



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

**CAPITOL IV**

**RESULTATS**

## Capítol IV : RESULTATS

### 1. ALCOHOL DESHIDROGENASA DE PLACENTA HUMANA

#### 1.1. Capacitat d'oxidació d'etanol de la placenta humana

Es determinà la capacitat d'oxidació d'etanol de la placenta humana, mesurant l'activitat ADH en el sobrenedant dels homogenats de 14 placentes diferents (Taula XII).

No es varen observar diferències notables entre les placentes estudiades quant a capacitat de metabolització de l'etanol. A pH fisiològic i a les concentracions d'etanol que es poden trobar en sang després de la ingestió d'alcohol (33 mM), l'activitat per gram de teixit fou quasi indetectable, 50.000 vegades menor que l'observada en el fetge (106, 190, 197). Quan la concentració d'etanol s'incrementà fins a 500 mM o s'emprà un alcohol de cadena llarga, com octanol 1 mM, l'activitat de l'ADH de placenta a pH 10,0 fou encara 500 i 40 vegades, respectivament, inferior a la del fetge (239).

Com ja s'ha dit anteriorment, els homogenats de placenta presenten un elevat contingut en sang. Així doncs, es determinà la incidència d'una possible activitat ADH de la sang en la capacitat total d'oxidació d'etanol del sistema placentari (veure 11.4.2.). La concentració d'hemoglobina en placenta es calculà en aproximadament 20 mg/g de teixit, el que significa uns 75 ml de sang/placenta. Aquests resultats, d'acord amb les dades existents sobre sang placentària (44), suposen que una elevada quantitat de la proteïna dels eritròcits contaminaria els homogenats de placenta, podent representar entre un 25 i un 50 % de la proteïna soluble total. La mesura de l'activitat ADH en la sang d'individus sans no revelà activitat amb etanol 33 mM. Amb octanol 1 mM,

TAULA XII. Capacitat d'oxidació d'alcohols de la placenta humana a terme.

Substrat	Concentració (mM)	Activitat (mU/g de teixit) <sup>a</sup>	
		pH 7,5	pH 10,0
etanol	33	0,018 ± 0,06	0,28 ± 0,11
etanol	500	0,19 ± 0,07	4,05 ± 1,52
octanol	1	0,86 ± 0,32	14,66 ± 5,51

<sup>a</sup> Activitat mesurada en tampó fosfat monossòdic-NaCl 33 mM, pH 7,5 o glicina-NaOH 0,1 M, pH 10,0, MAD<sup>+</sup> 1,2 mM, a 25° C. La reacció s'inicià amb l'addició del substrat, després d'haver-se esgotat l'activitat "background" (veure III.2.1.5.1.1.). Les activitats són la mitjana ± desviació estàndard dels valors obtinguts amb els homogenats de 14 placentes diferents.

a pH 10,0, l'activitat mitjana de 6 preparacions d'eritròcits diferents fou de 0,073 mU/mg d'hemoglobina. La màxima contribució de l'ADH d'eritròcit a l'activitat ADH mesurada en l'homogenat de placenta seria de 1,46 mU/g de teixit, o un 10 % de l'activitat total. No es va detectar activitat ADH en el plasma, d'acord amb els baixos valors observats en individus no afectats per malaltia hepàtica (5), 279).

## 1.2. Aïllament i purificació de l'ADH de placenta humana

La purificació de l'ADH de placenta es realitzà seguint el mètode emprat per Parés i Vallee (239) per a la purificació de l'isoenzim  $\alpha$ -ADH de fetge, i comportà els passos que s'esmenten a continuació (veure també III.1.4. i Fig. 11).

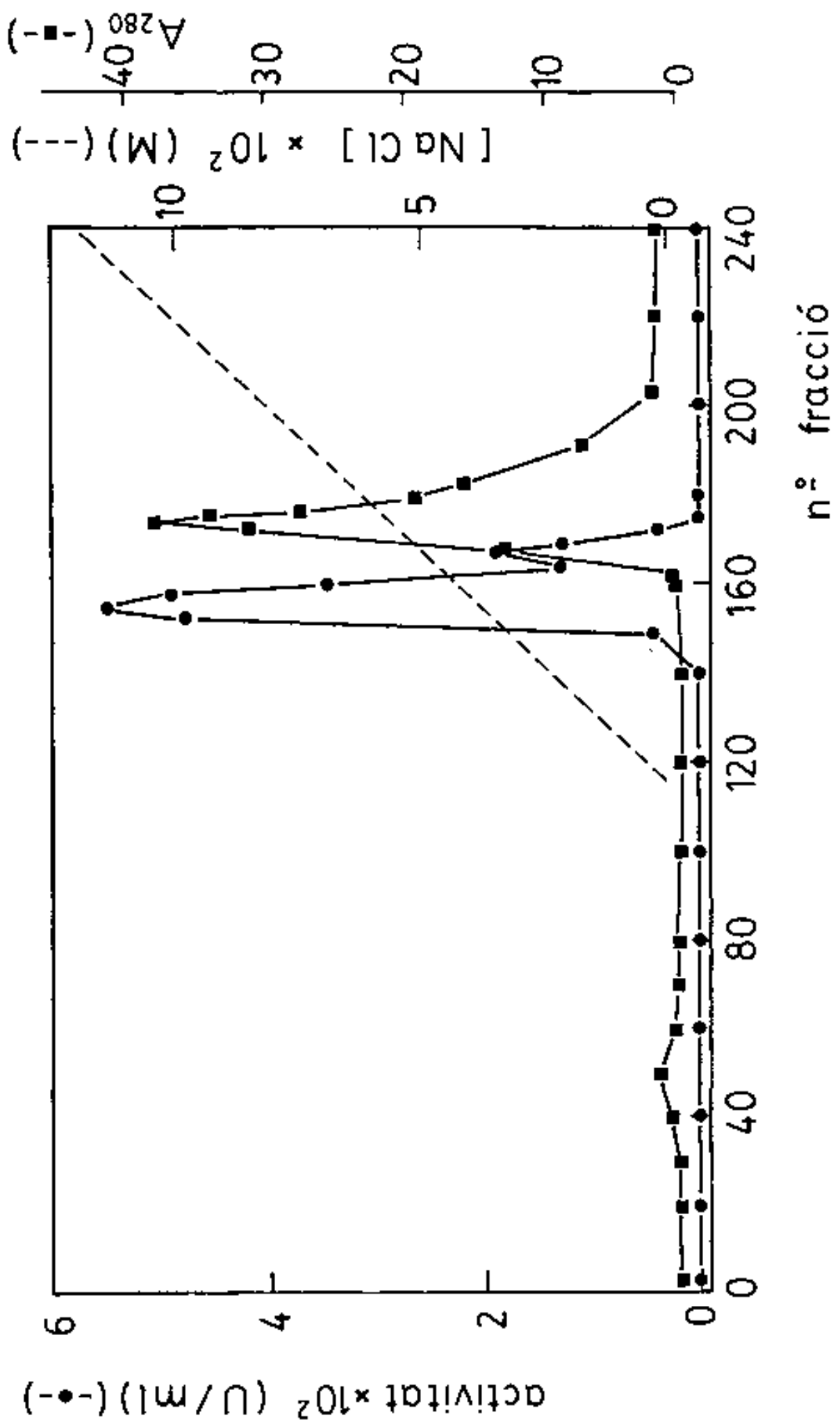
### - Exemple de purificació

En una purificació típica, es varen homogenitzar 500 g de placenta 1:1 (p/v) en tampó Tris-HCl 10 mM, pH 7,9 a 4°C, centrifugant-se a continuació a 11.000 x g durant 1 h. El sobrenedant (700 ml) es filtrà, i es dialitzà enfront de 25 l del mateix tampó durant 5 h. La mostra s'aplicà a una columna de DEAE-cel·lulosa (5 x 50 cm) equilibrada amb el tampó anterior, i l'enzim va ser eluït amb un gradient de 0 a 0,15 M de NaCl (3.000 ml). Les fraccions actives (300 ml) es varen reunir, concentrar fins a 25 ml, dialitzar enfront de tampó fosfat monossòdic-NaOH 10 mM, pH 7,3 i cromatografiar en una columna de S'AMP-Sepharose (1 x 22 cm), equilibrada amb el mateix tampó. La columna es va rentar successivament amb aquest tampó (300 ml) i amb Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 (300 ml). L'ADH de placenta va ser eluïda amb un gradient de 0 a  $6 \times 10^{-5}$  M de NADH (500 ml) i concentrada fins a un volum de 1-2 ml, amb una activitat estàndard de 1-2 U/ml, apropiada per als estudis físico-químics i cinètics posteriors. La duració total de la purificació fou de 6 dies.

La Taula XIII resumeix les diverses etapes de la purificació. Seguint aquest procés, l'enzim va ser purificat 12.000 vegades a partir de

**FIGURA 19** Perfil d'elució de la cromatografia en DEAE-cel·lulosa a pH 7,9 (veure III. 1.4.4.).

L'ADH de placenta va ser eluïda mitjançant un gradient de 0 a 0,15 M de NaCl (---): activitat amb octanol 1,0 mM (-●-); absorbància a 280 nm (-■-). El volum de les fraccions fou de 20ml.



l'homogenat de placenta.

- Cromatografia de DEAE-cel·lulosa

En la cromatografia de DEAE-cel·lulosa, l'ADH de placenta va eluir a una concentració de 40 mM de NaCl, immediatament abans de la fracció majoritària de l'hemoglobina, principal contaminant dels homogenats de placenta. Sovint, un petit pic d'activitat amb octanol 1,0 mM seguí al pic majoritari en el perfil d'elució, tal com succeeix en la purificació de l'isoenzim  $\chi$ -ADH de fetge (319) (Fig. 19). L'electroforesi en gel de midó d'una alíquota d'aquest segon pic mostrà una banda majoritària de mobilitat idèntica a  $\chi$ -ADH (veure IV.1.4.).

En una ocasió, per tal de detectar la possible presència d'isoenzims catòdics en placenta, es concentraren exhaustivament les fraccions eluides en el volum d'exclusió de la columna i es mesurà la seva activitat enfront d'etanol 33 mM. L'activitat obtinguda fou de 0,0084 mU/g de teixit, i la Km aparent per a l'etanol a pH 10,0, 0,91 mM, similar a la dels isoenzims de la classe I de fetge (Taula II). Una mostra del concentrat s'aplicà a una electroforesi de gel de midó, apareixent una tênue banda catòdica de mobilitat idèntica a la de l'isoenzim  $\beta_4\beta_4$ , el més abundant en el fetge humà (88) (dades no presentades). Encara que l'origen d'aquest isoenzim podria trobar-se en el teixit placentari, no es pot descartar que la seva procedència sigui el fetge, havent sigut transportat a través del plasma sanguini fins a la placenta (51, 279).

- Cromatografia en 5'AMP-Sepharose

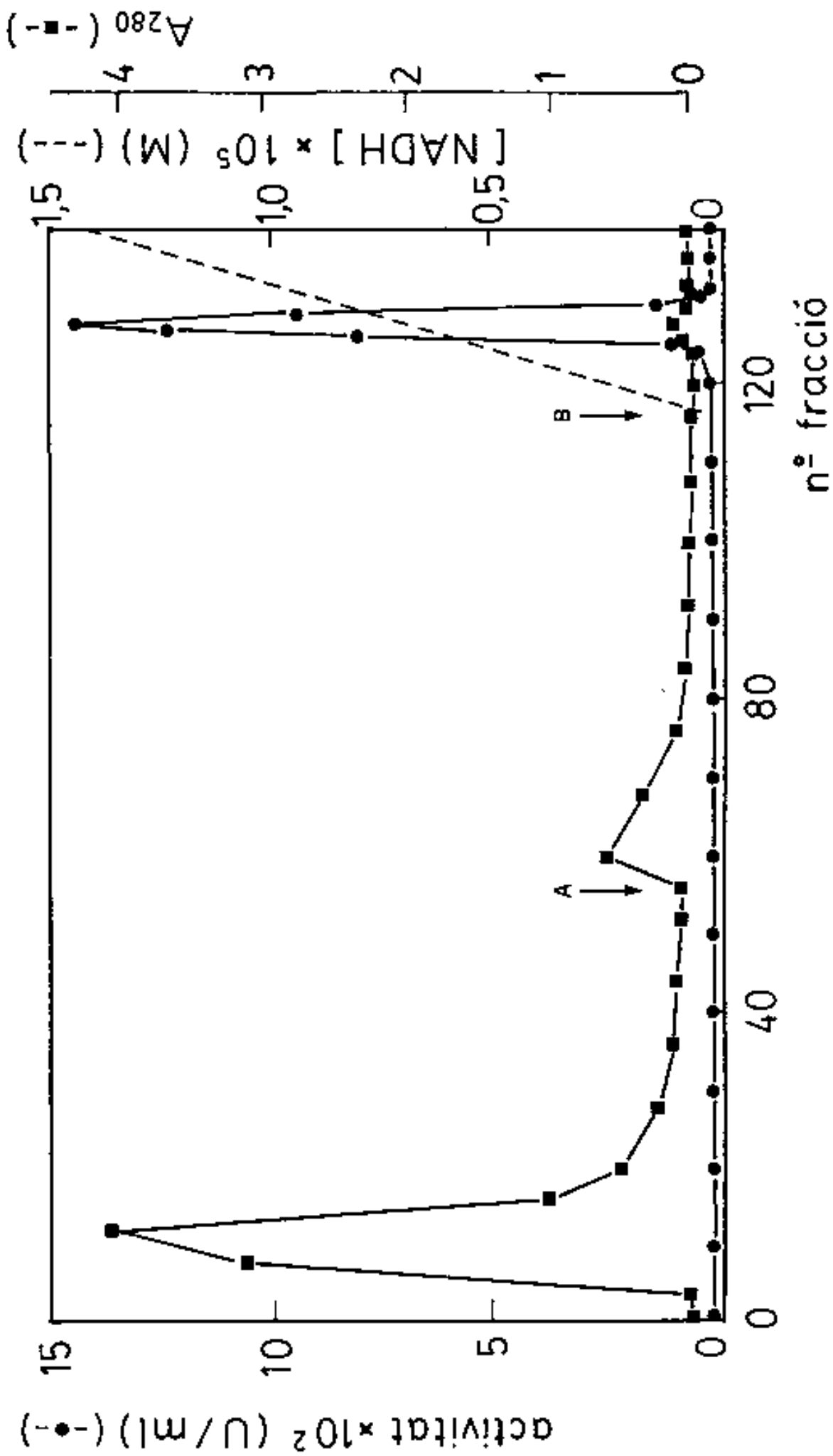
En la cromatografia de 5'AMP-Sepharose l'enzim eluí específicament mitjançant el gradient de NADH (Fig. 20), assolint-se finalment un elevat rendiment (Taula XIII). La purificació proporcionà quasi 2 mg d'enzim pur, demostrant-se la seva homogeneïtat per electroforesi en poliacrilamida amb SDS, cromatografia de gel filtració i electroforesi en gel de midó (Figs. 22 i 24). L'activitat específica de l'enzim pur a pH 10,0 resultà de 2,18 U/mg, mesurada amb octanol 1,0 mM, o 0,60 U/mg amb etanol 0,5 M.



**FIGURA 20** Perfil d'elució de la cromatografia en 5'AMP-Sepharose (veure III 1.4.6.).

La columna es va rentar successivament amb fosfat monossòdic 10 mM , pH 7,3, i amb Tris-HCl 0,1 M , pH 8,5 (A). L'ADH de placenta va ser eluïda amb un gradient (B) de 0 a  $6 \times 10^{-5}$  M de NADH (---): activitat amb octanol 1,0 mM (-●-) ; absorbància a 280 nm (-■-).

El volum de les fraccions fou de 5 ml.



TAULA XIII. Purificació de l'ADH de placenta humana <sup>a</sup>.

Pas de purificació	Activitat total <sup>b</sup> (U)	Proteïna total <sup>c</sup> (mg)	Activitat específica (U/mg)	Factor purificació (vegades)	Rendiment (%)
Homogenat	5,5	30.500	0,00018	1	100
DEAE-cel·lulosa	4,4	100	0,044	244	80
S'AMP-Sepharose	4,0	1,8	2,18	12.100	70

<sup>a</sup> Dades obtingudes per a una purificació típica a partir de 500g de teixit placentari.

<sup>b</sup> L'activitat es mesurà amb octanol 1,0 mM, NAD<sup>+</sup> 1,2 mM, en tampó glicina-NaOH 0,1 M, pH 10,0, a 25°C (veure III.2.1.1.1.).

<sup>c</sup> La concentració de proteïna es determina pel mètode de Lowry i col. (183), utilitzant albúmina de sèrum boví com a patró (veure III. 2.4.2.).

### 1.3. Estabilitat de l'ADH de placenta

L'enzim pur es mostrà altament inestable en absència de NADH o de DTT. Com s'observa en la Fig. 21, la vida mitjana de l'ADH de placenta en presència de NADH (2 mol de NADH/mol d'enzim) fou de 20 dies, mentre que amb DTT 1 mM es perllongà més enllà d'un mes sense pèrdua aparent en l'activitat. L'increment en l'activitat observat durant els primers dies d'emmagatzement, es podria deure a un efecte de reactivació de l'enzim per part dels agents estabilitzants, sobretot DTT, afegits en finalitzar la purificació.

El rendiment de la purificació millorà quan els tampons emprats també contingueren DTT 1 mM (dades no presentades), confirmant la susceptibilitat general dels isoenzims de l'ADH humana al medi oxidant, per raó de l'elevat contingut en residus de cisteïna (35, 319).

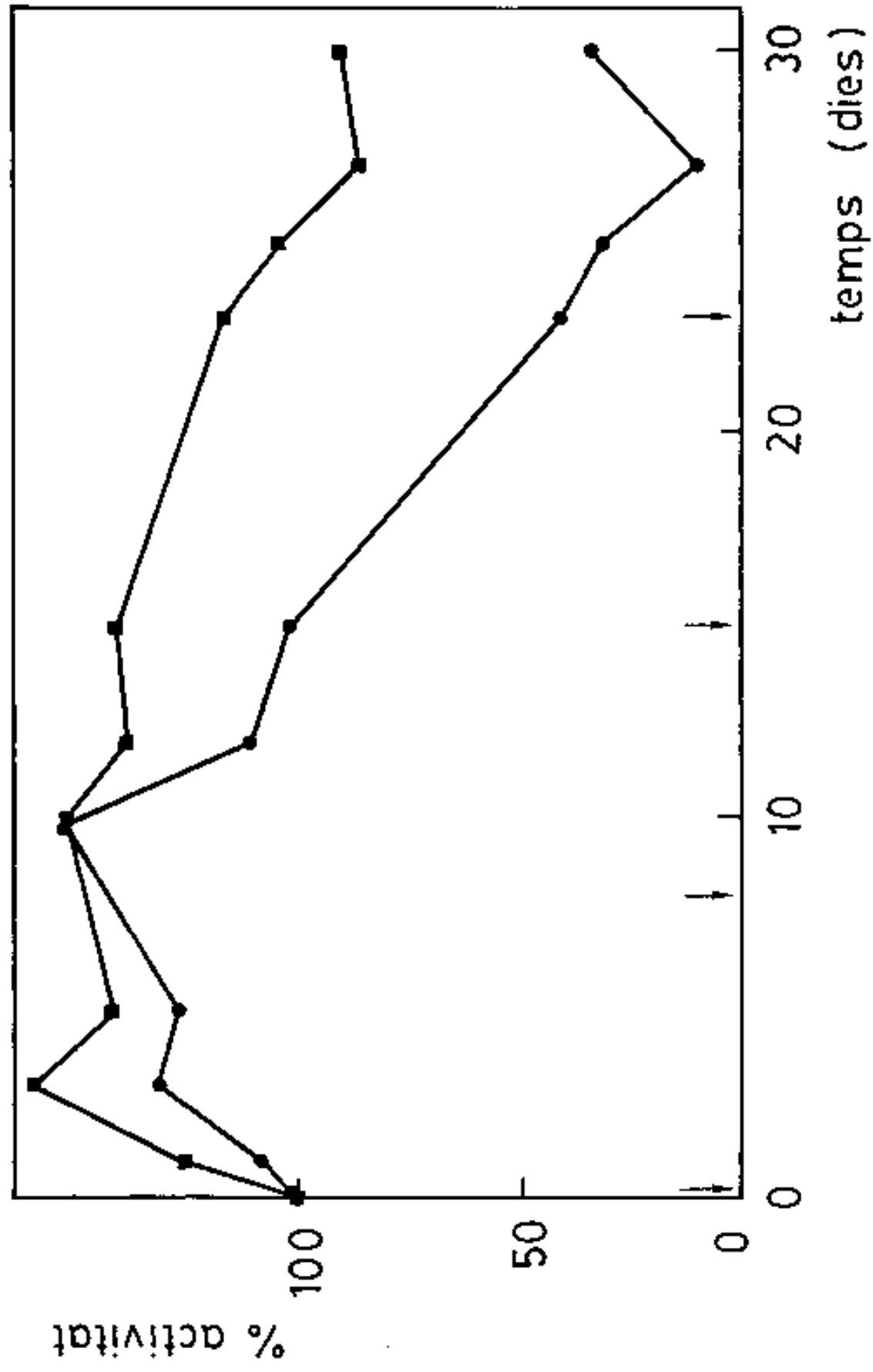
### 1.4. Anàlisi dels isoenzims de l'ADH de placenta

Quan es varen analitzar els homogenats de placenta mitjançant electroforesi de gel de midó, no s'observà cap banda d'activitat en la tinció amb etanol, d'acord amb la baixa activitat detectada amb aquest substrat. En la tinció amb pentanol, tots els homogenats de les 14 placentes examinades mostraren una única banda anòdica d'intensitat molt dèbil.

