evolutivament, les formes més abundants són β_1 i E, el que indica que l'expressió relativa dels gens ha variat en el curs de l'evolució (166).

3.5.1.1. Variabilitat isoenzimàtica de l'ADH

- Fenotip "ADH atípica"

Més del 85 % dels homogenats de fetge d'individus orientals (126, 337) i entre un 5 i un 25 % d'individus europeus i americans (106, 195, 281, 285) presenten en electroforesi de gel de midó bandes més catòdiques que l'isoenzim $\beta_1\beta_1$ (Fig.4). Aquests homogenats, mostren además un pH òptim d'oxidació de l'etanol de 8,5-8,8 (336). Aquests trets característics conformen el fenotip "ADH atípica". Els individus amb una

ADH atípica presenten l'al·lel ADH_2^A , el qual codifica per a la subunitat β_2 .

Estudis recents han demostrat que, estructuralment, la subunitat β_2 només difereix de β_1 en el canvi d'una arginina (Arg) per una histidina (His) en la posició 47 de la cadena polipeptídica, el que és compatible amb la mutació d'una sola base en el gen ADH_2 . Aquesta Arg es troba també present en les subunitats β_1 humana, E i S de cavall, en l'ADH de rata i en la de pollastre, el que suggereix que l'al·lel mutant és ADH_2^A , o sigui el que codifica per a la His (52, 167). Aquest canvi en l'estructura primària altera el seti de fixació dels anions o lloc on interacciona el grup pirofosfat del coenzim (veure I.3.1.), explicant-se totes les propietats cinètiques característiques de l'isoenzim $\beta_2\beta_2$, com ara una Km per al NAD^+ i $NADH$ 20 vegades més alta que la de $\beta_1\beta_1$, una elevada activitat específica (82 vegades més alta a pH 8,5) (336, 339) (Taula II), un pH òptim més baix d'acord amb el pKa inferior del grup imidazole de la His, insensibilitat a l'activació per clorurs (49) i una velocitat d'inhibició per iodoacetat més lenta (37, 38).

- Fenotip "ADH Indianapolis"

El 29 % de la població negra d'Indianapolis (E.U.A.) presenta el fenotip "ADH Indianapolis", el qual no s'ha observat en poblacions d'origen racial diferent (34). Els homogenats de fetge es caracteritzen per un màxim d'activitat d'oxidació d'etanol a pH 7,0 i l'aparició de bandes més catòdiques que l'isoenzim $\beta_1\beta_1$ en electroforesi de gel de midó (Fig. 4). Els individus amb ADH Indianapolis presenten l'al·lel ADH_2^{Ind} que codifica per a la subunitat β_{Ind} . A pH fisiològic, l'homodímer i els heterodímers amb β_{Ind} presenten Km per a l'etanol entre 56 i 74 mM (33), més elevades que la de π -ADH (34 mM). Així mateix, l'homodímer posseeix una activitat específica de 7 U/mg (36, 38), valor que ultrapassa el de l'isoenzim $\beta_2\beta_2$ (Taula II).

3.5.1.2. Distribució tissular

Els tres gens, ADH₁, ADH₂ i ADH₃ s'expressen diferentment segons l'òrgan o teixit i l'estadi del desenvolupament considerats, indicant una clara regulació de l'expressió genètica.

Les subunitats α s'han observat en fetge i ronyó d'adult, i en fetge de fetus (281).

Les subunitats β_1 i β_2 , en fetge, ronyó, pulmó, pell, fibroblasts i arrel de cabell d'adult, i en fetge i pulmó de fetus. Pell, fibroblasts i arrel de cabell permeten determinar còmodament la presència del fenotip "ADH atípica" en la població (113). Les mostres de pulmó de fetus donen informació sobre el locus ADH₂ quan en el fetge encara no han aparegut les subunitats β_1 o β_2 (281).

Les subunitats γ_1 i γ_2 es troben en fetge, ronyó, estómac i intestí d'adult, i en ronyó i intestí de fetus. El fetge de fetus no presenta isoenzims amb subunitats γ_1 o γ_2 , però l'anàlisi dels isoenzims de ronyó o intestí permet determinar el fenotip ADH₃ (281, 282) (veure 1.5.2).

3.5.2. Isoenzims de la classe II (π -ADH)

Aquesta classe està constituïda per l'isoenzim específic de fetge π -ADH (85), el qual migra entre l'origen i l'isoenzim α en electroforesi en gel de midó a pH 8,2 (Fig. 4). π -ADH es detecta en totes les biòpsies de fetge, però no sempre en les mostres procedents d'autòpsia, degut a la seva inestabilitat (195, 261, 281).

La característica més sobresortint de la π -ADH és la K_i per al 4-metilpirazole, 2 mM, 1.000 cops més elevada que la dels isoenzims de la classe I, el que impossibilita la seva unió a una columna de CapGapp-Sepharose.

La seva elevada K_m per a l'etanol a pH 7,5, 34 mM (31), i la seva

TAULA IV. Constants cinètiques dels isoenzims de la classe II de l'ADH humana.

<u>Alcohols</u> ^a	<u>K_m</u> (μM)	<u>k_{cat}</u> (min ⁻¹)	<u>k_{cat}/k_m</u> (x 10 ⁻⁵ M ⁻¹ min ⁻¹)
metanol	n.a.	n.a.	n.a.
etanol	120.000	470	0,04
pentanol	90	480	50
octanol	7	500	710
ciclohexanol	210.000	35	0,002
alcohol benzilic	7	550	790
1,2-etanodiol	290.000	45	0,002
àcid 16-hidroxi- hexadecanoic	60	370	60

Aldehids^b

acetaldehid	8.300	650	0,8
pentanal	53	920	170
octanal	6,8	1.200	1.800
ciclohexanona	100	20	2
benzaldehid	10	450	450

^a Activitat mesurada en tampó glicina:NaOH , pH 10,0 , en presència de NAD⁺ 2,4 mM (85).

^b Activitat mesurada en tampó TES 50 mM , pH 7,0 , NADH 0,213 mM (76)
n.a. , no es detecta activitat.

abundància en fetge han sigut motiu d'especulació sobre el paper que pot jugar π -ADH enfront d'una intoxicació severa per etanol. A una concentració 5 mM d'etanol, saturant per a quasi totes les formes de la classe I, l'activitat de π -ADH representa menys del 15 % de l'activitat ADH total del fetge. Però amb etanol 60 mM pot arribar a contribuir al 40 % de l'activitat total (196) (Fig. 6). π -ADH presenta també una elevada K_m per a l'acetaldehid a pH 7,0 (8,3 mM) (76).

L'especificitat de substrat és més restringida que la dels isoenzims de la classe I, ja que π -ADH no oxida ni metanol ni 1,2-etanodiol, i molt pòbrament el ciclohexanol. En canvi, conserva una elevada eficiència enfront d'alcohols primaris alifàtics de cadena llarga i aromàtics (26). Cal remarcar que l'octanal, juntament amb el benzaldehid, són els millors substrats en la reacció de reducció (76) (Taula IV).

3.5.3. Isoenzims de la classe III (χ -ADH)

L'electroforesi en gel de midó d'un homogenat de fetge i posterior tinció del gel amb pentanol revela dues bandes, χ_1 -ADH i χ_2 -ADH, que migren cap a l'ànode entre pH 7,6 i 8,6, a diferència de tots els altres isoenzims de l'ADH que són catòdics (239) (Fig 4). No s'ha observat mai χ_2 en absència de χ_1 , ni cap tipus de polimorfisme, pel que s'ha postulat que la banda minoritària, χ_2 , derivaria de χ_1 , per modificació posttraduccional (5). El baix punt isoelèctric de χ -ADH, 6,4, possibilita la seva separació dels isoenzims de les classes I i II mitjançant una cromatografia en DEAE-cel·lulosa (319). La seva concentració en fetge és de prop de 100 mg/Kg de teixit fresc (239).

Encara que χ -ADH presenta moltes propietats físiques comuns amb les classes I i II, també posseeix propietats estructurals i cinètiques notables (Taula I). La composició d'aminoàcids revela diferències importants en l'estructura primària, suficients per a explicar les diferències en càrrega i l'elevat valor del coeficient d'extinció molar. El perfil d'activitat d'oxidació d'alcohols en funció del pH és força

característic, amb un pic a pH 10,8-11,0. A pH 6,8, l'activitat és només el 5 % de l'activitat màxima.

Per altra banda, amb els alcohols primaris i aldehids de cadena curta (2-4 carbonis), χ -ADH no presenta saturació. Així, l'etanol 2,3 M no satura l'enzim ni a pH 7,5 ni a pH 10,0. En aquest cas, l'activitat es directament proporcional a la concentració de substrat (Fig. 6). χ -ADH és l'única ADH humana coneguda que oxida l'etanol tan pòbrament (Taula II), pel que l'oxidació d'aquest substrat no sembla ser la seva funció metabòlica.

Una altra característica important de χ -ADH és la insensibilitat a la inhibició per 4-metilpirazole. L'isoenzim conserva el 100 % de l'activitat amb 4-metilpirazole 12 mM (239), concentració que inhibeix totes les altres formes d'ADH incloïnt α -ADH.

4. ALDEHID DESHIDROGENASA (ALDH)4.1. Propietats generals de l'ALDH

L'aldehid deshidrogenasa (aldehid: NAD(P) oxidoreductasa, EC 1.2.1.3.) catalitza la reacció irreversible:



És un enzim àmpliament distribuït en la naturalesa (327). En els mamífers, es troba principalment en el fetge, on pot arribar a representar un 1 % de la proteïna total (249). Racker, l'any 1949, va demostrar per primera vegada la seva existència en fetge de bou (253). Fins 20 anys després no es publicà la purificació d'un dels isoenzims de fetge de cavall (104). De llavors ençà, s'ha purificat ALDH a partir del fetge de diverses espècies: home (24, 117, 125, 136, 182), cavall (97, 104), xai (69, 81, 133, 214), rata (204, 205, 229, 275), ratolí (11), bou (194), conill (94, 220), babuí (9) i gos (270).

L'enzim posseeix en general una àmplia especificitat de substrat. Entre els molts substrats de l'ALDH hi podem comptar, ademés de l'acetaldehid, propanal, aldehids alifàtics de cadena llarga, aromàtics, malondialdehid, derivats de neurotransmissors, com el 3,4-dihidroxifenilacetaldehid (DDPAL) i indole-3-acetaldehid, precursors d'àcids biliars i metabolits de corticosteroides (Taula VII). Generalment, utilitza NAD^+ com a coenzim, encara que algunes formes d'ALDH poden emprar NADP^+ . Ademés de les ALDH no específiques, l'organisme disposa d'altres enzims que oxiden aldehids específics, com la formaldehid deshidrogenasa, la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa o la semialdehid succínic deshidrogenasa (328).

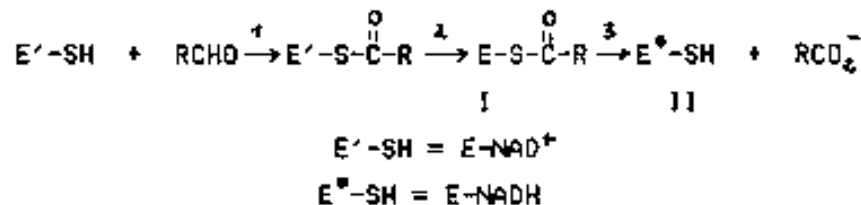
Nombrosos estudis en diverses espècies demostren l'existència d'isoenzims de l'ALDH en diferents fraccions subcel·lulars: citosòlica,

mitocondrial i microsomal. L'estudi de la distribució subcel·lular de l'ALDH ha sigut i és encara objecte de controvèrsia, degut a la multiplicitat tant de formes moleculars com de localitzacions, i a l'evident interès per esbrinar el lloc precís d'oxidació de l'acetaldehid dins de la cèl·lula hepàtica (veure I.4.5.).

Els diferents isoenzims de l'ALDH coneguts es divideixen en dues grans classes, segons el valor de la seva Km per als aldehids alifàtics de cadena curta: isoenzims de baixa Km (micromolar) (veure I.4.4.1.) i isoenzims d'alta Km (milimolar) (veure I.4.4.2.). Ambdues classes poden coexistir en el mateix compartiment subcel·lular.

4.2. Mecanisme catalític de l'ALDH

L'oxidació de l'aldehid té lloc mitjançant l'atac d'un nucleòfil, probablement el grup tio? d'un residu de cisteïna, sobre el grup carbonil (pas 1), donant lloc a la formació del tiohemiacetal I. Tot seguit, es produeix la deshidrogenació (pas 2) i la hidròlisi del tioester o desacil·lació (pas 3). En aquest darrer pas podria participar-hi un residu d'histidina, actuant coordinadament amb un segon grup, i constituint un sistema per a la captació de protons de l'aigua (32B).



Amb aquest mecanisme, l'ALDH és capaç d'actuar també com a esterasa, hidrolitzant esters suficientment reactius com els esters del nitrofenol (23, 274, 307). L'intermedi II és comú a les activitats deshidrogenasa i esterasa.

El mecanisme explica també els valors de Km per a l'acetaldehid, extraordinàriament més baixos en l'ALDH si la comparem amb l'ADH. La

baixa Km per a l'acetaldehid seria conseqüència de la formació del compost intermedi covalent I, mentre que en l'ADH les interaccions són no covalents (327) (veure I.3.2.).

4.3. Mecanisme cinètic de l'ALDH

A baixes concentracions d'acetaldehid, l'isoenzím ALDH II d'home, així com l'isoenzím citoplasmàtic de cavall (98) i el de xai (213), segueixen un mecanisme seqüencial ordenat BiBi en el que s'uneix en primer lloc el NAD^+ (veure I.3.3.), essent el pas limitant l'alliberació del NADH (327). A altes concentracions d'acetaldehid hi ha una certa contribució de mecanisme seqüencial estadístic (327).

L'isoenzím ALDH I d'home, així com l'isoenzím mitocondrial de cavall, segueixen també un mecanisme seqüencial ordenat BiBi amb unió preferent del NAD^+ (274) (veure I.3.3.), però és la desacil·lació el pas limitant de la reacció (310, 330). Això estaria d'acord amb el fet de que ALDH I, juntament amb els isoenzims mitocondrials de fetge de cavall (104), fetge de rata (275) i cervell de bou (102), incrementen la seva velocitat de catàlisi en augmentar l'electronegativitat del grup -R de l'aldehid (Taula VII). Així, en la Taula VIII, els enzims mitocondrials mostren un increment en la velocitat d'oxidació de l'hidroxiacetaldehid respecte de l'acetaldehid. L'estabilització de la densitat de càrrega positiva suportada pel grup carbonil facilitaria els atacs nucleofílics (passos 1 i 3).

4.4. Isoenzims de l'ALDH humana

L'electroforesi en gel de midó d'un homogenat de fetge humà revela la presència de, al menys, 4 o 5 bandes d'activitat ALDH que, a un pH de 7,6 o superior, migren cap a l'ànode. Les bandes més intenses s'anomenen, d'acord amb la mobilitat electroforètica, segons la nomenclatura de Harada i col. (125): ALDH I, ALDH II, ALDH III i ALDH IV (Fig. 7). ALDH

TAULA V. Propietats físico-químiques i cinètiques dels isoenzims de l'ALDH humana^a.

Propietat	baixa Km		alta Km	
	ALDH I	ALDH II	ALDH III	ALDH IV b
pes molecular total	225.000	245.000	230.000	139.500-175.000
pes molecular subunitats	54.200	54.800	n.d.	69.200
pI	4,95	5,0-5,3	6,3-6,4	6,8-6,9
$\epsilon_{280} \times 10^5$ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	2,25	2,36	n.d.	1,11
coenzim	NAD ⁺	NAD ⁺	NAD ⁺	NAD ⁺
pH òptim	9,5	8,6	9,0	8,45
especificitat de substrat	àmplia	àmplia	- alifàtics cadena llarga - aromàtics	semialdehid succínic i alifàtics cadena curta
Km acetaldehid (M), pH 7,0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻³ -10 ⁻²
activitat específica (U/mg)	0,5-2,6	0,58	0,9	2,21
inhibició disulfiram 20 μM	no	sí	no	no
termoestabilitat (70°C, 60 min)	inestable ^c	estable ^c	molt inestable ^c	molt inestable ^c

^a Veure referències 99,105,117,125,136,249.

^b Dades preliminars no publicades, presentades per Forte-McRobbie i Pietruszko al "Second Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism" (109).

^c Resultats observats en l'anàlisi d'un homogenat de fetge per electroforesi de gel de midó (125).

TAULA VI. Valors de Km dels isoenzims de l'ALDH humana ^a

Substrat	baixa Km (μ M)		alta Km (μ M)	
	ALDH I	ALDH II	ALDH III	ALDH IV ^b
<u>pH 7,0</u>				
acetaldehid	3,0	30 (2500) ^c	3.300	4.950
propanal	0,7	5 (1000) ^c	n.d.	9.400
NAD ⁺	70	40	84	41
<u>pH 9,5</u>				
acetaldehid	2,4	120	7.100 ^d	2.280 ^e
propanal	1,2	11	930	18.000 ^e
NAD ⁺	70	8	55 ^d	15 ^e

^a Veure referències 99,117,125,136,249 .

^b Dades preliminars no publicades, presentades per Forte-McRobbie i Pietruszko al "Second Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism" (109).

^c Entre parèntesi, valor mesurat a elevada concentració de substrat (1-20 mM)

^d valor mesurat a pH 9,0

^e valor mesurat a pH 8,5

n.d. = no determinat.

II apareix sovint com un doblet (221, 285, 302). Un esquema similar s'obté mitjançant electrofocalització analítica en gels d'agarosa (91).

Els dos isoenzims majoritaris, ALDH I i ALDH II, es troben principalment en fetge i ronyó, però també en altres teixits com pulmó, múscul, cor, estómac, intestí, melsa, cervell, pell, fibroblasts, anel de cabell i limfòcits (221). Els eritròcits només posseeixen l'ALDH II. Estómac i pulmó, sobretot, i també testicles, pell, melsa, cervell, fetge i ronyó presenten l'isoenzim ALDH III (91, 221). El quart isoenzim, ALDH IV, s'ha observat principalment en fetge i ronyó, però també en cor, intestí, pell, anel de cabell i fibroblasts. En sèrum i trombòcits no s'han detectat isoenzims de l'ALDH (113, 114, 247). Així doncs, l'ALDH es present pràcticament en tots els teixits del cos, de tal manera que l'acetaldehid derivat de l'etanol podria ésser ràpidament eliminat en tots els òrgans.

A diferència de l'ADH, els isoenzims de l'ALDH han estat poc estudiats per la seva gran inestabilitat, no havent-se postulat seriosament cap model genètic que expliqui la multiplicitat de formes moleculars. Tampoc s'ha estudiat exhaustivament la seva especificitat de substrat. Malgrat tot, en els darrers quatre anys s'ha avançat considerablement. Fruit d'aquest treball són les propietats dels quatre isoenzims de l'ALDH humana que apareixen resumides en les Taules V, VI, VII i VIII.

Com s'evidencia de l'anàlisi de les dades de la Taula V, ALDH I i ALDH II són isoenzims de baixa K_m , mentre que ALDH III i ALDH IV pertanyen al grup d'isoenzims d'alta K_m . Tot i així, ALDH I i ALDH II contribueixen al 70 % de l'activitat ALDH total en el fetge, mesurada amb una elevada concentració de propanal, tal com 13,5 mM a pH 9,0 (99). Això és possible gràcies a que ALDH I no sembla presentar inhibició per substrat a altes concentracions de propanal (310) i ALDH II mostra activació per substrat a elevades concentracions d'acetaldehid i propanal (125).

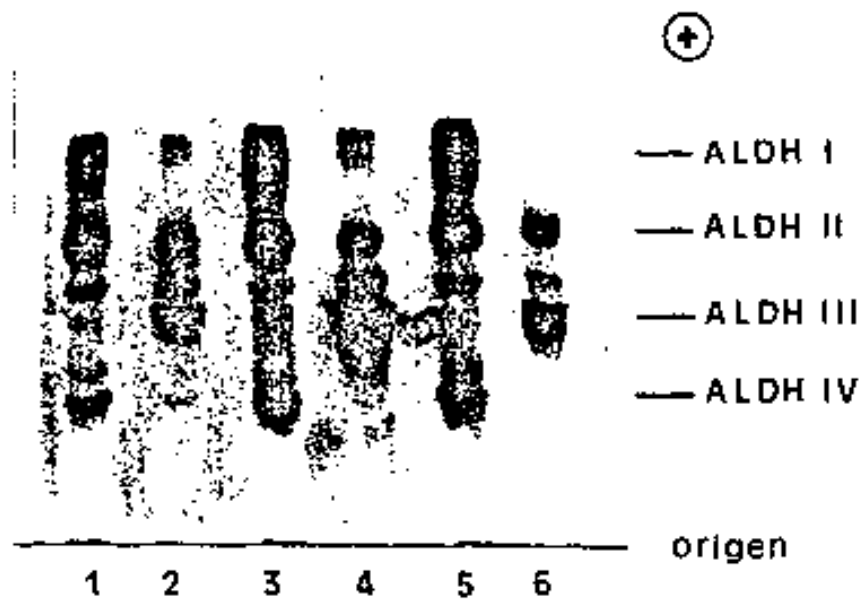


FIGURA 7 Electroforesi en gel de midó dels isoenzims de l'ALDH humana a pH 7,6 (reproduït de Soler,285).

1, 3 i 5 : Homogenat de fetge.

2, 4 i 6 : Homogenat d' estómac.

4.4.1. Isoenzims de baixa Km

4.4.1.1. Isoenzim ALDH I

És l'isoenzim de l'ALDH més abundant en el fetge, podent-se obtenir quasi 700 mg d'enzim/Kg de fetge (136). Les preparacions obtingudes per diferents autors indiquen que aquest isoenzim té una Km extraordinàriament baixa per a l'acetaldehid a pH 7,0 (3 μ M) (24, 117, 136, 182). Aquest valor de Km per al producte d'oxidació de l'etanol sembla especialment apropiat per a una efectiva eliminació de l'acetaldehid en les concentracions en que es troba en sang després de la ingestió d'alcohol (2 μ M) (101, 208, 233, 323).

Si la purificació d'aquest isoenzim no es realitza en absència d'oxigen apareixen varis pics en la darrera cromatografia (DEAE Bio-Gel A), amb diferents activitats específiques, el que podria ser degut a la formació de ponts disulfur intramoleculars. L'activitat específica mitjana obtinguda és de 1,3 U/mg, mesurada amb propanal 68 μ M a pH 9,0 (135).

El pes molecular d'ALDH I és de 225.000 dalton i el de les subunitats, 54.200, el que indica una estructura tetramèrica (24). El seu punt isoelèctric és 4,95 (114), essent el més anòdic dels isoenzims de l'ALDH coneguts.

Com es pot veure en la Fig. 8, el seu màxim d'activitat es troba a pH 9,5. A pH 7,0 presenta només el 15 % de l'activitat màxima.

L'enzim no és completament inhibït per disulfiram 40 μ M a pH 7,0 (24, 117, 125) (veure 1.4.4.1.4.). L'activitat de l'ALDH I es veu estimulada de 2 a 3 vegades en presència d'ions Mg^{2+} o Ca^{2+} (310), a les concentracions en que es troben normalment en els mitocondris, semblantment al que succeeix amb els isoenzims mitocondrials de cavall, rata, bou i babuí (329).

TAULA VII. Valors de Km i Vmax relativa per a diferents aldehíds dels isoenzims ALDH I i ALDH II ^a.

Substrat	ALDH I		ALDH II	
	Km (μ M) ^b	Vmax relativa ^c	Km (μ M) ^b	Vmax relativa ^c
formaldehid	300	40	-	-
acetaldehid	3,0	100	30(2500) ^d	100
propanal	0,7	121	5(1000) ^d	118
isobutanal	1	100	-	-
2-cloroacetaldehid	-	-	68	60
metoxiacetaldehid	-	163	-	-
hidroxiacetaldehid	58	155	180	42
DL-gliceraldehid	-	-	205	62
metilglioxal	-	19	-	-
glioxal	-	16	-	-
acid glioxílic	n.a.	n.a.	-	-
hidrat de clorat	n.a.	n.a.	-	-
crotonaldehid	1	10	-	-
benzaldehid	0,52	62	0,65	35
aldehid cinnàmic	-	-	0,55	26
indole-3-acetaldehid	2,1	148	<10	-
DOPAL	n.a.	n.a.	17	-

^a Veure referències 24, 117, 130, 150, 274, 307, 310 .

^b Els valors de Km no estan corregits per a la hidratació dels aldehíds (veure III. 1.1.2.)

^c Vmax per a l'acetaldehid = 100

^d Entre parèntesi, valor mesurat a elevada concentració de substrat (1-20mM)

(-), no determinat

n.a. , no es detectà activitat

DOPAL : 3,4-dihidroxifenilacetaldehid

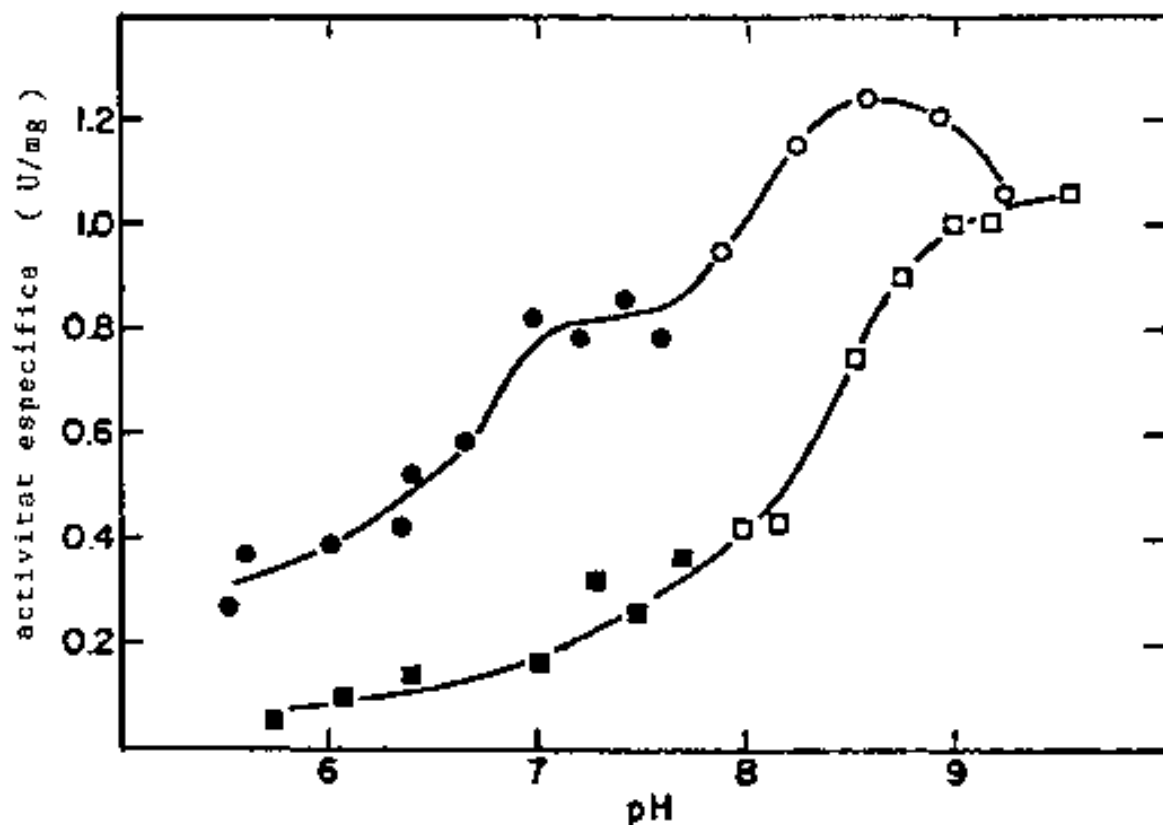


FIGURA 8 Perfil d'activitat en funció del pH dels isoenzims ALDH I (-●-, -○-) i ALDH II (-■-, -□-) de fetge (reproduït de Greenfield i Pietruszko, 117).

Activitat mesurada en tampó pirofosfat sòdic (-○-, -□-) 0,02 M o fosfat monossòdic (-●-, -■-) 0,02 M, NaCl 0,9 M, NAD⁺ 0,5 mM i propanal 13,6 mM.

4.4.1.2. Isoenzim ALDH II

Aquest isoenzim és similar a l'ALDH I en quant a pes molecular i nombre de subunitats, però presenta característiques cinètiques força notables. Àdhuc en preparacions homogènies de l'enzim, la representació de Lineweaver-Burk (209) per a l'acetaldehid i el propanal no és lineal a pH 7,0 (117), el que indicaria una aparent activació a concentracions elevades de substrat o cooperativitat negativa (180). Aquest comportament també s'ha observat en cinètiques de l'ALDH citoplasmàtica de fetge de xai (213), postulant-se dos setis de fixació en la molècula d'enzim amb diferent afinitat per al propanal (20, 23). Com a conseqüència d'aquesta cinètica bifàsica, a pH 7,0 l'enzim presenta dos valors de K_m per a l'acetaldehid, 2,5 μM i 30 μM . A pH 9,5, només s'ha calculat una K_m , però el seu valor (0,12 mM) és 50 vegades més alt que el de l'ALDH I (Taula VI). L'ALDH II sembla l'únic isoenzim actiu amb 3,4-dihidroxifenilacetaldehid (DOPAL), amb una K_m de 17 μM a pH 6,8 (130).

ALDH II s'uneix més fortament que ALDH I a una columna de 5'AMP-Sepharose, el que és reflex de la seva major afinitat pel NAD^+ (Taula VI).

Una altra característica distintiva de l'ALDH II és la inhibició amb disulfiram 20 μM , que és d'un 100 % a pH neutre i d'un 80 % a pH alt (125) (veure 1.4.4.1.4.). ALDH II, de la mateixa manera que els isoenzims citoplasmàtics de cavall, rata i bou, és inhibit per la presència de Mg^{2+} (311, 329).

L'activitat específica és de 0,54 U/mg, mesurada amb propanal 1,3 mM a pH 9,0 (94). El pH òptim es situa a pH 8,6, conservant el 66 % de l'activitat màxima a pH 7,0 (117) (Fig. 8).

- ALDH d'eritròcit

Un enzim amb activitat ALDH ha sigut purificat a partir d'hemolisats d'eritròcits per Inoue i col. (150), mostrant propietats idèntiques a les de l'isoenzim hepàtic ALDH II. L'ALDH d'eritròcit també presenta una cinètica bifàsica a pH 7,4 amb acetaldehid i propanal, així com les característiques inhibicions per disulfiram i Mg^{2+} (153). Pot utilitzar $NADP^+$, encara que amb una Km molt elevada. És capaç d'oxidar l'indole-3-acetaldehid, amb una Km menor de $10 \mu M$ a pH 8,8 (305). Agarwal i col. (7) han demostrat que l'ALDH d'eritròcit posseeix una mobilitat electroforètica idèntica a ALDH II de fetge, amb un pI de 5,0-5,3.

El fet de que ALDH II es trobi en eritròcit suggereix la seva localització en el citoplasma de la cèl·lula hepàtica, ja que els eritròcits madurs manquen de mitocondris, encara que conserven alguns dels enzims característics d'aquests orgànuls (333).

La capacitat d'oxidació d'acetaldehid dels eritròcits es situa entre 0,05 i 0,20 nmol/min/mg d'hemoglobina, depenent de la concentració del substrat (234, 306). Els valors de les activitats mesurades "in vitro" concorden força bé amb les velocitats d'eliminació observades "in vivo", manifestant-se també "in vivo" la naturalesa bifàsica de la reacció (cooperativitat negativa). Si tenim en compte el volum total de sang circulant en el cos humà, els eritròcits poden oxidar el 36% de l'acetaldehid que abandona el fetge, explicant-se en part les diferències de concentració d'acetaldehid entre la vena hepàtica i la circulació perifèrica (234). La resta de l'acetaldehid que abandona el fetge és oxidat en els teixits perifèrics o eliminat a través de reaccions no enzimàtiques, com és la unió covalent a l'hemoglobina o a altres proteïnes (153, 234).

4.4.1.3. Comparació entre ALDH I i ALDH II

El pes molecular, nombre de subunitats, composició d'aminoàcids, punt isoelèctric, coeficient d'extinció molar (117) (Taula V), així com els estudis immunològics (244), mostren similituds estructurals entre ambdós isoenzims. Malgrat tot, ALDH I i ALDH II no semblen tenir cap subunitat en comú, existint només com a homotetràmers (136).

Per altra banda, les seqüències d'aminoàcids dels isoenzims ALDH II d'home i citoplasmàtic de cavall són homòlogues en un 91 % dels 500 residus (16). L'homologia seqüencial és molt menor entre els isoenzims citoplasmàtic i mitocondrial d'una mateixa espècie (69 %) (137, 146).

L'homologia en l'estructura primària, juntament amb les propietats moleculars, Km per als substrats, interacció amb cations divalents, susceptibilitat al disulfiram i la coincidència en el pas limitant del mecanisme cinètic, permeten afirmar que ALDH I i ALDH II d'home són anàlegs, respectivament, als isoenzims mitocondrial i citoplasmàtic de cavall i de xai (Taula VIII).

Davant els estudis poc concloents de localització subcel·lular de l'ALDH humana (veure I. 4.5.), l'analogia amb els isoenzims de cavall i de xai i la manca d'hibridació entre les subunitats de ALDH I i ALDH II suggereixen que aquests isoenzims ocupen compartiments subcel·lulars diferents: ALDH I, mitocondrial i ALDH II, citoplasmàtic (244).

Probablement, ALDH I i ALDH II són productes de dos gens diferents que varen divergir en l'evolució a partir d'un gen ancestral comú per duplicació gènica (136). Aquest esdeveniment fou segurament anterior a la divergència evolutiva entre espècies com l'home i el cavall (137, 146).

TAULA VIII. Comparació de les propietats dels isoenzims ALDH I i ALDH II amb els isoenzims mitocondrials i citoplasmàtics de fetge de cavall i de xai ^a

	HOME		CAVALL				XAI				
	ALDH I		ALDH II		mitochondrial		citoplasmàtic				
	pes molecular	nº subunitats	pI	$\epsilon_{280} \times 10^5 (M^{-1}cm^{-1})$	mecanisme cinètic	pas limitant	K _m acetaldehid (μM), pH 7,5	V _{max} relativa	hidroxiacetaldehid ^c	efecte ions divalents	inhibició disulfiram
	225.000	4	4,92	2,25	seqüencial ordenat	desacil,lació	3,0	155	activació	no	
	245.000	4	5,00-5,30	2,36	seqüencial ordenat	desacil,lació	30(2500) ^b	42	inhibició	sí	
	240.000	4	5	2,52	seqüencial ordenat	desacil,lació	0,2	320	activació	no	
	230.000	4	6	2,18	seqüencial ordenat	desacil,lació	70	90	inhibició	sí	
	205.000	4	5,5-5,8	2,03	seqüencial ordenat	desacil,lació	n.d.	150	n.d.	no	
	212.000	4	5,2	n.d.	seqüencial ordenat	desacil,lació	n.d.	76	inhibició	sí	

^a Veure referències 20, 69, 97, 104, 133, 182, 213, 330, 117, 249, 331.

^b Els isoenzims ALDH II d'home i citoplasmàtic de xai presenten una cinètica bifàsica amb acetaldehid o propanal a pH 7,5

^c V_{max} per a l'acetaldehid = 100 n.d., no determinat.

4.4.1.4. Mecanisme d'inhibició de l'ALDH pel disulfiram

El disulfiram, disulfur de bis(dietiltiocarbamòil) és un reactiu que modifica els residus de cisteïna de les proteïnes (230). El mecanisme general d'aquesta reacció és mostra a la Fig. 9a. Quan el disulfiram reacciona amb un grup tiol, es trenca en dues molècules de dietilditiocarbamat, una de les quals resta covalentment unida al residu de cisteïna, mentre l'altre és alliberada al medi. L'ALDH és un dels enzims sensibles al disulfiram, degut a l'elevat contingut en residus de cisteïna, 32 Cys/molècula d'enzim en els isoenzims ALDH I i ALDH II (136). Els isoenzims citoplasmàtics de l'ALDH, com ALDH II, són extraordinàriament susceptibles a la reacció amb el disulfiram, resultant inhibits completament i estequiòmicament (veure 1.4.4.1.2.).

El mecanisme d'inhibició precís de l'ALDH humana pel disulfiram s'ha estudiat utilitzant l'isoenzim ALDH II (308), mostrant-se'n un esquema en la Fig. 9. ALDH II posseeix un grup tiol especialment reactiu enfront del disulfiram, que ademés sembla imprescindible per a l'activitat enzimàtica. En un primer estadi, el disulfiram s'uneix a aquest grup tiol, seguint el mecanisme de la Fig. 9a. Tanmateix, a continuació, un segon grup tiol ataca l'anterior intermedi covalent, formant-se un pont disulfur entre cisteïnes de la mateixa subunitat, properes en l'espai, però no necessàriament en la seqüència (Fig. 9b). Així, l'enzim resulta modificat sense conservar unida cap molècula de disulfiram. Aquesta inhibició és revertida "in vitro" per agents reductors, com 2-mercaptoetanol o DTT, però les concentracions de glutatió que es donen normalment en el fetge són insuficients per a revertir la reacció. Així, "in vivo", el glutatió hepàtic probablement no podria restablir l'activitat de l'ALDH modificada, requerint-se la nova síntesi d'ALDH (308, 309).

El disulfiram ha sigut profusament emprat en la teràpia d'aversiò en el tractament de l'alcoholisme, sota el nom de "Antabuse". La ingestió d'etanol, conjuntament amb l'administració de disulfiram, provoca l'augment de la concentració d'acetaldehid en l'organisme (217) i la

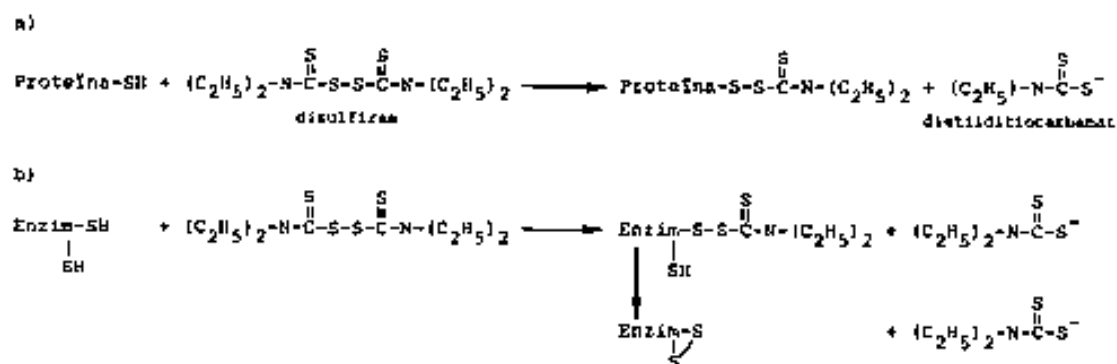


FIGURA 9 Mecanisme d'inhibició de l'ALDH pel disulfiram.
 a) Reacció proposada per Neims i col. (200) com a mecanisme general de modificació dels grups tiol de les proteïnes per disulfiram.
 b) Mecanisme d'inhibició de l'ALDH II proposat per Vallari i Pietruszko (308).

simultània aparició de símptomes desagradables com visió borrosa, nàusea i vermellor facial (123) (veure 1.2.4.). Com ja s'ha dit, l'enzim mitocondrial ALDH I, per la seva eficiència i en analogia amb altres espècies, podria ser l'únic responsable del metabolisme de l'acetaldehid en l'organisme. Els efectes del disulfiram semblen relacionats amb una inhibició d'aquest metabolisme i són similars als experimentats per individus que manquen d'ALDH I, després d'ingerir alcohol (veure 1.4.4.1.5.). Per altra banda, "in vitro", el disulfiram inhibeix preferentment l'isoenzim citoplasmàtic ALDH II, en contraposició a ALDH I que és més resistent a l'inhibició (veure 1.4.4.1.1.). Per a explicar aquesta paradoxa, Harada i col. (128) proposen que és en última instància la dietilamina, producte de degradació del disulfiram, la que inhibeix l'isoenzim ALDH I "in vivo". En cas de confirmar-se aquesta hipòtesi, el mecanisme d'inhibició hauria d'ésser revisat.

4.4.1.5. Variabilitat isoenzimàtica de l'ALDH

- Fenotip "ALDH no usual"

El 50 % de les mostres de teixit d'individus orientals sans no presenten l'isoenzim ALDH I quan son examinades mitjançant electroforesi en gel de midó o electrofocalització (112). La deficiència en ALDH I comporta un fenotip que s'anomena "ALDH no usual", diferent del "ALDH usual", el qual presenta tant ALDH I com ALDH II. L'homogenat hepàtic d'individus amb el fenotip "ALDH no usual" revela les propietats de l'únic isoenzim de baixa Km present, ALDH II, distingint-se fàcilment per la seva menor activitat específica i una Km per a l'acetaldehid més alta que la "ALDH usual". El pH òptim d'oxidació de l'acetaldehid en els homogenats hepàtics d'individus amb una "ALDH no usual" és de 9,0 en lloc de 9,7, mentres que l'activitat és inhibida en un 90 % amb disulfiram 20 μ M a pH 7,0 (125).

La freqüència d'aquesta deficiència genètica en la població està directament correlacionada amb la freqüència d'aparició de símptomes de

sensibilitat a l'alcohol (225). Aquests símptomes, d'entre els quals el més evident és la vermellor facial o "flushing", són molt similars als exhibits per individus que ingereixen alcohol conjuntament amb disulfiram (veure 1.2.4. i 1.4.4,1.4.). Després de la ingestió d'alcohol, la concentració mitjana d'acetaldehid en la sang dels individus deficients en ALDH I, i que experimenten "flushing", és superior a 30 μM , mentre que la dels individus normals és menor de 2 μM (127, 154, 226). Aquesta elevació súbita dels nivells d'acetaldehid circulant és el que s'anomena "síndrome d'acetaldehidèmia aguda" (324), que estimularia l'alliberament de catecolamines i provocaria els símptomes esmentats. S'ha suggerit que aquesta deficiència podria provocar el rebuig a l'alcohol per part de l'individu i, per tant, jugar un paper protector enfront de l'alcoholisme, al menys en el Japó (129, 131, 340).

Els treballs del grup de Yoshida (147, 149) mostren que els orientals deficients en ALDH I posseeixen en canvi una proteïna inactiva enzimàticament, però reactiva immunològicament amb anticossos contra l'isoenzim ALDH I. Aquesta proteïna és el resultat d'una mutació puntual que comporta el canvi d'un residu d'àcid glutàmic per una lisina en el segment C-terminal de l'enzim (138, 339). Ferencz-Biro i Pietruszko (105) sostenen, contràriament a Yoshida i col., que els orientals posseeixen una variant activa de l'isoenzim ALDH I, però amb una menor activitat específica i de mobilitat electroforètica idèntica a l'isoenzim ALDH I, quedant emmascarada per aquest últim en l'anàlisi dels homogenats per electroforesi. En qualsevol cas, restaria minuada la capacitat de metabolització de l'acetaldehid.

Així doncs, sembla que un mateix fet, la manca d'activitat ALDH, ja sigui per deficiència genètica o per inhibició amb disulfiram, provoca resultats similars: greus problemes en la metabolització de l'acetaldehid. Tot recolza la hipòtesi de que ALDH I és inhibida "in vivo" pel disulfiram o algun dels seus derivats metabòlics.

- ALDH d'individus alcohòlics

L'alcoholisme crònic apareix lligat a nivells elevats d'acetaldehid en sang (207, 217, 234), el que s'anomena "aldehydisme crònic" (324), sovint associat amb un mal funcionament de l'ALDH hepàtica (233, 238). El problema rau en averiguar si això és el reflex d'una deficiència genètica preexistent o del dany hepàtic provocat pel consum d'alcohol. Per altra banda, no existeix unanimitat sobre quin dels dos isoenzims majoritaris de l'ALDH, ALDH I o ALDH II apareix disminuït en la malaltia alcohòlica.

El grup de Peters (158) va observar una activitat minvada en l'ALDH citosòlica de biòpsies d'alcohòlics no cirròtics respecte dels controls. L'activitat es va mantenir en nivells baixos després d'un període d'abstinència, suggerint una deficiència primària d'ALDH (296).

D'altres treballs indiquen que la reducció en l'activitat ALDH és conseqüència de l'excessiu consum d'alcohol i que, en alguns casos, reverteix amb l'abstinència. Ricciardi i col. (260), en un estudi dut a terme amb biòpsies de pacients en diversos estadis de malaltia alcohòlica (fetge gras, hepatitis alcohòlica i cirrosi alcohòlica), observaren una reducció selectiva de l'activitat ALDH I (probablement mitocondrial) en els pacients cirròtics. Els autors atribueixen aquesta deficiència al dany mitocondrial que es produeix en els estadis avançats de la malaltia alcohòlica, que porta a l'establiment d'un cercle viciós de dany subcel·lular progressiu i que desemboca en la necrosi cel·lular (veure 1.2.4.). Nilius i col. (231) també observaren una reducció considerable de l'activitat ALDH total en pacients amb cirrosi alcohòlica. En un treball d'Agarwal i col. (6), l'activitat específica de l'isoenzim ALDH I aparegué sempre disminuïda en els alcohòlics respecte dels controls.

En eritròcits, l'isoenzim ALDH II mostrà una activitat significativament menor en alcohòlics crònics comparats amb els controls, tenyint-se molt dèbilment en un gel d'electrofocalització. L'activitat ALDH retornà a valors normals després de 12 setmanes d'abstinència, revelant-se com un marcador fiable de l'alcoholisme (7, 217).

Finalment, Tipton i col. (302) sotmeteren a electroforesis de gel de poliacrilamida amb gradient de densitat mostres de biòpsies hepàtiques d'alcohòlics i controls, quantificant les bandes d'activitat densitòmicament. La relació d'intensitats dels pics per a ALDH I i ALDH II fou invariable per a totes les mostres.

4.4.2. Isoenzims d'alta Km de l'ALDH

En general, han sigut menys estudiats que els isoenzims de baixa Km, ja que la majoria dels mètodes d'assaig enzimàtic i de purificació tendien a eliminar-els. Així doncs, les seves propietats moleculars són poc conegudes.

Els isoenzims humans d'alta Km, ALDH III i ALDH IV han sigut purificats a homogeneïtat recentment. Ambdues formes són retingudes per una columna de CM-Sephadex a pH 6,0, propietat que és utilitzada per a la purificació a partir d'homogenat de fetge, essent eluïts diferencialment mitjançant un gradient de 0 a 0,5 M de NaCl. Les seves propietats conegudes apareixen resumides en la Taula V i es deuen als treballs preliminars del grup de Pietruszko (99, 109). La seva localització subcel·lular i la seva funció fisiològica són totalment desconegudes.

4.4.2.1. Isoenzim ALDH III

Representa el 10 % de l'activitat ALDH total del fetge, mesurada amb propanal 13,5 mM a pH 9,0 (99). Harada i col. (125) el purificaren parcialment a partir d'estómac, i Edson i Pietruszko (99), a partir de fetge. ALDH III presenta un pes molecular de 230.000 dalton, postulant-se una estructura tetramèrica (Taula V). El seu màxim d'activitat es troba a pH 8,5, conservant el 35 % d'activitat a pH 7,0. A aquest pH, la Km per a l'acetaldehid és de 3,3 mM, i a pH 9,0, de 7,1 mM. El valor de la Km per als aldehids alifàtics disminueix ràpidament al augmentar la longitud de

la cadena carbonada. Així, a pH 9,0, la Km per a l'hexanal és de 16 μ M. L'activitat específica és de 0,9 U/mg, mesurada amb propanal 13,5 mM a pH 9,0.

No és inhibit per disulfiram i és molt termolàbil (125, 221).

4.4.2.2. Isoenzim ALDH IV

La majoria de les dades presentades per a ALDH IV en les Taules V i VI han de ser considerades com a preliminars i necessiten confirmació posterior. Han estat presentades recentment al "Second Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism" per Forte-McRobbie i Pietruszko (109). Agraïm als autors que ens hagin facilitat els detalls del seu treball prèviament a la seva publicació.

Segons aquests autors presenta peculiars característiques que el diferencien de tots els isoenzims de l'ALDH humana coneguts fins ara. El seu pes molecular sembla molt més baix, situant-se entre 139.000 i 175.000. Les seves subunitats tenen en canvi un pes molecular molt alt, 69.200 dalton, suggerint que es tracta d'un dímer. El seu punt isoelèctric, prop de la neutralitat (6,8-6,9), dificulta la seva purificació a partir de teixit hepàtic pels mètodes clàssics de cromatografia de bescanvi iònic. El seu màxim d'activitat es troba a pH 8,45. Les Km per a l'acetaldehid i propanal a pH 8,5 són, respectivament, 2,28 mM i 18,0 mM (109).

És tèrmicament molt inestable, doncs la seva activitat desapareix als 6 min d'incubació a 70°C (125).

4.4.2.3. Formes induïbles de l'ALDH en altres espècies

Ademés dels isoenzims constitutius del fetge normal, es coneix un segon grup d'isoenzims d'alta Km que poden ser induïts per diferents

tipus de xenobiòtics, com drogues (fenobarbital), insecticides (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, TCDD) o carcinògens químics (2-acetilaminofluorè i dietilnitrosamina). Aquests isoenzims, estudiats tots ells en fetge de rata, es caracteritzen per ser citosòlics i posseir pesos moleculars entre 100.000 i 200.000 dalton. Molts dels inductors no són substrats dels isoenzims induïts, pel que aquests podrien participar en el metabolisme dels aldehyds produïts pel sistema d'oxidació del citocrom P-450 o altres reaccions de desintoxicació general.

L'isoenzim induït amb fenobarbital presenta un pes molecular entre 72.000 (78) i 165.000 dalton (205), mentres que l'induit amb TCDD, 110.000-122.000 dalton (78, 205), havent-se demostrat en aquest últim cas que la forma funcional es un dímer. Lindahl i Evces (205) han purificat recentment una ALDH específica de tumor (110.000 dalton) i una ALDH induïda durant l'hepatocarcinogènesi (165.000 dalton). L'enzim induït amb TTDC i l'enzim específic de tumor són especialment actius enfront de benzaldehid com a substrat i NADP⁺ com a coenzim.

S'ha descrit també una ALDH citoplasmàtica de fetge de ratolí, amb un pes molecular de 60.000 dalton. La seva activitat s'incrementa 3 vegades durant l'embaràs, el que suggereix algun tipus de control hormonal (284).

4.5. Distribució subcel·lular de l'ALDH

La majoria d'estudis realitzats en el fetge de varies espècies assenyalen l'existència d'activitat ALDH en tres fraccions subcel·lulars: citosòlica, mitocondrial i microsomal (Taula IX). En general, les fraccions citosòlica i mitocondrial presenten isoenzims de baixa i alta Km per als aldehyds de cadena curta, mentre que la fracció microsomal només sembla posseir isoenzims d'alta Km (Taula X).

La utilització, pels diferents grups d'investigació, de diferents condicions experimentals, com el mètode de fraccionament subcel·lular, pH

de l'assaig de l'activitat enzimàtica, substrat emprat i concentració, i formes d'expressar l'activitat enzimàtica, han impedit moltes vegades la comparació i avaluació dels treballs ja realitzats.

4.5.1. Distribució subcel·lular de l'ALDH humana

Fins a l'actualitat no s'ha realitzat cap estudi que demostrï inequívocament l'associació d'un isoenzim determinat de l'ALDH humana amb un dels compartiments subcel·lulars.

Quan mostres de fetge humà, obtingudes d'autòpsies 10-24 h després de la mort, s'utilitzen per a un fraccionament subcel·lular, la major part de l'activitat ALDH apareix associada amb la fracció citosòlica, no trobant-se pràcticament activitat en les fraccions mitocondrial ni microsomal (125, 244). En un experiment realitzat amb mostres fresques de fetge de rata, Pietruszko i col. (244) demostraren que els nivells d'ALDH corresponents a les diferents fraccions particulades són profundament afectats per l'emmagatzement a temperatura ambient, el que indica que en les condicions "postmortem" té lloc la lisi de les membranes cel·lulars, alliberant-se els enzims de les fraccions particulades i aïllant-se com si es trobessin en la fracció citosòlica (244, 249).

Utilitzant paral·lelament una mostra de biòpsia hepàtica per al fraccionament i una mostra d'autòpsia per a una purificació i caracterització parcials de les formes de l'ALDH, Koivula (127) realitzà un dels pocs estudis fiables de que es disposa en fetge humà, anàleg al que ja havia dut a terme el mateix autor en rata. Els resultats assignaren a la fracció mitocondrial el 50 % de l'activitat ALDH total, mesurada amb propanal 9 mM, i més del 60 % si era mesurada amb propanal 60 μ M. En el citoplasma s'observà una forma de baixa Km similar en propietats a l'isoenzim ALDH I. La presència d'aquesta forma en la fracció soluble s'atribuï al trencament dels mitocondris durant la homogenització del teixit, com ho mostraren els marcadors enzimàtics emprats. També es purificà parcialment a partir del citoplasma una ALDH

d'alta Km, que podria correspondre a l'isoenzim ALDH II (recordar el seu comportament bifàsic). També es mencionà l'existència d'activitats d'alta Km en mitocondris i microsomes, anàlogues a les observades en fetge de rata (178).

Tipton i col. (301), a partir de mostres de biòpsies, mostraren que la major part de l'activitat mesurada amb acetaldehid 3 mM es trobava en els mitocondris, encara que també en detectaren en la fracció microsomal, i en el citoplasma en menor grau. Així mateix, suggeriren que l'enzim mitocondrial jugaria un paper primordial en el metabolisme de l'acetaldehid, al igual que en la rata, ja que utilitzant acetaldehid 15 µM com a substrat només observaren activitat en la fracció mitocondrial.

4.5.2. Distribució subcel·lular de l'ALDH en altres espècies

Els treballs realitzats en diverses espècies animals, sobretot en rata, han servit de model per a l'estudi de la distribució subcel·lular de l'ALDH humana, extrapolant-se alguns dels resultats per comparació de les propietats físico-químiques dels isoenzims respectius (veure 1.4.4.1.3.).

Així, en cavall i xai s'han purificat a homogeneïtat dos isoenzims de l'ALDH, demostrant-se que pertanyen a dos compartiments subcel·lulars diferents: un és mitocondrial i l'altre citoplasmàtic. En el cas dels isoenzims de xai el fraccionament fou previ a l'aïllament, mentre que en el cas del cavall, els isoenzims es varen purificar conjuntament, estudiant-se posteriorment la seva localització en un fraccionament a petita escala (69, 98).

Lindahl i Evces (206) han publicat recentment la distribució subcel·lular comparativa de l'activitat ALDH en fetge de rata, ratolí i conill, estudiant simultàniament sis soques diferents de rata. En els treballs de Lindahl i Evces (206) i Deitrich i Rodney (79), és

TAULA IX. Distribució subcel·lular de l'activitat ALDH hepàtica en diferents espècies.

Espècie	Percentatge activitat (%) ^a						Referències
	citoplasma		mitocondris		microsomes		
	baixa Km	alta Km ^b	baixa Km	alta Km ^b	baixa Km	alta Km ^b	
home	25	44	32	15	1	20	179
babuí	13	29	81	58	0	14	191
rata	2	6	60	24	2	36	304
rata	8	25	92	38	0	37	191
ratolí	66	57	19	11	10	19	327
conill	19	39	63	14	17	46	327

^a Percentatge d'activitat d'alta o baixa Km en la fracció respecte el total d'activitat d'alta o baixa Km, respectivament.

^b L'activitat dels isoenzims d'alta Km es calculà per diferència entre l'activitat obtinguda utilitzant una alta concentració de substrat i la mesurada a baixa concentració de substrat (veure III, 2.1.2.2.)

TAULA X. Valors de Km aparents per a l'acetaldehid dels isoenzims de l'ALDH de diferents espècies i orgànuls subcel·lulars ^a.

Espècie	Km aparent (µM)						Referències
	citoplasma		mitocondris		microsomes		
	baixa Km	alta Km	baixa Km	alta Km	alta Km	alta Km	
home	0,5	10.000	0,4	b	3.000	179	
babuí	45	550	11	150	b	191	
rata	0,7	1.000	0,7	2.000	2.000	178	
	n.a.	n.a.	1,5 ^c	1.500 ^d	b	275	
	b	b	1 ^c	900 ^d	900	304	
	b	b	5 ^c	1.500 ^d	800	145	
	4,5 } 10 } 22 }	9.400 } 13.000 }	0,13 ^c } 1 ^c }	1.300 ^d	b	327	
ratolí	5-35	1.610	1,7	1.530	b	327	
bou	50	n.a.	1	n.a.	1.000	327	

^a La majoria dels valors de Km varen ser obtinguts en extractes cel·lulars o fraccions parcialment purificades, pel que han de ser considerats solament com a orientatius.

^b Detectada certa activitat.

^c Activitat localitzada en la matriu mitocondrial.

^d Activitat localitzada en la membrana mitocondrial externa o espai intermembranal.
n.a., no es detectà activitat.

interessant observar que en totes les soques de rata examinades, el citosol presenta molt poca o nul·la activitat ALDH. Com es pot veure en el recull efectuat en la Taula IX, existeixen diferències significatives entre espècies, encara que en general la major part de l'activitat ALDH és mesurada en les fraccions particulades.

Quant a les formes enzimàtiques responsables de les diferents activitats observades, anàlisis prèvies per electrofocalització havien revelat la presència de múltiples isoenzims en fetge de rata (326). Bona part dels treballs indiquen l'existència de, al menys, 5 isoenzims. Preparacions dels isoenzims parcialment purificats demostren que aquests difereixen notablement en la K_m per a aldehids de cadena curta (Taula X), pes molecular, punt isoelectric, especificitat de coenzim, sensibilitat a inhibidors, termoestabilitat i propietats immunològiques (275).