Quan es varen aplicar simultàniament homogenat de placenta, ADH de placenta purificada i homogenat de fetge, l'isoenzim de placenta presentà una mobilitat idèntica a la de l'isoenzim hepàtic de la classe III,  $\zeta$ -ADH (Fig. 22). Semblantment a la mostra hepàtica, l'isoenzim de placenta es desdoblava en dues bandes de mobilitat lleugerament diferent, essent la més intensa la de migració més lenta cap a l'ànode. Aquest comportament havia sigut ja observat en la  $\zeta$ -ADH hepàtica, designant-se  $\zeta_1$ -ADH i

**FIGURA 21** Estabilitat de l'ADH de placenta en tampó Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, a 4°C.

L'enzim va ser emmagatzemat en presència de NADH (2 mols/mol enzim) (-●-) o de DTT 1 mM (-■-). Les fletxes indiquen l'addició de NADH a l'enzim (veure III.1.4.7.)



**FIGURA 22** Electroforesi en gel de midó de l'ADH humana  
a pH 8,6 , 220 V, durant 16 h (veure III. 3.1.2.)  
a) Tinció amb etanol 69 mM  
b) Tinció amb pentanol 74 mM

1 : Homogenat de fetge  
2 : Homogenat de placenta  
3 : ADH de placenta purificada

a

b

⊕

ADH placenta — ● — X-ADH

— origen —

— classe ↑ —



1 2 3

⊖

1 2 3





$\lambda_2$ -ADH les bandes de menor i major mobilitat, respectivament (5, 239).

Sempre que la tinció es perllongà durant més de 30 min, es detectaren en els homogenats (però no en la preparació d'enzim pur) dues noves bandes de mobilitat molt més anòdica. Aquestes també apareixien en absència de substrat i no es visualitzaven quan s'afegia piruvat al tampó de tinció. En canvi, sí es detectaven utilitzant lactat com a substrat, el que demostrava que les noves bandes corresponien a isoenzims de la lactat deshidrogenasa, concretament, LDH 1 i LDH 2 (132) (dades no presentades).

### 1.5. Caracterització físico-química de l'ADH de placenta

#### 1.5.1. Pes molecular de l'enzim natiu

El pes molecular de l'ADH de placenta purificada es determinà per cromatografia de gel filtració en una columna de Sephadex G-200 SF (veure III.1.4.8.1.). L'enzim eluí en un pic simètric d'activitat que coincidí amb el màxim d'absorció a 280 nm (dades no presentades), no existint, doncs, possibles proteïnes contaminants. Com es pot veure en la Fig. 23, el pes molecular obtingut, 74.000 dalton, fou lleugerament inferior al de l'ADH de fetge de cavall.

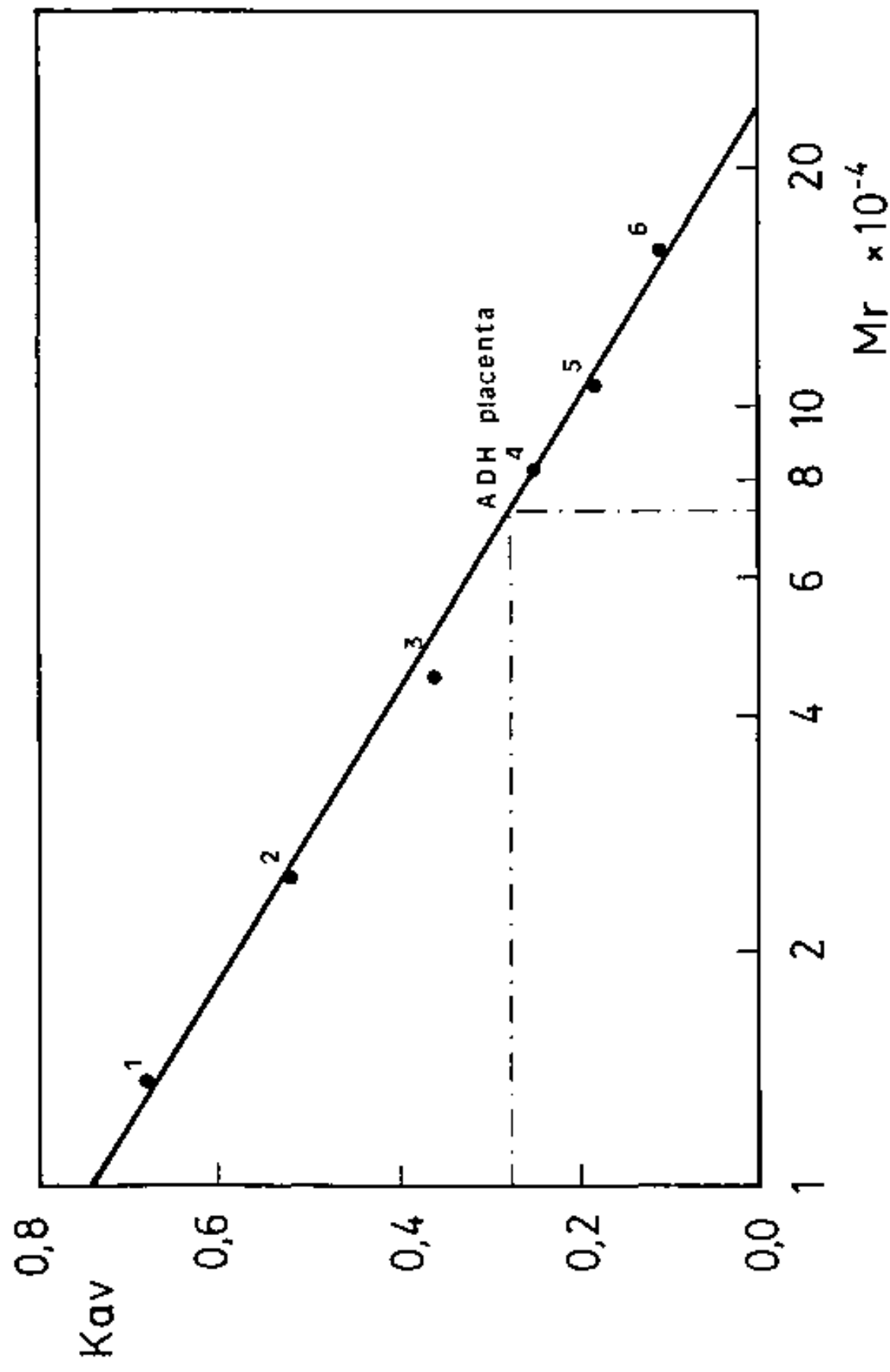
#### 1.5.2. Pes molecular de les subunitats

L'enzim pur va mostrar una única banda en electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS i tinció per proteïna amb Coomassie Blue, indicant la homogeneïtat de la preparació. Aquesta banda, de mobilitat lleugerament més ràpida que la de les subunitats de l'ADH comercial de fetge de cavall, correspongué a un pes molecular de les subunitats de 37.000 dalton (Fig. 24). Aquest resultat, juntament amb el pes molecular

**FIGURA 23** Determinació del pes molecular ( $M_r$ ) de l'ADH de placenta humana per cromatografia de gel filtració en Sephadex G-200 SF.

Representació de  $K_{av}$  enfront de  $\log M_r$  (veure III. 1.4.8.).  $r^2 = 0,994$  .  $V_t = 370$  ml .  $V_o = 135,6$  ml.

Proteïnes patró: 1. Ribonucleasa A,  $1,368 \times 10^4$ ;  
2. Quimotripsinògen A,  $2,5 \times 10^4$ ; 3. Ovoalbúmina ,  
 $4,5 \times 10^4$ ; 4. ADH de fetge de cavall,  $8,3 \times 10^4$ ;  
5. Hexoquinasa,  $10,6 \times 10^4$ ; 6. Aldolasa,  $15,8 \times 10^4$ .



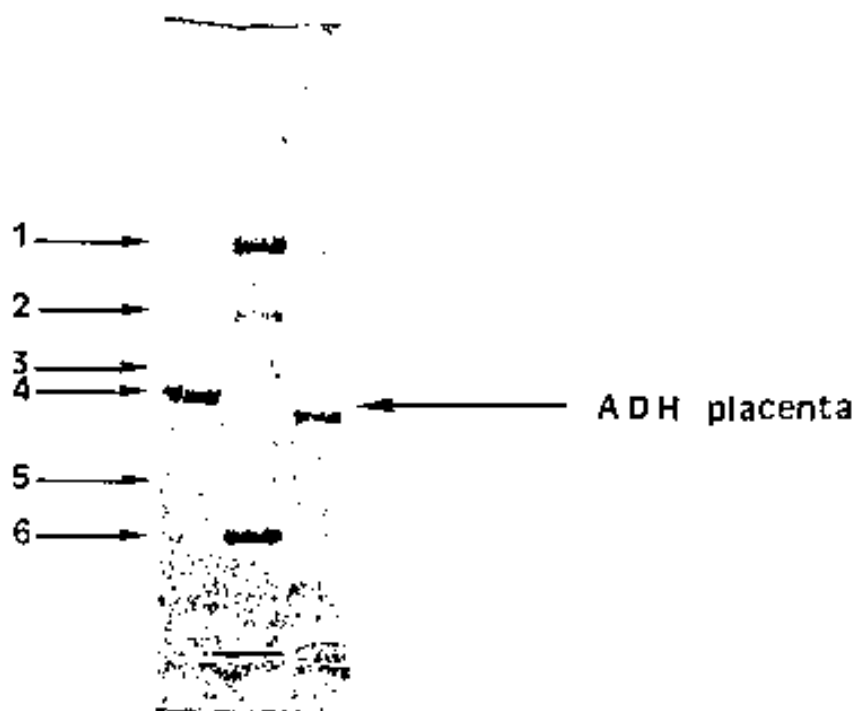
**FIGURA 24** Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS. Tinció amb Coomassie Blue (veure III. 3.2.)

a) Demostració de la homogeneïtat de l'enzim purificat.

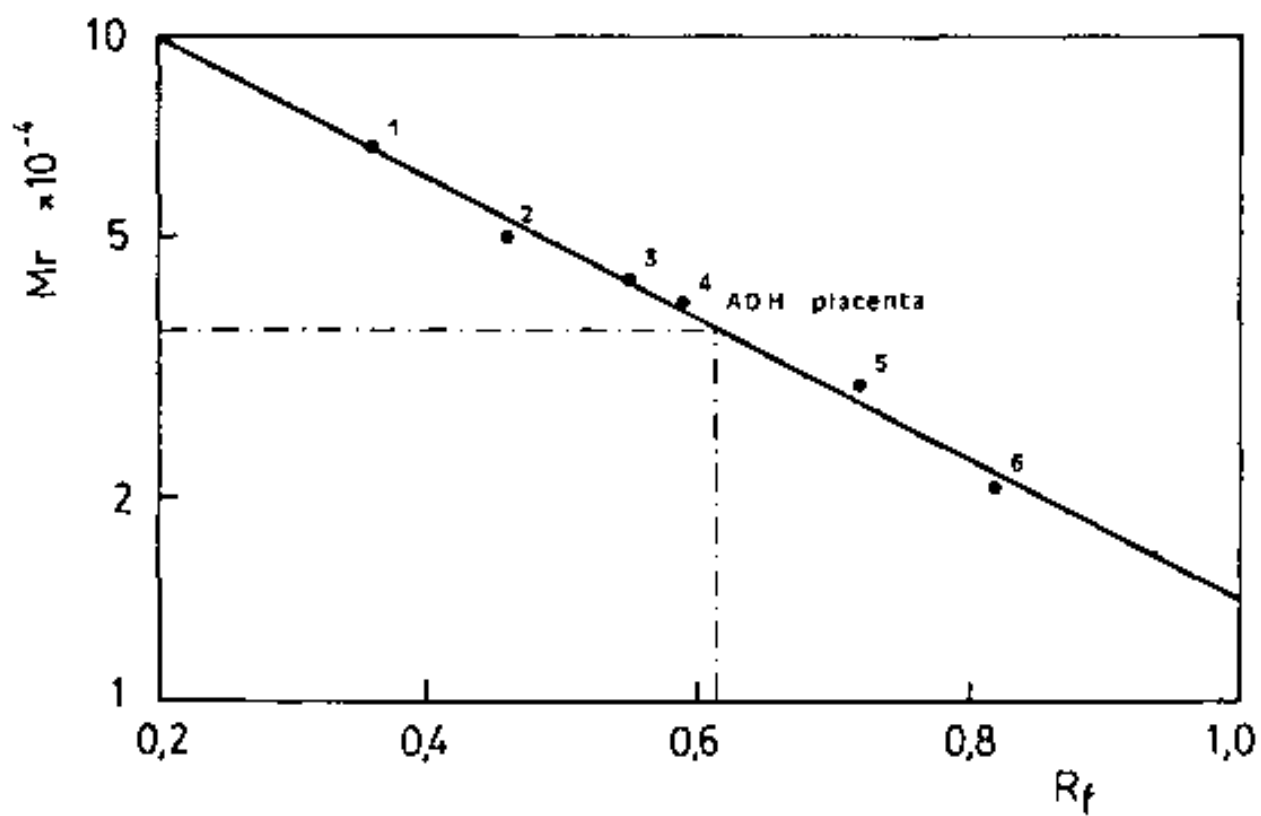
b) Càlcul del pes molecular de les subunitats (Mr) de l'ADH de placenta humana. Representació de  $\log Mr$  enfront de la migració relativa (Rf).  
 $r^2 = 0,987$ .

Proteïnes-patró: 1. Albúmina de sèrum boví,  $6,8 \times 10^4$ ; 2. Immunoglobulina G,  $5,0 \times 10^4$ ; 3. Ovoalbúmina,  $4,3 \times 10^4$ ; 4. ADH de fetge de cavall  $4,0 \times 10^4$ . 5. Anhidrasa carbònica,  $3,0 \times 10^4$ ; 6. Inhibidor de la tripsina,  $2,1 \times 10^4$ .

a



b



obtingut en condicions no dissociants (veure IV.1.5.1.), suggereix que l'enzim està compost per dues subunitats idèntiques. Aquestes característiques són comunes a totes les ADH de mamífer (veure 1.3.1.).

### 1.5.3. Nombre d'àtoms de zinc

El contingut mitjà en zinc d'una mostra d'enzim pur, mesurat per espectrofotometria d'absorció atòmica (veure III.2.6.), fou de  $4,08 \pm 0,38$  àtom-g Zn/mol d'enzim (Taula XIV), o sigui 2 àtoms de zinc per subunitat. En el mateix experiment es determinà com a control el contingut en zinc d'una mostra d'ADH comercial de fetge de cavall, el que donà un resultat de  $4,09 \pm 0,24$  àtom-g Zn/mol d'enzim, d'acord amb les dades publicades, demostrant-se la fiabilitat del mètode emprat. El nombre d'àtoms de zinc de l'ADH de placenta és, doncs, idèntic al de tots els altres isoenzims de l'ADH humana i de mamífer estudiats fins ara (Taula I).

### 1.5.4. Inhibició de l'activitat ADH amb agents quelants de metalls

Els agents quelants de metalls, 1,10-fenantrolina, àcid piridin-2,6-dicarboxílic i àcid 8-hidroxiquinolina-5-sulfònic, inhibiren parcialment l'activitat de l'ADH de placenta a pH 10,0, suggerint que al menys alguns dels àtoms de zinc són essencials per a l'activitat catalítica (Taula XV).

## 1.6. Caracterització cinètica preliminar de l'ADH de placenta

### 1.6.1. pH òptim per a l'oxidació d'alcohols

Emprant octanol 0,5 mM com a substrat (veure III.2.2.1.1.), la màxima activitat es presentà a pH 10,8, decreixent ràpidament per sobre d'aquest

TAULA XIV. Contingut en zinc de diferents mostres d'ADH de placenta <sup>a</sup>.

Mostra	$\mu\text{g}$ enzim/ml <sup>b</sup>	$A_{213,9}$	ppm Zn	Atoms-g Zn/mol enzim <sup>c</sup>
1	42	0,017	0,135	3,64
2	84	0,040	0,320	4,31
3	167	0,079	0,635	4,28
Mitjana:				$4,08 \pm 0,38$

<sup>a</sup> Les mostres d'enzim pur varen ser tractades i analitzades per espectrofotometria d'absorció atòmica tal com s'explica a III. 2.7.

<sup>b</sup> La concentració de proteïna es calculà per mesura de l'activitat enzimàtica a pH 10,0, 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, 1.3.).

<sup>c</sup> L'estequiometria molar es calculà basant-se en un pes molecular de 74.000, obtingut per cromatografia de gel filtració en Sephadex G-200 Superfine (veure IV, 1.5.1.).

TAULA XV. Activitat de l'ADH de placenta en presència de diversos inhibidors i agents quelants de metalls.

Inhibidor	Concentració (mM)	Temps incubació a 25°C (min)	Activitat relativa (%)
3-metilpirazole	12	5	100 <sup>b</sup>
4-metilpirazole	12	5	100 <sup>b</sup>
1,10-fenantrolina	10	3	40 <sup>c</sup>
àcid piridin-2,6-dicarboxílic	10	120	65 <sup>c</sup>
àcid 8-hidroxiquinolina-5-sulfònic	1	120	36 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Activitat relativa = 100%, activitat inicial en absència d'inhibidor.

<sup>b</sup>,<sup>c</sup> activitat es determina en el tampó fosfat monossòdic 0,1 M, pH 7,5, NAD<sup>+</sup> 1,2 mM, utilitzant etanol 0,5mM com a substrat.

<sup>c</sup>,<sup>1</sup> activitat es determina en tampó glicina-NaOH 0,1 M, pH 10,0, NAD<sup>+</sup> 1,2 mM, utilitzant etanol 1,0 mM com a substrat.



pH, signe de la inactivació de l'enzim degut al medi alcalí (Fig. 25). El pH òptim està comprès dins del rang de pH òptim observat per als isoenzims hepàtics de l'ADH humana (pH 9-11) (85, 190, 319). A pH 7,5, l'activitat fou només el 3 % de l'activitat màxima, a diferència dels isoenzims més comuns de la classe I, que a pH neutre encara posseeixen un 40 % de l'activitat màxima (190). A pH 6,0, l'ADH de placenta fou pràcticament inactiva.