Dels cinc isoenzims de rata, dos isoenzims, un de baixa K_m i un altre d'alta K_m , apareixen associats amb els mitocondris (Taula X) i han sigut extensament descrits (145, 178, 275, 304). L'isoenzim de baixa K_m ($1 \mu M$) es troba en la matriu mitocondrial i seria probablement el responsable de l'oxidació de l'acetaldehid durant el metabolisme de l'etanol (275). L'isoenzim d'alta K_m ($1-2 mM$) apareix associat amb la membrana mitocondrial externa (145) o amb l'espai intermembranal (275).

L'únic isoenzim microsomal detectat és d'alta K_m (Taula X), presenta activitat amb $NADP^+$ i es trobaria associat a membranes (178, 229).

En general, doncs, quan s'utilitza teixit fresc o biòpsies per al fraccionament subcel·lular, l'activitat ALDH apareix lligada en bona part a la fracció mitocondrial, encara que, al menys en home, l'activitat continguda en el citosol no seria despreciable (157, 159).

5. ALCOHOL I FETUS

Una vegada examinat l'estat del coneixement sobre els sistemes enzimàtics de metabolització d'etanol i d'acetaldehid en el fetge humà adult, es realitza una aproximació als possibles mecanismes de destoxificació d'aquestes drogues en la unitat feto-placentària. En primer lloc, es fa un repàs general a la fisiologia de la placenta, òrgan que relaciona els organismes matern i fetal, i a través del qual es produeix el pas d'etanol cap al fetus (veure 1.2.1.).

5.1. Fisiologia de la placenta humana

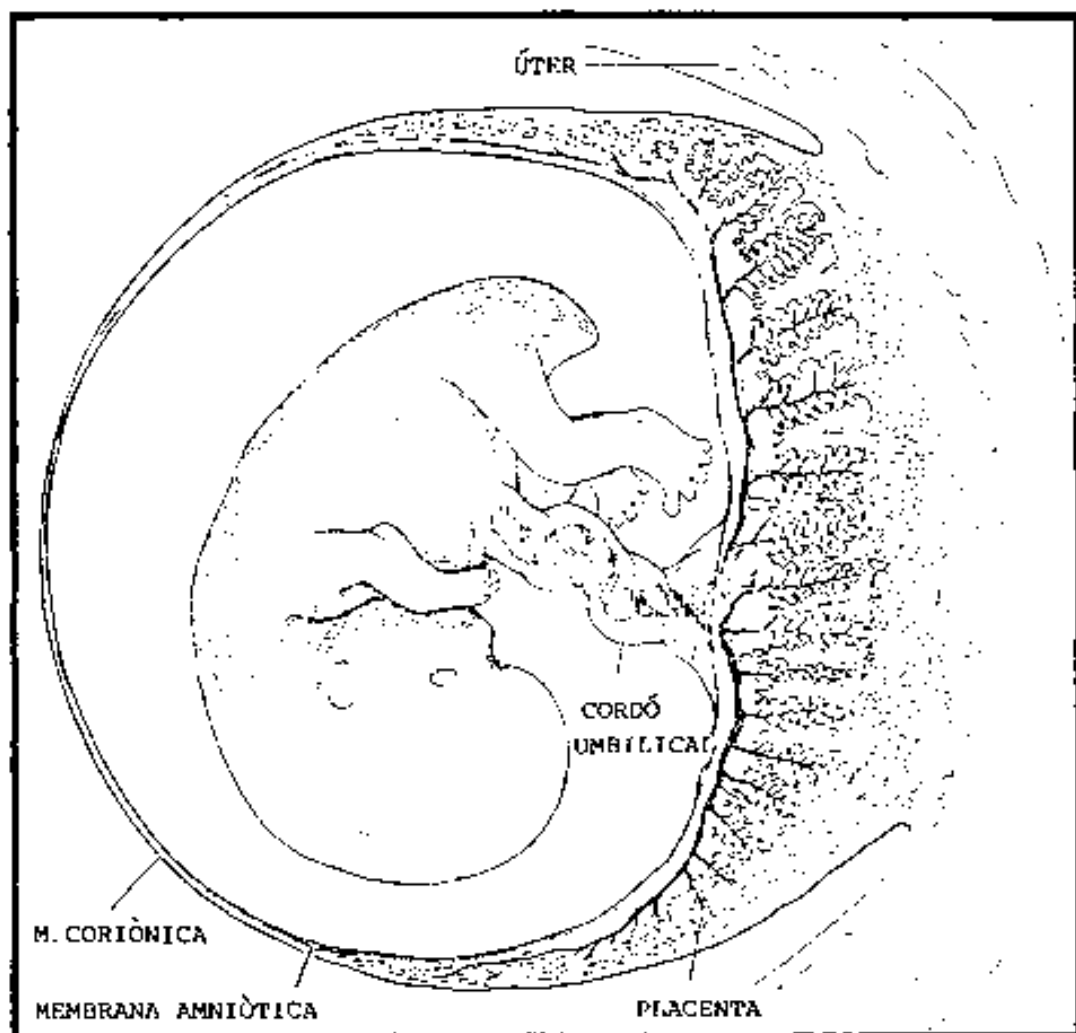
La placenta humana és l'òrgan d'intercanvi metabòlic entre les circulacions materna i fetal, realitzant un transport actiu dels nutrients necessaris per al correcte desenvolupament del fetus, tals com aminoàcids, vitamines, carbohidrats, lípids i minerals, sintetitzant hormones i transformant per acció enzimàtica moltes de les drogues o fàrmacs presents en la sang materna abans del seu pas cap al fetus (168).

La placenta es desenvolupa a partir del teixit embrionari per diferenciació del trofoblast en dues capes diferents, la externa o sincitiotrofoblast i la interna o citotrofoblast, definint-se clarament a partir del tercer mes de gestació. En el moment del naixement, la placenta pesa uns 500 g, el que significa una sisena part del pes total del nou-nat.

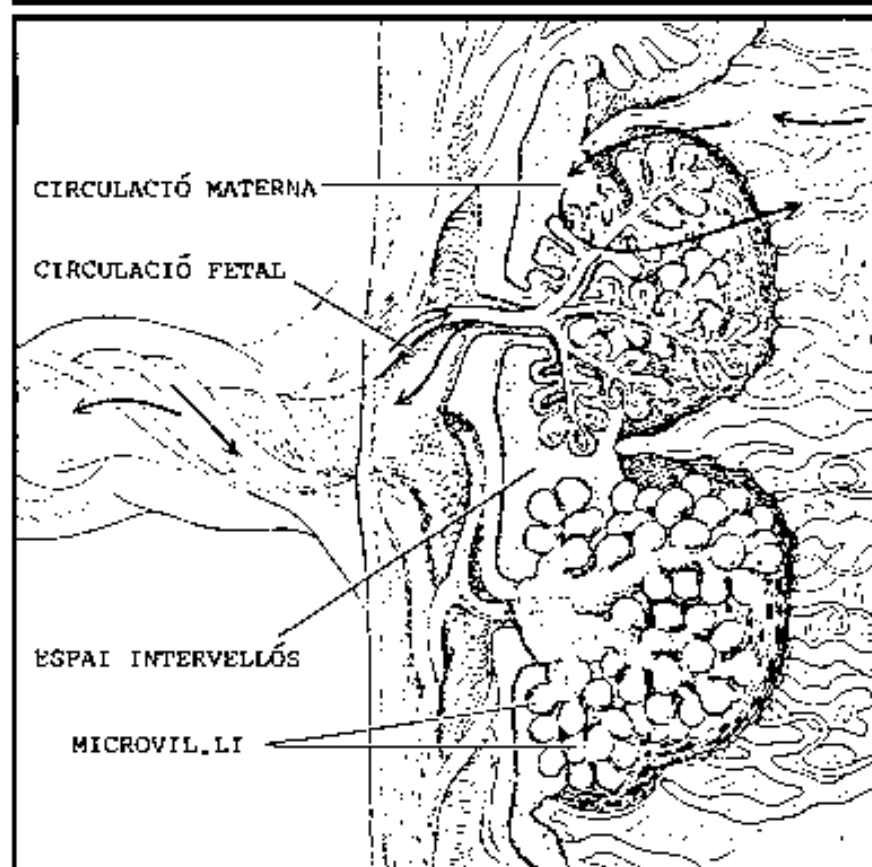
La placenta a terme és una estructura discoidal d'uns 20 cm de diàmetre i 3 cm de gruix en la part central. En la perifèria és molt més prima i es continua amb la membrana coriònica. La superfície materna de la placenta està dividida en una gran quantitat de lòbuls amb ramificacions membranoses. Les microvellositats d'aquesta zona invadeixen els vasos sanguinis de la pared uterina (placenta hemocorial), interdigitant-se els teixits fetal i matern i facilitant l'intercanvi

- FIGURA 10**
- a) Esquema de l'úter matern amb el fetus unit a la placenta a través del cordó umbilical i protegit per les membranes coriònica i amniòtica.
 - b) Secció transversal del teixit placentari prop del cordó umbilical, mostrant la penetració de les microvellositats en la pared de l'úter, el que facilita l'intercanvi de sang entre la mare i el fetus.
- Reproduït de Beaconsfield i col. (18).

a



b



mutu de gasos i substàncies. La superfície fetal es llisa i altament vascularitzada. Les artèries i venes fetals conflueixen en el cordó umbilical, que està implantat en el centre de la placenta (18) (Fig. 10).

El teixit placentari posseeix un metabolisme propi molt actiu, exhibint una gran quantitat d'activitats enzimàtiques complementàries a les del fetus en els diferents estadis de la gestació i desenvolupant a la vegada funcions nutritives, respiratòries, renals, hepàtiques i endocrines (264). La placenta a terme sembla que ha perdut algunes de les seves capacitats metabòliques, presentant segons alguns autors símptomes evidents d'envelliment (317).

La placenta ofereix una oportunitat única d'estudi de les complexes funcions fisiològiques de que disposa per a dur a terme la seva especial missió: control de la diferenciació i proliferació cel·lular, regulació de l'expressió genètica, sistema endocrí, processos de rebuig immunològic i d'envelliment i la biotransformació de les drogues. En general, les activitats enzimàtiques acostumen a ser d'un o dos ordres de magnitud més baixes que les observades en el fetge (168). Altres inconvenients per a l'estudi de la placenta són la seva heterogeneïtat, amb una gran quantitat de teixit connectiu i fibrós, i el seu elevat contingut en sang (aproximadament 100 ml) (44).

5.2. Desenvolupament fetal i postnatal de l'ADH i l'ALDH

Tant l'ADH com l'ALDH semblen pertànyer al grup d'enzims que incrementen notablement la seva activitat durant el període neonatal, encara que alguns isoenzims semblen ja presents durant la vida fetal (186, 278).

5.2.1. Desenvolupament de l'ADH

En l'home, es detecta activitat ADH en el fetge dels fetus de 8 setmanes de gestació, representant menys del 5 % de l'activitat adulta.

L'activitat augmenta constantment durant el desenvolupament fetal i postnatal, assolint els valors adults i configurant-se la dotació isoenzimàtica als cinc anys de vida (250).

Durant els diferents estadis del desenvolupament, apareixen els diferents isoenzims de l'ADH a mesura que s'expressen els diversos gens. El gen ADH_5 s'expressa molt aviat, apareixent α_2 -ADH en el fetge i tots els altres òrgans examinats de fetus de 16 i 22 setmanes de gestació (5, 240). En quant als isoenzims de la classe I, en el fetge i abans de les 20 setmanes de gestació, només hi és present l'isoenzim $\alpha\alpha$. Posteriorment s'expressa el gen ADH_2 , apareixent progressivament els isoenzims $\alpha\beta$ i els $\beta\beta$. El nouat disposa ja de tots els homodímers i heterodímers que es poden formar amb les subunitats α i β . Després del naixement apareixen les subunitats γ en el fetge, encara que aquestes poden observar-se molt abans en ronyó i intestí de fetus (281).

Altres espècies, com la rata, semblen seguir un model de desenvolupament similar a l'humà: l'activitat és molt baixa abans del part, però després augmenta linealment amb l'edat. En el moment del naixement, els valors d'activitat pugen fins al 20-25 % dels valors adults, assolint-els definitivament prop dels 20 dies de vida (254, 258, 278).

5.2.2. Desenvolupament de l'ALDH

Es coneix molt poc sobre el desenvolupament de l'activitat ALDH en fetge humà. Sembla que el fetge fetal es capaç d'eliminar l'acetaldehid amb una velocitat de metabolització de $0,6 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ teixit, mesurada amb acetaldehid 1 mM , encara que un terç de l'acetaldehid metabolitzat seria reduït a etanol per acció de l'ADH (251).

En rata, les activitats ALDH d'alta K_m i de baixa K_m es detecten a partir del dia 15 de gestació, amb un 2-5 % de les activitats adultes, augmentant gradualment al llarg del desenvolupament i assolint els

nivells adults als 50 dies de vida. El dia del naixement són del 20 % (278).

5.3. Antecedents sobre l'ADH i l'ALDH de placenta

Les poques dades bibliogràfiques sobre el metabolisme de l'etanol i de l'acetaldehid en placenta suggereixen l'existència d'activitats ADH i ALDH. Els enzims responsables d'aquestes activitats en placenta han sigut molt poc estudiats, no havent estat mai purificats ni caracteritzats.

Hagerman (122), l'any 1969, detecta per primera vegada activitat ADH en la fracció soluble d'un homogenat de placenta humana. En un estudi posterior, Krasner i col. (183) presentaren algunes de les propietats cinètiques i electroforètiques de l'ADH de placenta obtingudes directament de l'homogenat del teixit.

Investigacions més recents realitzades en placenta de rata no varen detectar activitat ADH en el sentit de reducció dels aldehids els dies 15 i 20 de gestació. El substrat emprat fou acetaldehid 8 mM, a pH 7,5 (278).

Kouri i col. (181), l'any 1977, mesuraren les activitats ALDH en homogenat de placenta humana utilitzant acetaldehid com a substrat, trobant quatre vegades menys activitat que en placenta de rata. L'activitat mesurada amb acetaldehid 18 mM fou només un 0,1 % de l'activitat trobada en fetge humà. L'activitat de baixa Km fou encara molt més petita comparada amb les activitat trobades normalment al fetge. Els mateixos autors estimaren que la fracció mitocondrial de la cèl·lula placentària contindria més de la meitat de l'activitat ALDH total (181).

En placenta de rata, Sippel i Kesaniemi (277) trobaren un 8 % de l'activitat ALDH del fetge adult, amb el que la placenta sencera tindria una activitat equivalent al 50 % de l'activitat total del fetge de fetus. Aquests mateixos autors, després de l'administració d'etanol a rates

embarassades, només trobaren en la placenta un 25 % de la concentració d'acetaldehid present en la sang materna, i gens d'acetaldehid en el fetus (176). Aquestes dades suggerien que la placenta de rata protegiria el fetus enfront de la intoxicació per acetaldehid, impedit la seva lliure difusió, al contribuir a la seva metabolització. Resultats similars foren obtinguts per Guerri i col. (120) amb rates intoxicades crònicament, encara que detectaren acetaldehid en el fetus en nivells similars als de la placenta.

6. IMPORTÀNCIA I LIMITACIONS DE L'ESTUDI CONJUNT DE L'ADH I L'ALDH

ADH i ALDH, principals enzims de la via metabòlica de l'etanol, es distingeixen per una sèrie de propietats comunes que fan interessant el seu estudi conjunt.

Ambdues deshidrogenases apareixen universalment distribuïdes en la naturalesa, mostrant una notable conservació de la seva estructura primària al llarg de l'evolució de les espècies. Els dos enzims exhibeixen múltiples formes moleculars o isoenzims amb variants al·lèliques en la població, amb diferent distribució tissular i propietats generals. Els isoenzims de l'ALDH presenten ademés diferent localització subcel·lular. Tot plegat podria contribuir a explicar les diferències individuals observades en la capacitat de metabolització de l'alcohol (197).

Dels estudis de distribució tissular sembla inferir-se una complementarietat metabòlica entre ADH i ALDH, ja que són precisament els teixits que contenen més ADH els que posseeixen més activitat ALDH (77, 172, 256). Per altra banda, la presència d'ambdós enzims en un mateix teixit podria accentuar localment el desequilibri que es produeix en el potencial red-ox després de la ingestió d'alcohol (324) (veure 1.2.5.). Cal remarcar que els dos enzims apareixen sincrònicament en el fetge fetal i del nadó durant el desenvolupament, no assolint els nivells adults fins després del naixement.

L'elevada concentració en fetge i l'àmplia especificitat de substrat, suggereixen un paper fisiològic de desintoxicació molt més ampli i important que no la simple eliminació de l'etanol i l'acetaldehid, encara que és indubtable la seva contribució a l'eliminació d'aquests tòxics.

L'elevat nombre de residus de cisteïna, alguns d'ells probablement en el centre actiu, explica la inestabilitat d'ambdós tipus d'enzims durant l'aïllament, quan són exposats a l'oxigen atmosfèric, àdhuc en presència

d'un excés d'agents reductors (2-mercaptoetanol o DTT). Per tant, en alguns casos es aconsellable treballar en atmosfera de nitrogen (180).

La complexitat dels sistemes ADH i ALDH ha dificultat enormement el seu estudi. Si bé els primers treballs es realitzaren molt aviat, sobretot en fetge de cavall, no ha sigut fins al desenvolupament de mètodes analítics i preparatius més ràpids i resolutius, com l'electrofocalització i la cromatografia d'afinitat, i més tard de la cromatografia líquida d'alta resolució, tècniques immunològiques i de genètica molecular, que s'ha assolit un coneixement més exacte de l'estructura i funció d'aquests enzims. Per altra banda, la manipulació dels enzims en condicions anaeròbies ha permès la seva obtenció amb elevats rendiments.

Encara que la recerca dels dos enzims ha sigut paralela, per l'indubtable interès que comporta el coneixement global de la via metabòlica de l'etanol, l'ALDH és actualment un enzim molt menys conegut que l'ADH.

CAPITOL II

OBJECTIUS

Capítol II : OBJECTIUS DE LA TESI

L'elecció de la placenta humana com a principal òrgan d'estudi respon a un interès intrínsec pel coneixement del metabolisme d'aquest peculiar òrgan i, sobretot, dels enzims que podrien oxidar l'alcohol en el seu pas cap al fetus. D'altra banda, la utilització de teixit placentari comporta evidents avantatges de tipus metodològic: és fàcilment obtenible, constituint la font més abundant de teixit humà fresc, el que permet mesurar les activitats enzimàtiques molt poc temps després de la seva obtenció, realitzar estudis de fraccionament subcel·lular sense problemes de deterioració del teixit (veure I.4.5.1.) i disposar de suficient material biològic per a la purificació i caracterització dels seus enzims. Addicionalment, l'origen fetal de la placenta podria representar un sistema accessible per a l'anàlisi de la dotació isoenzimàtica del futur nadó.

Amb l'objectiu general d'investigar si la placenta disposava d'un sistema propi de desintoxicació enfront de l'etanol, similar al que posseeix el fetge, ens varem proposar cobrir els següents objectius parcials:

1. Anàlisi electroforètica dels isoenzims de l'alcohol deshidrogenasa i de l'aldehid deshidrogenasa presents en placenta humana i comparació amb els isoenzims respectius de fetge humà.
2. Purificació a homogeneïtat i caracterització físico-química i cinètica de l'alcohol deshidrogenasa i de l'aldehid deshidrogenasa de placenta humana, comparant les seves propietats amb les dels isoenzims de fetge humà i d'altres espècies de mamífer.
3. Localització subcel·lular de l'alcohol deshidrogenasa i de l'aldehid deshidrogenasa de placenta humana.

4. Determinació de la capacitat global de metabolització de l'alcohol de la placenta humana i del possible paper fisiològic de l'alcohol deshidrogenasa i de l'aldehid deshidrogenasa de placenta en la protecció del fetus en mares alcohòliques.

CAPITOL III

MATERIALS I METODEDES

Capítol III : MATERIALS I MÈTODES

1. MÈTODES PREPARATIUS

1.1. Reactius

Tots els reactius emprats foren de la màxima puresa (qualitat "per a anàlisi")

1.1.1. Procedència dels coenzims i substrats

NAD⁺ (Grade III), NADH (Grade III), NADP⁺ (Sigma Grade), NADPH (Type I), tot trans-retinol, 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etanol, 17 β -estradiol, 17 β -estradiol-3-sulfat, 5 β -dihidrotestosterona, 3 β -hidroxi-5 β -androstan-17-ona, estriol, tot trans-retinal, semialdehid succínic, indole-3-acetaldehid (bisulfit sòdic), piridoxal, acetat de 1-naftil i acetat de 4-nitrofenil provenien de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, E.U.A.). El formaldehid es va preparar a partir de paraformaldehid (Sigma) (veure III.1.1.2.5.). El malondialdehid es va sintetitzar a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropà (Sigma) (veure III.1.1.2.6.).

Etanol, butanol, pentanol, hexanol, octanol, alcohol benzílic, alcohol cinnàmic, acetaldehid, hexanal, octanal, benzaldehid i aldehid cinnàmic varen ser obtinguts de E. Merck (Darmstadt, R.F.A.).

Propanal, butanal i 3-nitrobenzaldehid foren de Aldrich Chemie GmbH and Co. KG (Steinheim, R.F.A.).

Geraniol, 4-nitrobenzaldehid, 4-clorobenzaldehid, 4-hidroxibenzaldehid i vainillina varen ser subministrats per Fluka AG (Buchs SG, Suïssa).

Nerol i citral foren de Lucta S.A. (Barcelona).

Acetaldehid, propanal, butanal i hexanal varen ser destil·lats abans del seu ús, tal com s'explica a continuació.

1.1.2. Preparació dels substrats per a l'anàlisi enzimàtica

1.1.2.1. Destil·lació dels aldehids

Els aldehids, per la seva elevada reactivitat química, donen lloc a reaccions de hidratació, condensació aldòlica i d'oxidació al seu acid carboxílic quan són emmagatzemats (76), per molt que la preparació comercial sigui d'elevada puresa. Per tant, cal procedir a la seva destil·lació immediatament abans de la seva utilització. Una vegada destil·lats, i encara que es conservin a -40°C , s'alteren de nou ràpidament. Cal, doncs, destil·lar-els cada vegada, sempre que sigui possible.

Per als aldehids de baix pes molecular, com acetaldehid, propanal i butanal s'utilitzà un equip de destil·lació simple Afora 502 (Afora S.A, Barcelona), mentre que per als aldehids d'alt pes molecular, com hexanal, va caldre ademés un accessori de destil·lació al buit.

En ambdós casos la destil·lació es realitzà dins d'una campana de gasos. L'escalfament del matras es feu mitjançant un bany termostatitzat Univeba S-401 (Selecta, Martorell) omplert amb silicona "Fluido 710 Rodhorsil" (Siliconas Hispania S.A., Barcelona), i recollint el producte destil·lat dins d'un matràs en bany de gel. Es desprecienen el primer i últim quarts de volum de destil·lat, aprofitant només el destil·lat en el període intermedi i no sobrepasant en cap cas la temperatura d'ebullició de l'aldehid (Taula XI).

TAULA XI. Punts d'ebullició dels aldehids destil·lats.

<u>aldehid</u>	<u>p.eb. (°C)</u>
acetaldehid	21
propanal	48
butanal	75
hexanal	131

1.1.2.2. Conservació dels aldehids

Prèviament a la seva utilització en els estudis cinètics i en les tincions dels gels de midó, l'aldehid destil·lat es conservà dins d'un matràs Erlenmeyer de 50 ml amb tap de rosca, protegit de la llum amb paper d'alumini, i emmagatzemat a -40°C. L'aldehid s'utilitzà sempre dins d'un període no superior a 4 o 5 dies.

Per als estudis cinètics, es prepararen solucions aquoses tamponades al 3 % (v/v) amb aldehid recent destil·lat, les quals es conservaren sense alteració a 4°C més de 7 dies.

1.1.2.3. Mesura de la concentració de propanal

El propanal fou l'aldehid més àmpliament utilitzat com a substrat de l'ALDH, tant en estudis cinètics com per a la mesura de l'activitat estàndard. La seva volatilitat, però, dificultava la mesura correcta del volum en preparar les dissolucions. Calia, doncs, disposar d'un mètode que ens permetés en tot moment conèixer la concentració exacta de propanal en solució, així com el seguiment de la seva deterioració amb el temps una vegada destil·lat.

El mètode emprat fou el de la reducció de l'aldehid per acció de l'ADH de llevat (300). La reacció catalitzada per l'ADH de llevat és

perfectament reversible a pH neutre, on l'equilibri es desplaça completament cap a la formació de l'alcohol (veure 1.3.1.). En presència d'elevades concentracions d'enzim (0,4 μ M) i de NADH en excés respecte a l'aldehid, la reacció és ràpida, completa i estequiomètrica. La disminució en la concentració de NADH es mesura espectrofotomètricament a 340 nm, tal com s'especifica a 111.2.1., i fou equivalent a la concentració d'aldehid.

En un volum de 3 ml, s'afegiren en aquest ordre:

- 2.700 μ l de tampó fosfat monopotàssic-KOH (Panreac) 50 mM, pH 7,0
- 100 μ l d'una dissolució de 4,58 mg NADH/ml de tampó (0,2 mM a l'assaig)
- 100 μ l d'una solució de 1,76 mg d'ADH de llevat (Sigma)/ml de tampó

Es prengué nota de l'absorbància i s'afegiren:

- 100 μ l d'aldehid (aproximadament 0,1 mM a l'assaig)

S'enregistrà l'augment d'absorbància a 340 nm durant 1-2 min fins que s'assolí un valor constant.

El mètode es revela molt millor que no pas la utilització d'ALDH de llevat (Sigma), ja que les preparacions comercials d'aquesta última foren poc actives.

1.1.2.4. Mètodes de solubilització de substrats i inhibidors

Alguns dels estudis cinètics requeriren la utilització de compostos d'elevada hidrofobicitat, el que impedia la seva completa solubilització en els medis aquosos comunment emprats. Tres foren els mètodes més usats en la preparació d'aquestes solucions: la solubilització amb detergents, la solubilització per homogenització-dispersió i la solubilització amb dissolvents orgànics.

- Solubilització amb detergents

Després d'assajar diverses tècniques, el mètode de solubilització amb detergents és el que va ser escollit en la solubilització del retinol i del retinal, i és el descrit per Julià (169, 170), basat en el de Reyner (259).

Per al retinol, es pesaren 6 mg de tot trans-retinol i es varen dissoldre en 0,5 ml d'acetona (Merck). D'aquesta dissolució se n'agafaren ràpidament 350 μ l i s'afegiren a 50 ml de tampó glicina-NaOH 0,1 M, pH 10,0, contenint Tween 80 (Sigma) al 0,02 % (p/v), per tal d'obtenir una concentració final de retinol adequada (300 μ M) per als estudis cinètics. Tot el procés es realitzà en absència de llum.

L'espectre d'absorció del retinol dissolt d'aquesta forma fou idèntic al publicat per Reyner (259), amb un màxim a 328 nm. Utilitzant el coeficient d'extinció molar per al retinol $\epsilon_{328} = 39.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (259), s'observà sempre una concentració inferior a la calculada per pes. Malgrat això s'utilitzà el valor obtingut espectrofotomètricament com a mesura de la concentració real de retinol.

Per al tot trans-retinal es seguí el mateix mètode, però la concentració es calculà a partir de l'absorció a 400 nm, amb un $\epsilon_{400} = 29.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (259).

- Solubilització per homogenització-dispersió

Aquest mètode s'emprà en la dissolució de sòlids i líquids poc solubles, amb l'avantatge sobre l'anterior de no afegir altres components al tampó de l'assaig enzimàtic i, per tant, evitant qualsevol pertorbació de l'activitat enzimàtica.

El substrat, pesat o mesurat per aconseguir al final una concentració de l'ordre de 0,1-20 mM, es va dissoldre molt lentament en un vas de 10 ml per addició del tampó a temperatura ambient, gota a gota, procurant

evitar la formació de grumolls, formant-se una solució pastosa però homogènia. Lentament, s'hi afegí més tampó sense deixar d'agitar. La barreja, d'uns 5 ml i aspecte de dissolució col·loidal, s'afegí a un matràs aforat que contenia uns 100 ml de tampó en agitació forta, rentant després exhaustivament el vas de 10 ml de les restes de substrat i arrasant en el matràs a 100 ml. Periòdicament, el matràs es sotmetia a una agitació manual molt enèrgica.

Si al cap de 1 h d'agitació no s'observava un aspecte homogeni, el contingut del matràs es trasvassava a un recipient de plàstic i es sotmetia a una homogenització més enèrgica en un homogenitzador-dispensador Ystral (Döttingen, R.F.A.).

La solució s'emprava immediatament en els estudis cinètics i d'especificitat de substrat. En el cas de substrats sòlids, quan es formava un precipitat en el fons del recipient per agregació i sedimentació de les partícules, la solució es centrifugava a 27.000 x g durant 10 min en una centrifugadora Sorvall RC-5B en tubs de polipropilè de 40 ml, a temperatura ambient per a evitar noves precipitacions.

Seguidament, es mesurava l'espectre d'absorció del sobrenedant, per tal de calcular la concentració real de substrat. Sempre que fou possible es realitzaren els controls adequats d'activitat amb ADH de fetge de cavall (Sigma).

El mètode s'emprà amb èxit en la dissolució d'aldehids alifàtics de cadena llarga, nitrobenzaldehids i esteroides.

- Solubilització amb dissolvents orgànics

- Solubilització del disulfiram i de la rotenona

El disulfiram (Sigma) i la rotenona (Sigma) es varen dissoldre sempre en metanol (Merck) a les concentracions de 12 mM i 0,6 mM, respectivament. En l'assaig enzimàtic es varen afegir 10 µl d'aquestes

solucions a un volum total de 3 ml. Es va comprovar que l'addició de 10 µl de metanol no afectava l'activitat enzimàtica.

- Solubilització dels esters

- L'acetat de 4-nitrofenil es preparà immediatament abans del seu ús en acetona (Merck) a una concentració de 30 mM. La concentració màxima d'acetona a l'assaig fou del 3 % (v/v), no afectant les mesures d'activitat (11, 71).

La concentració exacta de l'acetat de 4-nitrofenil es determinà mesurant l'increment d'absorbància a 400 nm degut a la hidròlisi alcalina de l'ester en NaOH 0,1 M, emprant-se un coeficient d'extinció molar per a l'anió 4-nitrofenolat de $18.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (274, 307).

- L'acetat de 1-naftil es va dissoldre immediatament abans del seu ús en etanol (Merck) a una concentració de 20 mM, de forma que la concentració màxima d'etanol a l'assaig fou del 10 % (v/v) (193). Aquesta concentració d'etanol no va afectar l'activitat de l'enzim.

La concentració de l'acetat de 1-naftil es determinà per hidròlisi alcalina en NaOH 0,1 M i mesura de l'absorbància a 292 nm, emprant un coeficient d'extinció molar per al 1-naftol a pH 8,5 de $4.677 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (124).

1.1.2.5. Preparació del formaldehid

El formaldehid es va preparar a partir d'una solució de paraformaldehid al 10 % (p/v) en aigua destil·lada, que s'escalfà a 60°C en un bany termostatitzat per tal de facilitar-ne la dissolució. S'ajustà a pH 7,0 amb NaOH 0,1 M i es filtrà (57). La solució resultant de formaldehid es conservà a 4°C.

1.1.2.6. Preparació del malondialdehid

El malondialdehid es va sintetitzar immediatament abans del seu ús, a partir de 250 µl de 1,1,3,3-tetraetoxipropà, per hidròlisi de l'acetal en 25 ml de HCl 1 N, a temperatura ambient durant 20 min. S'ajustà el pH a 8,5 amb NaOH 0,1 N i s'arrasà a 50 ml amb tampó pirofosfat sòdic 33 mM, pH 8,5 (140). El malondialdehid és altament inestable, polimeritzant molt fàcilment, pel que es conservà protegit de la llum a 4°C.

La concentració del malondialdehid obtingut es va mesurar per espectrofotometria directa de la β-hidroxiacroleïna corresponent en HCl 1 N ($\epsilon_{245} = 14.900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) o per reacció amb l'àcid 2-tiobarbitúric (48). En aquest assaig, l'àcid 2-tiobarbitúric (Sigma) es va dissoldre, escalfant suaument, en HCl 0,25 N de forma que la concentració final fou del 0,375 % (p/v). A 2 ml d'aquesta solució s'afegí 1 ml de la solució de malondialdehid, s'agità la barreja i s'escalfà en un bany termostatitzat a 100°C durant 15 min. Una vegada refredada, es llegí l'absorbància a 535 nm, emprant un coeficient d'extinció molar de $156.000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (48).

1.2. Solucions amortidores

1.2.1. Procedència dels reactius utilitzats per a la preparació de tampons

El Tris (tris(hidroximetil)aminometà), de pKa = 8,3, va ser obtingut de Merck, Sigma o Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, E.U.A.). L'acetat sòdic (pKa = 4,76), fosfat monossòdic (pKa = 6,8), pirofosfat sòdic (pKa = 8,2) i glicina (pKa = 9,9) provenien de Merck. L'Hepes (àcid N-2-hidroxiètilpiperazina-N'-etasulfònic), de pKa = 7,55, fou subministrat per Sigma.

El pH final de les solucions tampó fou ajustat emprant quantitats

apropiades d'àcid clorhídric o àcid ortofosfòric, o bé hidròxic sòdic, tots ells de Panreac p.a. (Montplet y Esteban S.A., Montcada i Reixac).

1.2.2. Efecte de la temperatura sobre el pH de tampons que contenen Tris

El pH de les solucions de Tris presenta variacions importants amb la temperatura, 0,03 unitats de pH/°C (116). Així, el pH d'una solució de Tris 10 mM, pH 7,9 a 4°C, passaria a ser aproximadament de 7,5 quan la temperatura augmentés a 10°C. Els tampons es prepararen, doncs, a partir de Tris 1 M i el pH fou ajustat en fred amb HCl concentrat, o bé a temperatura ambient però tenint en compte l'esmentat anteriorment.

1.2.3. Desgasificació i saturació dels tampons amb nitrogen

En la purificació de l'ALDH de placenta, es va treballar en condicions anaeròbiques per a evitar l'oxidació dels grups cisteïna lliures de l'enzim. Tots els tampons utilitzats varen ser desgasats, una vegada refredats a 4°C, mitjançant una trompa d'aigua en un matràs de Kitasato de 3 l amb agitació durant 10 min. Tot seguit es va fer bombollear nitrogen (tipus "R", Sociedad Española del Oxígeno, Madrid) en el si del tampó durant uns minuts a 4°C.

1.2.4. Tampons emprats en la purificació de l'ADH de placenta

- Tampó 1 : Tris-HCl 10 mM, pH 7,9 a 4°C ($\mu = 0,53$ mmho) (239) (tampó inicial de la cromatografia de bescurus iònic).
- Tampó 2 : Fosfat monossòdic-NaOH 10 mM, pH 7,3 (tampó inicial de la cromatografia d'afinitat).
- Tampó 3 : Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 a 4°C.

1.2.5. Tampons emprats en la purificació de l'ALDH de placenta

- Tampó 4 : Tris-HCl 10 mM, EDTA (Titriplex III, Merck) 1 mM, DTT (Sigma) 1 mM, pH 8,2 a 4°C ($\mu = 0,63$ mmho) (tampó inicial de la cromatografia de bescanvi iònic).
- Tampó 5 : Fosfat monossòdic-NaOH 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 6,0 (tampó inicial de la cromatografia d'afinitat).
- Tampó 6 : Fosfat monossòdic-NaOH 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 6,0.
- Tampó 7 : Fosfat monossòdic-NaOH 30 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,3 (tampó de la cromatografia de gel filtració).

Els tampons es varen preparar com a màxim un o dos dies abans de la seva utilització, per tal d'evitar la deterioració que sofreix el DTT. Posteriorment, varen ser desgasats i saturats amb nitrogen, tal com s'explica a III.1.2.3.

1.3. Obtenció i conservació del teixit

Les placentes, amb un pes aproximat 500 g, es varen obtenir del Servei d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu de Barcelona, i provenien d'embarassos normals, a terme (38-42 setmanes de gestació). Per als estudis rutinaris, varen ser congelades dins de les 2 h següents al part, transportades ràpidament dins d'una nevera portàtil amb gel i emmagatzemades a -40°C fins a la seva utilització. Prèviament s'havia comprovat que una única congelació i descongelació del teixit no disminuïa les activitats dels enzims objecte d'aquest estudi. Les placentes es processaren sempre dintre dels tres mesos següents a la seva obtenció.

1.4. Aïllament i purificació dels enzims

La purificació de l'ADH i de l'ALDH de placenta comportà una sèrie de mètodes preparatius (veure III.1.4.1. i següents) que foren comuns per als dos enzims, a excepció de les condicions de pH i força iònica que vingueren determinades pel tipus de tampó emprat (III. 1.2.4.). Esquemes generals del procés de purificació de l'ADH i de l'ALDH s'indiquen en les Figs. 11 i 12, respectivament.

1.4.1. Homogenització del teixit

En una purificació típica, una mostra de teixit placentari sense descongelar es trossejà i se'n pesaren uns 500 g. Quan el teixit començà a descongelar-se es separaren les restes de les membranes fetals, cordó umbilical i tot el teixit vascular i connectiu possible. El teixit es pesà novament, es trossejà més extensament amb tisores i s'hi afegí tampó 1 o tampó 4 (segons es tractés d'una purificació de l'ADH o de l'ALDH, respectivament) en la proporció 1:1 (p/v), a 4°C.

La mostra es repartí en tres vasos de precipitats que es mantingueren en bany de gel. En una primera fase, l'homogenització es realitzà mitjançant un aparell Minipimer (Braun Española S.A., Esplugues de Llobregat) a la màxima velocitat, en tres tandes de 2 min cada una. Seguidament, la barreja es passà durant 1 min per un homogenitzador-dispersador Ystral a una velocitat de 10.000 r.p.m., per tal d'acabar de trencar les cèl·lules del teixit.

L'homogenat així obtingut (aproximadament 1.000 ml) presentà un característic color vermell degut a l'hemoglobina provinent de la sang, així com una considerable quantitat de teixit conjuntiu blanquinós.

La manipulació del teixit, així com de la mostra en els primers

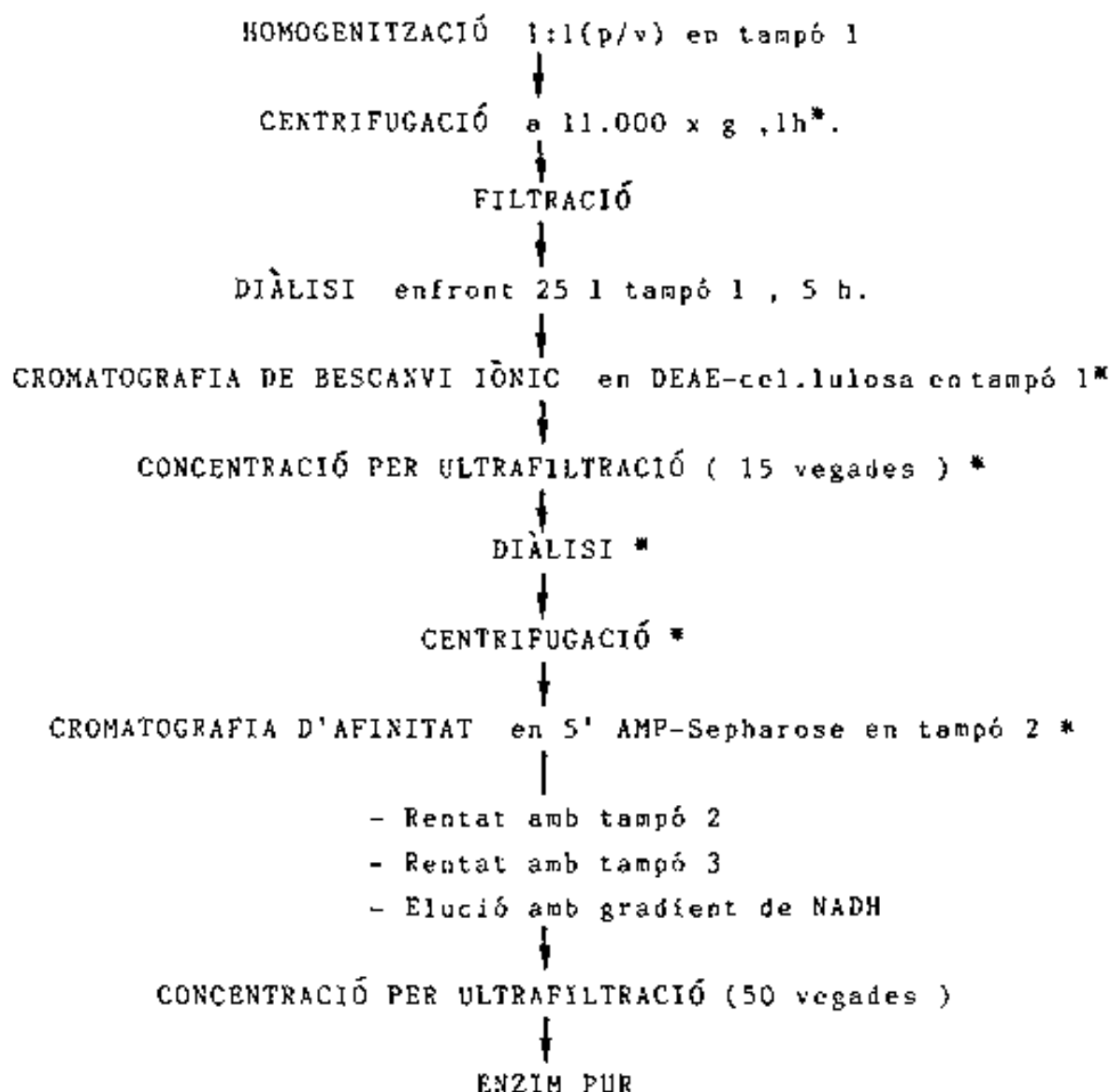


FIGURA 11 Esquema de la purificació de l'ADH de placenta humana.

Tot el procés es realitzà a 4°C. Per a la composició dels tampons veure III. 1.2.4.

* En el passos indicats es separà una alíquota per a la determinació de l'activitat enzimàtica i de la concentració de proteïnes. L' alíquota s'analitzà immediatament o es conservà a -40°C fins al moment de la seva anàlisi.

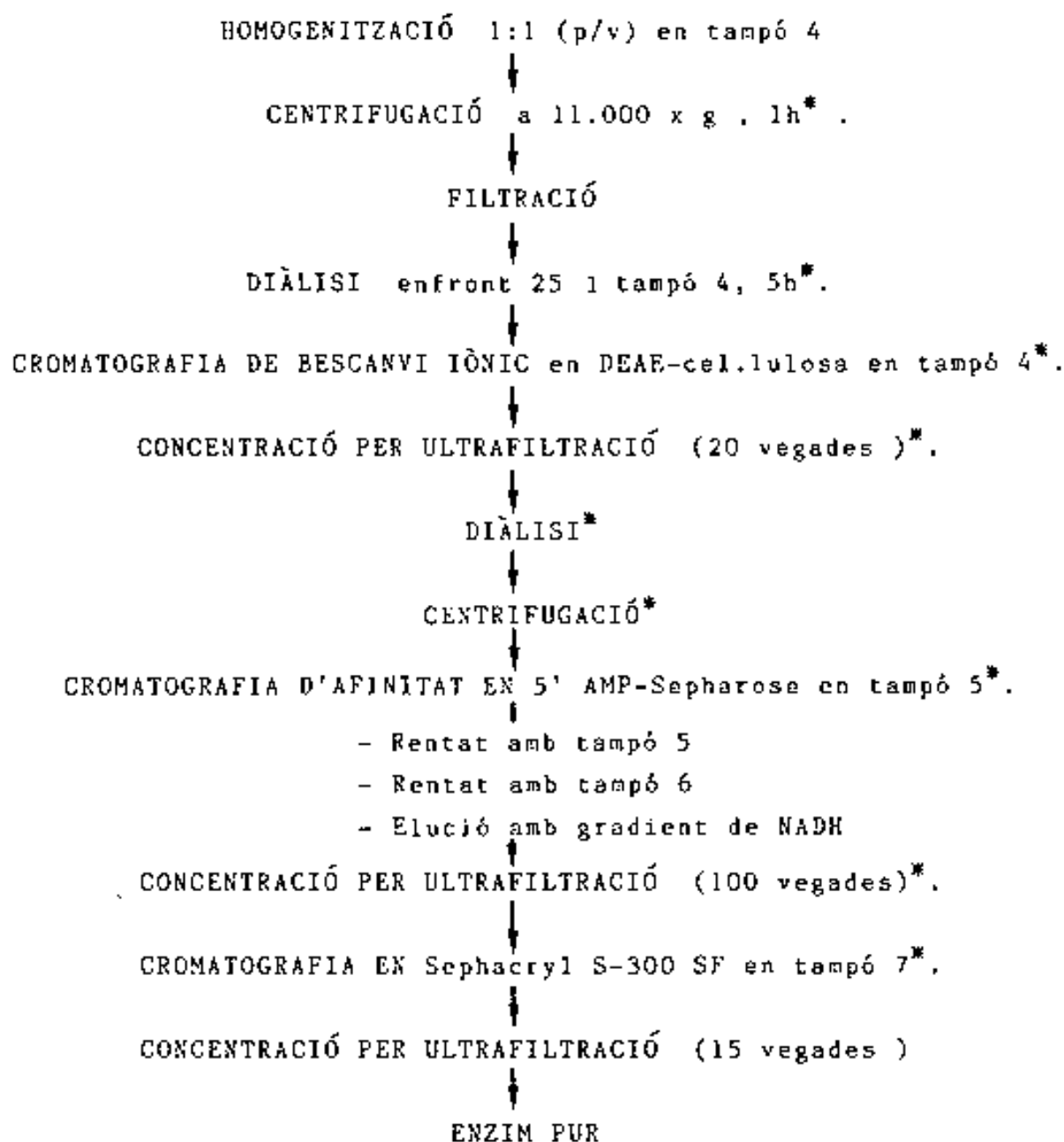


FIGURA 12 Esquema de la purificació de l'ALDH de placenta humana.

Tot el procés es realitzà a 4°C. Tots els tampons emprats foren desgasats i saturats amb nitrogen. Per a la composició dels tampons veure III. 1.2.5.

* En els passos indicats es separa una alíquota per a la determinació de l'activitat enzimàtica i de la concentració de proteïnes. L'alíquota s'analitzà immediatament o es conservà a -40°C fins el moment de la seva anàlisi.

estadis de la purificació, es feu amb la protecció de guants de plàstic o de cirugia.

1.4.2. Centrifugació i filtració

L'homogenat es va centrifugar durant 1 h a $11.000 \times g$ (8.000 r.p.m.) i a 4°C , en una centrifugadora refrigerada Sorvall RC-5B (Dupont Instruments, Newtown, CN, E.U.A.), utilitzant un rotor GSA i 6 ampolles de polipropilè de 250 ml cada una. El sobrenedant (aproximadament 700 ml) es va decantar acuradament, obtenint-se una solució vermella i translúcida. Quan la solució era tèrbola, es filtrava tot seguit a través d'un embut de placa porosa que contenia resina DEAE-cel·lulosa (Whatman, Maidstone, Regne Unit) (2×10 cm), equilibrada amb el tampó de la cromatografia de bescanvi iònic, per tal d'eliminar la grassa i altres partícules insolubles.

1.4.3. Diàlisi

1.4.3.1. Preparació dels sacs de diàlisi

Els sacs foren de cel·lulosa, del tipus 250-7U (Sigma), prèviament tallats, amb una capacitat aproximada de 50 ml, o bé del tipus Visking (Medicell International Ltd., Londres, Regne Unit).

Per tal d'eliminar possibles impureses que poguessin contaminar la mostra, els sacs es tractaren de la següent manera: Es bulliren en 600 ml d'aigua destil·lada quatre vegades successives. Els dos primers cops s'hi afegiren, ademés, 6 g, aproximadament, de bicarbonat sòdic (Merck). Una vegada refredats, els sacs es conservaren a 4°C , prèvia addició d'unes gotes de cloroform (Panreac) per tal d'evitar el creixement de microorganismes. Inmediatament abans d'utilitzar-els, els sacs es rentaren exhaustivament amb aigua destil·lada i s'agafaren sempre pels extrems o bé amb guants de plàstic.

1.4.3.2. Equilibració de la mostra

El sobrenedant es repartí en 14-15 sacs de diàlisi (aproximadament 50 ml/sac) amb l'ajut d'un embut petit, tancant-se amb dos nusos a cada un dels extrems. Els sacs es submergiren en vasos que contenien tampó 1 (per a l'ADH) o tampó 4 (per a l'ALDH) a 4°C, enfront dels volums i en els temps següents: primer, 2 h en 10 l de tampó, i després, 3 h en 5 l de tampó amb 2 canvis.

La diàlisi es realitzà sempre amb agitació del tampó i a 4°C.

Acabada la diàlisi es mesurà el pH i la força iònica de la mostra per tal de conèixer el grau d'equilibració aconseguit.

1.4.4. Cromatografia de bescanvi iònic

1.4.4.1. Preparació de la resina de bescanvi iònic

La resina utilitzada fou DEAE-cel·lulosa DE 52 microgranular i prehidratada (Whatman) que posseeix grups dietilaminoetil (DEAE) (Fig. 13).

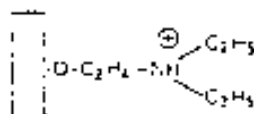


FIGURA 13 Grup dietilaminoetil (DEAE) .

Al estar carregats positivament en un ampli rang de pH (pH 2-pH 9), els grups DEAE uneixen anions com poden ser els clorurs (Cl^-) del NaCl, els grups hidroxil de l'aigua (OH^-) o els enzims objecte d'aquest estudi, que en el pH al que es realitza la cromatografia estan carregats negativament. Es tracta, doncs, d'una resina de bescanvi aniònic.

- Equilibració de la resina

S'agafaren 500 g de DEAE-cel·lulosa i s'afegiren, agitant amb una vareta de vidre, a 2 l de tampó amb una força iònica 10 cops superior (Tris 0,1 M) al de la cromatografia (Tris 10 mM), per tal d'arribar més ràpidament al pH desitjat. La suspensió es deixà sedimentar en un embut filtrant de 3 l i es rentà amb uns 10 l del tampó més concentrat. Una vegada assolit el pH, la resina es rentà amb uns 20 l del tampó de la cromatografia (tampó 1 o tampó 4), fins que la força iònica de l'eluit era idèntica a la del tampó inicial.

- Eliminació dels "fines"

Els "fines" o partícules de resina més petites del normal ($10 \mu\text{m}$) i, per tant, de sedimentació més lenta, són la causa de molts problemes en la cromatografia, com poden ser: distorsió en l'entrada de la mostra, fluxos disminuïts, col·lapsament de la columna, etc.

Els "fines" s'eliminaren en un vas de 3 l per decantació del tampó sobrenedant, una vegada sedimentada la major part de la resina prèviament equilibrada. Aquest procés es repetí 3 cops més.

- Regeneració de la resina

Una vegada utilitzada, cal regenerar la resina retornant-li la seva capacitat de bescanvi. En un primer tractament, la resina es suspengué durant 30 min en 15 volums de HCl (Panreac) 0,5 N. Seguidament, es rentà exhaustivament amb aigua destil·lada en un embut filtrant, fins arribar a pH 4. En un segon tractament, la resina es suspengué en 15 volums de NaOH

(Panreac) 0,5 N durant 1 h (332). Es realitzà un nou rentat amb aigua destil·lada fins arribar al pH del tampó de la columna de bescanvi iònic (tampó 1 o tampó 4). Una mateixa resina es regenerà fins a un màxim de tres vegades.

La resina regenerada s'equilibrava seguint el procediment descrit anteriorment.

1.4.4.2. Empaquetament de la resina en la columna

500 g de DEAE-cel·lulosa, prèviament equilibrada i eliminats els "fines", es suspengueren en 2 l del tampó de la cromatografia (tampó 1 o tampó 4) i s'empaquetaren a temperatura ambient en una columna de 5 x 50 cm, a un flux de 100 ml/h, lleugerament superior al de la cromatografia. Un cop empaquetada la resina, la columna es col·locà dins d'una cambra freda a 4°C, on acabà de sedimentar la resina, que ocupà un volum de prop de 900 ml. Una vegada refredada, la resina es rentà amb 1 l de tampó a un flux de 90 ml/h per a acabar-la d'equilibrar, comprovant-se finalment que el pH i la força iònica del tampó eluït eren idèntics als del tampó aplicat.

1.4.4.3. Aplicació de la mostra

Un cop equilibrada la mostra (750 ml) per diàlisi (veure III.1.4.3.), s'aplicà a la columna amb l'ajut d'una pipeta d'èmbol de 10 ml, procurant no distorsionar la superfície lliure de la resina. La totalitat de la mostra es feu entrar a un flux de 50 ml/h, controlant la possible formació d'esclatxes laterals en la resina per col·lapsament. Les bombes peristàltiques més utilitzades per al control del flux foren la Varioperpex (LKB-Produkter AB, Bromma, Suècia) i la Microperpex 2132 (LKB). Les fraccions, d'un volum de 10 ml, foren recollides amb un col·lector Ultrorac (LKB) o bé amb un Redirac 2112 (LKB). El seguiment de l'hemoglobina present en la mostra permeté la contínua avaluació del desenvolupament de la cromatografia i del grau de retenció de la mostra.

Per tal d'eliminar les proteïnes no unides a la resina, i que eluïen en el volum d'exclusió, la columna es renta amb 1 l de tampó 1 o tampó 4 a un flux de 90 ml/h.

1.4.4.4. Elució de l'enzim

L'enzim va ser eluït mitjançant un gradient salí lineal de 0 a 0,15 M de NaCl (Merck) de volum total 3 l, a un flux de 60 ml/h. El gradient s'aconsegüí amb dos vasos de precipitats, connectats en sifó, que contenien l'un 1,5 l de tampó, i l'altre 1,5 l de NaCl 0,15 M en el mateix tampó. Una vegada eluït l'enzim, s'aplicaren 2 l de NaCl 1 M per a rentar la resina de les proteïnes més fortament unides. La resina es conservà en azida sòdica (Merck) al 0,04 % (p/v) fins a la seva regeneració.

Es mesurà l'activitat enzimàtica i s'estimà la concentració de proteïna de les fraccions cromatogràfiques tal com es descriu en les seccions III.1.1.1., III.2.1.2.1., III.2.1.4. i III.2.4.1. El perfil de la conductivitat del gradient salí es va seguir per mesura en un conductímetre CDM3 (Radiometer, Copenhagen, Dinamarca). El pH de les fraccions del gradient es mesurà en un pHmetre PHM 61 (Radiometer).

1.4.5. Concentració per ultrafiltració

Les fraccions que mostraren activitat enzimàtica (300 ml) es varen reunir, procurant menysprear aquelles que continguessin molta hemoglobina, i es varen concentrar per ultrafiltració fins a un volum de 20 ml. S'emprà un concentrador de 200 ml Amicon (Amicon Corp., Danvers, MA, E.U.A.) amb una membrana Diaflo PM 10 de 62 mm (Amicon) que reté les proteïnes de pesos moleculars superiors a 10.000 dalton. La mostra es va mantenir en agitació suau, a 4°C i sota una pressió de nitrogen (tipus "R", Sociedad Española del Oxígeno) de 2,5 Kg/cm².

Les membranes es rentaren en una solució de KCl (Panreac) 2 M durant 2 h, guardant-se després en aigua destil·lada i unes gotes d'etanol, a 4°C, per a evitar el creixement de microorganismes.

1.4.6. Cromatografia d'afinitat

La resina utilitzada fou 5'AMP-Sepharose (Sigma), que conté el grup 5'AMP (2 μ moles de 5'AMP/ml de gel) unit covalentment pel grup N⁶-amino, per mitjà d'un braç espaiador de 6 carbonis, a una matriu de Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suècia) (Fig. 14a).

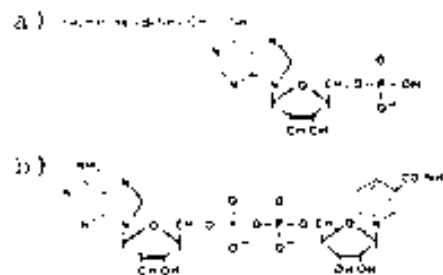


FIGURA 14 Comparació de les estructures del grup adenosina 5'-monofosfat (5'AMP) i del dinucleòtid de nicotinàmida i adenina (NAD⁺).

- Estructura del grup 5'AMP unit a una matriu de Sepharose 4B mitjançant un braç espaiador 6-aminohexil.
- Estructura del NAD⁺.

Com es veu en la Fig. 14, el grup 5'AMP presenta similituds estructurals amb el NAD^+ , coenzim de moltes deshidrogenases, tals com l'ADH i l'ALDH. Això possibilita la interacció d'aquests enzims amb la resina i la seva unió i elució específiques en determinades condicions.

1.4.6.1. Preparació de la columna d'afinitat

5 g de 5' AMP-Sepharose s'hidrataven en 100 ml de tampó fosfat monossòdic-NaOH (Merck) 0,1 M, pH 7,3, a temperatura ambient. Aquest tractament va servir per a eliminar els conservants afegits a la resina, com lactosa o glicerol. El tampó es decantà i s'afegiren 60 ml de tampó de la cromatografia d'afinitat. En el cas d'una purificació d'ADH s'emprà el tampó 2 (veure III.1.2.4.), i en el cas d'una purificació d'ALDH, el tampó 5 (veure III.1.2.5.).