Aquest comportament a valors de pH propers a la neutralitat qüestiona seriosament el paper d'aquest enzim en l'oxidació d'alcohols en condicions fisiològiques.

#### 1.6.2. Especificitat de coenzim

Amb octanol i octanal com a substrats, l'enzim utilitzà preferentment  $\text{NAD}^+$  i NADH com a coenzims, amb una  $K_m$  de  $64 \mu\text{M}$  i  $3,6 \mu\text{M}$ , respectivament, a pH 7,5 (Taula XX). Quan  $\text{NADP}^+$  1,2 mM va substituir al  $\text{NAD}^+$ , no es detectà activitat ADH.

Quan s'emprà NADPH 0,26 mM, juntament amb octanal 4 mM com a substrat, l'activitat fou el 20 % de l'observada amb NADH.

#### 1.6.3. Oxidació dels alcohols alifàtics de cadena curta

Com es pot observar en la Taula XVI, els alcohols alifàtics de menys de 5 carbonis no saturaren l'ADH de placenta, àdhuc a les elevadíssimes concentracions de substrat emprades. Així, amb etanol 2,5 M, equivalent a un 12 % (v/v) d'etanol, no es detectà saturació, indicant que l'afinitat de l'enzim per a aquest substrat és pràcticament nul·la. En aquestes condicions, l'activitat és directament proporcional a la concentració de substrat, no podent-se calcular  $K_m$  ni  $K_{cat}$ , però sí la constant d'especificitat  $K_{cat}/K_m$  (veure III.2.2.2.) (Fig. 26). Aquest peculiar comportament cinètic reflecteix aparentment una reacció bimolecular entre l'enzim i el substrat.

FIGURA **25** Perfil d'activitat de l'ADH de placenta enfront del pH per a l'oxidació dels alcohols (veure III. 2.2.1.1.).

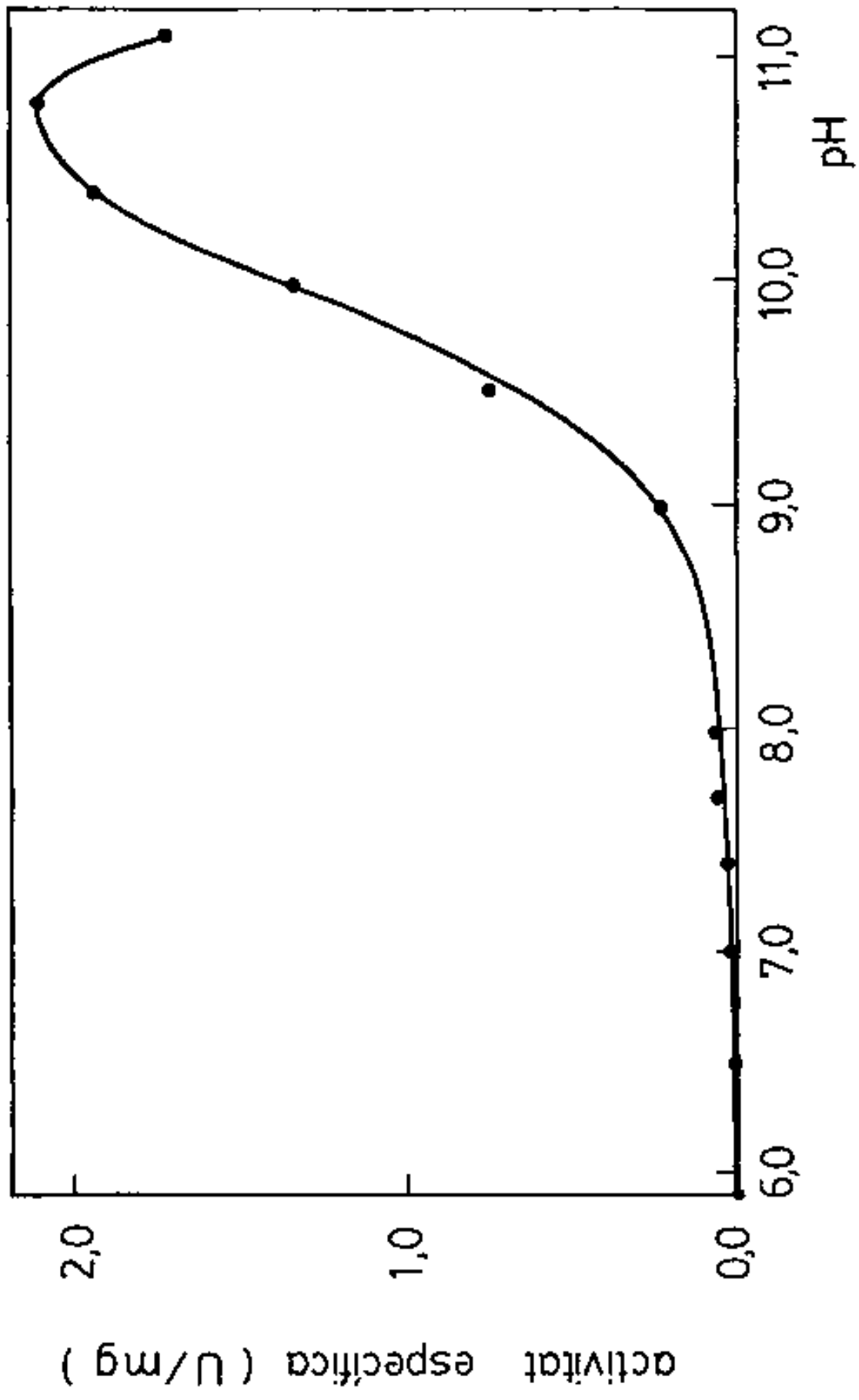
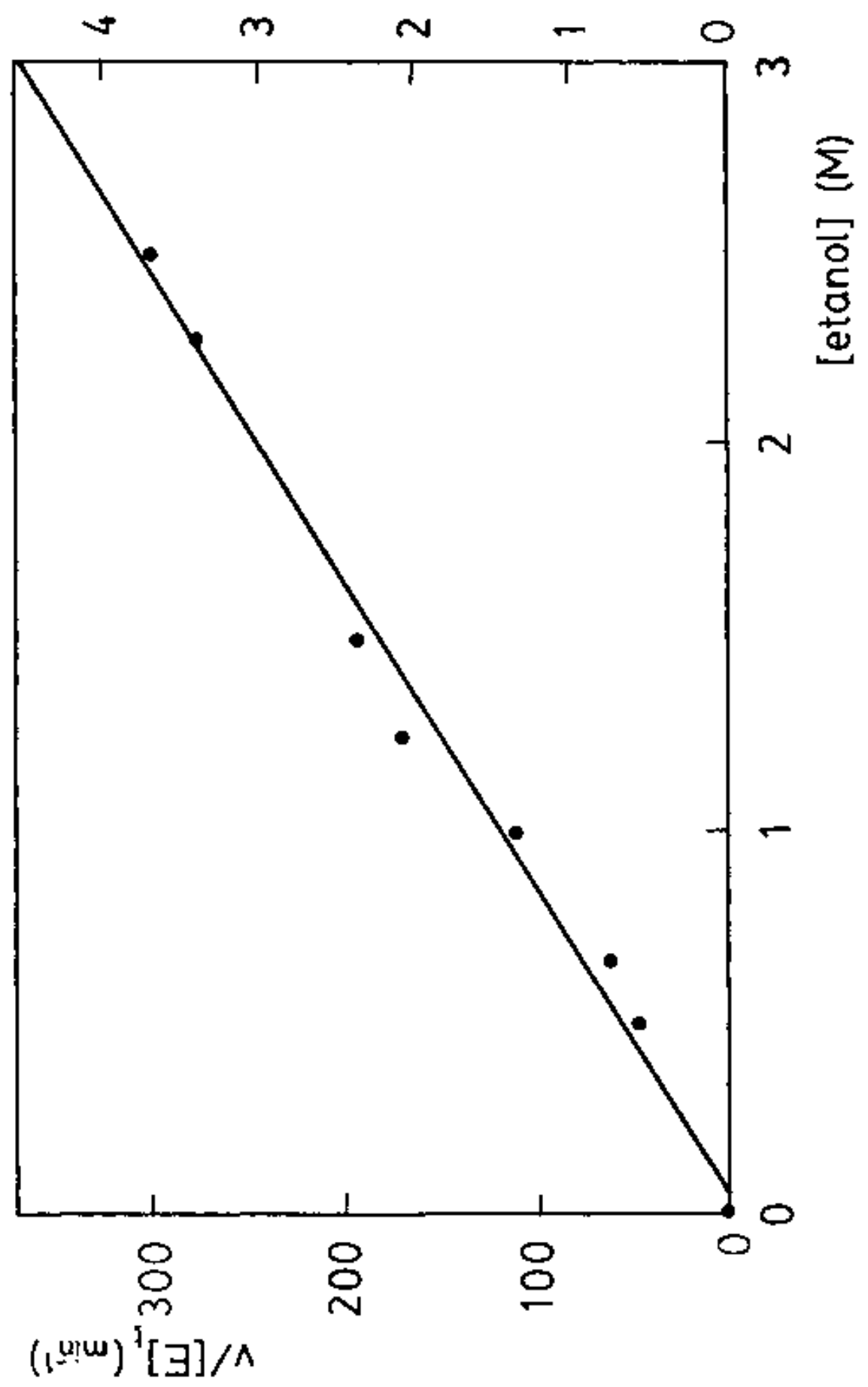


FIGURA 26 Cinètica de l'ADH de placenta amb etanol a pH 10,0.  
Representació directa de  $v/[E]_t$  enfront de  $[S]$ ,  
mostrant-se la manca de saturació de l'enzim. La  
relació  $k_{cat}/k_m$  es calculà a partir de la gràfica  
tal com s'explica a III.2.2.2.

activitat especifica (U/mg)



La baixa afinitat de l'enzim per l'etanol explica l'escassa activitat detectada amb etanol 33 mM en homogenat de placenta i l'absència de la banda anòdica en la tinció amb etanol de l'electroforesi en gel de midó (veure IV.1.1. i IV.1.4.).

#### 1.6.4. Inhibició amb derivats del pirazole

L'enzim de placenta resulta totalment insensible a una concentració 12 mM dels derivats del pirazole, 3-metilpirazole i 4-metilpirazole, conservant el 100 % de l'activitat inicial quan octanol 1,0 mM era utilitzat com a substrat a pH 7,5 (Taula XV).

#### 1.7. Identitat de les propietats de l'ADH de placenta amb les de l'isoenzim $\chi$ -ADH de fetge

Com s'ha vist fins ara, les propietats físiques de l'ADH de placenta eren similars a les de les altres ADH de fetge, però les propietats electroforètiques i cinètiques contrastaven marcadament amb les dels isoenzims més estudiats de les classes I i II de l'ADH humana.

En canvi, l'enzim purificat a partir de placenta presentava notables similituds amb l'isoenzim  $\chi$ -ADH de fetge, recentment descobert per Parés i Vallee (239) (veure I. 3.5.3.). Aquestes analogies es concretaven en els següents punts:

- a) Un punt isoelectric extraordinàriament baix, responsable de la mobilitat electroforètica netament anòdica, idèntica per als dos isoenzims.
- b) Un característic perfil d'activitat d'oxidació dels alcohols en funció del pH, amb una activitat quasi nul·la a pH neutre.

- c) Manca de saturació amb etanol i altres alcohols alifàtics de cadena curta com a substrats.
- d) Insensibilitat a la inhibició per 4-metilpirazole.

Les propietats observades en aquesta caracterització preliminar permetien afirmar que l'únic isoenzím de l'ADH detectat en placenta era idèntic a l'isoenzím  $\chi$ -ADH de fetge, a la vegada que recolzaven els resultats obtinguts, primer per Parés i Vallee (239), i després per Wagner i col. (319), per a la forma hepàtica.

Una vegada demostrada aquesta identitat, la recerca es va centrar en completar, amb l'isoenzím purificat a partir de placenta, el treball de caracterització de  $\chi$ -ADH que s'havia iniciat a partir de fetge, sobretot en aquells aspectes de l'estudi que presentaven "a priori" més complexitat en el teixit hepàtic. La placenta constituïa un sistema singular per a l'estudi de  $\chi$ -ADH, al facilitar tant el seu aïllament i purificació com els estudis de localització subcel·lular. L'existència d'un únic isoenzím exclouïa qualsevol possibilitat de contaminació per part d'altres formes de l'ADH, presents ineludiblement en el fetge.

Per altra banda, les peculiars propietats cinètiques de  $\chi$ -ADH, així com la seva presència exclusiva en placenta, plantejaven importants interrogants arran de la seva possible funció en el metabolisme normal d'aquest òrgan durant la gestació. Per aquest motiu es va decidir investigar amb més profunditat l'especificitat de substrat de l'isoenzím  $\chi$ -ADH. Al mateix temps, s'intentà esbrinar el mecanisme cinètic de  $\chi$ -ADH, estudi que no havia sigut abordat en els treballs previs utilitzant l'isoenzím hepàtic.

## 1.8. Aprofundiment en l'estudi cinètic de l'isoenzim $\chi$ -ADH

Per a l'estudi cinètic i d'especificitat de substrat de  $\chi$ -ADH s'empraren alcohols i aldehids amb diferents estructures moleculars i grups funcionals (Figs. 27 i 28), que serviren de model de les molècules fisiològicament actives més usuals.

### 1.8.1. Especificitat de substrat

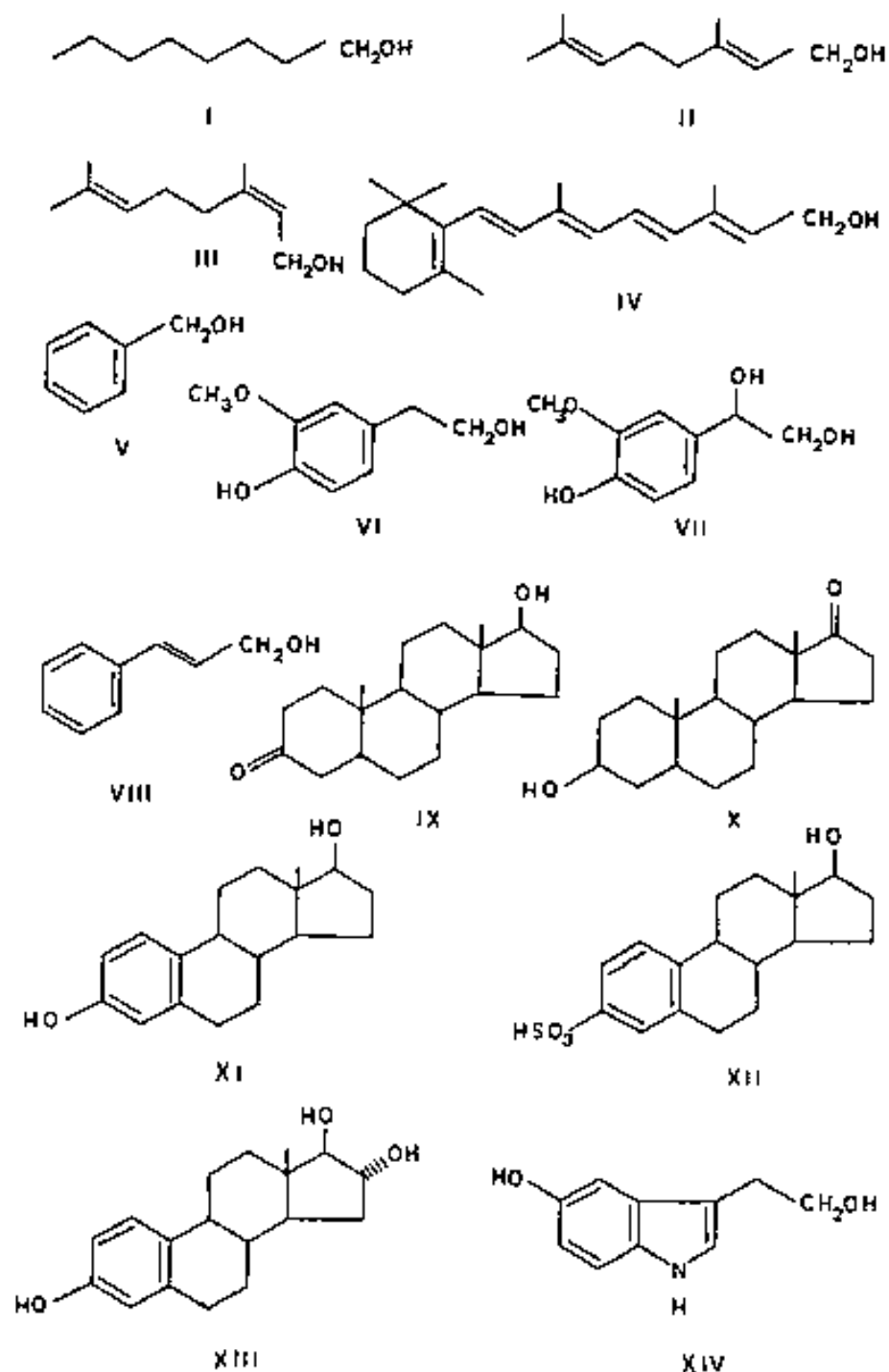
#### 1.8.1.1. Oxidació d'alcohols

L'estudi de l'especificitat de substrat es realitzà a pH 10,0, ja que a aquest pH l'activitat enzimàtica és molt més elevada que a pH neutre (veure IV.1.6.1.). Per altra banda, la major part de les dades cinètiques de les classes I i II havien sigut obtingudes a aquest pH (85, 318).

- Els valors de  $K_m$ ,  $k_{cat}$  i  $k_{cat}/K_m$  de  $\chi$ -ADH per a l'oxidació d'alcohols alifàtics primaris,  $\omega$ -hidroxiàcids i alguns isoprenoides apareixen en la Taula XVI.

L'hexanol fou l'alcohol de cadena més curta per al qual es pogué calcular la  $K_m$ . Per als alcohols alifàtics primaris de més de 5 carbonis, la  $K_m$  va disminuir al augmentar la longitud de la cadena carbonada, arribant a 0,4 mM per al nonanol. Aquest fenomen es comú a les altres classes de l'ADH humana i de mamífer, i es degut a la participació de les interaccions hidrofòbiques en la fixació del substrat. Així, la molècula de  $\chi$ -ADH podria presentar una conformació similar a la de l'ADH de fetge de cavall, amb un túnel hidrofòbic en l'entrada del centre actiu (veure I.3.1.). Els valors de  $K_m$  de  $\chi$ -ADH foren, però, d'un a tres ordres de magnitud més elevats que per als altres isoenzims de l'ADH humana. Així, la  $K_m$  per a l'octanol fou de 0,6 mM, comparada amb valors de 5 a 17  $\mu$ M i 7  $\mu$ M, per a les classes I i II, respectivament (85, 318).





**FIGURA 27** Estructures moleculars dels alcohols emprats com a substrats de  $\alpha$ -ADH :  
 octanol (I), geraniol (II), nerol (III), tot trans-retinol (IV), alcohol benzílic (V), 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etanol (VI), 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etanodiol (VII), alcohol cinnàmic (VIII), 5 $\beta$ -dihidrotestosterona (IX), 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -andros-tan-17-ona (X), 17 $\beta$ -estradiol (XI), 17 $\beta$ -estradiol-3-sulfat (XII), estriol (XIII), 2-(5-hidroxiindol-3-il)etanol (XIV).

TAULA XVI. Constants cinètiques de l'ADH de placenta humana (X-ADH) per als alcohols a pH 10,0 <sup>a</sup>

Substrat <sup>b</sup>	[S] (mM) <sup>c</sup>	K <sub>m</sub> (mM)	kcat (min <sup>-1</sup> )	kcat/K <sub>m</sub> (M <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
etanol	2.500	n.s.	n.s.	120 <sup>d</sup>
butanol	500	n.s.	n.s.	860 <sup>d</sup>
hexanol <sup>e</sup>	10	5,5	310	55.000
hexanol (pH 7,5) <sup>f</sup>	15	17	40	2.400
octanol	2	0,6	440	705.000
nonanol <sup>g</sup>	0,4	0,4	340	780.000
àcid 12-hidroxidodecanoic <sup>e</sup>	0,1	0,05	275	5.000.000
geraniol	1	0,5	450	900.000
nerol	1	0,6	450	720.000
retinol	0,2	0,08	3,5	42.900

<sup>a</sup> Activitat mesurada en tampó. glicina-NaOH 0,1M, pH 10,0, amb NAD<sup>+</sup> 1,2 mM, segons es descriu a III, 2.1.1.