La resina s'empaquetà en una columna de dimensions 1 x 22 cm, a un flux de 20 ml/h, emprant una bomba peristàltica Watson-Marlow Ltd. (Regne Unit) de flux constant. La resina ocupà un volum de 20 ml. Seguidament es deixà refredar en una cambra freda a 4°C i s'equilibrà amb 10-15 volums del tampó de la cromatografia d'afinitat.

1.4.6.2. Preparació de la mostra per a la cromatografia d'afinitat

La mostra procedent de la cromatografia de bescanvi iònic, una vegada concentrada, es preparà tal com indiquen els següents apartats.

- Equilibració de la mostra

Aquest pas és imprescindible per tal d'eliminar l'elevat contingut en sals de l'eluit de la cromatografia de bescanvi iònic. El concentrat de la cromatografia de bescanvi iònic es dialitzà en un sol sac del tipus 250-9U (Sigma) enfront de 2 l del tampó de la cromatografia d'afinitat (tampó 2 o tampó 5) durant 14 h i amb un sol canvi a les 4 h.

- Centrifugació

La diàlisi de la mostra concentrada enfront d'un tampó de baixa força iònica provoca la formació d'un petit precipitat blanquinós que hauria pogut col·lapsar la columna d'afinitat.

Així doncs, la mostra es centrifugà a 3.000 x g (5.000 r.p.m.) durant 10 min a 4°C en una centrifugadora refrigerada Sorvall RC-5B, rotor SS-34, utilitzant dos tubs de Corex de 15 ml.

1.4.6.3. Aplicació de la mostra a la columna d'afinitat

La mostra (20-25 ml) s'aplicà amb l'ajut d'una pipeta Pasteur. Es rentaren les parets de la columna amb tampó i es feren passar 300 ml de tampó de la cromatografia d'afinitat a un flux de 20 ml/h. El volum de les fraccions fou de 15 ml i es recolliren en un dels col·lectors descrits a III.1.4.4.3. La major part de l'hemoglobina va eluir en els primers 100 ml. El procediment següent fou diferent segons es tractés d'una purificació d'ADH o bé d'ALDH, tal com s'indica en els següents apartats i en les Figs. 11 i 12.

1.4.6.4. Rentat amb tampó de força iònica més elevada

La columna es rentà amb 300 ml del tampó següent:

- En el cas d'una purificació d'ADH s'emprà el tampó 3 (veure III.1.2.4.), que implicava un augment tant de força iònica com de pH, respecte al tampó inicial (tampó 2).
- En el cas d'una purificació d'ALDH s'emprà el tampó 6 (veure III.1.2.5.).

Aquest rentat comportava l'elució de proteïnes unides inespecíficament, tals com l'hemoglobina residual.

1.4.6.5. Elució de l'enzim

L'enzim va ser eluït específicament mitjançant 500 ml (volum total) d'un gradient lineal de 0 a 0,06 mM de NADH, segons el mètode de Parés i Vallee (239). El NADH desplaçava el grup 5'AMP de la interacció amb l'enzim, el qual quedava alliberat de la seva unió amb la resina. El NADH era preparat immediatament abans del seu ús. El volum de les fraccions recollides fou de 5 ml.

Per tal d'eluir la LDH, més fortament retinguda que l'ALDH, s'aplicaren 100 ml de NADH 0,7 mM (248).

Es mesurà l'activitat enzimàtica i l'absorbància a 280 nm, tal com es descriu a III.2.1.1.1., III.2.1.2.1., III.2.1.4. i III.2.4.1. Simultàniament es mesurà l'absorbància a 340 nm per tal de seguir el perfil de concentració de NADH.

La columna es rentà finalment amb 200 ml de NaCl (Merck) 1 M amb l'objecte d'eluir qualsevol resta d'enzim retingut.

Posteriorment, per tal de poder utilitzar la resina novament, aquesta es rentà amb 200 ml d'urea (Merck) 2 M en tampó 2 o tampó 5, que desnaturalitzava i eliminava qualsevol resta de proteïna fortament unida.

Seguidament, la resina s'equilibrava amb tampó 2 o tampó 5 i es conservava a 4°C previa addició d'azida sòdica (Merck) al 0,04 % (p/v).

Cap resina d'afinatat no s'emprà més de 3 vegades per a una purificació d'ADH. En les purificacions d'ALDH es procurà fer servir sempre una resina nova.

1.4.6.6. Recromatografia en la columna de 5'AMP-Sepharose

El mètode de recromatografia (170) s'emprà en els pocs casos en que,

per causes desconegudes, l'enzim va eluir de la columna d'afinitat durant el rentat previ a l'aplicació del gradient de NADH. En aquestes ocasions, l'enzim eluïa inespecíficament, altament contaminat i en volum elevat que feia difícil la seva detecció. Amb l'objecte d'obtenir una preparació més purificada, les fraccions actives es reunien, es concentraven, es dialitzaven i es centrifugaven. El concentrat s'aplicava novament a la columna d'afinitat, seguint el procediment ja esmentat. Donat que en la primera cromatografia ja s'havia eliminat bona part de la proteïna contaminant, els rentats podien ser menys extensos. L'enzim quedava fortament retingut a la columna i s'assolia un alt grau de purificació.

1.4.6.7. Concentració de l'enzim pur

Les fraccions amb activitat enzimàtica (50 ml) es reuniren i es concentraren per ultrafiltració fins a un volum de 1 a 2 ml per als estudis físico-químics i cinètics posteriors. En aquest cas s'emprà ademés un concentrador de 10 ml Amicon amb una membrana Diaflo PM 10 de 25 mm de diàmetre (Amicon).

1.4.7. Emmagatzement de l'enzim pur

L'enzim s'emmagatzemà sempre en solució, en tubs Eppendorf, a 4°C.

- L'ADH es conservà sempre en tampó 3, en presència d'una de les següents substàncies estabilitzants:

a) NADH, en la relació 2 mols NADH/mol enzim. El NADH s'afegia novament cada 7 dies per tal de restituir el que s'havia alterat.

b) DTT 1 mM.

- L'ALDH es conservà en tampó 6 o tampó 7 i en atmosfera de nitrogen.

1.4.8. Cromatografia de gel filtració

Per tal d'assolir un grau de puresa més elevat en els enzims ADH i ALDH, i al mateix temps determinar el seu pes molecular, s'utilitzà la cromatografia de gel filtració o d'exclusió molecular.

Per a cada proteïna es defineix

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o) , \text{ on}$$

V_e = volum d'elució de la proteïna (volum de solvent necessari per a eluir-la, es pren com a referència la fracció que presenta màxima absorbència o activitat enzimàtica en el perfil d'elució).

V_o = volum buit de la columna o volum de solvent necessari per a eluir una proteïna que no entri en l'interior de la matriu del gel.

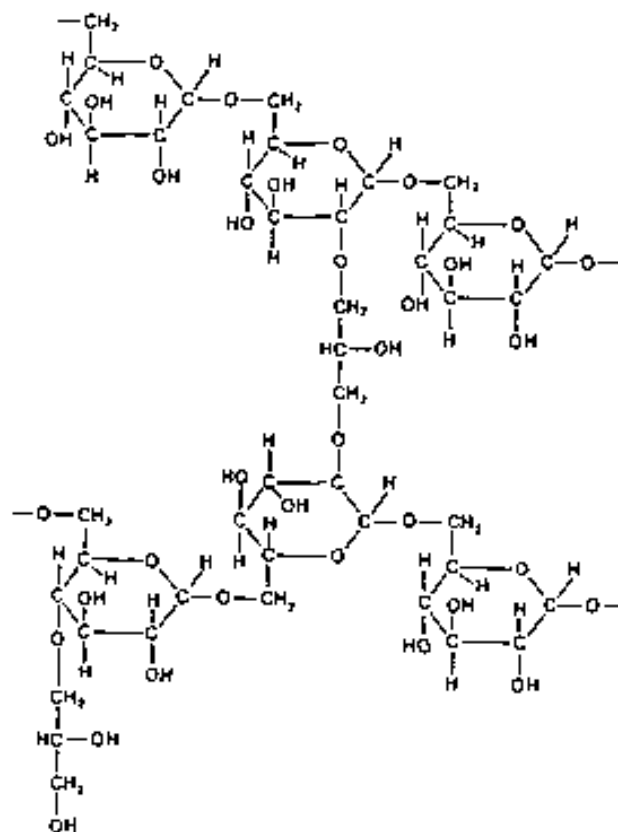
V_t = volum total de la columna

$V_t - V_o = V_s$ = volum de la fase estacionària o de l'interior de la matriu del gel.

K_{av} representa la fracció del volum de la fase estacionària que és accessible per a la difusió d'una proteïna determinada, i és independent del grau d'empaquetament del gel (242). El seu valor és inversament proporcional al logaritme del pes molecular en el cas de proteïnes globulars, de manera que amb proteïnes-patró adequades es pot obtenir una recta de calibratge que, per interpolació, ens permet calcular el pes molecular dels enzims problema.

S'empraren dos tipus de gels, de composició i característiques hidrodinàmiques diferents, Sephadex G-200 Superfine (Pharmacia) i Sephacryl S-300 Superfine (Pharmacia).

a



b

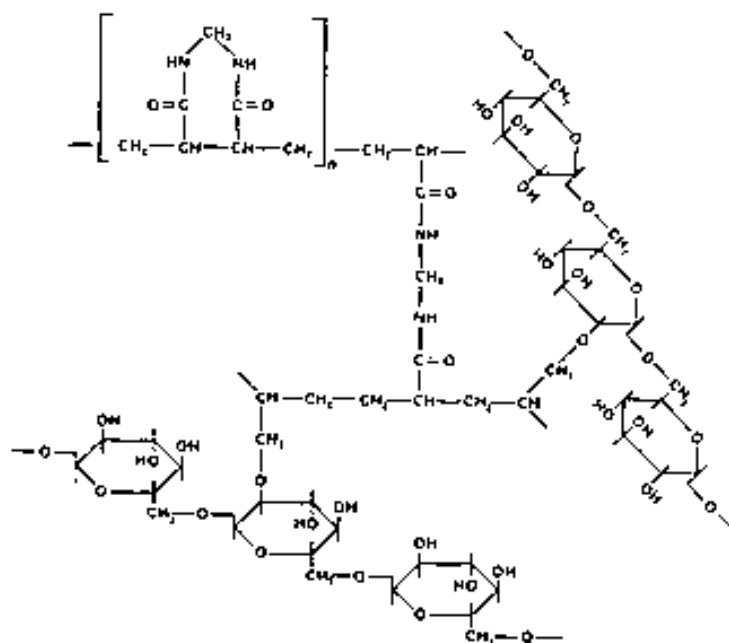


FIGURA 15 Estructura molecular parcial de la matriu dels gels emprats en la cromatografia de gel filtració:
 a) Sephadex.
 b) Sephacryl.

1.4.8.1. Cromatografia en Sephadex G-200 Superfine

- Característiques del gel

El Sephadex està constituït per partícules esfèriques poroses, que en el cas del G-200 Superfine tenen un diàmetre en sec de 10-40 μm . Cada partícula és un reticle format per la unió covalent de cadenes de dextrà per mitjà d'epiclorohidrina (Fig. 15a). El Sephadex G-200 Superfine presenta uns límits d'exclusió per a proteïnes globulars de 5.000 i 250.000 dalton de pes molecular.

Els gels amb un baix grau d'entrecreuament, com el Sephadex G-200, presenten seriosos inconvenients, ja que poden compactar-se per un excés de pressió hidrostàtica o de flux. Per a una columna de dimensions similars a l'emprada, la pressió hidrostàtica s'ha de mantenir entre 4 i 16 cm d'aigua, i el flux màxim és de 4,5 ml/h (242).

- Hidratació del gel

Es pesaren 20 g de Sephadex G-200 Superfine i es deixaren hidratar en 3 volums de tampó de la cromatografia de gel filtració (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, o tampó 7, segons s'hagués d'aplicar una mostra d'ADH o d'ALDH, respectivament) durant 72 h a temperatura ambient (242). Una vegada hidratat, el gel es deixà refredar a 4°C. Immediatament abans de l'empaquetament, el gel es desgasà en un kitasato de 2 l mitjançant una trompa d'aigua.

- Preparació de la columna

La columna, de dimensions 2,3 x 90 cm, es deixà refredar a 4°C. Per tal d'evitar al màxim la formació de bombolles d'aire durant l'empaquetament, la columna s'omplí de tampó de la cromatografia fins a 1/10 de l'alçada total. Aquest tampó es feu passar varies vegades a través de la placa inferior de la columna per tal d'alliberar qualsevol bombolla d'aire, i es pinçà l'extrem inferior del tub de sortida

procurant que quedés ple de tampó. A la columna se li acoblà un embut d'un volum equivalent. L'extrem del tub de sortida es portà fins a l'alçada del nivell superior de l'embut, per tal de no sobrepassar en cap cas la pressió hidrostàtica permesa.

- Empaquetament del gel en la columna

El gel (en un volum una vegada i mitja el de la columna), degasat i fred, s'afegí molt lentament per les parets de la columna amb l'ajut d'una vareta de vidre, omplint també l'embut. Al cap de 5 min, es baixà l'extrem del tub de sortida 12 cm per sota del nivell superior de l'embut i es permeté la lliure sortida del tampó. L'empaquetament es realitzà per acció de la gravetat, sense bomba peristàltica. Periòdicament es vigilà que el flux no sobrepassés els límits permesos, rectificant també la posició de la sortida a mesura que baixava el nivell del tampó. Així que es pogué, es retirà l'embut i, amb el tub de sortida pinçat, es tapà la columna, connectant l'entrada a un flascó de Mariotte que contenia tampó degasat, el que proporcionà una pressió hidrostàtica constant. El tub de sortida es baixà a un nivell situat a 14 cm per dessota del flascó de Mariotte. El flux obtingut fou de 4 ml/h.

La columna s'equilibrà amb dos volums de tampó Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, en el cas de l'ADH, o amb tampó 7, en el cas de l'ALDH.

El volum total del gel (Vt), fou calculat mesurant l'alçada del gel dins de la columna i assumint un diàmetre constant d'aquesta, o bé es calibrà la columna prèviament amb volums coneguts de tampó.

- Aplicació de la mostra

La mostra s'aplicà per sedimentació acurada de 1 ml de solució, contenint ademés glicerol (Panreac) al 10% (v/v), en una fina capa per damunt de la superfície lliure del gel. Per a facilitar aquesta operació, s'utilitzà una petita xeringa de 1 ml de capacitat i 5 mm de diàmetre, continuada amb un tub capilar de plàstic d'uns 30 cm de longitud que es

submergí per sota del tampó sense arribar a tocar el gel.

La concentració de les proteïnes-patró fou de 10 mg/ml com a màxim, i cada una d'elles s'aplicà separatament de les altres. Quan fou necessari, les mostres de proteïnes-patró es dialitzaren enfront de 100 ml del tampó d'equilibració per tal d'eliminar l'excessiu contingut en sals, com sulfat amònic.

L'ADH provinent de la cromatografia d'afinitat s'aplicà en una concentració de 0,38 mg/ml. L'ALDH provinent també de la cromatografia d'afinitat s'aplicà en una concentració de 0,4 mg/ml.

- Elució de la mostra

L'elució de la mostra es realitzà amb el mateix tampó d'equilibració, per acció de la gravetat o amb l'ajut d'una bomba peristàltica P-1 (Pharmacia), sempre a un flux constant de 4 ml/h i una pressió hidrostàtica de 14 cm d'aigua. El volum de les fraccions fou de 1,2 ml, recollides amb un col·lector Microcol TOC-80 (Gilson, Villiers-le-Bel, França) (60 gotes/tub) o un Redirac 2112 amb gradeta de 160 tubs (18 min/tub).

- Proteïnes-patró emprades

Foren les mateixes que les emprades per Lange i col. (190) per a la determinació del pes molecular de l'ADH de fetge humà: Ribonucleasa A (Biozyme Laboratoires Ltd, Blaenavon, South Wales, Regne Unit) repurificada, 13.680 dalton; Quimotripsinògen A (Merck), 25.000; Ovoalbúmina (Sigma), 45.000; ADH de fetge de cavall (Sigma), 83.000; i Aldolasa (Sigma), 158.000. En una ocasió, s'emprà Lactat deshidrogenasa (Sigma), 140.000, en lloc d'Aldolasa.

1.4.8.2.. Cromatografia en Sephacryl S-300 Superfine

- Característiques del gel

El Sephacryl està constituït per partícules esfèriques d'un diàmetre de 40-105 μm , i es fabrica per l'entrecruament covalent d'al·lildextrà amb N,N'-metilenbisacrilamida (Fig. 15b). Aquesta composició li confereix una estructura força rígida i estable que permet pressions hidrostàtiques i fluxos extraordinàriament elevats, comparats amb els del Sephadex G-200 Superfine. Ademés, es comercialitza en forma de suspensió, pel que no cal hidratar-el. Aquestes característiques escurcen enormement els temps de separació (quasi 5 vegades), en comparació a la cromatografia en Sephadex G-200 Superfine.

El Sephacryl S-300 Superfine presenta uns límits d'exclusió per a proteïnes globulars de 10.000 i 1.500.000 dalton de pes molecular.

- Preparació del gel

500 ml de Sephacryl S-300 Superfine es varen suspendre en 1.500 ml de tampó 7. El gel es deixà sedimentar i es decantà l'excés de tampó. S'hi afegí un volum de tampó igual a la meitat del volum del gel sedimentat i es deixà refredar a 4°C. Posteriorment, el gel es degasà com s'explica a III.1.4.8.1.

- Preparació de la columna

La columna i la seva preparació foren idèntiques a les descrites en la secció III.1.4.8.1, per a la columna de Sephadex G-200 Superfine, excepte que en la columna de Sephacryl no es requeriren precaucions referents a la pressió hidrostàtica.

- Empaquetament del gel en la columna

El gel s'empaquetà amb l'ajut d'una bomba peristàltica P-3

(Pharmacia) per tal d'assolir els elevats fluxos requerits durant l'empaquetament (70 ml/h). El gel (en un volum una vegada i mitja el de la columna), desgasat i fred, s'afegí com descriu la secció III. 1.4.B.1., però sense tenir en compte la pressió hidrostàtica. Una vegada sedimentat el Sephacryl, es connectà l'entrada de la columna a un flascó de Mariotte, equilibrant-se la columna amb dos volums de tampó. Després, el flascó de Mariotte es situà de forma que la pressió hidrostàtica fós d'uns 100 cm d'aigua, per tal d'assolir un flux de 16 ml/h per acció de la gravetat. El volum total del gel (V_t) fou calculat mesurant l'alçada del gel dins de la columna i assumint un diàmetre constant d'aquesta.

- Aplicació de la mostra

Es seguí el procediment descrit a III.1.4.B.1. L'ALDH, provinent de la cromatografia d'afinitat, s'aplicà en una concentració de 0,22 mg/ml.

- Elució de la mostra

L'elució de la mostra es realitzà amb el mateix tampó d'equilibració, per acció de la gravetat, a un flux constant de 16 ml/h i una pressió hidrostàtica de 100 cm d'aigua. El volum de les fraccions fou de 1,7 ml, recollides en un col·lector Redinac 2112 amb gradeta de 160 tubs (6,4 min/tub).

- Proteïnes-patró emprades

S'empraren els següents patrons: Ribonucleasa A, 13.680 dalton; Dvoalbúmina, 45.000; ADH de fetge de cavall, 83.000; Lactat deshidrogenasa, 140.000; ALDH de llevat (Sigma), 245.000; i Ferritina (Sigma), 470.000.

1.4.B.3 - Càlcul del volum buit de la columna (V_0)

El volum d'elució del Blue Dextran 2000 (Pharmacia) es considerà com el volum buit de la columna. L'aplicació d'aquest compost fou prèvia a la



de qualsevol proteïna, en una concentració de 2 mg/ml, seguint el procediment descrit a III.1.4.8.1. El seguiment de la banda de Blue Dextran al llarg de la columna permeté avaluar la uniformitat de l'empaquetament del gel.

1.4.8.4. Càlcul del volum d'elució (V_e)

Les proteïnes es detectaren en les fraccions recollides per la seva absorbància a 280 nm (o bé a 215 nm). ADH i ALDH de placenta humana, ADH de fetge de cavall, ALDH de llevat i lactat deshidrogenasa (LDH) es detectaren per mesura de l'activitat enzimàtica. El Blue Dextran es detectà mesurant l'absorbància a 619 nm.

El volum d'elució es calculà com a la suma del volum dels tubs recollits des de l'aplicació de la mostra fins al tub (inclusiu) de màxima concentració en proteïna o de màxima activitat.

Les fraccions corresponents als enzims objecte d'aquest estudi (20 ml) foren reunides i concentrades segons es descriu a III.1.4.6.7.

2. MÈTODES ESPECTROFOTOMÈTRICS

2.1. Mesura de l'activitat enzimàtica

La mesura de l'activitat enzimàtica es realitzà en un espectrofotòmetre UV-vis, de doble feix, Cary 219 (Varian Associates, Inc., Palo Alto, CA, E.U.A.), amb registre gràfic, i termostatitzat a 25°C. El "period" (temps entre mesures), igual a 1 s, i la "spectral band width" (amplada de la banda d'absorció), igual a 1,0 nm, foren dos paràmetres de l'aparell que es mantingueren constants en totes les determinacions. Les cubetes emprades per a l'assaig foren de quars Herasil 1 o Suprasil 1 (Hellma GmbH and Co., Mullheim, R.F.A.), de 1 cm de pas òptic i d'una capacitat de 1 o 3 ml. Les cubetes es netejaren amb barreja cròmica, rentat extensiu amb aigua corrent, 5 volums d'aigua destil·lada i 2 volums d'acetona, assecant-les amb un assecador de cabell.

Prèviament a l'inici de la reacció, el tampó de l'assaig fou incubat a 25°C per tal d'assolir més ràpidament la temperatura de reacció. L'addició dels components de la barreja de reacció i de l'enzim es feu per mitjà de pipetes automàtiques de volum variable Pipetman (Gilson). Per als estudis cinètics, l'enzim s'afegí sempre per mitjà de microxeringues de 25 µl (Hamilton Co., Reno, NE, E.U.A., o Unimetrics Corporation, Anaheim, CA, E.U.A.).

L'activitat enzimàtica es calculà per mesura de la velocitat inicial. Quan la línia d'increment d'absorbància no fou rectilínia, es traçà la recta tangent a temps zero.

L'activitat s'expressà en U, Unitats Internacionals. En el cas de les activitats deshidrogenasa NAD⁺-depenents, 1 U equival a 1 µmol de NADH produït o utilitzat per minut.

2.1.1. Mesura de l'activitat ADH

- Oxidació d'alcohols

L'activitat es mesurà generalment en tampó glicina-NaOH 0,1 M, pH 10,0, o bé en fosfat monossòdic-NaOH 0,1 M, pH 7,5, amb NAD^+ 1,2 mM com a coenzim, l'enzim i l'alcohol corresponent.

- Reducció d'aldehids

L'activitat es mesurà sempre en tampó fosfat monossòdic-NaOH 0,1 M, pH 7,5, amb NADH 0,26 mM com a coenzim, l'enzim i l'aldehid corresponent.

En ambdós casos, l'activitat es determinà a 340 nm, màxim d'absorció del NADH, basant-se en un coeficient d'extinció molar (ϵ_{340}) de $6.220 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. En el cas del retinol i del retinal, es mesurà a 400 nm, utilitzant un ϵ_{400} de $29.500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (259).

2.1.1.1. Mesura de l'activitat estàndard de l'ADH de placenta humana i de l'isoenzim α -ADH

L'activitat estàndard es mesurà com s'indica a 1:1.2.1.1., però utilitzant octanol 1 mM com a substrat. L'assaig es realitzà, en un volum total de 3 ml, afegint els següents volums en l'ordre indicat:

- 1390 μl de tampó glicina-NaOH 0,1 M, pH 10,0
- 100 μl d'una dissolució preparada diàriament de 25 mg NAD^+ /ml de tampó, mantinguda a 4°C
- 10 μl d'enzim
- 1500 μl d'octanol 2 mM, dissolt en tampó de pH 10,0

2.1.1.2. Mesura de l'activitat dels isoenzims de les classes I i II de l'ADH de fetge humà i ADH de fetge de cavall

L'activitat es mesurà com s'indica a III.2.1.1., però utilitzant etanol 33 mM com a substrat (190). La barreja de reacció contenia, en un volum total de 3 ml:

- 2790 µl de tampó glicina-NaOH 0,1 M, pH 10,0
- 100 µl d'una dissolució preparada diàriament de 25 mg NAD⁺/ml de tampó, mantinguda a 4°C
- 10 µl d'enzim
- 100 µl d'etanol 1 M dissolt en tampó pH 10,0

2.1.2. Mesura de l'activitat deshidrogenasa de l'ALDH

L'activitat deshidrogenasa es determinà mesurant la producció de NADH a 340 nm en una barreja de reacció que contenia tampó pirofosfat sòdic-HCl 33 mM, pH 8,5, NAD 0,5 mM com a coenzim, l'enzim i l'aldehid corresponent. Paral·lelament es mesurà, en absència d'enzim, l'augment d'absorbància per minut (veure III.2.1.5.2.).

El tampó emprat fou pirofosfat sòdic, segons la majoria dels treballs realitzats amb ALDH (117, 275). No és convenient la utilització del tampó Tris-HCl, ja que està descrit que els aldehids reaccionen amb el Tris a pH alt, obtenint-se activitats enzimàtiques sensiblement disminuïdes (80, 236, 262, 304). Es seleccionà el pH de 8,5, ja que l'ALDH de placenta humana presenta el seu màxim d'activitat a pH 8,45 (veure IV.2.6.1.).

2.1.2.1. Mesura de l'activitat estàndard de l'ALDH de placenta humana

L'activitat estàndard es mesurà seguint les indicacions de III.2.1.2., però utilitzant propanal 13,3 mM recent destil·lat (veure III.1.1.2.) com a substrat (247, 248).

L'assaig es realitzà, en un volum total de 3 ml, afegint els següents volums en l'ordre indicat:

- 2790 μ l de tampó pirofosfat sòdic-HCl 33 mM, pH 8,5
- 100 μ l d'una dissolució preparada diàriament de 10 mg NAD⁺/ml de tampó, mantinguda a 4°C
- 10 μ l d'enzim
- 100 μ l de propanal 400 mM, dissolt en tampó de pH 8,5

Paralelment es mesurà, en absència d'enzim, l'augment d'absorbància per minut degut a la formació del complex NAD-propanal (veure III.2.1.5.2.). Aquest valor es restà de l'augment total observat.

2.1.2.2. Mesura de l'activitat dels isoenzims d'alta Km i de baixa Km de l'ALDH

En homogenats i fraccions parcialment purificades, es mesurà l'activitat en presència d'alta i baixa concentració de propanal, 13,3 mM i 66 μ M respectivament, per tal d'obtenir informació sobre l'existència de formes d'alta i de baixa Km, tal com descriuen Pietruszko i col. (247, 248). L'activitat dels isoenzims de baixa Km seria directament l'observada amb propanal 66 μ M. Assumint que no hi hagués inhibició per substrat en els isoenzims de baixa Km (veure I.4.4.), l'activitat dels isoenzims d'alta Km s'obtindria per diferència entre l'activitat amb propanal 13,3 mM (mesura de l'ALDH total) i l'activitat amb propanal 66 μ M (indicativa de l'ALDH de baixa Km).

Sempre que es treballà amb homogenat de fetge, aquest s'incubà 5 min

amb 4-metilpirazole (Aldrich) 1 mM per tal d'inhibir els isoenzims de l'ADH, evitant així la desaparició del NADH produït per reducció del propanal (present en concentracions elevades) a propanol. L'addició de 4-metilpirazole no es realitzà quan es treballà amb homogenat de placenta, ja que aquesta no presenta cap isoenzim de l'ADH sensible al 4-metilpirazole (veure IV.1.6.4.).

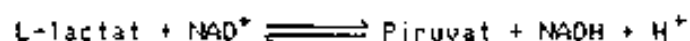
2.1.3. Mesura de l'activitat esterasa de l'ALDH

S'utilitzaren com a substrats l'acetat de 4-nitrofenil i l'acetat de 1-naftil. La hidròlisi de l'acetat de 4-nitrofenil es determinà mesurant a 400 nm la producció de 4-nitrofenol en una barreja de reacció que contenia també fosfat monossòdic 0,1 M, pH 7,0, l'enzim i diferents concentracions de substrat (veure III.1.1.2.4.). Paral·lelament, es va mesurar com a blanc la hidròlisi espontània de l'èster en absència d'enzim. Es va emprar un coeficient d'extinció molar per al 4-nitrofenol a pH 7,0 de $9.450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (23, 105, 307).

La hidròlisi de l'acetat de 1-naftil es determinà mesurant a 240 nm la producció de 1-naftol en una barreja de reacció que contenia també pirofosfat sòdic 30 mM, pH 8,5, l'enzim i diferents concentracions de substrat (veure III.1.1.2.4.). Paral·lelament, es va mesurar com a blanc la hidròlisi espontània de l'èster en absència d'enzim. L'estudi dels espectres d'absorció de l'acetat de 1-naftil i del 1-naftol a pH 8,5 aconsella treballar a 240 nm, emprant-se un coeficient d'extinció molar de $7.200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, que fou determinat experimentalment.