<sup>b</sup> Les estructures moleculars d'alguns dels substrats utilitzats apareixen en la Fig. 2<sup>7</sup>.

<sup>c</sup> Concentració de màxima substrat atesa en l'assaig. En molts casos vindrà limitada per la solubilitat del substrat.

<sup>d</sup> Valor calculat a partir del pendent de la recta resultant de la representació directa de v enfront de [S] (Fig. 29). (Veure III, 2.2.2.)

<sup>e</sup> Dades facilitades gentilmente per Parés i Vallee (239).

<sup>f</sup> Activitat mesurada en tampó fosfat monossòdic 0,1 M, pH 7,5, amb NAD<sup>+</sup> 1,2 mM.

<sup>g</sup> Dada obtinguda de Vallee i Bazzone (312).

n.s. = no s'observa saturació de l'enzim.

Els valors de  $k_{cat}$  es mantingueren pràcticament constants (300-400  $\text{min}^{-1}$ ) per als millors substrats, independentment de la seva estructura, suggerint un mateix pas limitant en el mecanisme cinètic, probablement l'alliberació del NADH. Aquest comportament s'ha observat també en les classes I i II de l'ADH humana (85, 190, 318) i en isoenzims anàlegs al  $\chi$ -ADH en altres espècies animals (72, 172).

L'octanol (I), amb una constant d'especificitat ( $k_{cat}/K_m$ ) 7.000 vegades superior a la de l'etanol, fou un dels millors substrats de  $\chi$ -ADH, i s'emprà en la major part dels estudis realitzats amb l'ADH de placenta. El millor substrat en termes de  $k_{cat}/K_m$  és l'àcid 12-hidroxidodecanoic, amb una  $K_m$  de 55  $\mu\text{M}$ , del mateix ordre que les observades per als isoenzims catòdics de l'ADH humana (85, 318). Sembla que la presència d'un grup hidrofílic al final d'una cadena alifàtica llarga, lluny del grup hidroxil, afavoreix en tots els isoenzims la unió del substrat al centre actiu de l'enzim. La interacció d'una cua carregada negativament amb el solvent o amb algun residu amb densitat de càrrega positiva, com el seti de fixació dels anions (veure I.3.1.), podria col·laborar en la fixació del substrat.

El geraniol (II) i el seu isòmer, nerol (III), alcohols poliinsaturats de de la família dels terpens i components dels olis essencials, presentaren constants cinètiques similars a les de l'octanol (I). La presència de dobles enllaços i de ramificacions en la cadena de 6 carbonis no semblà massa important en la definició de l'especificitat enzimàtica. Tampoc no varen variar  $K_m$  ni  $k_{cat}$  per la presència d'un doble enllaç en conformació cis en el nerol.

El tot trans-retinol (IV), o vitamina A, és oxidat eficientment pels isoenzims catòdics d'home i d'altres mamífers (216, 222, 259), amb valors de  $K_m$  de l'ordre de  $\mu\text{M}$ , postulant-se com un dels possibles substrats fisiològics de l'ADH en el fetge. Per altra banda, la presència d'una cadena poliinsaturada llarga semblava una estructura favorable per a l'acció de  $\chi$ -ADH. D'acord amb això, el retinol, fou el substrat pel

qual  $\chi$ -ADH presentà una Km més baixa (80  $\mu$ M). L'eficiència catalítica (kcat/Km) aparegué, però, molt disminuïda, degut al valor extraordinàriament baix de kcat (3,5 min<sup>-1</sup>). Una kcat tant baixa reflectiria un pas limitant més lent que la dissociació del coenzim, amb el que el mecanisme cinètic seria probablement diferent de l'exhibit amb els alcohols alifàtics de cadena llarga (veure IV.1.8.2.).

- En la Taula XVII es mostren les constants cinètiques obtingudes per a l'oxidació d'alcohols aromàtics.

L'alcohol benzílic (V), el més simple dels alcohols aromàtics estudiats, no saturà l'enzim, àdhuc a una concentració de 100 mM, presentant un comportament i una constant d'especificitat similars als de l'etanol i alcohols de cadena curta (veure IV.1.6.3.). Cal afegir que l'alcohol benzílic és un dels millors substrats per a les altres formes de l'ADH humana, a excepció de l'isoenzim  $\beta_1\beta_2$  (318). Així, l'isoenzim -ADH posseeix per a aquest substrat una Km de 7  $\mu$ M i una kcat de 550 min<sup>-1</sup> (85).

Quan l'anell aromàtic presentà substituents, com en el cas del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etanol (VI) i 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etanodiol (VII), derivats del metabolisme de les catecolamines, es pogué calcular la Km, encara que el seu valor fou molt alt i la kcat molt petita. Per analogia amb altres isoenzims de l'ADH, el valor de kcat més baix per al compost VII que per al compost VI es podria explicar per la presència d'un grup hidrofílic proper al carboni que suporta el grup alcohol. Aquest es el cas del 1,2-etanodiol comparat amb l'etanol (Taula III i IV).

El millor substrat en termes de kcat/Km fou l'alcohol cinnàmic (VIII), molt bon substrat també per a altres isoenzims de fetge humà i de cavall (245). La seva Km (0,17 mM) fou però molt més alta que la mesurada per als altres isoenzims.

TAULA XVII. Constants cinètiques de l'ADH de placenta humana (X-ADH) per als alcohols a pH 10,0 (continuació) <sup>a</sup>.

Substrat <sup>b</sup>	[S] (mM) <sup>c</sup>	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (M <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
alcohol benzílic	100	n.s.	n.s.	770 <sup>d</sup>
2-(4-hidroxí-3-metoxi- fenil) etanol	100	25	10	400
2-(4-hidroxí-3-metoxi- fenil) etanodiol	10	12	1,8	140
alcohol cinnàmic	4	0,17	208	1.200.000

<sup>a</sup> Activitat mesurada en tampó glicina-NaOH 0,1 M, pH 10,0, amb NAD<sup>+</sup> 1,2 mM, segons es descriu a III. 2.1.1.

<sup>b</sup> Les estructures moleculars dels substrats utilitzats apareixen en la Fig. 27.

<sup>c</sup> Concentració màxima de substrat atesa en l'assaig. En molts casos vingué limitada per la solubilitat del substrat

<sup>d</sup> Valor calculat a partir del pendent de la recta resultant de la representació directa de  $v$  enfront de [S] (veure III. 2.2.2.).

n.s. = no s'observà saturació de l'enzim.

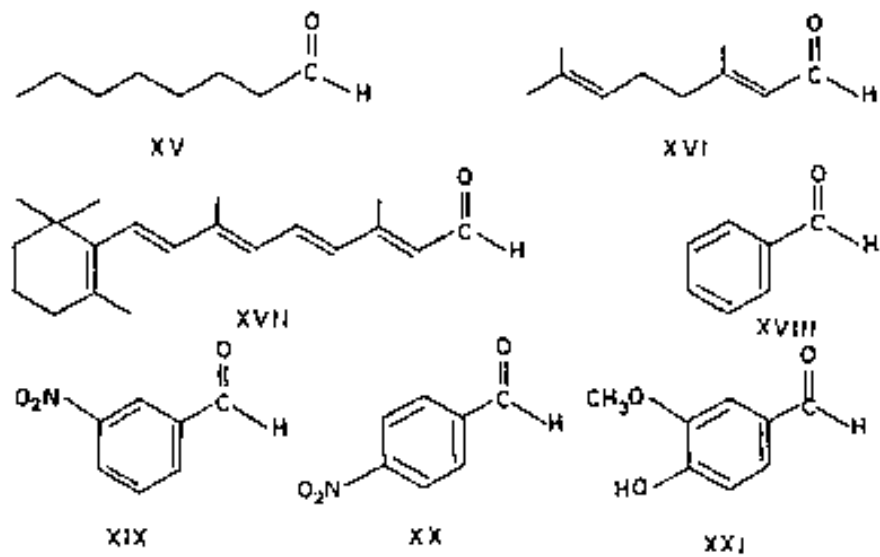
- Donada l'activa participació de la unitat feto-placentària en la síntesi d'hormones esteroides durant la gestació (83) i l'anteriorment descrita activitat de diferents ADH de mamífer enfront d'alguns esteroides (245), s'investigà la possible oxidació d'aquests compostos per part de  $\chi$ -ADH. Com es pot observar en la Taula XIX, cap dels esteroides assajats (IX, X, XI, XII i XIII) fou substrat de  $\chi$ -ADH, malgrat les elevades concentracions ateses, a diferència dels isoenzims catòdics de fetge humà i de cavall que es revelaren actius en un assaig dut a terme paral·lelament (els isoenzims catòdics de l'ADH de cavall oxiden amb eficiència el grup hidroxil en posició 3 de molècula d'esteroides (245)). Així mateix,  $\chi$ -ADH de fetge presenta molt poca o nul·la activitat enfront d'alcohols cíclics com el ciclohexanol (241), amb bona correlació amb la manca d'oxidació dels grups hidroxil en els anells de les molècules d'esteroides.

Tampoc es registrà activitat amb el 2-(5-hidroxiindol-3-il)etanol (5-hidroxitriptòfol) (XIV), derivat del metabolisme de la serotonina que, pel contrari, fou oxidat eficientment per l'enzim de fetge de cavall.

#### 1.8.1.2. Reducció d'aldehids

Per a totes les classes d'isoenzims de l'ADH humana, l'activitat màxima per a la reducció dels aldehids es detecta entre pH 6 i pH 7 (76). Ademés, a pH fisiològic, la kcat per a la reducció dels aldehids és en general de l'ordre de 30 a 100 vegades més elevada que la d'oxidació dels corresponents alcohols (317, 243). Aquests resultats impliquen que la funció de l'ADH "in vivo" podria ser l'eliminació d'aldehids o cetones endògenes, més que la d'alcohols. Per tant, s'investigà l'especificitat de substrat de  $\chi$ -ADH enfront de diversos aldehids.

Els resultats obtinguts per a la reducció d'aldehids a pH 7,5 es presenten en la Taula XVIII.



**FIGURA 28** Estructures moleculars dels aldehids emprats com a substrats de  $\chi$ -ADH: octanal (XV), citral (XVI), retinal (XVII), benzaldehyd (XVIII), 3-nitrobenzaldehyd (XIX), 4-nitrobenzaldehyd (XX), vainillina (XXI).

TAULA XVIII. Constants cinètiques de l'ADH de placenta humana (X-ADH) per als aldehids a pH 7,5 a

Substrat <sup>b</sup>	[S] (mM) <sup>c</sup>	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (M <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
acetaldehid <sup>d</sup>	890	n.s.	n.s.	160 <sup>e</sup>
octanal	4	2,2	330	150.000
citral	1	n.s.	n.s.	13.000
benzaldehid	10	n.s.	n.s.	1.500 <sup>e</sup>
3-nitrobenzaldehid	10	4	420	100.500
4-nitrobenzaldehid	3	1,5	68	45.000

<sup>a</sup> Activitat mesurada en tampó fosfat monossòdic 0,1 M, pH 7,5 ; amb NAD<sup>+</sup> 1,2 mM , segons es descriu a III. 2.1.1.

Els valors no es corregiren per a la hidratació dels aldehids.

<sup>b</sup> Les estructures moleculars dels substrats utilitzats apareixen en la Fig. 28 .

<sup>c</sup> Concentració màxima de substrat atesa en l'assaig. En molts casos vingué limitada per la solubilitat del substrat.

<sup>d</sup> Dada facilitada gentilmente per Parés i Vallee (239).

<sup>e</sup> Valor calculat a partir del pendent de la recta resultant de la representació directa de v enfront de [S].

n.s. = no s'observà saturació de l'enzim.



Similarment al que succeïa amb els alcohols alifàtics de cadena curta, l'acetaldehid i els altres aldehids alifàtics de cadena curta no saturaren l'enzim. La poca solubilitat dels aldehids alifàtics de cadena llarga, únics per als que possiblement es podria calcular la  $K_m$ , agreujava la situació, dificultant la caracterització cinètica de l'enzim. L'octanal (XV) fou l'únic aldehid alifàtic estudiat que mostrà cinètica de saturació, amb una  $K_m$  de 2,2 mM i una de les millors relacions  $k_{cat}/K_m$ . Recentment, s'ha demostrat que l'octanal és també el millor substrat per a les altres classes de l'ADH humana, al posseir la constant d'especificitat,  $k_{cat}/K_m$ , més elevada de tots els aldehids assajats (76). En el cas de  $\alpha$ -ADH, però, la  $k_{cat}$  per a l'octanal és més baixa si la comparem amb els altres isoenzims (Taules III i IV).

Citral (XVI) i retinal (XVII), productes de l'oxidació del geraniol (II) i retinol (IV), respectivament, no foren bons substrats per a  $\alpha$ -ADH. El citral, degut a la seva poca solubilitat, no arribà a saturar l'enzim i la seva  $k_{cat}/K_m$  fou 10 vegades més baixa que la del corresponent aldehid alifàtic, octanal. Amb el retinal no es detectà activitat. Probablement, el doble enllaç situat en el carboni 2 d'aquestes molècules afavoreix l'oxidació dels corresponents alcohols, però dificulta la reducció dels aldehids per part de  $\alpha$ -ADH. Una observació similar havia sigut efectuada per Pietruszko i col. (243) emprant formes catòdiques de l'ADH humana enfront d'alcohols de cadena curta. A partir de l'anàlisi de les  $k_{cat}$  dels isoenzims de la classe I per a alguns alcohols i els seus corresponents aldehids, Deetz i col. (76) han suggerit que a un alcohol que és bon substrat li correspondrà un aldehid que també es bon substrat per a la reacció inversa. Aquesta afirmació no sembla extrapolable als isoenzims de la classe III, doncs encara que octanol i octanal compleixen la regla, no ho fan així geraniol i citral.

Amb un aldehid aromàtic, tal com benzaldehid (XVIII),  $\alpha$ -ADH mostra característiques similars a les observades amb el seu alcohol corresponent: no saturació i una baixa relació  $k_{cat}/K_m$ , diferenciant-se clarament dels trets propis dels isoenzims de les classes I i II. Aquests isoenzims tenen en el benzaldehid un dels seus millors substrats (Taules

TAULA XIX. Alcohols i aldehids o cetones amb els que no es detectà activitat ADH.

Substrat <sup>a</sup>	[S] màx (mM) <sup>b</sup>
<u>Alcohol</u> <sup>c</sup>	
metanol	1.200
2-(5-hidroxiindol-3-il)etanol	10
5 $\beta$ -dihidrotestosterona	1
3 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -androstan- -17-ona	0,1
17 $\beta$ -estradiol	0,1
17 $\beta$ -estradiol-3-sulfat	10
estriol	1
<u>Aldehid o cetona</u> <sup>d</sup>	
retinal	0,2
vainillina	33
5 $\beta$ -dihidrotestosterona	1

<sup>a</sup> Les estructures moleculars dels possibles substrats apareixen en les Fig. 27 i 28.

<sup>b</sup> Concentració màxima de substrat atesa en l'assaig. En molts casos vindrà limitada per la solubilitat del substrat.

<sup>c</sup> Assaig realitzat en tampó glicina-NaOH 0,1 M , pH 10,0 , NAD<sup>+</sup> 1,2 mM.

<sup>d</sup> Assaig realitzat en tampó fosfat monossòdic 0,1 M , pH 7,5 , NAD<sup>+</sup> 1,2 mM.

III i IV).

Per altra banda, la presència de grups nitro en l'anell benzènic, com en el 3-nitrobenzaldehyd (XIX) i 4-nitrobenzaldehyd (XX), va afavorir enormement la reducció del grup carbonil, sobretot quan el grup nitro es trobà en posició meta. No fou així, però, quan els substituents foren de naturalesa més hidrofílica, com en el cas de la vainillina (XXI), que posseïx una estructura similar a la d'alguns aldehyds derivats de catecolamines.

Tampoc es detectà activitat de reducció del grup carbonil en posició 3 de la cetona  $5\beta$ -dihidrotestosterona (IX), que en canvi és substrat de l'ADH de fetge de cavall (245). Aquest resultat està en consonància amb la manca d'activitat de  $\chi$ -ADH enfront de la ciclohexanona (76).

#### 1.8.2. Mecanisme cinètic i constant d'equilibri

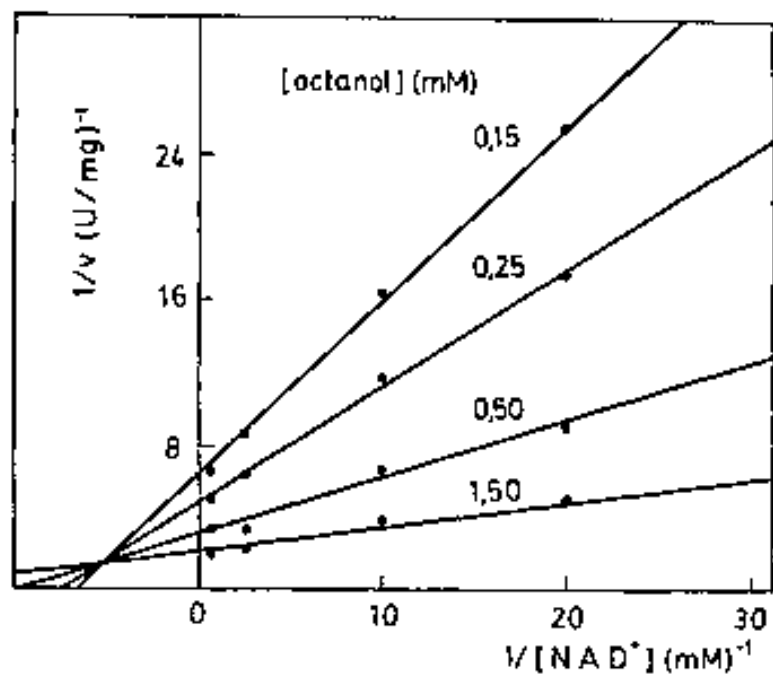
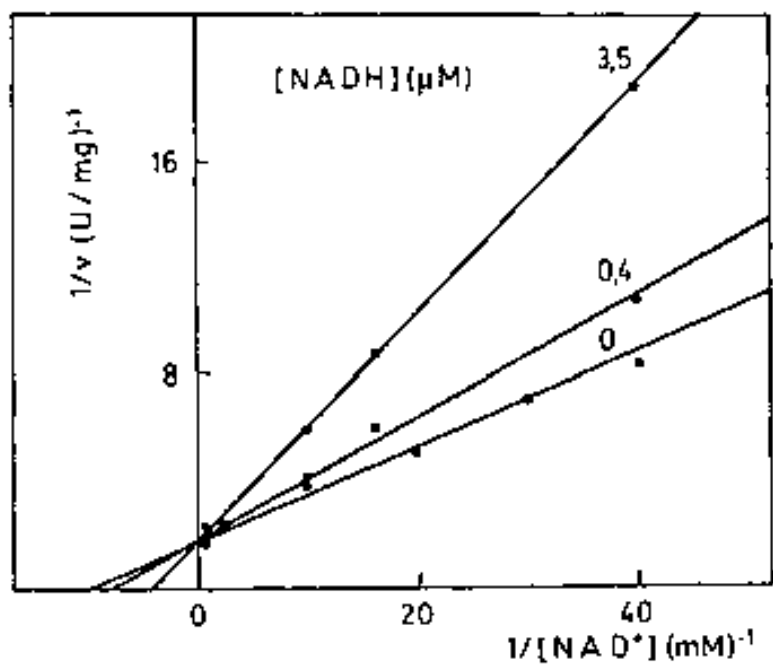
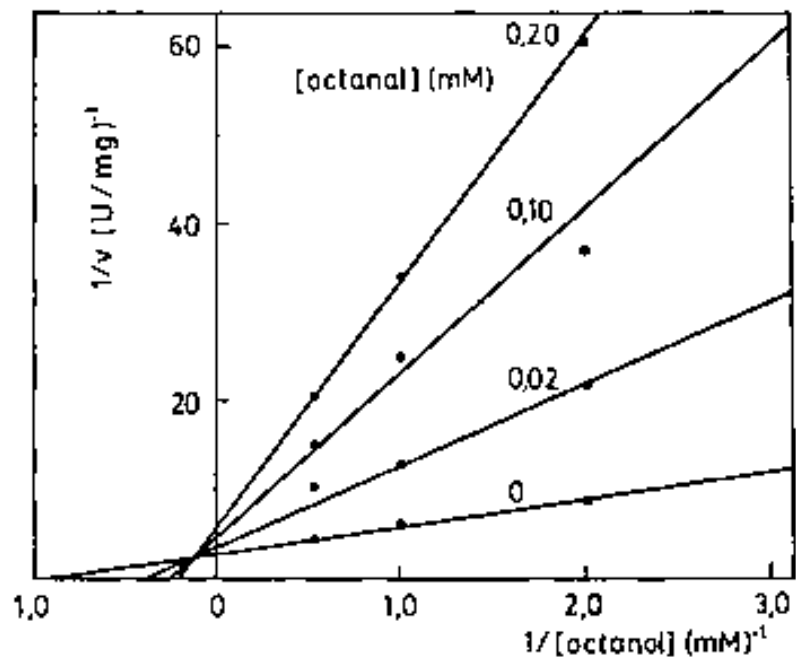
Donat que  $\chi$ -ADH difereix significativament dels isoenzims de les classes I i II en el comportament cinètic, semblà interessant investigar el seu mecanisme cinètic. L'estudi es realitzà a pH 7,5 per tal d'obtenir resultats comparables als ja existents per als altres isoenzims. Com a substrats, s'empraren octanol i el seu aldehyd corresponent, octanal, parella més específica per a  $\chi$ -ADH atenent al valor de  $K_{cat}/K_m$ . Malgrat que etanol i acetaldehyd havien sigut els substrats més utilitzats en els estudis mecanístics de les classes I i II (31, 88), no varen poder ésser emprats en aquest cas, doncs mancaven d'una cinètica de saturació.