2.1.4. Mesura de l'activitat lactat deshidrogenasa

La reversibilitat de la reacció catalitzada per la lactat deshidrogenasa (LDH) va permetre la mesura de l'activitat en els dos sentits:



- Oxidació del lactat

Es mesura a 340 nm en una barreja de reacció que contenia pirofosfat sòdic-HCl 33 mM, pH 8,5, NAD 0,5 mM, i'enzim : DL-lactat sòdic (Fluka) 26 mM.

- Reducció del piruvat

Es mesura a 340 nm seguint el procediment descrit al "Biochemica Catalogue Boehringer" (21), amb lleugeres modificacions. La barreja de reacció contenia fosfat monossòdic-NaOH 0,1 M o fosfat monopotàssic-KOH (Panreac) 50 mM, ambdós a pH 7,5, NADH 0,22 mM, l'enzim i piruvat sòdic (Sigma) 0,76 mM.

2.1.5. Origen de l'activitat "background"

Existeixen tres tipus d'activitat "background", que per la seva magnitud poden constituir una font important d'error en les mesures d'activitat enzimàtica. La seva existència obliga a realitzar els adequats controls en absència de substrat i d'enzim.

2.1.5.1. Activitat "background" deguda a substrats endògens

Sempre que es treballa amb homogenat fresc de teixit aparegué una elevada activitat enzimàtica en absència de substrat, que desapareixia parcialment per diàlisi. Aquest tipus de "background", ja referit per altres autors (306), té el seu origen en algunes deshidrogenases NAD^+ -depenents (com poden ser la LDH, molt abundant en placenta, o la mateixa ADH), ja que no es detecta en absència de NAD^+ . Aquestes deshidrogenases utilitzen substrats endògens presents en l'homogenat, com el lactat (227), produint NADH. Aquesta activitat "background" augmenta amb el pH,

i és pràcticament menyspreable al cap de 2 h d'incubació, a 25°C, de l'homogenat en presència de NAD⁺, si l'assaig es realitza a pH 10,0, o 30 min, si a pH 8,5.

Exhaurida l'activitat "background", s'afegí el substrat corresponent i en cap cas es va creure necessària una nova addició de NAD⁺, ja que es trobava en excés.

2.1.5.2. "Background" degut a la formació de complexos NAD-aldehid

En la determinació d'activitats ALDH amb propanal aparegué un "background" (augment de l'absorbància a 340 nm en funció del temps) en absència d'enzim, ja descrit per altres autors (92, 247, 306). L'origen d'aquest "background" és la formació d'un complex covalent entre el NAD⁺ i el propanal que presenta una banda d'absorció a prop de 340 nm. Aparentment, la reacció semblà de segon ordre, ja que la velocitat de formació del complex fou proporcional tant a la concentració de propanal com de NAD⁺.

La reacció progressà més ràpidament quant més elevat fou el pH. Així, amb propanal recent preparat, a pH 8,5, el valor d'aquest "background" arribà a 0,00035 unitats d'absorbància/min (amb propanal 13,3 mM i NAD⁺ 0,5 mM), i segons Pietruszko i col. (247), a pH 9,5, és de 0,0014 unitats d'absorbància/min.

Un altre aldehid que també presentà aquest "background" fou l'indole-3-acetaldehid, com ja descriuen Duncan i Tipton (92).

Com es recomana en les seccions III.2.1.2. i III.2.1.2.1., cal mesurar aquest tipus de "background" cada vegada que s'empra un aldehid com a substrat, per tal d'efectuar la correcció corresponent.

2.1.5.3. "Background" degut a l'absorbància del substrat o del producte

Alguns dels substrats emprats o productes produïts en els estudis cinètics presenten complexos espectres d'absorció que inclouen regions de l'ultraviolat i del visible, absorbint alguns en la zona de 340 nm. La desaparició del substrat, per inestabilitat o per acció de l'enzim, i de vegades la simultània aparició del producte, podria donar lloc a complicades interpretacions de la variació d'absorbància a 340 nm, sobretot quan els coeficients d'absorció molar són superiors als del NADH. Sempre que fou possible s'intentà utilitzar una altra zona de l'espectre per a la mesura de l'activitat enzimàtica. En cas contrari s'abandonà l'estudi cinètic amb el substrat conflictiu. Aquest tipus de "background" es pot preveure determinant l'espectre d'absorció del substrat i del producte al mateix pH de l'assaig enzimàtic, àdhuc estudiant la variació de l'absorbància a 340 nm en presència i en absència d'enzim.

2.1.6. Mesura de l'activitat enzimàtica en condicions especials

2.1.6.1. Barrejes de reacció que presenten una absorbància elevada

En les mesures d'activitat en homogenats o fraccions que presentaren una elevada concentració d'hemoglobina, com són els de placenta o eritròcits, o bé amb substrats o inhibidors que exhibiren una absorbància superior a 1,5 unitats d'absorbància, s'emprà un "spectral band width" (amplada de la banda d'absorció) superior a 1,0 nm. En aquestes condicions s'aconseguí disminuir l'absorbància de la barreja de reacció i, amb ella, el soroll de fons de l'aparell. En cada cas es realitzaren mesures de control per a comprovar que la variació d'aquest paràmetre no influïa sobre la variació d'absorbància deguda a l'activitat enzimàtica. No es revelaren efectius ni reproduïbles l'ús de cubetes de 2 mm de pas òptic o del "rear beam attenuator" (filtre esmorteïdor en la cubeta de

referència).

2.1.6.2. Barrejes de reacció de poc volum

Sempre que el volum de la barreja de reacció fou inferior a 2 ml en les cubetes de 3 ml o a 0,6 ml en les cubetes de 1 ml, s'emprà un aixecador de cubetes, de que va equipat el Cary 219, per tal de que el feix de llum passés totalment per la part de cubeta ocupada per la mostra.

2.1.7. Càlcul de l'activitat específica d'una fracció enzimàtica

L'activitat específica d'una fracció s'expressa en U/mg de proteïna o $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteïna i, comparada amb l'activitat específica d'altres fraccions, ens dóna informació sobre el grau de purificació assolit.

Quan es considera l'activitat específica de l'enzim pur, el seu valor ens dóna idea de la velocitat de recanvi de l'enzim.

Es calcula coneixent l'activitat estàndard en U/ml (veure III.2.1.1.1. i III.2.1.2.1.) i la concentració de proteïna en mg/ml (III.2.5.2. i III.2.5.3.):

$$\text{activitat específica} = \text{activitat estàndard} / [\text{proteïna}]$$

2.1.8. Càlcul de la concentració total d'enzim

La concentració total d'enzim ($[E]_t$), expressada en μM , es calcula a partir de l'activitat estàndard, en U/ml, i de l'activitat específica de l'enzim pur, en U/mg, utilitzant també el seu pes molecular (M_r):

$$[E]_t = \frac{\text{activitat estàndard} \times 10^6}{\text{activitat específica de l'enzim pur} \cdot M_r}$$

2.2. Mètodes d'estudi cinètic

2.2.1. Variació de l'activitat en funció del pH

2.2.1.1. Oxidació d'alcohols per l'ADH de placenta humana

Els diferents pH es varen aconseguir amb els tampons següents:

- pH 4,0-6,0 : acetat sòdic-NaOH 0,1 M
- pH 6,5-8,5 : fosfat monossòdic-NaOH 33 mM
- pH 9,0-11,5 : glicina-NaOH 0,1 M

Com a substrat s'utilitzà octanol 0,5 mM i com a coenzim NAD^+ 1,2 mM.
La concentració d'enzim en l'assaig fou de 45 nM.

En acabar la mesura espectrofotomètrica, es mesurà el pH de la barreja de reacció.

2.2.1.2. Oxidació d'aldehids per l'ALDH de placenta humana

Els diferents pH es varen aconseguir amb els tampons següents:

- pH 6,00-7,50 : fosfat monossòdic-NaOH 33 mM
- pH 8,00-9,00 : pirofosfat sòdic-HCl 33 mM
- pH 9,25-10,00 : pirofosfat sòdic-HCl 33 mM o glicina-NaOH 0,1 M

Com a substrat s'utilitzà propanal 13,3 mM i com a coenzim NAD^+ 0,5 mM. La concentració d'enzim en l'assaig fou de 70 nM.

En acabar la mesura espectrofotomètrica, es mesurà el pH de la barreja de reacció.

2.2.2. Determinació i significat de les constants cinètiques K_m , k_{cat} i k_{cat}/K_m

Per al càlcul de les constants cinètiques de l'enzim per a un determinat substrat, s'emprà el mètode de representació de Lineweaver-Burk o dels dobles recíprocs (209). Es representà $1/v$, on v és la velocitat inicial, enfront de $1/[S]$, on $[S]$ és la concentració de substrat, obtenint-se, quan el comportament fou michaelià, una recta (ajustada per un programa de regressió lineal), en que la intersecció amb l'eix d'abscises donà $-1/K_m$, on K_m és la constant de Michaelis, i la intersecció amb l'eix d'ordenades donà $1/V_{max}$, on V_{max} és la velocitat màxima.

- K_m , o constant de Michaelis, s'expressa en unitats de concentració molar (M) i equival a la concentració de semisaturació, i en determinades condicions pot donar una idea de l'afinitat de l'enzim per un determinat substrat (63). Generalment, però, es considera com una constant de dissociació aparent, essent una funció complexa de vàries constants de velocitat que relacionen els diferents complexos en que pot trobar-se l'enzim (108). Per a obtenir la K_m per a un determinat substrat s'empraren una mitja de 5 concentracions diferents de substrat oscil·lant entre 0,3 i 10 vegades la K_m aproximada. La concentració de coenzim fou saturant.

- k_{cat} , o constant catalítica, s'expressa en min^{-1} . S'anomena també "velocitat de recanvi de l'enzim", ja que representa el nombre màxim de molècules de substrat convertides en producte per molècula d'enzim i per unitat de temps. Es calcula a partir de V_{max} , en U/ml, i de la concentració total d'enzim ($[E]_t$), en μM , (veure III.2.1.8.). De la definició

$$V_{max} = k_{cat} \cdot [E]_t,$$

s'obté:

$$k_{cat} = v_{max} / [E]_t$$

- k_{cat}/K_m , o constant d'especificitat (108), s'expressa en $M^{-1}.min^{-1}$ i equival a la constant de velocitat de segon ordre aparent, que relaciona les concentracions d'enzim lliure ($[E]$) i de substrat quan la concentració de substrat és molt petita. Així, en l'equació de Michaelis-Menten:

$$v = (v_{max} \cdot [S]) / (K_m + [S]) = (k_{cat} \cdot [E]_t \cdot [S]) / (K_m + [S])$$

quan $[S] \ll K_m$,

$$v = (k_{cat}/K_m) \cdot [E] \cdot [S]$$

ja que $[E]_t = [E]$.

$[E]_t$ = concentració d'enzim total

$[E]$ = concentració d'enzim lliure

Si dos substrats A i B competeixen per l'enzim, les activitats enzimàtiques per a cada un d'ells, independentment, venen donades per:

$$v_A = (k_{cat}/K_m)_A \cdot [E] \cdot [A] \text{ i } v_B = (k_{cat}/K_m)_B \cdot [E] \cdot [B]$$

Quan $[A] = [B]$, la relació d'activitats depèn únicament i exclusivament de la relació entre les respectives constants d'especificitat.

$$v_A/v_B = (k_{cat}/K_m)_A / (k_{cat}/K_m)_B$$

Així doncs, k_{cat}/K_m constitueix un paràmetre indicador de l'especificitat de diferents substrats que competeixen per a un mateix enzim (108), essent un criteri àmpliament utilitzat en els estudis de caracterització cinètica dels enzims objecte d'aquest treball.

En les reaccions que no presentaren cinètica de saturació (cinètica

de primer ordre), es considerarà k_{cat}/K_m el valor del pendent de la recta resultant de la representació directa de $v/[E]_t$ enfront de $[S]$, ja que els valors de K_m i de k_{cat} foren impossibles de determinar.

$$v/[E]_t = (k_{cat}/K_m) \cdot [S]$$

2.2.3. Inhibició per substrat

A elevades concentracions de substrat l'activitat enzimàtica pot resultar inhibida, no podent assolir-se la velocitat màxima predita per la representació de Lineweaver-Burk. Segons Cleland (64), aquest tipus d'inhibició segueix l'equació:

$$v = (V_{max} \cdot [S]) / [K_m + [S] + ([S]^2/K_i)] \quad (1)$$

K_i = constant d'inhibició definida per Cleland (64)

Els valors experimentals de v i $[S]$ s'ajustaren a l'equació 1 amb l'ajut del programa d'ajust de corbes per regressió no lineal BMDP3R, en una terminal Digital d'un ordinador VAX 11/VMS, obtenint-se els valors de K_m , V_{max} i K_i . Els valors de K_m i V_{max} aproximats, obtinguts de la representació de Lineweaver-Burk, s'empraren com a valors inicials per a efectuar la iteració del programa.

2.2.4. Determinació del coeficient de Hill

El coeficient de Hill (n) es calcula en el cas de comportament no michaelia de l'enzim i es una mesura de l'allostèria o no hiperbolicitat enfront d'un determinat substrat.

Partint de l'equació de Michaelis-Menten,

$$v = (V_{max} \cdot [S]) / (K_m + [S]),$$

s'arriba a

$$[S]_{0,5} = [S]^h \cdot (V_{\max} - v/v), \text{ o}$$

$\log v/(V_{\max} - v) = h \cdot \log [S] - \log [S]_{0,5}$, on h i $[S]_{0,5}$, la concentració de semisaturació, es poden calcular a partir de la representació de $\log v/(V_{\max} - v)$ enfront de $\log [S]$.

Els possibles valors de h són: $h > 1$, cooperativitat positiva, quan la unió de les primeres molècules de substrat facilita la unió de les subsegüents; $h = 1$, comportament michaelià; $h < 1$, cooperativitat negativa, on la unió de les primeres molècules dificulta la unió de les subsegüents. El valor de h pot ésser com a màxim igual al nombre de lligams que pot fixar l'enzim. Aquest número és sovint igual al nombre de subunitats de l'enzim (180).

2.2.5. Determinació del mecanisme cinètic i de la constant d'equilibri de l'ADH de placenta humana

Es realitzaren els següents estudis d'inhibició creuada i d'inhibició per producte amb NAD^+ , octanol, octanal i NADH , emprant també fosfat monossòdic 0,1 M, pH 7,5 a 25°C:

- a) Cinètica amb variació de les concentracions de NAD^+ i octanol.
- b) Cinètica d'inhibició de la reducció del NAD^+ pel NADH amb una concentració constant d'octanol de 1,5 mM.
- c) Cinètica d'inhibició de l'oxidació de l'octanol per l'octanal amb una concentració constant de NAD^+ de 1,2 mM (saturant).
- d) Cinètica d'inhibició de la reducció de l'octanal per l'octanol amb una concentració constant de NADH de 0,26 mM (saturant).

Les representacions de Lineweaver-Burk dels valors obtinguts (31, 272) permeteren l'elucidació del mecanisme cinètic i el càlcul de les

següents constants cinètiques: K_a (Km per a NAD^+), K_b (Km per a l'octanol), K_{ia} (o $K_{2,a}$, constant de dissociació del NAD^+), K_{ib} (constant d'inhibició per a l'octanol), K_p (Km per a l'octanal), K_q (Km per a NADH), K_{ip} (constant d'inhibició per a l'octanal), K_{iq} (o $K_{2,q}$, constant de dissociació del NADH), així com $V_1/[E]_t$ (velocitat màxima d'oxidació de l'octanol) i $V_2/[E]_t$ (velocitat màxima de reducció de l'octanal). Aquestes constants cinètiques estan directament relacionades amb les constants de velocitat $k_1, k_2, k_3, k_4, k_5, k_6, k_7$ i k_8 (272) (veure I.3.3.). La nomenclatura emprada fou la de Cleland (62).

Igualment es calculà el valor de la constant d'equilibri a pH 7,5 a partir de la relació de Haldane:

$$K_{eq} = (V_1 \cdot K_p \cdot K_{iq} \cdot [H]^+) / (V_2 \cdot K_b \cdot K_{ia})$$

2.2.6. Mètodes dels estudis d'inhibició

2.2.6.1. Inhibició de l'ADH de placenta humana amb derivats del pirazole

La barreja de reacció, que contenia el tampó a pH 10,0, el NAD^+ i l'enzim, s'incubà durant 5 min a 25°C en presència de 3-metilpirazole o 4-metilpirazole (Aldrich), ambdós a una concentració de 12 mM (Fig. 16a i 16b). Seguidament s'afegí el substrat i es mesurà l'activitat espectrofotomètricament. Paral·lelament, es determinà l'activitat en absència d'inhibidor.

2.2.6.2. Inhibició de l'ADH de placenta humana amb agents quelants de metalls

S'utilitzaren, en experiments diferents, els següents agents

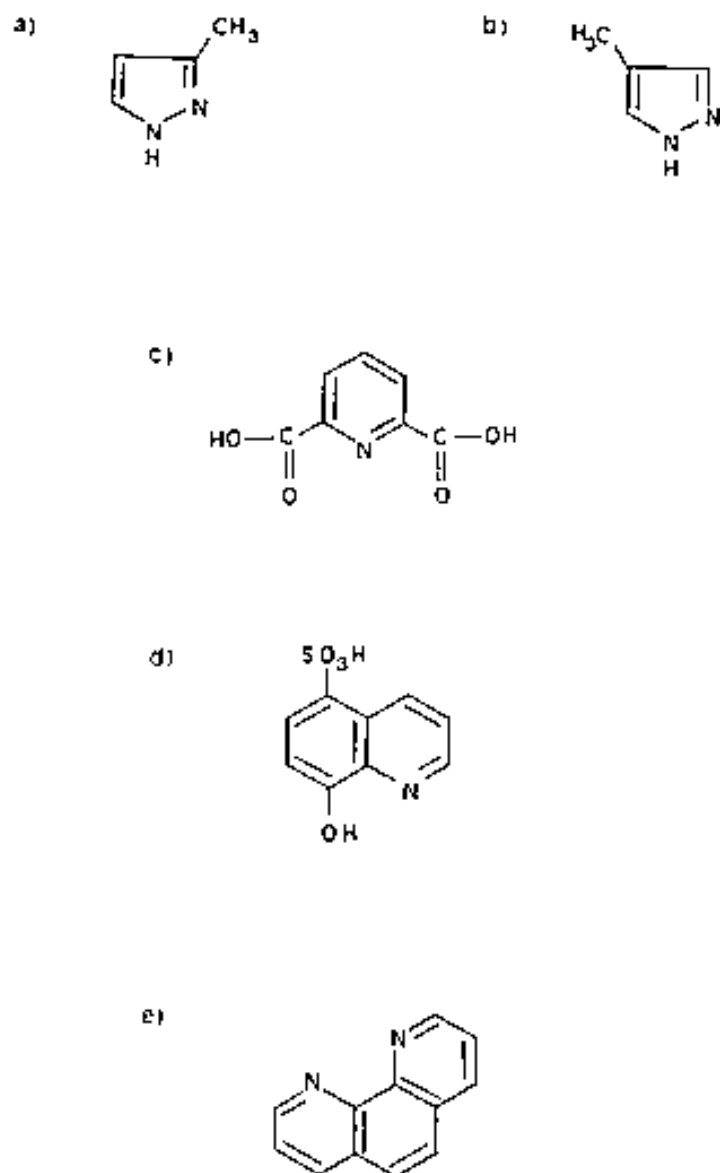


FIGURA 16 Estructura molecular dels inhibidors de l'ADH emprats.

- a) 3-metilpirazole. b) 4-metilpirazole. c) àcid piridin-2,6-dicarboxilic. d) àcid 8-hidroxi-quinolina-5-sulfònic. e) 1,10-fenantrolina.

quelants: àcid piridin-2,6-dicarboxílic, àcid
8-hidroxiquinolina-5-sulfònic i 1,10-fenantrolina.

La barreja de reacció, que contenia el tampó a pH 10,0, el NAD⁺ i l'enzim, s'incubà durant 2 h a 25°C en presència d'àcid piridin-2,6-dicarboxílic (Sigma) 10 mM (Fig. 16c) o àcid 8-hidroxiquinolina-5-sulfònic (Sigma) 1 mM (Fig. 16d). Al cap d'aquest temps s'afegí el substrat i es mesurà l'activitat.

La 1,10-fenantrolina (Sigma) (Fig. 16e) s'emprà en una concentració de 10 mM, afegint-se el substrat tot seguit, sense incubació prèvia.

En tots els casos es mesura paral·lelament l'activitat en absència d'inhibidor.

2.2.6.3. Inhibició de l'ALDH de placenta humana amb disulfiram

Prèviament a l'assaig, 200 µl d'enzim pur es varen dialitzar, per tal d'eliminar el DTT, durant 24 h a 4°C, enfront de 5 canvis de 100 ml de tampó Hepes 50 mM, pH 7,0, desgasat i saturat amb nitrogen (309, 310). Donat el petit volum de mostra a dialitzar, s'empraren cèl·lules de microdialisi de 50 i 100 µl de capacitat (Cambridge Repetition Eng. Ltd., Cambridge, Regne Unit).

El disulfiram es va dissoldre segons es descriu a III.1.1.2.4. Es prepararen diferents dissolucions de l'inhibidor en metanol, de forma que les concentracions de disulfiram en l'assaig estiguessin compreses entre 8,4 nM i 40 µM. Com a màxim, s'afegiren a la barreja de reacció 10 µl de metanol en un volum final de 3 ml.

Una alíquota de la solució d'enzim dialitzat (8,4 nM) es deixà incubar durant 10 min a 25°C en tampó pirofosfat sòdic 33 mM, pH 8,5, en absència de NAD⁺ i en presència de les concentracions de disulfiram esmentades. Seguidament s'afegiren el NAD⁺ i el substrat, mesurant-se

l'activitat espectrofotomètricament.

Per als estudis d'inhibició en funció del temps d'incubació, l'enzim s'incubà durant diferents períodes de temps en les mateixes condicions anteriors, però en presència de disulfiram 0,84 μ M.

En tots els casos es realitzaren els adequats controls sense disulfiram.

2.3. Mètodes d'estudi de l'estabilitat tèrmica de l'ALDH

El procés de desnaturalització d'un enzim per acció del calor segueix una cinètica de primer ordre (272), del tipus

$$v = v_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (2), \text{ on}$$

v = activitat residual de l'enzim en el temps t

v_0 = activitat inicial de l'enzim

k = constant de desnaturalització tèrmica

t = temps

El temps mitjà de desnaturalització, o temps en que s'ha perdut el 50 % de l'activitat enzimàtica es $t_{1/2} = 0,693/k$.

Transformant adequadament l'equació 2, s'arriba a $\log v/v_0 = -(k/2,3) \cdot t$, on si s'expressa el quocient v/v_0 com a percentatge d'activitat residual (% activitat) i es representa \log % activitat enfront de t , s'obté una recta de pendent $-k/2,3$.

Per a l'estudi de l'estabilitat tèrmica de l'ALDH de placenta, s'afegí una alíquota de l'enzim pur (50 μ l) a 200 μ l de tampó fosfat monossòdic-NaOH 0,1 M, pH 7,5, o pirofosfat sòdic-HCl 33 mM, pH 8,5, escalfat prèviament a 25°C o 45°C. La solució d'enzim s'incubà en un bany termostatitzat a 25°C o 45°C. A diferents temps, s'agafaren mostres que s'afegiren immediatament a la barreja de reacció per a la determinació de

l'activitat enzimàtica.

2.4. Estudi de l'efecte dels ions divalents sobre l'ALDH de placenta

Prèviament a l'assaig, una alíquota de l'enzim pur es va dialitzar per tal d'eliminar l'EDTA, seguint el mètode descrit a III.2.2.6.3. (310).

La barreja de reacció contenia també Hepes 25 mM, pH 7,0, amb diferents concentracions de clorur magnèsic, des de 0 fins a 4 mM, NAD^+ 0,5 mM, l'enzim (11 nM) i propanal 13,3 mM.

Tant en la diàlisi com en l'assaig s'emprà també Hepes en lloc de també pirofosfat sòdic, ja que el primer no sequestra els ions Mg^{2+} (116, 310). L'assaig es realitzà a pH 7,0, pH en que els efectes del Mg^{2+} són més ostensibles en els altres isoenzims de l'ALDH (9, 329).

2.5. Determinació de la concentració de proteïna

2.5.1. Estimació per mesura de l'absorbància a 280 nm

L'absorbància a 280 nm és característica dels residus de tirosina i triptòfan de les proteïnes i pot servir per a estimar la concentració relativa de proteïna en una solució. La mesura puntual a 280 nm enfront del tampó s'emprà en les fraccions cromatogràfiques per a seguir la proteïna contaminant o determinar el volum d'elució de proteïnes-patró. La lectura es realitzà en un espectrofotòmetre Cary 219, un Hitachi 220 S (Hitachi Ltd., Tokyo, Japo) o bé un Cecil CE 292 (Cecil Instruments Ltd., Cambridge, Regne Unit), sempre a 25°C. Així, doncs, la mostra freda s'hagué de temperar abans de fer la mesura.

Quan la mostra va absorbir més de 1,5 unitats d'absorbància, se'n diluï una alíquota.

Quan la concentració de proteïna fou massa baixa com per a detectar-ne l'absorbància, aquesta es mesurà a 230 nm o 215 nm (enllaç peptídic) (298).

2.5.2. Determinació quantitativa de proteïnes pel mètode de Lowry

El mètode es basa en la proporcionalitat que existeix entre la concentració de proteïna i l'absorbància a 650 nm, observada en solucions de 15 a 110 µg/ml de proteïna, al tractar-les amb el reactiu de Folin-Ciocalteu (211). L'absorbància és deguda a la reacció produïda entre els grups hidroxil de les tirosines de la proteïna i els grups fenol del reactiu, que dóna el poder reductor capaç de reduir ions Cu(II) a Cu(I). El tartrat forma un complex amb aquest Cu(I), evitant la seva precipitació. Per a traçar la recta patró s'utilitzaren diferents concentracions d'albumina de sèrum boví (BSA, Fraccio V, Sigma), que conté 4 mols de tirosina/mol de proteïna. Aquestes concentracions es prepararen a partir d'una dissolució patró de BSA: 50 mg/10 ml d'aigua destil·lada, i es realitzaren dilucions apropiades per a obtenir una corba de calibratge des de 12,5 µg/ml fins a 50 µg/ml. Totes les mostres (blanc, patrons i problemes) s'analitzaren per duplicat.

- Preparació dels reactius

- Solució A: 2 g de tartrat sòdic-potàssic (Panreac) i 100 g de carbonat sòdic (Carlo Erba, Mila, Itàlia) es dissoleren en 500 ml de NaOH (Panreac) 1 M i s'arrasà a 1 l amb aigua destil·lada.

- Solució B: 2 g de tartrat sòdic-potàssic i 1 g de sulfat de coure pentahidratat (Merck), es dissoleren en 90 ml d'aigua destil·lada i s'afegiren 10 ml de NaOH 1 M.

- Solució C: 1 volum (3 ml) del reactiu de Folin-Ciocalteu (Merck) fou diluït en 15 volums (45 ml) d'aigua destil·lada. Aquesta solució es

preparà en el moment de l'anàlisi.

- Procediment

Les solucions del blanc, patrons i problemes es tractaren de la següent manera:

A 1 ml d'aquestes solucions, s'afegiren

- 0,9 ml de solució A
- S'escalfà a 50°C durant 10 min en un bany termostatitzat
- Es deixà refredar a temperatura ambient
- S'afegiren 0,1 ml de solució B
- Es deixà 10 min a temperatura ambient
- S'afegiren 3 ml de solució C i s'agità ràpidament, escalfant a 50°C durant 10 min
- Es deixà refredar a temperatura ambient i es llegí l'absorbància a 650 nm respecte al blanc en un espectrofotòmetre Hitachi 220 S o bé en un Cecil CE 292.

Les concentracions de les mostres problema s'obtingueren per interpolació dels valors d'absorbància en la corba de calibratge, obtinguda a partir de les solucions patró.

2.5.3. Determinació quantitativa de proteïnes pel mètode de Bradford

El mètode es basa en el desplaçament del màxim d'absorbància d'una solució àcida del colorant "Coomassie Blue G-250" des de 465 a 595 nm quan el reactiu s'uneix a proteïna (40). La diferència d'absorbància és lineal per a concentracions de proteïna entre 1 i 25 µg/ml. Per a la recta patró s'empraren γ-globulina bovina (γ-Gb, Bio-Rad) o bé BSA (Fraccio V, Sigma) a diferents concentracions.

- Procediment

En un volum de 800 µl de tampó de dissolució de la mostra o

d'aigua destil·lada es prepararen diferents concentracions de la proteïna-patró i de la mostra problema, i s'afegiren 200 µl del reactiu de Bradford (Bio-Rad). Al cap de 5 min es mesurà l'absorbància a 595 nm en un espectrofotòmetre Hitachi 220 S, Cary 219 o Cecil CE 292. La linealitat es va mantenir durant 1 h. El procés es realitzà a temperatura ambient. Totes les mostres s'analitzaren per duplicat.