S'examinaren les propietats cinètiques de  $\chi$ -ADH en l'estat estacionari mitjançant estudis d'inhibició creuada i d'inhibició per producte, utilitzant  $NAD^+$ , octanol, octanal i  $NADH$ , tal com s'explica a III.2.2.5. Les representacions de Lineweaver-Burk dels valors obtinguts experimentalment apareixen en la Fig. 29. L'anàlisi de l'activitat en absència de productes, variant simultàniament les concentracions de  $NAD^+$  i octanol, proporcionà la gràfica de la Fig. 29a, on les rectes

**FIGURA 29** Representacions de Lineweaver-Burk de les cinèti-  
ques d'inhibició creuada i d'inhibició per produc-  
te de  $\chi$ -ADH amb  $\text{NAD}^+$ , octanol, octanal i NADH.

L'activitat enzimàtica es mesura en tampó  
fosfat monossòdic 0,1 M, pH 7,5 a 25°C.

- a) Cinètica amb variació simultània de les concen-  
tracions d'octanol i de  $\text{NAD}^+$ .
- b) Cinètica d'inhibició de la reducció del  $\text{NAD}^+$   
pel NADH. (octanol) = 1,5 mM.
- c) Cinètica d'inhibició de l'oxidació de l'octanol  
per l'octanal. ( $\text{NAD}^+$ ) = 1,2 mM.

**a****b****c**

s'intersecten seguint un model de tipus mixte. En quant als estudis d'inhibició per producte, la inhibició de la reducció del  $\text{NAD}^+$  pel  $\text{NADH}$ , amb una concentració constant d'octanol, resultà de naturalesa competitiva (Fig. 29b). En canvi, la inhibició de l'oxidació de l'octanol per l'octanal fou mixta (Fig. 29c). No va ser possible obtenir la corresponent representació de la inhibició de la reducció de l'octanal per acció de l'octanol, a causa de la baixa solubilitat d'aquest últim. No obstant això, el comportament descrit per a  $\alpha$ -ADH és consistent amb un mecanisme seqüencial ordenat BiBi, amb unió preferent del  $\text{NAD}^+$ , similar a l'observat en altres formes de l'ADH humana (31, 88) i de cavall (96, 335).

Basant-se en aquest mecanisme, les dades de la Fig. 29 foren utilitzades, segons el mètode descrit per Segel (272) per al càlcul de les constants cinètiques recollides en la Taula XX.  $K_{ia}$  i  $K_a$  varen ser calculades de les dades de la Fig. 29a;  $K_{iq}$ , de la Fig. 29b; i  $K_{ip}$  s'extrapolà de les dades de la Fig. 29c.  $K_q$  es calcula a partir de la  $K_q$  aparent, obtinguda amb octanal 4 mM (concentració no saturant), utilitzant l'equació per al mecanisme seqüencial ordenat BiBi (272)

$$K_q = K_q \text{ app.} (1 + K_p/[P]) / (1 + K_{iq} \cdot K_p / K_q \cdot [P])$$

[P] = concentració d'octanal = 4 mM

Els valors de  $K_b$ ,  $K_p$ ,  $V_1/[E]_t$  i  $V_2/[E]_t$  havien sigut obtinguts anteriorment utilitzant  $\text{NAD}^+$  1,2 mM o  $\text{NADH}$  0,26 mM.

Les constants de Michaelis per als coenzims ( $K_a$  per al  $\text{NAD}^+$  i  $K_q$  per al  $\text{NADH}$ ), així com les constants de dissociació dels complexos binaris  $E \cdot \text{NAD}^+$  ( $K_{ia} = K_2/K_1$ ) i  $E \cdot \text{NADH}$  ( $K_{iq} = K_7/K_8$ ) (veure 1.3.3.), que apareixen en la Taula XX, són del mateix ordre que els valors publicats per als isoenzims de les classes I i II (31, 35, 88). En canvi, com ja s'ha comentat, les constants de Michaelis per a l'octanol ( $K_b$ ) i l'octanal ( $K_p$ ) són 1.000 vegades superiors a les dels isoenzims de les altres classes, que són de l'ordre de  $10^{-6}$  M (76, 85, 318). Aquest fet suggereix una baixa afinitat de  $\alpha$ -ADH per als alcohols alifàtics primaris i aldehids alifàtics, el que fa suposar l'existència de diferències en el

TAULA XX.

Constants cinètiques de X-ADH a pH 7,5 <sup>a</sup>

	mM
K <sub>a</sub> (NAD <sup>+</sup> )	0,064
K <sub>b</sub> (octanol)	0,94
K <sub>ia</sub> (NAD <sup>+</sup> )	0,192
K <sub>ib</sub> (octanol)	>20
K <sub>p</sub> (octanal)	2,22
K <sub>q</sub> (NADH)	0,0043
K <sub>ip</sub> (octanal)	0,19
K <sub>iq</sub> (NADH)	0,0023

V <sub>1</sub> /[E] <sub>t</sub> (oxidació octanal)	58 min <sup>-1</sup>
V <sub>2</sub> /[E] <sub>t</sub> (reducció octanal)	328 min <sup>-1</sup>

<sup>a</sup> Les constants cinètiques s'expressen amb nomenclatura de Cleland (62). Els subíndex a, b, p, i q de les constants de Michaelis (K) i de les constants d'inhibició (K<sub>i</sub>) representen NAD<sup>+</sup>, octanol, octanal i NADH, respectivament. V<sub>1</sub>/[E]<sub>t</sub> és la kcat per a l'oxidació de l'octanal, mentre V<sub>2</sub>/[E]<sub>t</sub> és la kcat per a la reducció de l'octanal. Els valors no es coregiren per a hidratació de l'octanal i varen ser calculats segons Segel (272).

seti de fixació del substrat respecte als altres isoenzims de l'ADH.

Per altra banda, com es desprèn de les dades de la Taula XX, la  $k_{cat}$  que presenta  $\chi$ -ADH a pH 7,5 per a la reducció de l'octanal,  $328 \text{ min}^{-1}$ , és només unes 5 vegades superior a la  $k_{cat}$  per a l'oxidació de l'octanol,  $58 \text{ min}^{-1}$ . En canvi, com ja s'ha dit anteriorment, per als isoenzims de les classes I i II, els valors de  $k_{cat}$  per als aldehids són de 30 a 100 vegades superiors als corresponents alcohols. Aquest últim fet s'explica perquè el pas limitant de la catàlisi en ambdós sentits de la reacció és la dissociació del complex enzim-coenzim, i perquè la velocitat de dissociació del complex enzim-NAD<sup>+</sup> és més ràpida que la del complex enzim-NADH (76). En el cas de  $\chi$ -ADH, si es suposa que el pas limitant de la reacció és també la dissociació del coenzim (veure IV. 1.8.1.1.), el seu peculiar comportament cinètic es podria explicar per la diferent relació de velocitats de dissociació dels complexos enzim-coenzim. Això indicaria per a l'isoenzim  $\chi$ -ADH una estructura del seti de fixació del coenzim diferent de la dels isoenzims de les altres classes, d'acord amb el que suggereixen Deetz i col. (76). Tanmateix, el valor de les constants de dissociació,  $K_{is}$  i  $K_{iq}$ , no revela diferències substancials amb els altres isoenzims.

Per altra banda, emprant la relació de Haldane (272)

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

es calculà el valor de la constant d'equilibri a pH 7,5 i a 25°C per a la reacció d'interconversió de l'octanol i l'octanal, que resultà ésser de  $1,58 \times 10^{-10}$  M. Com en el cas de l'equilibri entre l'etanol i l'acetaldehid ( $K_{eq} = 1,6 \times 10^{-11}$  M (96)), la reducció de l'aldehid és molt més afavorida termodinàmicament que no pas l'oxidació de l'alcohol (veure I.3.1.).



### 1.9. Localització intracel·lular de l'isoenzim $\chi$ -ADH

A diferència de l'ADH hepàtica que presenta múltiples formes isoenzimàtiques, l'ADH de placenta està constituïda per un sol isoenzim, pel que es pot determinar la seva localització subcel·lular sense ambigüitats, doncs no hi ha possibilitat de contaminació per part d'altres formes amb activitat ADH.

Amb aquest objectiu, 20 g de teixit fresc de placenta varen ser homogenitzats en un aparell Potter S (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, R.F.A.), a 1.000 r.p.m. i amb 10 baixades del pistó, en condicions isotòniques (veure també III.4.1.2.). La suspensió es centrifugà a 100.000 x g durant 1 h. El 98 % de l'activitat ADH i el 90 % de l'activitat lactat deshidrogenasa, marcador citosòlic, es varen detectar en el sobrenedant, mentre que en el sediment varen aparèixer el 80 % i 65 %, respectivament, de les activitats totals monoamino oxidasa i glucosa-6-fosfatasa, marcadors de les fraccions mitocondrial i microsomal, respectivament (veure III.4.1.4.).

Aquest primer fraccionament ens indicà que  $\chi$ -ADH es localitzava molt probablement en el citoplasma de la cèl·lula placentària. Aquesta evidència es confirmà posteriorment quan es va realitzar un estudi més exhaustiu, paral·lelament a la localització subcel·lular de l'ALDH de placenta (veure IV.2.7.).

### 1.10. Desenvolupament de l'activitat ADH en el fetge

Una vegada determinada la capacitat d'oxidació d'etanol de la placenta a terme i caracteritzat l'únic isoenzim de l'ADH present en aquest òrgan, era necessari obtenir una visió més dinàmica del metabolisme materno-fetal de l'alcohol en el transcurs d'un determinat període de la gestació. Per una banda era altament interessant completar el treball efectuat en placenta amb estudis paral·lels sobre la capacitat

de metabolització del fetge fetal durant el desenvolupament. Per l'altra banda, calia esbrinar si, en les primeres etapes de la gestació, la placenta podia jugar algun paper en l'eliminació de l'etanol, complementari al del fetge fetal. La placenta a terme podria posseir una activitat ADH disminuïda respecte a la placenta en altres estadis de l'embaràs, degut al procés d'envelliment sofert per aquest òrgan (veure I 1.5.1.).

Òbviament, l'obtenció de teixits fetals i de placentes normals en estadis primerencs de la gestació comportava en l'espècie humana importants problemes ètics. Quan no, el nombre de mostres vàlides per a l'anàlisi era molt limitat. Així, per exemple, la major part de placentes provinents de parts prematures corresponen habitualment a mares diabètiques, el que les exclouïa d'un estudi de la població normal. Es va decidir, doncs, utilitzar un model animal per a aquest tipus de recerca. La rata és l'animal utilitzat en la majoria d'estudis del metabolisme de l'etanol. Recentment, el nostre grup de treball ha purificat i caracteritzat els isoenzims de l'ADH de rata, dividint-els en tres classes, cada una amb propietats anàlogues a la classe corresponent de l'ADH humana (172). Així, l'isoenzim ADH-2 de rata posseeix propietats moleculars i cinètiques molt similars a  $\gamma$ -ADH (172) (veure també V.1.6.). Malgrat que l'home i la rata són dues espècies que arriben al terme de la gestació amb diferent grau de desenvolupament (269), les comparacions interespecífiques podien ser de gran ajut per a la consecució del nostre objectiu. Així doncs, s'escollí la rata com a animal model per als estudis de l'activitat ADH en fetge de fetus i en placenta al llarg del desenvolupament. El treball en rata permetria ademés l'anàlisi d'un gran nombre de mostres de teixit d'una forma ràpida i sistemàtica.

S'estudiaren les activitats ADH d'un fetge de fetus humà de 6 mesos, i de fetges de fetus de rata dels darrers dies de la gestació, així com de les seves corresponents placentes. En la Taula XXI apareixen els resultats obtinguts al mesurar l'activitat ADH amb etanol 33 mM i amb octanol 1,0 mM, comparant-se amb les activitats dels fetges d'individus adults i amb les activitats específiques dels isoenzims anòdics  $\gamma$ -ADH

TAULA XXI

Desenvolupament de les activitats ADH (etanol deshidrogenasa i octanol deshidrogenasa) en homogenat de fetge i placenta d'home i de rata. Comparació amb les activitats específiques dels isoenzims X-ADH d'home i ADH-2 de rata.

Mostra <sup>a</sup>	Activitat ADH a pH 10,0 (mU/g de teixit)		
	Etanol 33 mM	Octanol 1,0 mM	Relació etanol 33mM/octanol 1,0mM
<u>Home:</u>			
X-ADH pur de placenta (mU/mg)	60	2.200	0,03
Placenta a terme	0,28	15	0,02
Fetge fetus 6 mesos	27	38	0,7
Fetge adult	1.190	595	2
<u>Rata:</u>			
ADH-2 pur de fetge (mU/mg) <sup>b</sup>	8,2	240	0,03
Placenta 19,20 i 21 dies. <sup>c</sup>	0	20	0
Fetge fetus 19 dies.	20	75	0,27
Fetge de fetus 21 dies.	81	112	0,72
Fetge nounat	117	122	0,96
Fetge adult	630	450	1,4

a Excepte en els cas dels enzims purs, X-ADH i ADH-2, totes les altres mostres varen correspondre a homogenats de teixit.

Les mostres de teixit s'homogenitzaren tal com s'explica a III, 4.3.3. En cada homogenat de placenta de rata es reuniren 4 o 5 placentes. En cada homogenat de fetge de fetus de rata es reuniren de 10 a 15 fetges.

b Isoenzim anòdic similar en propietats a l'isoenzim X-ADH de fetge humà i a l'ADH de placenta humana, purificat i caracteritzat per Julià i col. (171) Dades proporcionades per Julià (172)

c Els resultats són la mitjana dels obtinguts els dies 19, 20 i 21 de gestació.

d'home i ADH-2 de rata (172). Paralelament, es realitzaren anàlisis dels homogenats per electroforesi en gel de midó (Fig. 30).

El fetge de fetus humana presentà un 2 % de l'activitat del fetge adult, mesurada amb etanol 33 mM, i un 6 % mesurada amb octanol 1,0 mM. L'electroforesi revelà la presència de l'isoenzim  $\gamma$ -ADH i dels isoenzims de la classe I,  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta_1$  i  $\beta_1\beta_1$ . La banda corresponent a  $\alpha\beta_1$  fou la més intensa, característica d'un fetus d'edat gestacional avançada (281) (dades no presentades).

En els fetges de fetus de rata, tant l'activitat etanol deshidrogenasa (veure III.2.1.1.2.) com octanol deshidrogenasa (veure III.2.1.1.1.) s'incrementaren notablement els últims dies de la gestació, essent del mateix ordre que les trobades en fetus humans. Així, l'activitat amb etanol 33 mM passa del 3 % de l'activitat adulta el dia 19, al 19 % el dia del naixement (dia 22), dades que estan d'acord amb el model de desenvolupament proposat per altres autors (veure I.5.2.). L'increment en l'activitat etanol deshidrogenasa durant aquest període del desenvolupament es correlacionà directament amb un augment notable de la intensitat de les bandes catòdiques en l'electroforesi dels homogenats (Fig. 30). En canvi, les bandes anòdiques, de mobilitat idèntica a l'isoenzim ADH-2 de fetge adult, es mostraren invariables en la seva intensitat.

En placenta de rata, només es detectà activitat amb octanol 1,0 mM, no havent-se observat cap disminució de l'activitat ADH durant els darrers dies de la gestació, que hauria indicat una pèrdua en la funcionalitat d'aquest òrgan (veure I.5.1.). Els homogenats de placenta, anàlogament al que succeeix en home, revelaren una única banda anòdica en l'electroforesi de gel de midó i tinció amb pentanol, de mobilitat idèntica a l'isoenzim anòdic present en els fetges de fetus i a l'isoenzim ADH-2 de fetge adult (171).

La relació entre les activitats mesurades amb etanol 33 mM i octanol 1,0 mM es revelà una mesura indicativa de la composició isoenzimàtica de

**FIGURA 30** Electroforesi en gel de midó de l'ADH de rata a pH 7,6, 720 V, durant 5 h (veure III.4.3.5.).

- 1 : Homogenat de fetge adult.
- 2 : Homogenat de fetges de nadons.
- 3 i 4 : Homogenat de fetges de fetus de 20 i 19 dies de gestació, respectivament.
- 5, 6 i 7: Homogenats de placentes de 19, 20 i 21 dies de gestació, respectivament.

ADH-2 i ADH-3 són isoenzims anàlegs als isoen- de les classes III i I d'home, respectivament (172).

⊕



023

ADH-2

ADH placenta de rata  
origen

MAA

ADH-3



1 2 3 4 5 6 7

⊖

les mostres analitzades. Així, en placenta i fetges de fetus, la relació fou sempre inferior a 1, com succeeix en les preparacions d'enzim pur de  $\alpha$ -ADH humana i ADH-2 de rata. En els fetges d'individus adults, la relació fou sempre superior a 1, indicant el predomini de les formes catòdiques. En el transcurs del desenvolupament, la relació activitat etanol 33 mM/activitat octanol 1,0 mM va anar sempre en augment, reflectint la progressiva aparició dels isoenzims catòdics, molt actius a baixes concentracions d'etanol (Taula XXI).

## 2. ALDEHID DESHIDROGENASA DE PLACENTA HUMANA

### 2.1. Capacitat d'oxidació d'acetaldehid i de propanal de la placenta humana

Foren estudiades 11 placentes humanes a terme, mesurant l'activitat ALDH dels seus homogenats enfront d'acetaldehid i propanal, a alta i baixa concentració de substrat (veure III.2.1.2.2.) i a dos pH diferents, 7,5 i 8,5 (Taula XXII). L'activitat ALDH total per gram de teixit fresc fou de 16,43 mU/g, mesurada amb propanal 13,3 mM a pH 8,5, el que significà unes 50 vegades menys activitat que el teixit hepàtic adult, que presentà per terme mitjà 870 mU/g de teixit (106). Amb acetaldehid 18 mM, l'activitat fou de 7,14 mU/g de teixit, valor aproximat a les 4,16 mU/g de teixit detectades per Kouri i col. (181) també en placenta humana.

L'activitat mitjana mesurada a baixa concentració d'acetaldehid, 0,74 mU/g de teixit, fou també similar al valor publicat per Kouri i col. (0,89 mU/mg de teixit) (181), variant àmpliament segons els homogenats i essent pràcticament indetectable en alguns d'ells (Taula XXII). Amb propanal 66  $\mu$ M, l'activitat en placenta (1,10 mU/g de teixit) resultà unes 500 vegades menor que en fetge (500 mU/g de teixit) (106), indicant un pobre contingut de la placenta en isoenzims de baixa  $K_m$ .

Es determinà també la possible contribució de l'ALDH present en la sang (veure I.4.4.1.2. i III.4.2.) a l'activitat ALDH de la placenta. Amb aquest objecte, es va mesurar l'activitat ALDH en el plasma i en els eritròcits de la sang d'individus adults sans. No es va detectar activitat en el plasma. L'activitat ALDH en eritròcits fou de 0,038 i 0,051 mU/mg d'hemoglobina, mesurada amb propanal 66  $\mu$ M i 13,3 mM, respectivament. Aquesta activitat fou deguda a ALDH II, únic isoenzim



TAULA XXII. Capacitat d'oxidació d'acetaldehid i propanal de la placenta humana a terme.

Substrat	Concentració (mM)	Activitat (mU/g de teixit) <sup>a</sup>	
		pH 7,5	pH 8,5
acetaldehid	18 <sup>b</sup>	4,46 ± 1,21	7,14 ± 1,93
acetaldehid	0,18 <sup>c</sup>	0,49 ± 0,26	0,74 ± 0,40
propanal	13,3 <sup>b</sup>	10,27 ± 2,78	16,43 ± 4,45
propanal	0,066 <sup>c</sup>	0,60 ± 0,32	1,10 ± 0,60

<sup>a</sup> Activitat mesurada en tampó fosfat monosòdic- NaOH 33 mM , pH 7,5 o pirofosfat sòdic-NaOH 0,1 M, pH 10,0 , NaCO<sup>+</sup> 0,5 mM, a 25°C .La reacció s'inicià amb l'addició del substrat després de haver-se esgotat l'activitat "background" (veure III. 2.1.5.1) . Les activitats són la mitjana ± desviació estàndard dels valors obtinguts amb els homogenats de 11 placentes diferents

<sup>b</sup> Concentració de substrat per a mesurar l'activitat ALDH total (veure III. 2.1.2.2.)

<sup>c</sup> Concentració per a mesurar l'activitat dels isoenzims de l'ALDH de baixa Km (veure III. 2.1.2.2.)

present en els eritròcits que, en virtut del seu comportament bifàsic pot contribuir a l'activitat en un ampli rang de concentracions (153) (veure I.4.4.1.2.). L'activitat ALDH total fou de l'ordre de l'estimada per altres autors utilitzant propanal 20 mM (0,1 mU/mg d'hemoglobina) (152, 306). Tenint en compte el volum de sang present en la placenta (veure IV.1.1.), la contribució de l'activitat de l'isoenzim ALDH II d'eritròcit a l'activitat ALDH de la placenta, mesurada amb propanal 13,3 mM, seria com a màxim de 2 mU/g de teixit, o un 12 % de l'activitat ALDH total. L'ALDH procedent de la sang podria ser en canvi l'origen de l'activitat ALDH de baixa Km mesurada en homogenat de placenta. El diferent contingut en sang dels homogenats explicaria la gran variació observada en els valors d'aquesta activitat (Taula XXII).

## 2.2. Purificació de l'ALDH de placenta humana

### - Exemple de purificació

Després d'assajar diverses condicions, s'adoptà un mètode de purificació (veure també III.1.4. i Fig. 12), que va introduir el tractament dels tampons per tal de treballar en una atmosfera anaeròbia (veure III.1.2.3.). Es varen homogenitzar 500 g de placenta 1:1 (p/v) en tampó Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 8,2 a 4°C. La suspensió resultant es centrifugà després a 11.000 x g durant 1 h. El sobrenedant (700 ml) es filtrà, i es dialitzà enfront de 25 l del mateix tampó durant 5 h. La mostra s'aplicà a una columna de DEAE-cel·lulosa (5 x 50 cm) equilibrada amb el tampó anterior, i l'enzim va ser eluït amb un gradient de 0 a 0,15 M de NaCl (3.000 ml). Les fraccions actives (360 ml) es varen reunir, concentrar fins a 20 ml, dialitzar enfront de tampó fosfat monossòdic-NaOH 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1mM, pH 6,0 i cromatografiar en una columna de 5'AMP-Sepharose (1 x 22 cm) equilibrada amb el mateix tampó. Les condicions emprades foren similars a les donades per Pietruszko i Yonetani (248) per a la purificació d'ALDH I i ALDH II de fetge. La columna es va rentar successivament amb aquest tampó (300 ml) i amb fosfat monossòdic-NaOH 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 6,0 (300 ml). Quan

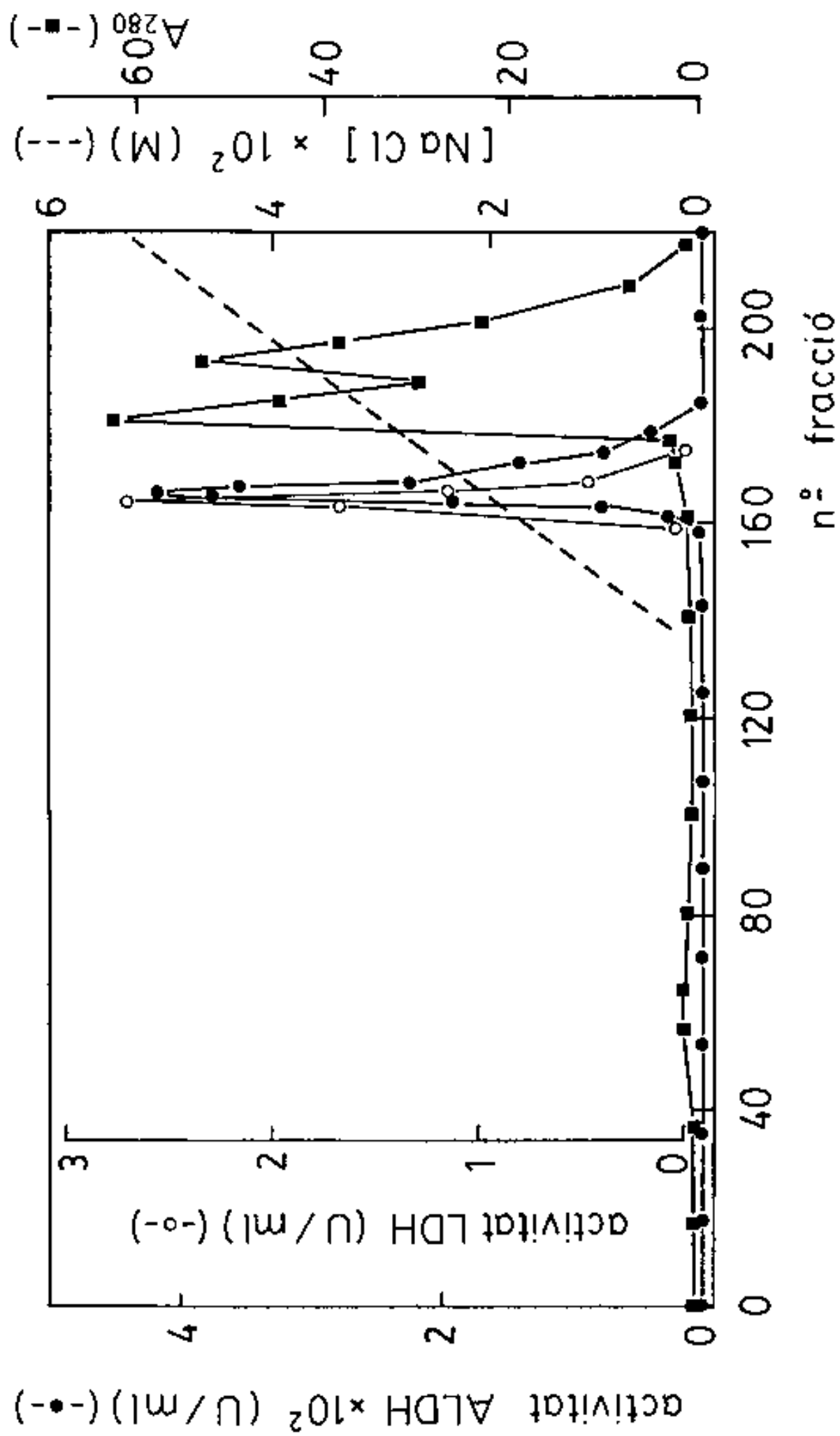
L'enzim eluïa inespecíficament, era recromatografiat en una nova columna en les mateixes condicions (veure III.1.4.6.6.). L'ALDH va ser eluïda amb un gradient de 0 a  $6 \times 10^{-5}$  M de NADH (500 ml) i concentrada fins a un volum de 1-2 ml. El grau de purificació assolit en aquest estadi fou suficient per a la majoria d'estudis físico-químics i cinètics. Quan interessà un enzim completament pur, el concentrat provinent de la cromatografia d'afinitat s'aplicà a una columna de Sephacryl S-300 SF (2,3 x 90 cm) equilibrada amb tampó fosfat monossòdic-NaOH 30 mM, EDTA 1mM, DTT 1 mM, pH 7,3. Al final, les fraccions amb activitat ALDH (10-20 ml) varen ser concentrades de tal forma que l'activitat estàndard fós d'aproximadament 1 U/ml. Tots els tampons emprats foren desgasats i saturats amb nitrogen. La purificació completa es realitzà en 8 o 10 dies.

#### - Cromatografia en DEAE-cel.lulosa

En la cromatografia de DEAE-cel.lulosa s'eliminaren les proteïnes més bàsiques i la major part de l'hemoglobina. La Fig. 31 mostra el perfil d'elució típic de la columna de DEAE-cel.lulosa, molt similar al de la purificació de l'ADH de placenta. L'ALDH de placenta humana va requerir, però, un pH superior (8,2, en comptes de 7,9, utilitzat per a l'ADH) per a la seva unió a la resina, d'acord amb el seu punt isoelèctric més alt (veure IV.2.5.3.).

L'elució de l'ALDH es va produir a una concentració de 30 mM de NaCl, immediatament abans de  $\chi$ -ADH i de la fracció majoritària de l'hemoglobina, que quedaren més retingudes en la columna. L'únic pic d'activitat ALDH presenta el 84 % de l'activitat total continguda inicialment en l'homogenat (veure IV.2.1.). Conjuntament amb l'ALDH, va eluir un pic d'activitat lactat deshidrogenasa (LDH), que va correspondre a l'isoenzim LDH 4 (veure IV.2.4.), el qual posseeix el mateix punt isoelèctric que l'ALDH de placenta (dada no presentada). De les 3000 U d'activitat LDH, mesurades amb lactat 28 mM a pH 8,5, que va exhibir l'homogenat de placenta, unes 200 U varen eluir conjuntament amb l'ALDH, contaminant sovint les preparacions d'enzim (veure IV.2.4.).

**FIGURA 31** Perfil d'elució de la cromatografia en DEAE-cel·lulosa a pH 8,2 (veure III. 1.4.4.).  
L'ALDH de la placenta va ser eluïda mitjançant un gradient de 0 a 0,15 M de NaCl (---): activitat ALDH ( propanal 13,3 mM ) (-●-); activitat LDH ( lactat 28 mM ) (-○-); absorbància a 280nm (-■-).  
El volum de les fraccions fou de 20ml.



En acabar el gradient, la columna es rentà amb 2.000 ml del tampó inicial, contenint NaCl 1 M, per tal d'eluir les proteïnes més fortament unides. En les fraccions eluïdes en aquest rentat no es detectà activitat ALDH, amb el que es descartà la presència d'altres isoenzims de punt isoelectric més baix, com ALDH I i ALDH II.

#### - Cromatografia en 5'AMP-Sepharose

En el segon pas de purificació, la cromatografia d'afinitat en 5'AMP-Sepharose, s'eliminà la resta de l'activitat LDH i d'altres proteïnes contaminants. L'ALDH de placenta va eluir amb el gradient de NADH. La LDH, exenta d'activitat ALDH, quedà normalment més fortament retinguda, essent eluïda mitjançant una elevada concentració de NADH (0,7 mM) (Fig. 32).

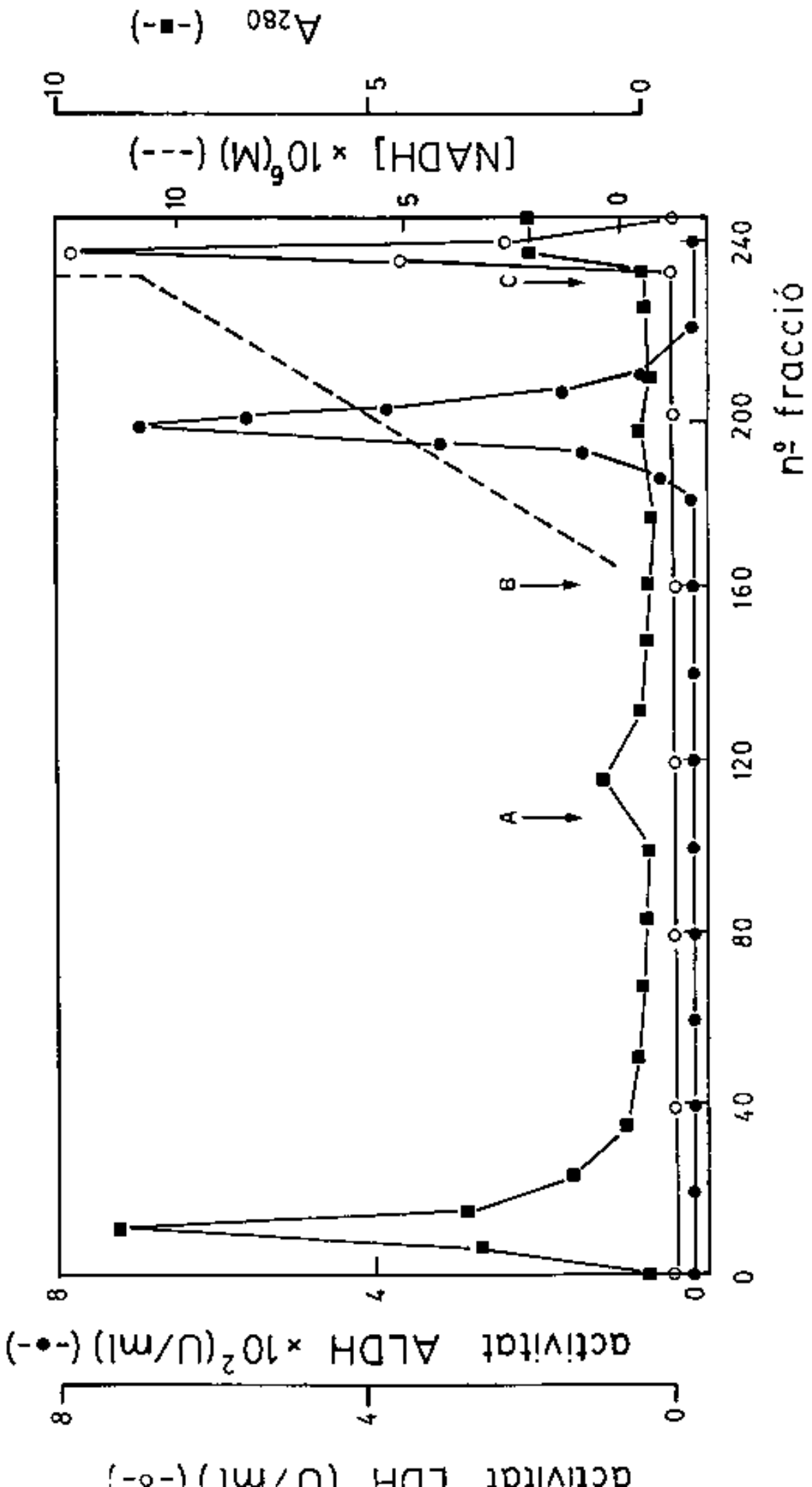
#### - Cromatografia de gel filtració

El darrer pas de la purificació, la cromatografia de gel filtració, va servir per a obtenir un enzim altament purificat i lliure de possibles restes d'activitat LDH, a la vegada que ens proporcionà el pes molecular de l'enzim (veure IV.2.5.1.).

En la Taula XXIII s'aprecia el grau de puresa assolit en cada un dels passos de la purificació. Normalment, l'ALDH de placenta es purificà unes 7.000 vegades, obtenint-se al final 1 mg d'enzim altament purificat, amb un rendiment global del 10 %. Quan es desitjà un enzim lliure de qualsevol impuresa, el rendiment baixà ostensiblement (aproximadament, fins al 2 %), degut a la labilitat de l'ALDH de placenta en aquest estadi de la purificació (veure IV.2.3.). La preparació final d'enzim pur fou homogènia en electroforesi en gel de poliàcrilamida amb SDS i tinció amb sals de plata, on aparegué una sola banda que ens proporciona ademés el pes molecular de les subunitats (Fig. 37). L'activitat específica de l'enzim, 1,43 U/mg, resultà del mateix ordre que les publicades per als altres isoenzims de l'ALDH humana, ALDH I (0,5-2,6 U/mg) i ALDH II (0,58

**FIGURA 32** Perfil d'elució de la cromatografia en 5'AMP-Sepharose (veure III. 1.4.6.).

La columna es va rentar successivament amb fosfat monossòdic 10 mM , EDTA 1 mM, DTT 1 mM , pH 6,0 i amb fosfat monossòdic 50 mM , EDTA 1 mM , DTT 1 mM, pH 6,0 (A). L'ALDH de placenta va ser eluïda amb un gradient (B) de 0 a  $6 \times 10^{-5}$  M de NADH (---): activitat amb propanal 13,3 mM (-●-). La LDH va ser eluïda amb NADH 0,7 mM (C): activitat amb lactat 28 mM (-○-). Absorbància a 280 nm (-■-). EL volum de les fraccions fou de 5ml.).





TAULA XXIII Purificació de l'ALDH de placenta humana <sup>a</sup>.

Pas de purificació	Activitat total <sup>b</sup> (U)	Proteïna total <sup>c</sup> (mg)	Activitat específica (U/mg)	Factor purificació (vegades)	Rendiment (%)
Homogenat	8,8	67.500	0,00013	1	100
DEAE-cel·lulosa	7,4	693	0,011	84	84
5'AMP-Sepharose	3,4	97	0,035	269	39
5'AMP-Sepharose (recromatografia)	0,9	1	0,91	7.000	10
Sephacryl S-300 SF	0,126	0,088	1,43	11.000	10

<sup>a</sup> Dades obtingudes per a una purificació típica a partir de 500g. de teixit placentari.

<sup>b</sup> L'activitat es mesurà amb propanal 13,3 mM + NAD<sup>+</sup> 0,5 mM, en tampó pirofosfat àcid-HCl 33 mM, pH 8,5, a 25°C (veure III. 2.1.2.1.).

<sup>c</sup> La concentració de proteïna es determinà pel mètode de Bradford (40), utilitzant albúmina de sèrum boví com a patró (veure III. 2.4.3.)

U/mg) (136).