Els avantatges del mètode de Bradford sobre el de Lowry es poden resumir en:

- facilitat del mètode, menys reactius i temps d'assaig més curt
- estabilitat del complex colorant-proteïna
- menor nombre d'interferències
- major sensibilitat, el que permet treballar amb concentracions de proteïna més baixes.

2.6. Determinació quantitativa de zinc en l'ADH de placenta humana per espectrofotometria d'absorció atòmica

2.6.1. Tractament del material

Sempre que fou possible es treballà amb material de plàstic. Quan fou de vidre, aquest no havia estat tractat amb àcid nítric anteriorment (315).

Tot el material es tractà amb el detergent descontaminant d'ions Ausilab 301 (Carlo Erba) al 0,5 % (p/v) durant un mínim de 12 h. Posteriorment, es rentà repetidament amb aigua lliure de metalls.

2.6.2. Tractament de l'aigua i del tampó

L'aigua lliure de metalls s'obtingué a partir d'aigua desionitzada Milli-R (Millipore Corp., Bedford, MA, E.U.A.), posteriorment tractada

amb resina desmetal·litzant AG-501-X8 (Bio-Rad). Aquest darrer tractament es feu afegint aproximadament 5 g de resina per cada 5 l d'aigua, deixant-ho en agitació durant 4-5 h i decantant en acabar. La conductivitat final de l'aigua així obtinguda fou de 0,45 µmho.

El tampó lliure de zinc, fosfat monossòdic (Merck) 0,1 M, es preparà amb aigua lliure de metalls i fou ajustat a pH 7,5 amb NaOH (Merck) 1 M. El seu contingut en zinc es comprovà per espectrofotometria d'absorció atòmica, essent inferior a 0,03 ppm Zn (1 ppm = 1 part per milió = 1 µg/ml). El tractament del tampó amb resina quelant de metalls divalents Chelex 100 (Bio-Rad) no disminuí significativament el contingut en zinc, pel que decidírem ometre aquest tractament.

2.6.3. Tractament de l'enzim

685 µg d'enzim pur, en 1 ml de tampó Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, es varen dialitzar enfront de 250 ml de tampó lliure de zinc, a 4°C, amb quatre canvis de tampó i un mínim de dues hores de diàlisi entre cada canvi, conservant-se el tampó de la darrera diàlisi (10 h). Els sacs de diàlisi foren del tipus Visking de 10 mm d'amplada (Medicell, Regne Unit) i havien estat preparats en aigua lliure de metalls. La concentració d'enzim actiu es mesurà per determinació de l'activitat enzimàtica a pH 10,0 en una alíquota de l'enzim dialitzat, utilitzant etanol 0,5 M com a substrat i considerant una activitat específica de 0,6 U/mg (veure III.2.1.8. i IV.1.2.).

Es realitzaren 3 dilucions diferents de l'enzim amb tampó de la darrera diàlisi (blanc), per tal d'obtenir concentracions finals des de 0,49 nM fins a 1,96 nM.

Les mostres d'enzim i el tampó de la darrera diàlisi es pipetejaren dins de tubs Pyrex, de 8 mm de diàmetre i 3,5 ml de capacitat, i s'hi afegiren, lentament i escalfant a la flama, 0,3 ml d'àcid nítric concentrat (Merck, màxim contingut en Zn: 0,000005 %) per tal d'hidrolitzar tota la proteïna present. S'arrasà a 1,5 ml amb tampó de la darrera diàlisi.

2.6.4. Preparació de les solucions-patró de zinc

Com a patrons per a la recta de calibratge s'empraren dissolucions de clorur de zinc (II) des de 0,05 ppm fins a 1,25 ppm Zn, partint d'una solució mare de 1.000 ppm Zn (Phaxe). Els patrons i el blanc es prepararen amb tampó lliure de zinc, afegint-hi àcid nítric en la mateixa proporció que en el tractament de l'enzim (veure III.2.6.3.).

2.6.5. Estandarització del mètode amb ADH comercial de fetge de cavall

Paralelament, es realitzà la determinació quantitativa de zinc en ADH de fetge de cavall (Sigma), que serví per a comprovar la sensibilitat i fiabilitat del mètode emprat. El procediment seguit amb la mostra fou el mateix que per a l'ADH de placenta humana. Les concentracions d'enzim actiu foren des de 0,45 nM fins a 7,26 nM, i es determinaren emprant dos mètodes diferents:

- Mesura de l'absorbància a 280 nm, coneixent el coeficient d'extinció molar a 280 nm per a l'ADH de fetge de cavall, $3,78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (30).

- Mesura de l'activitat enzimàtica, segons les condicions de Dalziel (73) modificades (tampó glicina-NaOH 0,1 M, pH 10,0, NAD^+ 1,2 mM, etanol 8,2 mM) i assumint una activitat específica de 3 U/mg (13).

2.6.6. Mesura de l'absorció atòmica en un espectrofotòmetre de flama

L'aparell utilitzat fou un espectrofotòmetre Perkin-Elmer 703 (Perkin-Elmer, Norwalk, CN, E.U.A.), amb flama d'aire-acetilè, làmpara de 213,9 nm i "slit" de 0,7 nm. El flux d'aspiració de la mostra es reduí fins a 0,6 ml/aspiració per tal de gastar el mínim volum de mostra. L'aparell realitzà 3 lectures en cada aspiració, essent el temps d'integració de 0,5 s. Amb aquestes condicions, el límit inferior de sensibilitat es situà en 0,02 ppm de Zn.

El tub d'aspiració de la mostra es rentà entre mesures amb aigua lliure de metalls. Es mesurà per duplicat l'absorbància de totes les mostres i patrons respecte els blancs respectius. Es representaren les absorbàncies mitjanes dels patrons a 213,9 nm enfront de les concentracions de zinc, ajustant-se a una recta pel mètode dels mínims quadrats. Les concentracions de zinc de les mostres s'obtingueren per interpolació dels valors d'absorbància.

L'estequiometria molar es calculà basant-se en el pes molecular de l'ADH de placenta humana.

3. MÈTODES ELECTROFORÈTICS

3.1. Electroforesi en gel de midó

3.1.1. Electroforesi d'alt voltatge

L'aplicació de voltatges elevats en l'anàlisi d'isoenzims permet escurejar els temps de separació, i per tant, de difusió de la mostra en el si del gel, augmentant la resolució de les bandes. Es seguí amb lleugeres modificacions el mètode de Bosron i col. (32) recollit en les normes de l'Organització Mundial de la Salut (O.M.S.) per a l'anàlisi dels isoenzims de l'ADH humana (227) i desenvolupat al Departament de Bioquímica per Ferré (106, 107) i Soler (285).

3.1.1.1. Preparació del motllo per al gel

Utilitzant 4 separadors de tefló de 3 mm de gruix, es construí un motllo (3 x 120 x 240 mm), directament sobre una placa de refrigeració de metacrilat dissenyada per Ferré (106). Prèviament, la placa de refrigeració, els separadors i una placa de vidre, destinada a cobrir el gel, s'havien netejat acuradament amb aigua, sabó, aigua destil·lada i hexà.

3.1.1.2. Preparació del gel

Es preparà un gel de midó del 13 % (p/v) a partir d'una suspensió que contenia:

- 26 g midó hidrolitzat (Sigma)
- 98 mg NAD⁺ (Grade AA1, Sigma) (0,65 mM)

- 0,48 g Tris (20 mM)
- 32,7 mg EDTA (0,5 mM), si es tractava d'una electroforesi per a analitzar els isoenzims de l'ALDH
- aigua destil·lada fins a un volum total de 200 ml, ajustant a pH 8,2 amb HCl diluït, o bé a pH 7,6 amb àcid ortofosfòric diluït, segons es tractés d'una electroforesi d'isoenzims de l'ADH o bé de l'ALDH, respectivament.

La solució s'escalfà en un matràs Kitasato (Pyrex) de 1 l, exposat directament sobre la flama, mentre s'agitava ininterrompudament. La solució es va espessir gradualment, canviant d'un aspecte lletós a un de més transparent, i es retirà del foc així que es tornà menys viscosa i començà a bullir.

Tot seguit, el gel es desgasà en una trompa d'aigua durant 60 s i s'extengué per l'interior del motllo, col·locant lentament una placa de vidre per damunt i procurant que no es formessin bombolles d'aire. Es deixà reposar 1,5 h a temperatura ambient i després 2 h a 4°C.

3.1.1.3. Preparació del tampó d'electroforesi

Per a l'electroforesi d'isoenzims de l'ADH es prepararen 2 l de tampó Tris-HCl 0,3 M, pH 8,2. Per a l'electroforesi d'isoenzims de l'ALDH, el tampó fou Tris-fosfòric 0,3 M, EDTA 10 mM, pH 7,6. En ambdós casos, el tampó es deixà refredar a 4°C.

3.1.1.4. Aplicació de les mostres

S'aixecà la placa de vidre que cobria el gel i s'eixugà la superfície del gel amb paper de filtre. Normalment, les butxaques per a la introducció de les mostres (10 mm d'amplada) es feren en la zona mitja del gel, amb l'ajut d'una espàtula i un regle, deixant una separació d'uns 5 mm entre elles. En el cas de l'electroforesi d'isoenzims de

l'ALDH, les butxaques es feren 5 cm més a prop del càtode.

S'aplicaren 10 µl de cada mostra en papers Whatman n° 3 (3 x 10 mm), els quals s'introduïren dins de la butxaca corresponent amb l'ajut d'unes pinces. Les cubetes de l'equip Multiphor 2117 LKB s'ompliren amb el tampó a 4°C, 1 l en l'ànode i 1 l en el càtode, afegint 200 mg de NAD⁺ (Grade AA1, Sigma) al tampó de la cubeta corresponent al càtode. El gel es connectà a les cubetes per mitjà de dos papers Whatman n° 1 (104 x 253 mm) per electrode. Seguidament, el gel s'eixugà amb paper de filtre i es cobrí amb una làmina transparent de PVC "Reynolon" (Inasa, Izurzun, Navarra) procurant no deixar bombolles d'aire. El conjunt es cobrí amb una segona placa refrigerant de vidre de l'equip Multiphor (LKB), a mode de sandvitx, connectada a la primera i a un bany refrigerat d'aigua circulant RWC 50 (Savant Instruments, Inc., Hicksville, NY, E.U.A.), que contenia etanol (Panreac) al 10 % (v/v) a 4°C. Cobrint tot el sistema, es col·locà una tapa anticondensació.

Els electrodes es connectaren a una font d'alt voltatge 2197 (LKB).

Les condicions limitants que es programaren en l'aparell foren:

Voltatge = 720 V
 Intensitat = 60 mA
 Potència = 60 w

Les condicions reals d'electroforesi foren:

Voltatge = 720 V
 Intensitat = 25-35 mA
 Potència = 15-25 w

El temps d'electroforesi fou de 6-7 h per als isoenzims de l'ADH, i de 8 h per als isoenzims de l'ALDH.

3.1.1.5. Tinció del gel per activitat enzimàtica

La tinció del gel es realitzà per activitat enzimàtica, essent específica per a diferents deshidrogenases NAD^+ -depenents, segons el tipus de substrat emprat. Aquest mètode permeté l'anàlisi dels isoenzims de l'ADH i l'ALDH en homogenat de teixit sense necessitat de purificació prèvia.

Un cop acabada l'electroforesi, es desconnectà la font de voltatge i el gel es col·locà en una superfície llisa, on es dividí longitudinalment en dues làmines d'aproximadament 1,5 mm de gruix, mitjançant un tallador Buchler 3-1082 (Buchler Instruments, Fort Lee, NJ, E.U.A.) que permet regular el gruix del tall.

La tinció es realitzà sempre a 45°C, llevat del cas dels isoenzims termolàbils de l'ALDH (veure IV.2.4.). La solució tenyidora consistia en 500 ml de tampó Tris-HCl 50 mM, pH 8,6, normalment escalfat a 45 °C, al que s'afegiren 200 mg de NAD^+ (Grade AA1, Sigma), 100 mg de NBT (Sigma) (Fig. 17a) i 7 mg de PMS (Sigma) (Fig. 17b). Es col·locaren 250 ml d'aquesta solució en un recipient de plàstic i els 250 ml restants en un altre, afegint a cadascun una de les làmines del gel i el volum de substrat corresponent. Els recipients es taparen hermèticament i s'incubaren en un bany termostatitzat a 45°C (a 20°C, en el cas dels isoenzims termolàbils de l'ALDH), en absència de llum, durant un temps que oscil·là entre 2 i 45 min, depenent del tipus de substrat i de la intensitat desitjada de les bandes. La tinció s'aturà per decantat de la solució tenyidora i rentat amb aigua durant 5 min. Aquest rentat del gel eliminà parcialment la tinció inespecífica de fons. Després, el gel es rentà novament amb aigua i es conservà dins d'un recipient de plàstic, protegit de la llum amb paper d'alumini, a 4°C.

El fonament de la tinció es el següent: El poder reductor, generat al transformar-se el NAD^+ en $\text{NADH} + \text{H}^+$ per acció enzimàtica, s'acobla al NBT, que és un acceptor d'electrons. La sal de tetrazoli és reduïda al seu formazan, substància de color blau fosc i insoluble que precipita en

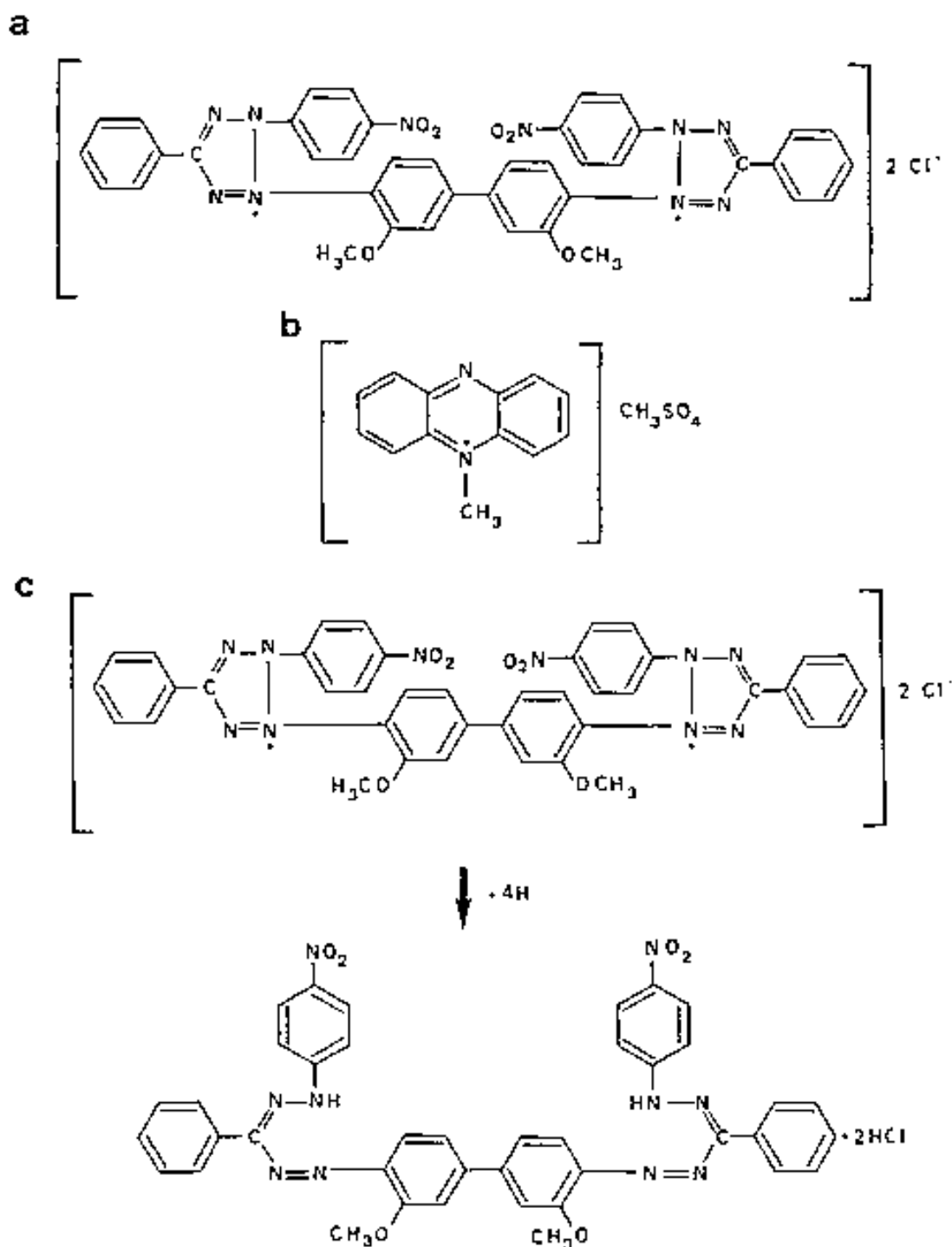


FIGURA 17 Reactius emprats en la tinció per activitat enzimàtica de deshidrogenases NAD^+ -depenents.

- a) Estructura del clorur de (3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenil)-bis(2-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazoli)) (NBT).
- b) Estructura del metosulfat de N-metilfenazoni (PMS).
- c) Formació del formazan insoluble per reducció del NBT.

les zones del gel on es troba l'enzim. El PMS actua com a un transportador d'electrons que accelera la reacció anterior (Fig. 17c).

En les incubacions a temps llarg de mostres d'homogenat o fraccions parcialment purificades, aparegueren ademés bandes corresponents als isoenzims de la LDH, molt abundant en placenta. Això fou degut al substrat endògen que conté l'homogenat (veure III.2.1.5.1.). L'addició de 300 mg de piruvat sòdic (Sigma) (11 mM) o bé 920 mg d'oxalat potàssic (Fluka) (20 mM) per cada 250 ml de solució tenyidora inhibí l'aparició de les bandes de LDH (125, 173), evitant així possibles confusions en l'assignació de les bandes.

- Tinció dels isoenzims de les classes I i II de l'ADH

Quan es treballà amb homogenats de fetge es realitzà una tinció específica per als isoenzims anomenats catòdics (en les condicions de pH emprades en l'electroforesi). A la solució tenyidora s'hi afegí 1 ml d'etanol absolut per cada 250 ml (69 mM) com a substrat de l'ADH. La tinció es realitzà a 45°C.

- Tinció dels isoenzims de la classe III de l'ADH

La visualització de la γ -ADH en la part anòdica dels gels es realitzà amb 2 ml de pentanol per cada 250 ml de solució tenyidora (74 mM). La tinció es realitzà a 45°C.

- Tinció dels isoenzims de l'ALDH

La tinció es realitzà amb propanal recent destil·lat (veure III.1.1.2.1. i III.1.1.2.2.), el qual es va dissoldre en una proporció de 2 ml per cada 250 ml de solució tenyidora (111 mM). El pH d'aquesta barreja fou ajustat de nou amb NaOH diluït, prèviament a l'addició dels reactius específics de la tinció. Ademés, s'afegiren 100 μ l d'una solució de 4-metilpirazole 30 mM per cada 250 ml, per tal d'evitar l'aparició de les bandes catòdiques de l'ADH. Sempre que fou possible es realitzà una

tinció amb piruvat (11 mM) i una altra sense, per les raons exposades a IV.2.4. En alguna ocasió, també s'utilitzà tampó pirfosfat sòdic 50 mM, ajustat a pH 8,6 amb acid ortofosfòric diluït, en lloc de Tris (veure III.2.1.2.), no observant-se cap diferència. La tinció es realitzà a dues temperatures diferents, 20°C i 45°C, per tal de visualitzar els isoenzims termolàbils de l'ALDH (veure IV.2.4.).

- Tinció dels isoenzims de la LDH

La tinció, molt ràpida (2 min), es realitzà afegint 603 mg de DL-lactat sòdic (Fluka) per cada 250 ml de solució tenyidora. Quan s'emprà àcid DL-làctic (Sigma) (0,5 ml per cada 250 ml) s'ajustà de nou el pH a 8,6.

3.1.2. Electroforesi de baix voltatge

Es va seguir el mètode de Li i Magnes (195), modificat per Parés i Vallee (239).

- Preparació del motllo per al gel

El motllo per al gel fou de metacrilat (Buchler), de dimensions 5 x 125 x 250 mm, netejant-se prèviament els seus components tal com s'indica a III.3.1.1.1.

- Preparació del gel

El gel, del 13 % (p/v) en midó, es preparà com es descriu a III.3.1.1.2., però adequant les quantitats dels reactius a les dimensions del motllo:

- 60 g midó hidrolitzat
- 1,4 g NAD (Grade AA1, Sigma) (0,4 mM)
- 1,51 g Tris (25 mM)
- aigua destil·lada fins a un volum total de 450 ml, ajustant a pH 8,6

amb HCl diluït

La solució s'escalfà en un matràs de Kitasato (Pyrex) de 2 l de capacitat.

- Preparació del tampó d'electroforesi

Es preparà 1 l de tampó Tris-HCl 0,3 M, pH 8,6, que es deixà refredar a 4°C.

- Aplicació de les mostres

Es retirà la pinta metàl·lica formadora de butxaques, de la qual ve provist el motllo, i s'aplicaren 27 µl de cada mostra en les butxaques centrals del gel, procurant evitar la difusió d'una a l'altra. Les butxaques es segellaren amb vaselina calenta i es connectaren els extrems del gel a cada una de les cubetes dels electrodos amb un paper de filtre doblegat.

L'electroforesi es realitzà en posició horitzontal, a 220 V, durant 16-17 h, dins una cambra freda a 4°C, essent la font de voltatge l'alimentador Atom 502 (Atom S.A., Barcelona).

3.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS

L'electroforesi vertical discontinua en gel de poliacrilamida amb el detergent dodecil sulfat sòdic (SDS) es basa en el mètode descrit per Weber i Osborn (325) i modificat per Laemmli (188), que permet el càlcul del pes molecular de les subunitats, a la vegada que ens dóna informació sobre la puresa de l'enzim.

3.2.1. Preparació de les solucions

En totes les solucions emprades per a la preparació del gel es va utilitzar aigua desionitzada Milli-R, de conductivitat inferior a 1 μmho . La composició de les solucions va ser la següent:

- Solució A (acrilàmida)

- acrilàmida (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, E.U.A.) 30 % (p/v)
- bis-acrilàmida (Merck) 0,8 % (p/v)

S'afegí carbó actiu (Merck) i s'agità durant 1-3 h, ultrafiltrant-se després a través d'una membrana Whatman de 0,2 μm en un filtre Sartorius (Sartorius GmbH, Göttingen, R.F.A.).

- Solució B (tampó del gel superior o "stacking gel")

- Tris-HCl 0,5 M, SDS (Cambrian, Croydon, Regne Unit) 0,4 % (p/v), pH 6,8.

- Solució C (tampó del gel inferior)

- Tris-HCl 1,5 M, SDS 0,4 % (p/v), pH 8,8.

- Tampó de les cubetes o d'elució

- 1 l de Tris-HCl 25 mM, glicina 0,2 M i SDS 0,1 % (p/v), pH 8,4.

- Tampó d'aplicació de les mostres

- Glicerol (Panreac) 10 % (v/v), SDS 3 % (p/v), Tris-HCl 60 mM, 2-mercaptoetanol (Merck) 5 % (v/v) i un 2 % (v/v) d'una solució de blau de bromofenol (Carlo Erba) al 0,1 % (p/v), pH 6,8, que ens permeté seguir l'evolució de l'electroforesi.

3.2.2. Preparació de les plaques

Les dues plaques de vidre (190 x 215 mm), separadors i pinta formadora de butxaques (1 mm de gruix) es netejaren acuradament amb aigua

i sabó, aigua destil·lada, i hexà o acetona. Entre les plaques es col·locaren els separadors de 1 mm de gruix i es mantingueren unides mitjançant unes pinces. Normalment, les unions laterals es segellaren amb agarosa (Bio-Rad) al 1-1,8 % (p/v). Seguidament, les plaques es col·locaren en posició vertical damunt d'una base de metacrilat.

3.2.3. Preparació dels gels

Els volums que s'esmenten a continuació foren calculats per a un gel de 1 mm de gruix.

- Gel segellador de la base (22,5 % d'acrilamida)

15 ml de solució A, 5 ml de solució C, 50 µl de TEMED (Merck) i 150 µl d'una solució de persulfat amònic (Merck) al 10 % (p/v), preparada al moment, es barrejaren en un vas de precipitats i s'afegiren per entremig de les dues plaques. Les unions laterals també es poden segellar afegint-hi aquesta barreja amb una pipeta Pasteur. Una vegada polimeritzat el gel, es separà la base amb molta cura i es comprovà l'estanqueïtat del motllo amb aigua desionitzada.

- Gel inferior (11 % d'acrilamida)

9,7 ml de solució A, 4,8 ml de solució C, 11,9 ml d'aigua desionitzada, 30 µl de TEMED i 300 µl d'una solució de persulfat amònic al 10 % (p/v) es barrejaren i s'afegiren igualment entre les dues plaques perfectament seques fins a uns 4 cm del seu extrem superior. A continuació, s'afegí isobutanol formant una capa fina damunt del gel, per tal d'aconseguir una discontinuïtat uniforme entre els gels inferior i superior. Una vegada polimeritzat el gel, s'eixugà l'isobutanol i l'aigua sobrant.

- Gel superior (4,5 % d'acrilamida)

1,8 ml de solució A, 3 ml de solució B, 6 ml d'aigua desionitzada, 15 µl de TEMED i 150 µl de la solució de persulfat amònic al 10 % (p/v) es barrejaren i s'afegiren damunt del gel inferior ja polimeritzat. Tot

seguit s'introduí la pinta formadora de butxaques de 1 mm de gruix, procurant desplaçar les bombolles d'aire que es formessin.

El gel es conservà entremig de les plaques, tapant la part superior amb Parafilm "M" (American Can Co., Greenwich, CT, E.U.A.) i tot el conjunt amb paper d'alumini, deixant-el durant 12 h a temperatura ambient.

3.2.4. Preparació de les proteïnes-patró

Les proteïnes-patró es prepararen a una concentració de 2 mg/ml d'aigua destil·lada i es conservaren a -40°C. Quan foren emprades, es diluïren amb aigua destil·lada de forma que la concentració final fós la indicada en la secció III.3.2.5. Les proteïnes més utilitzades i els seus pesos moleculars foren: Lisozim, 14.700 dalton; Inhibidor de la tripsina, 21.000; Anhidrasa carbònica, 30.000; Ovoalbúmina, 43.000; Albúmina de serum boví, 68.000; i Fosforilasa b, 90.000; totes elles subministrades per Sigma.

3.2.5. Aplicació de les mostres

Es retirà la pinta formadora de butxaques, es col·locaren les plaques amb el gel en les cubetes i es segellaren les unions amb agarosa. La cubeta superior s'omplí amb tampó d'elució i es comprovaren les possibles pèrdues. A continuació s'omplí la cubeta inferior.

Prèviament, 25 µl de mostra o de patró s'havien barrejat amb 25 µl de tampó d'aplicació de les mostres. D'aquesta barreja se n'aplicaren 25 µl en la seva butxaca corresponent, amb l'ajut d'una microxeringa Hamilton, de tal forma que la quantitat de proteïna aplicada fós al voltant de 25 µg per a la tinció amb Coomassie Blue i de 1 µg per a la tinció amb sals de plata.

Les cubetes es connectaren a una font de voltatge Atom 502, amb les

següents condicions:

- 100 V, durant la migració de la mostra a través del gel superior, fins arribar al gel inferior (aproximadament 30 min).
- 200 V, durant la migració de la mostra a través del gel inferior, fins arribar al gel segellador de la base (aproximadament 3 h).

3.2.6. Tinció del gel per proteïna

Acabada l'electroforesi, el gel es separà de les plaques de vidre utilitzant guants de plàstic i es tenyiren les bandes de proteïna per un dels següents mètodes, segons la quantitat de proteïna present i la sensibilitat desitjada.

3.2.6.1. Tinció amb Coomassie Blue

El gel es va submergir successivament en les següents solucions:

- Solució tenyidora: Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) 0,1 % (p/v), etanol (Panreac) 25 % (v/v) i àcid acètic (Panreac) 10 % (v/v) en aigua desionitzada.

El gel es deixà en 250 ml d'aquesta solució a 37°C durant 12 h.

- Solució destenyidora: Etanol 20 % (v/v) i àcid acètic 8 % (v/v) en aigua desionitzada.

El gel es rentà repetidament en aquesta solució, amb agitació suau, fins que el fons queda transparent. Finalment, el gel es deixà en solució d'àcid acètic al 8 % (v/v).

3.2.6.2. Tinció amb sals de plata

El mètode de tinció amb sals de plata plata Bio-Rad, basat en el

mètode de Merril i col. (223) i descrit en el "Bio-Rad Technical Bulletin No. 82-1089" (22), permet realitzar tincions de proteïna amb una sensibilitat de 10 a 50 vegades més gran que la tinció amb Coomassie Blue, constituint un criteri de puresa molt més estricte.