### 2.3. Estabilitat de l'ALDH de placenta

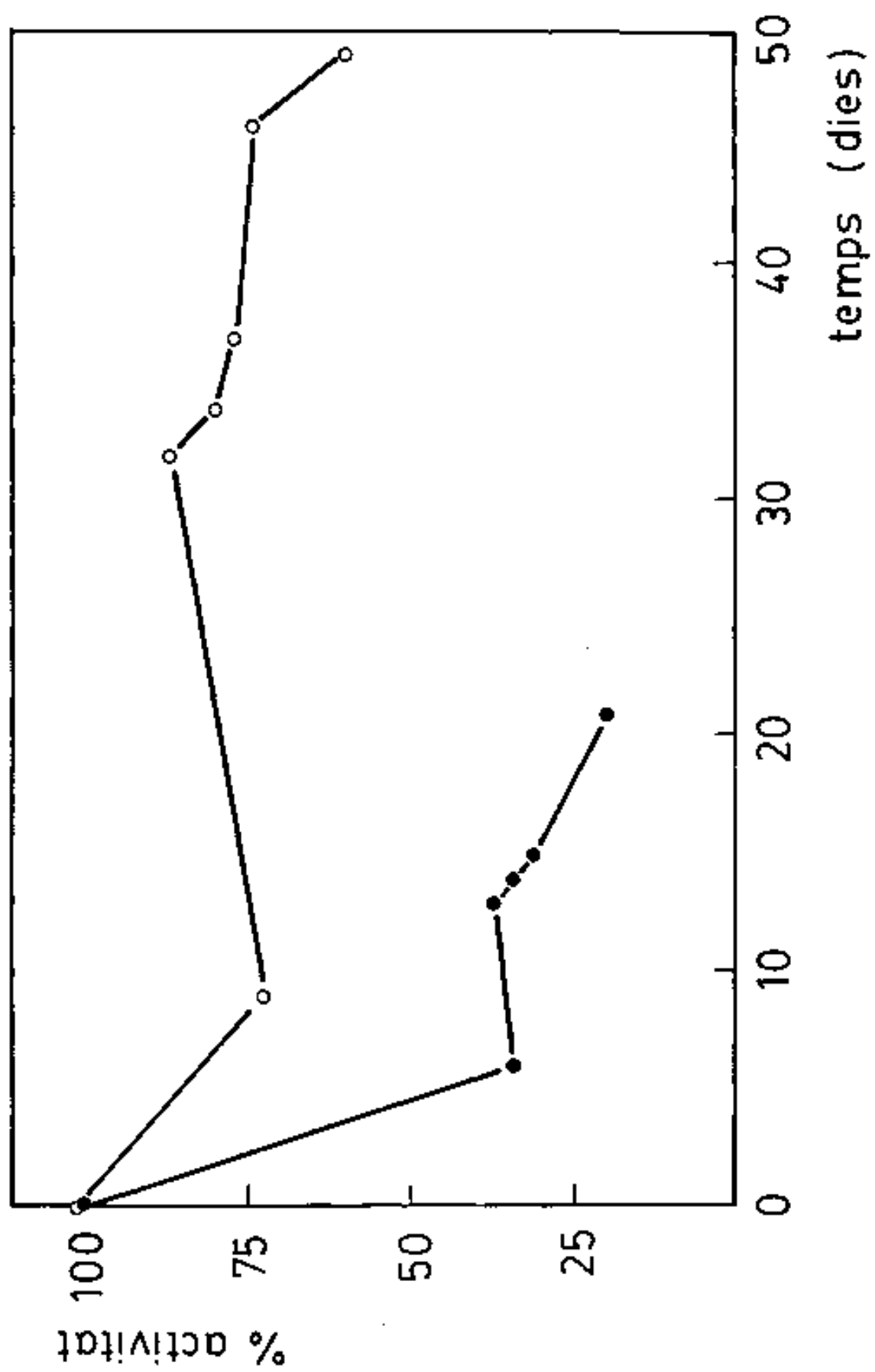
L'enzim es revelà altament inestable en absència d'agents reductors o d'una atmosfera anaeròbia, perdent la seva activitat ràpidament en el transcurs del procés de purificació. Quan el DTT, en que es conservava l'ALDH de placenta, era eliminat per diàlisi enfront de tampó lliure de DTT, durant 24 h, l'enzim perdia aproximadament el 50 % de la seva activitat inicial, malgrat que el tampó de la diàlisi estava saturat amb nitrogen (III.1.2.5.). Aquesta és una característica comuna a tots els isoenzims de l'ALDH, i és probablement deguda a l'elevat contingut en residus de cisteïna susceptibles d'oxidació (24B) (veure IV.2.6.5.). L'addició de DTT 1 mM o 2-mercaptoetanol 20 mM a una alíquota de l'enzim dialitzat no restaurà l'activitat inicial, indicant que l'oxidació d'alguns residus de cisteïna podia causar la inactivació irreversible de l'enzim. Per altra banda, l'activitat ALDH va disminuir notablement per processos de congelació-descongelació, àdhuc en homogenats del teixit, essent preferible l'emmagatzement a 4°C per a la seva utilització a curt termini.

La Fig. 33 mostra l'estabilitat de l'ALDH de placenta humana emmagatzemada a 4°C, a pH 7,3, en presència de DTT 1 mM. L'enzim pur va perdre la seva activitat ràpidament, presentant només el 50 % de l'activitat al cap d'una setmana. En canvi, una preparació menys pura d'enzim, que no havia sigut cromatografiada en la columna de gel filtració, conservà més del 80 % de l'activitat durant un mes, probablement degut a l'efecte estabilitzador de les proteïnes contaminants.

### 2.4. Anàlisi dels isoenzims de l'ALDH de placenta

Les electroforesis en gel de midó dels homogenats de placenta humana

**FIGURA 33** Estabilitat de l'ALDH de placenta en tampó fosfat monossòdic-NaOH 30 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM , pH 7,3 , saturat amb nitrogen, a 4°C :  
Preparació d'ALDH abans de la cromatografia en Sephacryl (-○-). Preparació d'ALDH després de la cromatografia en Sephacryl (-●-).



no revelaren cap banda d'activitat ALDH en la tinció amb propanal (Fig. 34), malgrat l'activitat detectada per mètodes espectrofotomètrics (veure IV.2.1.). Així mateix, quan s'aplicà una alíquota d'enzim purificat a una electroforesi en gel de midó, juntament amb homogenat de fetge i homogenat d'estómac, dos fenòmens diferents, la temperatura d'incubació i la presència de LDH contaminant, dificultaren la detecció de l'ALDH de placenta.

- Efecte de la temperatura d'incubació sobre la tinció de l'ALDH de placenta

Malgrat l'elevada concentració d'enzim aplicada (1-2 U/ml), quan la tinció es realitzava a 45°C (temperatura usual emprada en aquest tipus d'estudi), no s'observava pràcticament cap banda d'activitat ALDH provinent de l'enzim purificat. En el millor dels casos, s'intuïa una zona de tinció molt dèbil al cap de 1 h d'incubació (Fig. 34). En canvi, quan la tinció es realitzà a 20°C, aparegué ràpidament una família de bandes anòdiques ben visibles, de menor mobilitat que els isoenzims ALDH I i ALDH II de fetge i que ALDH III d'estómac, però de similar mobilitat al grup de bandes corresponents a l'isoenzim ALDH IV de fetge, les quals també es tenyiren més intensament a aquesta temperatura (Fig. 34). Així doncs, l'ALDH de placenta es tenyia millor a una temperatura baixa, el que suggeria la seva extraordinària termolabilitat (veure IV.2.5.4.), explicant-se també la dèbil tinció d'ALDH IV en els homogenats de fetge, normalment tenyits a 45°C. Contràriament, ALDH I i ALDH II es tenyien millor a temperatura alta.

- Efecte de la LDH contaminant sobre la tinció de l'ALDH de placenta

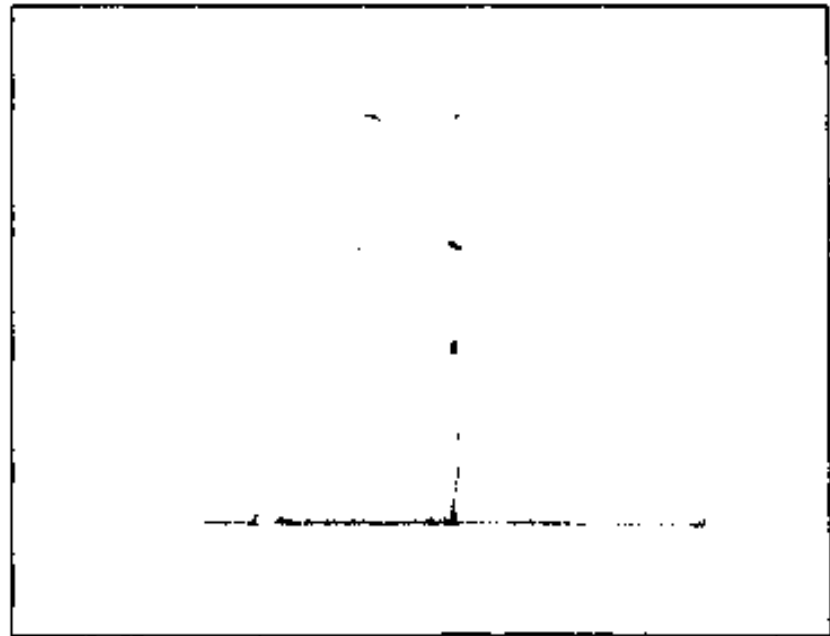
Quan la preparació d'enzim posseïa com a contaminant activitat lactat deshidrogenasa (veure IV.2.2.), la meitat del gel tenyida en presència de piruvat (afegit rutinàriament per a inhibir la LDH en les mostres d'homogenat) no mostrava cap banda, però sí la presentava la meitat tenyida sense piruvat, en que molt a prop d'una tènue banda de l'isoenzim LDH 4 apareixia l'ALDH de placenta (dades no presentades).

Així doncs, s'investigà l'efecte conjunt de la presència de LDH

**FIGURA 34** Electroforesi en gel de midó de l'ALDH humana a pH 7,6 , 720 V , 30-40 mA , durant 8 h (veure III. 3.1.1. ).

Tinció per activitat realitzada amb propanal 111 mM i afegint piruvat 11mM: a) a 45°C, b) a 20°C.  
1: Homogenat de fetge, 2: Homogenat de estómac,  
3: ALDH de placenta purificada, 4: Homogenat de placenta, 5 ,6 i 7:ALDH de placenta purificada, amb diferents quantitats de LDH 4 .

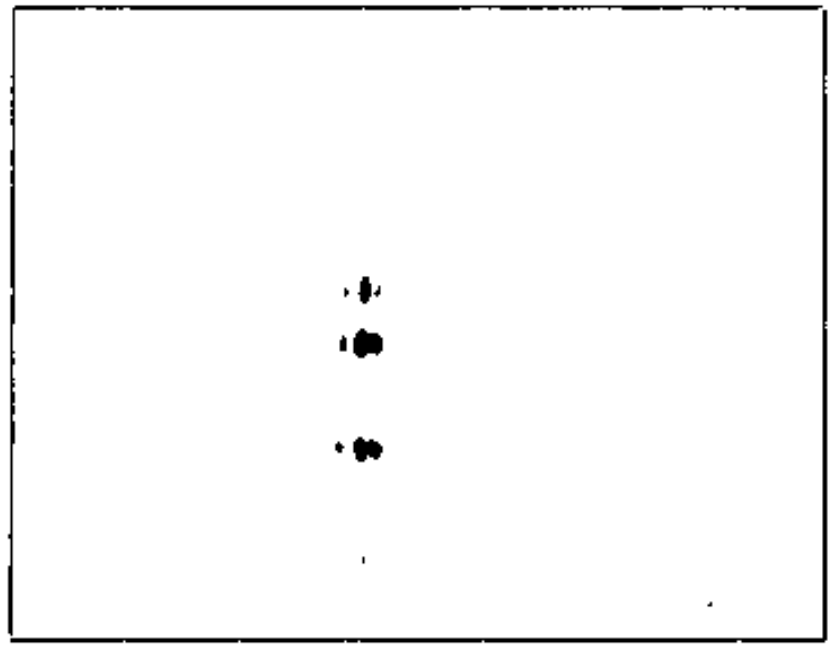
a



b

(+)

—ALDH I—  
—ALDH II—  
—ALDH III—  
—ALDH IV—  
—origen—



(-)

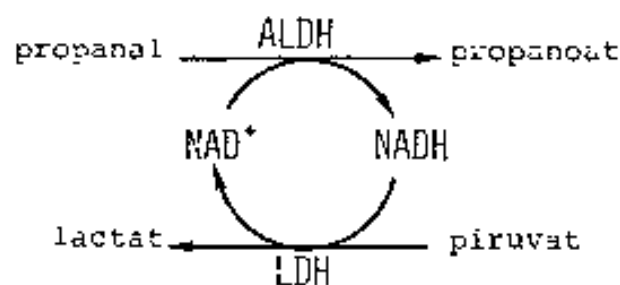
7 6 5 4 3 2 1

1 2 3 4 5 6 7

contaminant i de piruvat sobre la tinció de l'ALDH de placenta. S'aplicaren a un mateix gel varies alíquotes d'ALDH de placenta purificada, les quals contenen diferents quantitats afegides d'una preparació de LDH 4 de placenta. La tinció del gel en presència de piruvat revelà que la intensitat de les bandes de l'ALDH de placenta era tant més dèbil com major quantitat de LDH 4 contenia l'alíquota corresponent (Fig. 34). És a dir, l'isoenzim LDH 4 emascarava d'alguna forma la tinció de l'ALDH de placenta en presència de piruvat.

S'estudià a continuació l'efecte del piruvat en l'activitat ALDH mesurada espectrofotomètricament. L'ALDH de placenta purificada, lliure de LDH, no fou inhibida en presència de piruvat. Tanmateix, en les fraccions que presentaven LDH contaminant (veure IV.2.2.), l'activitat ALDH va resultar aparentment inhibida per l'addició de piruvat a la barreja de reacció.

El piruvat actua com a inhibidor de l'oxidació del lactat per la LDH (141), però a baixes concentracions de NADH és substrat natural de la LDH. És molt probable que el NADH, produït en l'oxidació del propanal per part de l'ALDH, sigui utilitzat per la LDH per a la reducció del piruvat, no detectant-se augment d'absorbència a 340 nm (Fig. 35).



**FIGURA 35** Mecanisme d'acoblament entre l'ALDH i la LDH, amb la reoxidació del NADH produït, per a explicar la inhibició aparent de l'activitat ALDH pel piruvat en fraccions parcialment purificades.



El mateix mecanisme impediria la reducció del NBT en la tinció del gel de midó, al sobreposar-se les bandes de ALDH IV i LDH 4, i explicaria la manca de tinció de l'ALDH en els homogenats de placenta i en les fraccions parcialment purificades i, probablement, la tinció anormalment dèbil d'ALDH IV en els homogenats de fetge (221).

## 2.5. Caracterització físico-química de l'ALDH de placenta

### 2.5.1. Pes molecular de l'enzim natiu

El pes molecular de l'ALDH de placenta, determinat per duplicat mitjançant cromatografia en una columna de Sephacryl S-300 SF fou de 100.000 dalton (Fig. 36a), i per cromatografia en una columna de Sephadex G-200 SF, resultà de 114.000 dalton (Fig. 36b) (veure III.1.4.3.1.1). En ambdues columnes, l'enzim va eluir en un pic simètric d'activitat (dades no presentades), no detectant-se activitat ALDH en les fraccions eluides en la regió de 200.000 dalton. Aquesta era la primera vegada que s'observava un isoenzim de l'ALDH humana amb un pes molecular inferior a 200.000 dalton.

### 2.5.2. Pes molecular de les subunitats

L'electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions dissociants de diferents preparacions d'ALDH de placenta mostrà una única banda de proteïna en la tinció amb sals de plata. Aquesta banda correspongué, en 5 experiments independents, a un pes molecular de les subunitats de 63.000 dalton (Fig. 37). Considerant el pes molecular de l'enzim natiu (114.000 dalton), proposàrem una estructura dimèrica per a la forma funcional de l'enzim, a diferència de l'estructura tetramèrica que semblava ser

**FIGURA 36** Determinació del pes molecular ( $M_r$ ) de l'ALDH de placenta humana per cromatografia de gel filtració. Representació de  $K_{av}$  enfront de  $\log M_r$  (veure Ill. 1.4.8.).