Tot el procés de tinció es realitzà en una safata de vidre i a temperatura ambient. El gel va ésser sotmès de manera seqüencial, durant els temps indicats, a les següents solucions:

- Fixació

- Metanol (Panreac) 40 % (v/v) i àcid acètic (Panreac) 10 % (v/v) en aigua desionitzada, en dos rentats de 30 min cada un.
- Etanol (Panreac) 10 % (v/v) i àcid acètic 5 % (v/v) en aigua desionitzada, durant 12 h, i després, 4 rentats de 30 min cada un.

Acabada la fixació, el gel es rentà dos cops amb aigua desionitzada.

- Tinció

- Oxidant (Bio-Rad) 10 % (v/v), constituït per dicromat potàssic i àcid nítric, durant 5 min i agitant lleugerament. Després es rentà 3 cops amb aigua desionitzada durant un total de 15 min.
- Reactiu de plata (Bio-Rad) 10 % (v/v), constituït per nitrat de plata, durant 20 min en agitació suau. Es rentà amb aigua desionitzada durant 1 min.
- Revelador (Bio-Rad) 3,2 % (p/v), constituït per carbonat sòdic i paraformaldehid, en dos rentats, un de 30 s i l'altre de 5 min, el primer amb agitació constant. Després es renta amb un nou volum de revelador fins que les bandes varen adquirir la intensitat desitjada.
- Solució d'atur, formada per àcid acètic (Panreac) 5 % (v/v), durant 5 min. Es rentà dues vegades amb aigua desionitzada.

3.2.7. Determinació del pes molecular de les proteïnes

Es representà el logaritme del pes molecular de les proteïnes-patró (o de les seves subunitats en cas de ser oligòmers) enfront de la mobilitat electroforètica (R_f), obtenint-se una recta de calibratge. El pes molecular de les subunitats dels enzims problema (ADH i ALDH) s'obtingué de la interpolació dels seus R_f .

3.3. Electrofocalització analítica en gels ultrafins de poliacrilamida

L'electrofocalització permet separar les proteïnes segons els seus punts isoelectrics al llarg d'un gradient estable de pH, format gràcies a substàncies anomenades amfòlits. En aquest treball s'utilitzà l'electrofocalització analítica en gels de poliacrilamida de 0,2 mm. Aquesta tècnica proporcionà el punt isoelectric dels enzims objecte d'estudi a la vegada que va constituir un nou criteri de puresa.

3.3.1. Preparació de l'acrilamida

La composició de la solució va ser la següent:

- acrilamida (Eastman Kodak) 29,1 % (p/v)
- bis-acrilamida (Merck) 0,9 % (p/v)

S'arrasà a 100 ml amb aigua desionitzada. La solució es tractà com s'indica a III.3.2.1. Es conservà a 4°C durant un màxim de dues setmanes.

3.3.2. Preparació de les plaques de vidre

Per a la formació del gel de poliacrilamida de 0,2 mm s'emprà un motllo Ultramould 2217-200 (LKB), seguint les especificacions de la casa comercial (210).

Les plaques de vidre de l'Ultramould es rentaren acuradament amb aigua, sabó i aigua destil·lada, eixugant-se amb un mocador de paper. Els tractaments que segueixen facilitaren la separació i manipulació del gel una vegada acabada l'electrofocalització. La placa més curta es mullà amb 2 ml d'una solució de dimetildiclorosilà al 2 % (p/v) en 1,1,1-tricloroetà (Repel-Silane, LKB), escampant-se per tota la superfície amb un mocador de paper. Es deixà assecar i es rentà amb aigua destil·lada. La placa més llarga es mullà amb unes gotes d'aigua destil·lada i s'hi va estendre un full de suport plàstic (Gel Bond PAG Film, LKB) amb la seva cara hidrofòlica cap amunt, procurant eliminar qualsevol bombolla d'aire entre el suport i la placa.

S'anivellà el suport metàl·lic de l'Ultramould de forma que quedés perfectament horitzontal i s'hi col·locaren la placa llarga amb el suport plàstic adherit, l'espaiador de 0,2 mm de gruix i les guies de plàstic. La placa curta es deixà preparada, amb la cara tractada amb Repel-Silane cap avall, en la part no foradada de l'espaiador.

3.3.3. Preparació del gel

El gel (110 x 245 mm) es preparà a una temperatura de 20°C. Per a un gel de 0,2 mm de gruix, s'afegiren a un vas de precipitats: 2,5 ml de la solució d'acrilàmida, 0,75 ml de Ampholine 1809 (LKB) per al rang de pH 3,5-10,0 i 6,0 ml d'aigua desionitzada. La barreja es desgasà durant 5 min en un matràs de Kitasato de 100 ml. Es passà novament a un vas de precipitats de 10 ml, on s'afegiren 70 µl de persulfat amònic al 10 % (p/v), preparat al moment, i 10 µl de TEMED, agitant-se suaument.

Tot seguit, la solució s'abocà per sobre de la placa llarga començant per l'extrem proper a la placa curta, la qual s'anà desplaçant al mateix temps per sobre del gel entre les guies, procurant no deixar formar cap bombolla d'aire. La polimerització del gel es produí en 1 h a 20°C.

3.3.4. Preparació de l'aparell d'electrofocalització

S'emprà el sistema Multiphor 2117 (LKB). La placa refrigerant es connectà a un bany refrigerat d'aigua circulant RWC 50, a 4°C, des de 1 h abans d'iniciar l'electrofocalització.

Es va estendre un full de paper milimetrat especial LKB (per a ajudar posteriorment a la correcta situació dels electrodes i de les mostres damunt del gel) per sobre de la placa refrigerant, afegint unes gotes de querosè per les dues cares del paper i procurant eliminar qualsevol bombolla d'aire. A continuació, es col·locà al damunt el suport plàstic amb el gel de poliacrilàmida adherit, vigilant també la formació de bombolles.

Es prepararen 2 electrodes de paper (6 x 240 mm) amb 5 gruixos de paper Whatman n° 3 i es mullaren amb àcid ortofosfòric (Panreac) 1 M, l'ànode, i hidròxid sòdic (Merck) 1 M, el càtode. Els electrodes de paper es col·locaren damunt del gel, seguint el model del paper milimetrat, i es tallaren els seus extrems de tal forma que aquests no sortissin del gel (334).

Es col·locà la tapa amb els electrodes per a l'aplicació d'un camp elèctric transversal al gel, el que permeté l'aplicació simultània de fins a 15 mostres. Els electrodes es connectaren a una font d'alt voltatge 2197 (LKB). El gel es va sotmetre a un "pre-running" de 30 min per tal d'establir el gradient de pH prèviament a l'aplicació de les mostres.

Les condicions limitants que es programaren en l'aparell foren:

- Voltatge = 1500 V
- Intensitat = 30 mA
- Potència = 15 w

3.3.5. Aplicació de les mostres

Després del "pre-running" es col·locaren retalls de 5 x 10 mm de paper adsorbent especial (LKB) damunt del gel, deixant una separació de 5 mm entre ells. S'aplicaren 20 µl de mostra directament damunt de cada paper amb l'ajut d'una pipeta automàtica.

Es connectaren novament els electrodes durant 1,5 h, en les mateixes condicions anteriors, controlant els paràmetres elèctrics cada 15 min.

3.3.6. Determinació del gradient de pH. Càlcul del punt isoelectric

Per a la determinació del gradient de pH es varen emprar els dos mètodes que s'indiquen a continuació.

3.3.6.1. Electrode de pH de superfície

Acabada l'electrofocalització, es mesurà immediatament el pH "in situ", directament sobre la superfície del gel i a la mateixa temperatura de l'electrofocalització. S'emprà un electrode de pH de superfície 2117-111 (LKB) acoblat a un pHmetre digital Methrom 632 (Methrom, Herisau, Suïssa), que permeté mesurar el pH en intervals de pocs mil·límetres.

L'electrofocalització es continuà 10-15 min mes per tal de contrarestar la possible difusió de les bandes durant la mesura del pH.

3.3.6.2. Redissolució de l'amfolit

S'agafà una porció central del gel, des de l'ànode fins al càtode, i es tallà en 18 quadrats de 5 x 5 mm, utilitzant tisores i paper mil·limetrat com a guia. Cada tros de gel es col·locà dins d'un Eppendorf, numerats del 1 al 18, que contienien 0,7 ml d'aigua destil·lada. El pH es mesurà al cap de 12 h, mitjançant un electrode de pH de diàmetre petit. Aquest

mètode és més imprecís i s'utilitzà solament quan no es disposà d'electrode de superfície.

3.3.6.3. Càlcul del punt isoelectric

Es representà el pH enfront de la distància mesurada des del càtode. El punt isoelectric de l'ADH i l'ALDH s'obtingué per interpolació de les distàncies de les seves bandes respectives al càtode.

3.3.7. Tinció del gel

L'aplicació d'una mateixa mostra per duplicat en diferents parts del gel permeté la seva tinció simultània per activitat enzimàtica i per proteïna, fent palès el seu grau de puresa.

Per a la tinció per activitat, es seguí el mateix procediment descrit a III.3.1.1.5. per als gels de midó.

Per a la tinció per proteïna, s'emprà la tinció amb sals de plata per ser més sensible, segons es descriu a III.3.2.6.2. però amb lleugeres variants.

- Abans del procés de fixació normal, el gel, adherit encara al suport plàstic, es tractà successivament amb les següents solucions per tal d'eliminar les restes d'amfòlits (22):

- 1) Metanol (Panreac) 30 % (v/v), àcid tricloroacètic (Panreac) 10 % (p/v), àcid sulfosalicílic (Sigma) 3,5 % (p/v) en aigua desionitzada durant 1 h.
- 2) Metanol 30 % (v/v) i acid tricloroacètic 12 % (v/v) en aigua desionitzada durant un mínim de 8 h i variis canvis.
- 3) Fixació, tal com s'explica a III.3.2.6.2.

- Per a la tinció, es seguiren les especificacions donades per als gels de gruix inferior a 0,5 mm, però tenint en compte que el gel resta adherit a un suport plàstic (22) (veure també III.3.2.6.2.). El gel es

tractà successivament amb les següents solucions:

- 1) Oxidant: 3 min, seguit de 2 rentats amb aigua desionitzada durant un total de 10 min.
- 2) Reactiu de plata: 15 min, seguit d'un rentat amb aigua desionitzada durant 1 min.
- 3) Revelador: Tal com es descriu a III.3.2.6.2.

3.4. Fotografia dels gels

Els gels tenyits varen ser fotografiats tan aviat com fou possible amb una Polaroid MP-4 Land Camera (Polaroid Corp., Cambridge, MA, E.U.A.), emprant un transil.luminador com a font de llum. Per als gels de midó s'emprà ademés il.luminació directa amb focus.

S'empraren dos tipus de pel.lícula:

- Pel.lícula Polaroid Type 665 (Positive/Negative Black & White Land Film). Generalment, el diafragma es situà a f16, essent el temps d'exposició de 1 s. El temps de revelat fou de 30 s. El positiu es fixa immediatament. El negatiu es rentà exhaustivament amb aigua i després amb sulfat sòdic al 12 % (p/v). Es tractà amb humectador Negra (Negra Industrial S.A., Barcelona) i es deixà assecar.

- Pel.lícula Agfa LITH (Agfa-Gevaert, Leverkusen, R.F.A.), que permet treballar amb llum vermella. El negatiu s'adaptà a un xassís de la càmera Polaroid. Generalment, el diafragma es situà a f16, essent el temps d'exposició de 25 s, controlat per un temporitzador connectat al sistema d'il.luminació. El negatiu es deixà 2 min en solució de revelador Negra P-121 al 10 % (v/v) preparat recentment, 30 s en solució d'atur (àcid acètic al 5 %, v/v) i un mínim de 30 s en fixador Negra N-FIX 172 al 10 % (v/v). Es rentà amb aigua, es mullà amb humectador Negra i es deixà assecar.

La fotografia es positivà en paper Agfa n° 5 Ultradur LITH, per il.luminació suau a través d'un vidre que fixà el negatiu. El procés de

revelat fou el mateix que per als negatius, rentant-se només amb aigua.

Per a fotografies de més qualitat s'emprà una camera Pentax, amb trípode, provista de pel·lícula Agfa PAN 25.

3.5. Conservació dels gels

Els gels de midó es fixaren amb una solució constituïda per metanol 45 % (v/v) i àcid acètic 10 % (v/v) en aigua destil·lada i es conservaren en bosses de plàstic segellades, en absència de llum i a 4°C.

Els gels de poliacrilamida més gruixuts es conservaren amb uns mililitres d'aigua destil·lada dins de bosses de plàstic segellades, en absència de llum i a temperatura ambient. Els gels de poliacrilamida més prims simplement es deixaren assecar a l'aire, adherits al suport plàstic.

4. MÈTODES ESPECIALS

4.1. Fraccionament subcel·lular

La majoria dels teixits humans només poden estudiar-se en profunditat en mostres extretes per autòpsia, de 24 a 48 h després de la mort de l'individu. Això comporta que el teixit a estudiar ha sofert ja greus alteracions en les seves estructures tissulars i cel·lulars.

La placenta és l'únic òrgan humà que pot ésser processat i analitzat poc temps després de deixar d'ésser funcional, el que permet estudiar en inmillorables condicions aspectes com el de la distribució subcel·lular dels enzims.

4.1.1. Obtenció del teixit per al fraccionament

Les placentes es varen processar al cap de 1 h del part, evitant en qualsevol cas una congelació prèvia que pogués danyar les estructures intracel·lulars (veure III.1.3.).

4.1.2. Homogenització isotònica del teixit

20 g de placenta es netejaren de teixit connectiu, tal com s'explica a III.1.4.1. i es rentaren amb 20 ml de tampó isotònic a 4°C, que contenia sacarosa (Merck) 0,25 M, Tris 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, a pH 7,4, eliminant en el possible la sang. El líquid del rentat es decantà i el teixit es trossejà minuciosament amb tisores.

S'afegiren 20 ml del tampó isotònic a 4°C i s'homogenitzà manualment

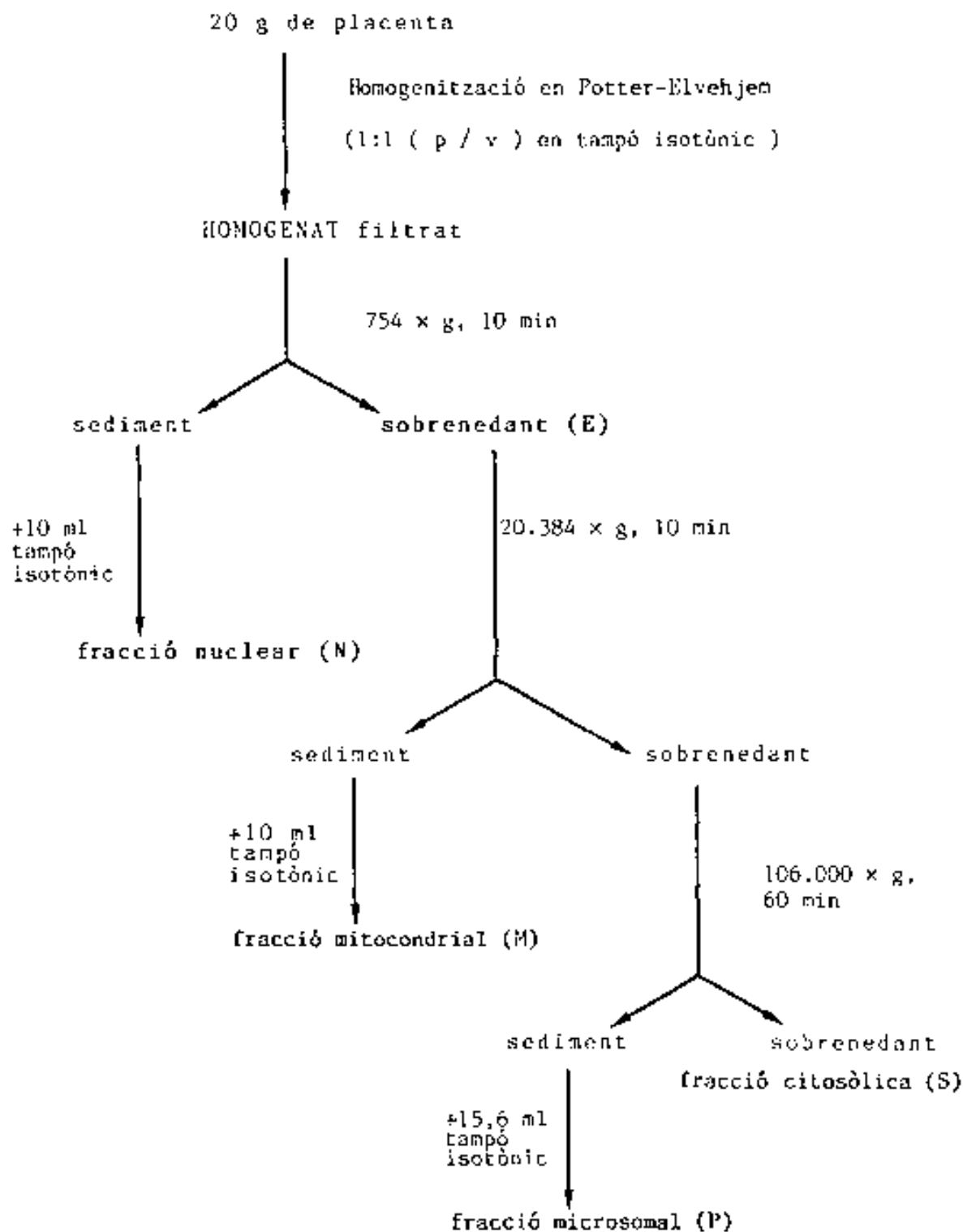


FIGURA 18 Esquema del fraccionament subcel·lular en mostres de placenta.

en un homogenitzador Potter-Elvehjem de 30 ml amb pistó de tefló, per tal d'evitar el trencament dels orgànuls subcel·lulars. L'homogenat va ésser filtrat a través de 4 capes de gassa quirúrgica (145, 181) per tal d'eliminar les restes de teixit connectiu, el que permeté realitzar posteriorment mesures d'activitat enzimàtica en la fracció nuclear. Tot el procés es realitzà en bany de gel.

4.1.3. Centrifugació diferencial

Un esquema de les diferents centrifugacions efectuades apareix en la Fig. 18. L'homogenat es centrifugà a $754 \times g$ durant 10 min a 4°C (centrifugadora Sorvall RC-5B, 2.500 r.p.m. amb el rotor SS-34, tubs de polipropilè de 40 ml). El sediment es va resuspendre, mitjançant un Potter-Elvehjem, en 10 ml de tampó isotònic a 4°C , anomenant-se fracció nuclear (N), segons la nomenclatura de de Duve i col. (95).

El sobrenedant, anomenat extracte citoplasmàtic (E), es centrifugà a $20.384 \times g$ durant 10 min a 4°C (centrifugadora Sorvall RC-5B, 13.000 r.p.m. amb el rotor SS-34, tubs de polipropilè de 40 ml), per tal d'assegurar la sedimentació de tots els mitocondris. El nou sobrenedant es decantà acuradament i es guardà. El sediment es va resuspendre lentament en 10 ml de tampó isotònic a 4°C , repetint la centrifugació a $20.384 \times g$. El sediment final, blanquinós, es va resuspendre en 10 ml de tampó isotònic i s'anomenà fracció mitocondrial (M). Els sobrenedants es centrifugaren separatament a $106.000 \times g$ durant 60 min a 4°C (ultracentrifugadora preparativa Beckman L8-70, Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, E.U.A., 32.000 r.p.m. amb el rotor basculant SW-60, tubs de polial·lòmer de 4,8 ml). Els sediments, rosats, es varen reunir i resuspendre en 15,6 ml de tampó isotònic, anomenant-se fracció microsomal (P). Els sobrenedants reunits constituïren la fracció citosòlica (S) (Fig. 18).

Es varen agafar alíquotes de totes les fraccions i es varen conservar a 4°C , assajant-se dintre de les hores següents. Algunes es varen congelar a -40°C per a la determinació de proteïnes.

4.1.4. Mesura de l'activitat enzimàtica

Les alíquotes foren tractades amb el detergent no iònic Triton X-100 1 % (p/v) (Serva p.a., Heidelberg, R.F.A.), immediatament abans de la mesura de les activitats enzimàtiques (excepte en el cas de l'ADH), per tal d'alliberar les fraccions d'enzim ocluides o unides a membranes (305).

L'activitat ADH es mesurà tal com es descriu a III.2.1.1. L'activitat ALDH es mesurà segons es descriu a III.2.1.2., a alta i baixa concentració de propanal. S'afegí ademés rotenona 2 µM (veure III.1.1.2.4.) per tal d'inhibir la NADH oxidasa mitocondrial, evitant així la reoxidació del NADH produït (305).

4.1.4.1. Mesura de l'activitat d'enzims marcadors de les fraccions subcel·lulars

Tots els assajos es varen realitzar en tampó fosfat monopotàssic-KOH (Panreac) 50 mM, pH 7,5, i a 25°C (305).

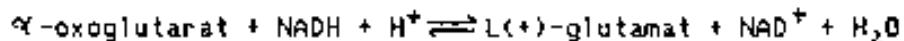
- Lactat deshidrogenasa (LDH) (EC 1.1.1.27)

S'utilitzà com a marcador citosòlic. Es mesurà espectrofotomètricament a 340 nm, segons s'explica a III.2.1.4., en el sentit de reducció del piruvat.

- Glutamat deshidrogenasa (GDH) (EC 1.4.1.3)

Es va utilitzar com a marcador de la matriu mitocondrial. L'assaig es feu espectrofotomètricament a 340 nm, segons Schmidt (271). La barreja de reacció contenia també a pH 7,5, acetat amònic (Merck) 120 mM, NADH 0,15 mM, ADP (Grade III, Sigma) 1,5 mM i acid α-oxoglutànic (Boehringer

Mannheim GmbH, Mannheim, R.F.A.) 8 mM.

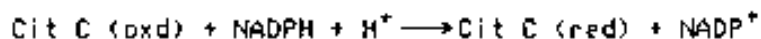


- Monoamino oxidasa (MAO) (EC 1.4.3.4)

Es va utilitzar com a marcador de la membrana externa mitocondrial. Es mesurà espectrofotomètricament a 250 nm la producció de benzaldehid ($\epsilon_{250} = 13.400 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) a partir de clorhidrat de benzilamina 2,5 mM (290).

- NADPH-citocrom C reductasa (EC 1.6.2.3)

Es un enzim microsomal. Es va determinar espectrofotomètricament, tal com descriuen Tottmár i col. (304), seguint l'aparició de citocrom C reduït a 550 nm ($\epsilon_{550} = 18.500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). La barreja de reacció contenia el tampó de pH 7,5, citocrom C oxidat (77 %, Boehringer) 0,05 mM, cianur potàssic (Carlo Erba) 0,3 mM, per tal d'inhibir la citocrom C oxidasa de la cadena respiratòria, i NADPH (Sigma) 0,1 mM.

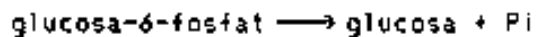


- Glucosa-6-fosfatasa (EC 3.1.3.9)

Es va utilitzar com a marcador microsomal, además de la NADPH-citocrom C reductasa. La seva activitat es va mesurar per l'alliberació de fosfat a partir de glucosa-6-fosfat. La reacció enzimàtica es realitzà segons el mètode de Nordlie i Arion (232): 0,6 ml de tampó cacodilat (Merck) 0,1 M, pH 6,5, i 0,2 ml de glucosa-6-fosfat (Boehringer) 150 mM, s'arrasaren a 1,5 ml amb aigua destil·lada i s'incubaren a 30°C durant 5 min. S'afegiren 0,5 ml de mostra i la barreja es deixà a 30°C durant 20 min més. La reacció es deturà amb 1 ml d'àcid tricloroacètic (Panreac) al 10 % (p/v). La solució es centrifugà a 1.000 r.p.m. durant 8 min en una centrifugadora de sobretaula refrigerada Beckman o una MSE Super-Minor (MSE Scientific Instruments, Crawley, Sussex, Regne Unit) per tal d'eliminar les proteïnes precipitades.

Per a la determinació del fosfat inorgànic es seguí el següent

mètode: S'agafà una alíquota de 0,5 ml del sobrenedant de l'anterior centrifugació i s'hi afegiren 3 ml d'una solució de sulfat de p-metilaminofenol (Photorex, Merck) al 1 % (p/v). Es deixà 10 min a temperatura ambient i es llegí l'absorbància a 800 nm. La quantitat de fosfat alliberat es calculà a partir d'una recta de calibratge construïda amb concentracions-patró de fosfat monopotàssic (Merck) des de 0,125 mM fins a 5 mM.



4.2. Mètodes dels estudis en sang

4.2.1. Obtenció i tractament dels eritròcits

Mostres de 10 ml de sang, procedent de donants normals, es varen recollir en tubs heparinitzats i es varen centrifugar a 1.930 x g durant 10 min a 4°C (centrifugadora Sorvall RC-58, 4.000 r.p.m. amb el rotor SS-34, tubs Pyrex o Corex de 15 ml) (132). El plasma es va eliminar per succió amb pipeta Pasteur i es va guardar a part. Els eritròcits es varen rentar 2 cops amb tampó isotònic Tris-HCl 10 mM, NaCl (Merck) 0,145 M, pH 7,4, centrifugant-se cada vegada a 1.930 x g durant 10 min. Els eritròcits empaquetats es lisaren per xoc osmòtic en 1 volum de tampó fosfat monopotàssic (Merck) 20 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 6,0, a 4°C, durant 20 min.

L'hemolitzat resultant es va centrifugar a 27.000 x g durant 30 min a 4°C (centrifugadora Sorvall RC-58, 15.000 r.p.m. amb el rotor SS-34, tubs de polipropilè) segons descriuen Towell i col. (306). El sobrenedant es diluï amb el mateix tampó emprat per al xoc osmòtic en la proporció 1:5 (v/v), abans de la mesura de l'activitat enzimàtica, observant-se les indicacions descrites a III.2.1.6.1.

4.2.2. Mesura de la concentració d'hemoglobina total

Per tal de quantificar la contribució de les formes enzimàtiques presents en la sang a l'activitat dels enzims estudiats en placenta, interessà una mesura del grau de contaminació de la placenta per part de la sang. Com a paràmetre indicador d'aquesta contaminació s'utilitzà la concentració d'hemoglobina en el teixit respecte a la concentració d'hemoglobina normal en sang.

La concentració d'hemoglobina total en sang o placenta es calculà per mesura de l'absorbància a 542 nm, longitud d'ona en que les tres classes d'hemoglobina, oxihemoglobina, desoxihemoglobina i carboxihemoglobina, absorbeixen per igual, emprant-se un ϵ_{542} de $14.200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} / \text{mol grup Hemo}$. El pes molecular de l'hemoglobina es considerà de 66.000 dalton (103).

4.3. Mètodes per als estudis en fetge de fetus i placenta de rata

4.3.1. Animals i dieta

Les rates, femelles verges de la raça Sprague-Dawley, foren alimentades ad-libitum amb dieta sòlida. Els animals es deixaren aparellar amb mascles de la mateixa raça, considerant-se com a dia 0 el dia de l'aparellament i mantenint-se en observació fins el dia 15 de gestació.

4.3.2. Obtenció i conservació dels teixits

Les rates embarassades foren anestessades amb éter etílic (Panreac) i sacrificades per decapitació. Inmediatament es realitzà una cessàrea extreient el sac amniòtic, que contenia de 12 a 14 cries per rata. De

cada un dels fetus s'obtingué la placenta i el fetge. Les placentes, per una banda, i els fetges, per una altra, corresponents a un mateix dia de gestació, es reuniren en un sol grup i es conservaren congelats a -40°C fins el moment de la seva anàlisi.

4.3.3. Homogenització i centrifugació dels teixits

Es pesaren de 0,5 a 1 g de cada grup de teixits i es tallaren en trossos petits, netejant les pinces i tisores cada cop per a evitar contaminacions. S'afegí també Tris-HCl 10 mM, DTT 0,5 mM, pH 8,4, a 4°C, en la proporció 2:1 (p/v) i s'homogenitzà manualment en un homogenitzador Potter-Elvehjem amb pistó de tefló, rodejat de bany de gel.

L'homogenat es centrifugà a 27.000 x g durant 1 h a 4°C (centrifugadora Sorvall RC-5B, 15.000 r.p.m. amb el rotor SS-34, tubs de polipropilè de 40 ml).

4.3.4. Mesura de l'activitat ADH

L'activitat ADH en fetge i placenta es mesurà amb octanol 1,0 mM segons es descriu a III.2.1.1.1. En fetge, es mesurà ademés amb etanol 33 mM, tal com es descriu a III.2.1.1.2.

4.3.5. Anàlisi dels isoenzims de l'ADH per electroforesi en gel de midó

L'electroforesi es realitzà a pH 7,6, efectuant-se la tinció amb pentanol, tal com es descriu a III.3.1.1.