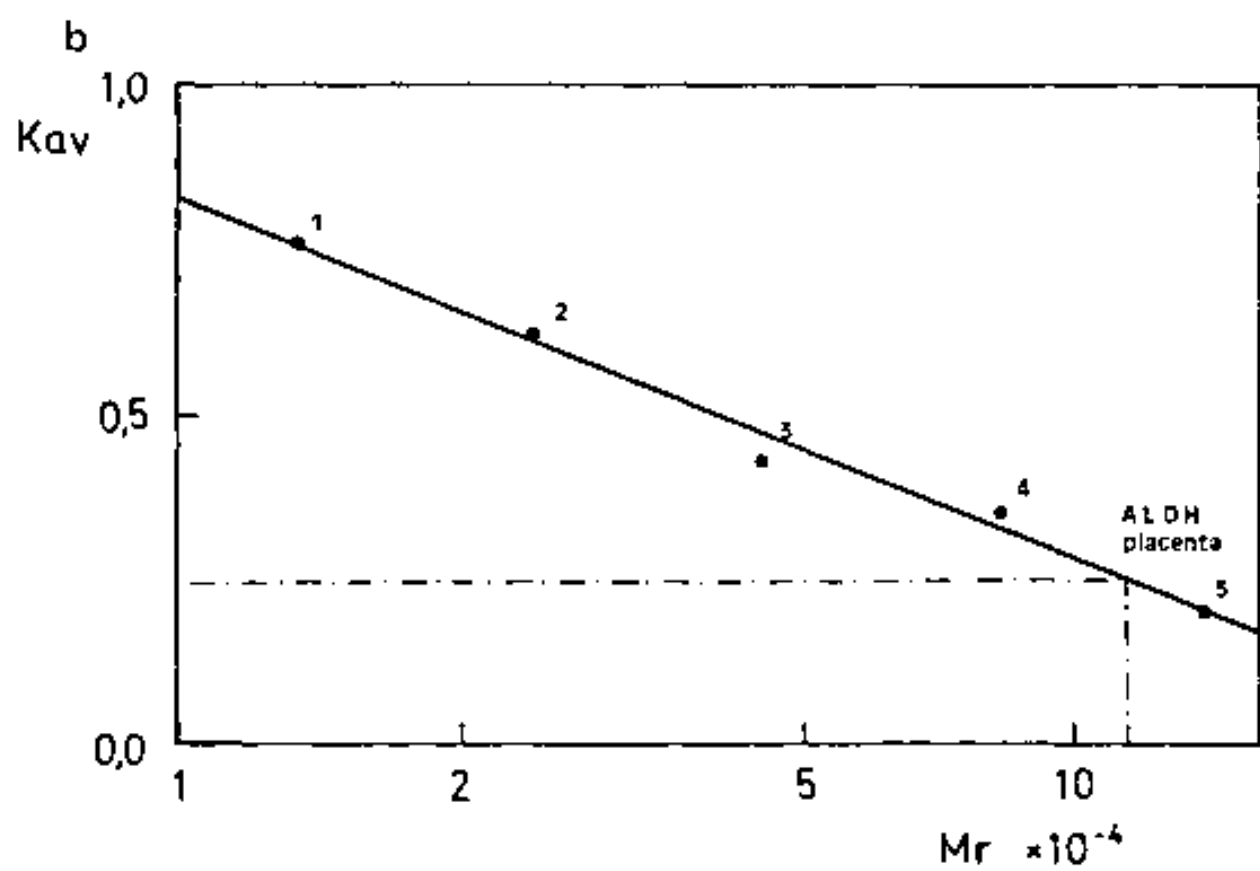
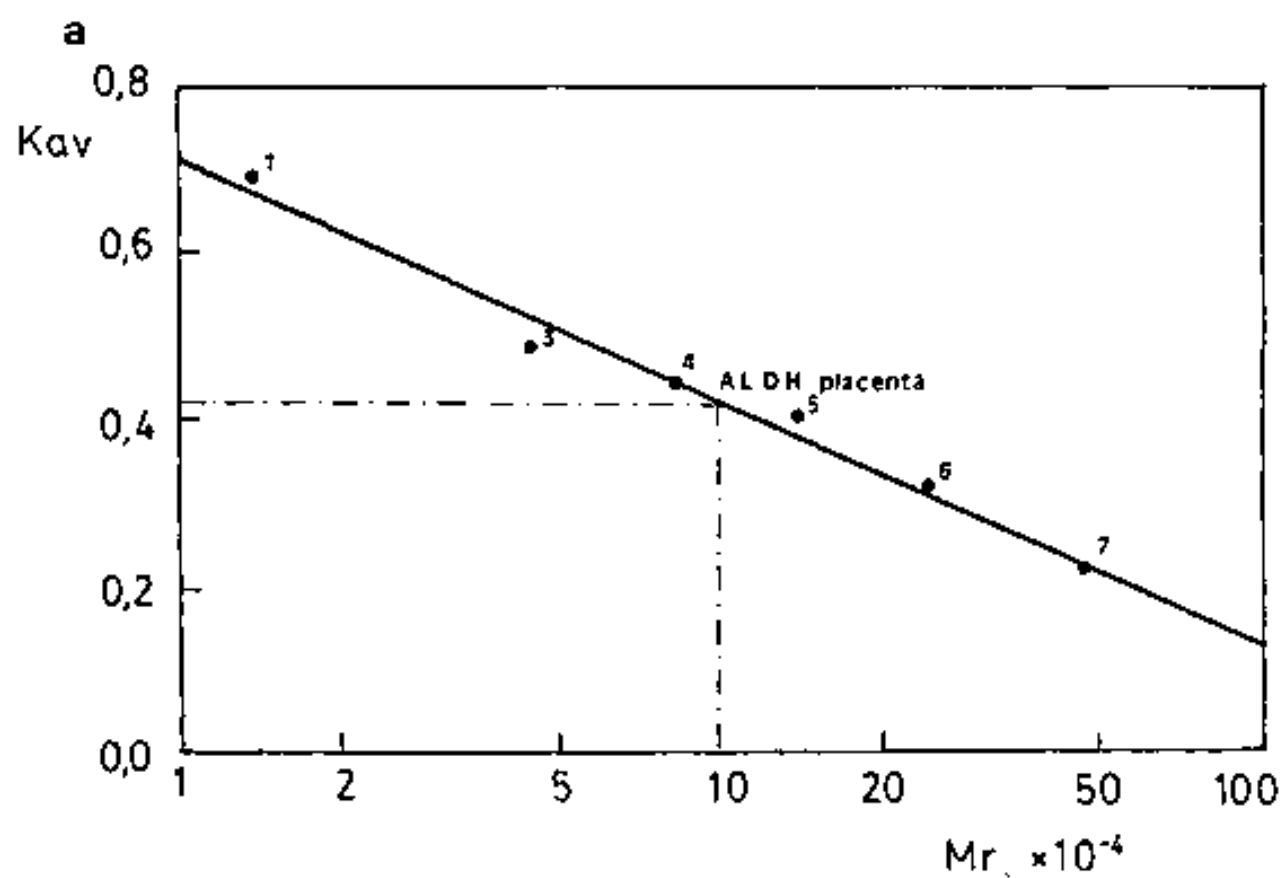
Proteïnes-patró ( $M_r$ ) : 1. Ribonucleassa A,  $1,368 \times 10^4$ ; Quimotripsinògen A,  $2,5 \times 10^4$ ; 3. Ovoalbúmina  $4,5 \times 10^4$ ; 4. ADH de fetge de cavall,  $8,3 \times 10^4$ ; 5. Lactat deshidrogenasa,  $14 \times 10^4$ ; 6. ALDH de llevat  $24,5 \times 10^4$ ; 7. Ferritina,  $47 \times 10^4$ .

a) Cromatografia en Sephacryl S-300 SF.

$$V_t = 391 \text{ ml. } V_0 = 118 \text{ ml. } r^2 = 0,9824$$

b) Cromatografia en Sephadex G-200 SF.

$$V_t = 390,1 \text{ ml. } V_0 = 127,3 \text{ ml. } r^2 = 0,9878$$



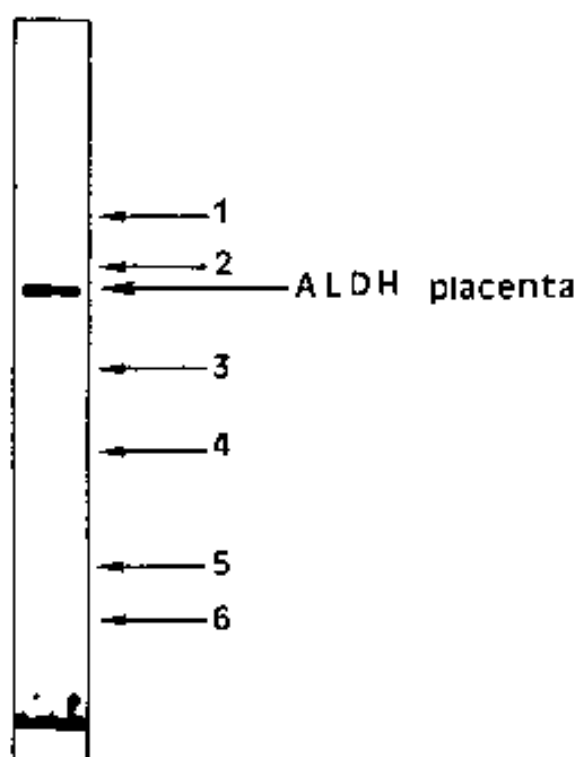
**FIGURA 37** Electroforesi en gel poliacrilamida amb SDS. Tinció amb sals de plata (veure III.3.2.)

a) Demostració de la homogeneïtat de l'enzim purificat.

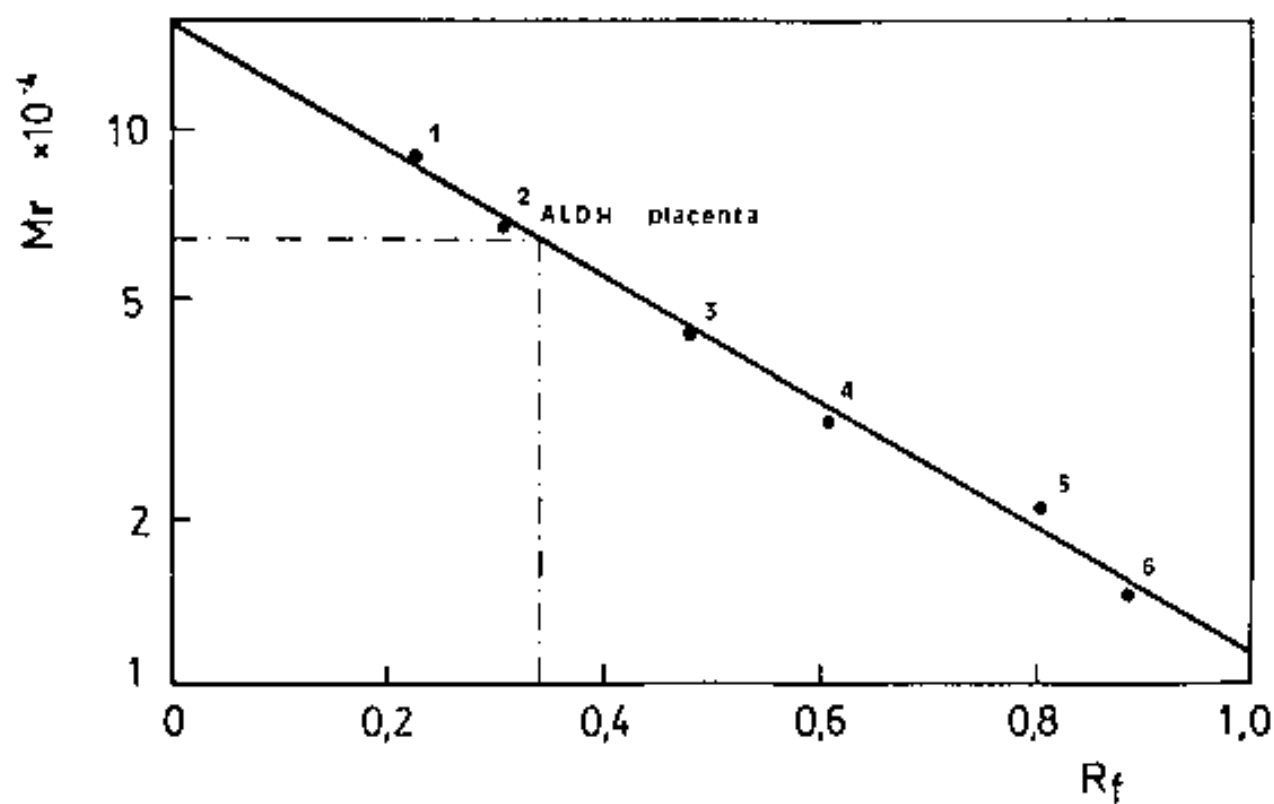
b) Càlcul del pes molecular de les subunitats (Mr) de l'ALDH de placenta humana. Representació de  $\log Mr$  enfront de la migració relativa (Rf).  
 $r^2 = 0,9924$ .

Proteïnes-patró (Mr). 1. Fosforílase b,  $9,0 \times 10^4$ ; 2. Albúmina de sèrum boví,  $6,8 \times 10^4$ ; 3. Ovoalbúmina,  $4,3 \times 10^4$ ; 4. Anhidrase carbònica,  $3,0 \times 10^4$ ; 5. Inhibidor de la tripsina,  $2,1 \times 10^4$ ; 6. Lisozim,  $1,47 \times 10^4$ .

a



b



característica de l'ALDH humana (249).

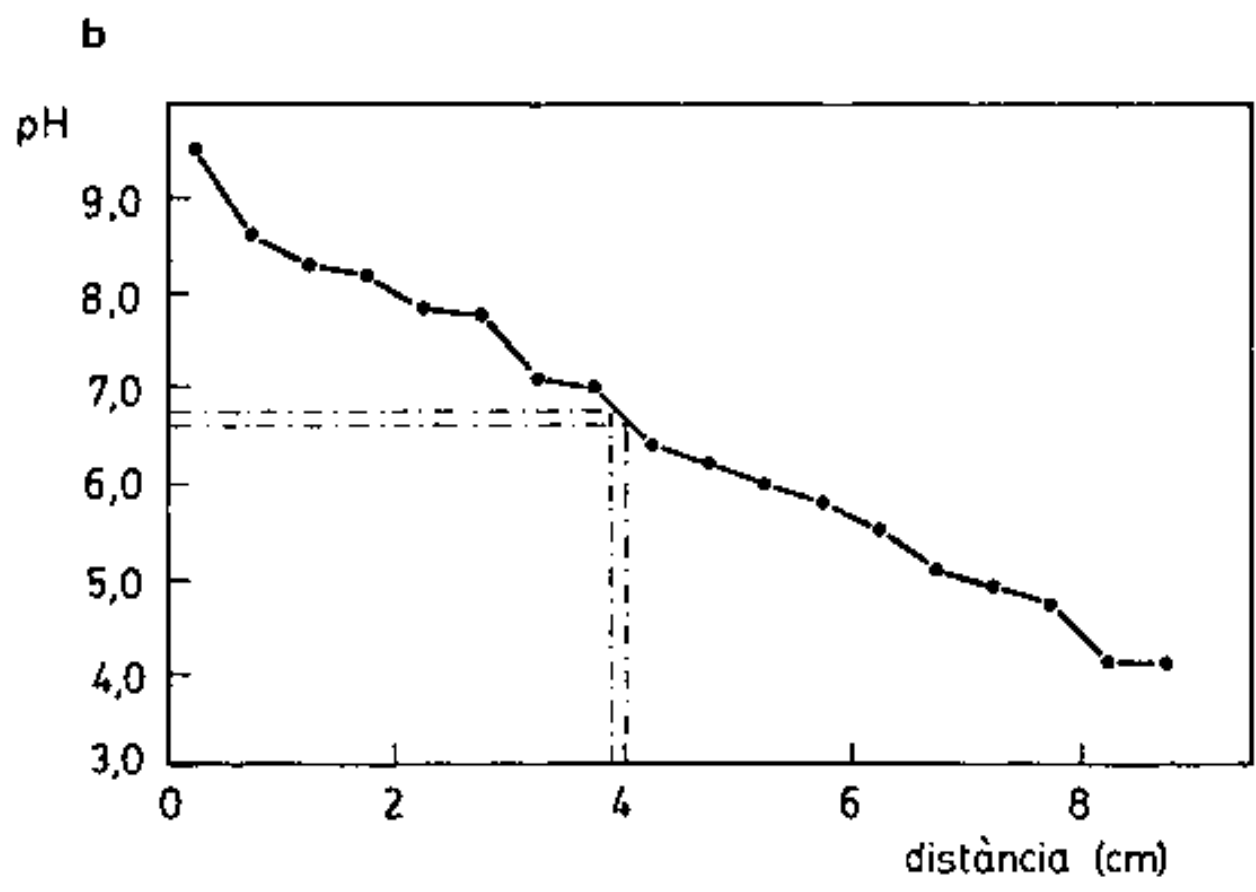
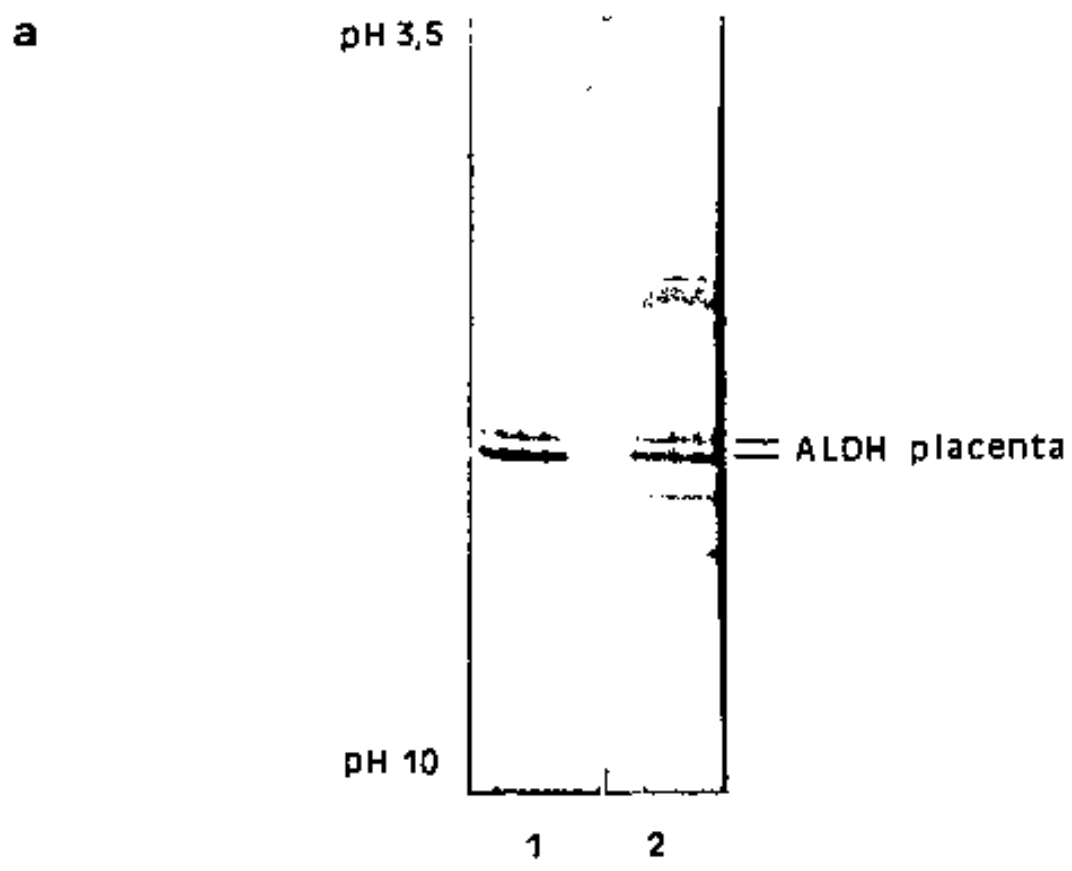
### 2.5.3. Punt isoelectric

L'electrofocalització analítica de l'enzim pur en gels ultrafins de poliacrilamida revelà dues úniques bandes d'activitat ALDH a pH 6,75 i pH 6,90. La tinció per proteïna amb sals de plata presentà dues bandes majoritàries de punts isoelectrics idèntics als de les bandes tenyides amb propanal (Fig. 38). Els punts isoelectrics de l'ALDH de placenta, sensiblement més elevats que els dels isoenzims ALDH I (pI 4,95) i ALDH II (pI 5,00-5,30), explicarien la més lenta mobilitat electroforètica en gel de midó, a pH 7,6, de l'enzim de placenta i la necessitat d'augmentar el pH en la columna de DEAE-cel·lulosa respecte a l'utilitzat per a la unió de l'ALDH de placenta (pI 6,4) (319).

### 2.5.4. Estabilitat tèrmica

S'estudià l'estabilitat tèrmica a 45°C de l'ALDH en homogenat de fetge i de placenta humans, i l'estabilitat a 45°C i 25°C de l'ALDH de placenta purificada, seguint els mètodes explicats en la secció III.2.3. En tots els experiments, s'obtingué la corba de desnaturalització tèrmica del enzim, per representació del percentatge d'activitat residual (100 % d'activitat a temps zero) enfront del temps d'incubació (Figs. 39 i 40).

- FIGURA 38** Electroforesis analítica en gel ultrafí de poli-acrilamida. Rang de pH = 3,5 - 10 .
- a) Comparació de la tinció per proteïna i per activitat d'una preparació d'ALDH de placenta humana.
  - b) Representació del gradient de pH. El punt isoelectric de l'ALDH de placenta es calculà per interpolació de les distàncies mesurades des del càtode a cada una de les bandes.





- Estabilitat tèrmica de l'ALDH en homogenat de fetge i de placenta

En homogenat de fetge, quan l'activitat es mesurava amb propanal 66  $\mu$ M (ALDH de baixa Km), es conservava encara més del 90 % de l'activitat inicial als 10 min d'incubació, i un 70 % al cap de 1 h. En canvi, quan s'utilitzava propanal 13,3 mM (ALDH total), només es detectava el 51 % de l'activitat inicial als 10 min. Més espectacular era la disminució quan es considerava l'activitat de l'ALDH d'alta Km, calculada per diferència entre les activitats mesurades amb propanal 13,3 mM i amb propanal 66  $\mu$ M (veure III.2.1.2.2.). En aquest cas, el percentatge d'activitat residual era del 6,5 % als 10 min d'incubació (Fig. 39). Resultats similars a l'observat per a l'ALDH d'alta Km s'obtingueren amb homogenat de placenta on, als 10 min d'incubació, només restava un 7,2 % de l'activitat inicial, amb un perfil de la corba de desnaturalització tèrmica idèntic al de l'ALDH d'alta Km (Fig. 39). Aquest experiment demostrava clarament la diferent termolabilitat dels isoenzims hepàtics de l'ALDH humana: els isoenzims de baixa Km apareixien força resistents a la desnaturalització tèrmica, mentre els d'alta Km perdien ràpidament la seva activitat per acció del calor. Les dades aportades concorden amb les observacions de Harada i col. (125) i Meier-Tackman i col. (221), al estudiar l'estabilitat tèrmica dels isoenzims de l'ALDH humana. Segons Harada i col. (125), contràriament a ALDH I i ALDH II, els isoenzims ALDH III i ALDH IV, una vegada separats per electroforesi en gel de midó, eren extremadament inestables a 70°C. El comportament paral·lel quant a termoestabilitat, observat per a l'activitat ALDH de placenta i l'activitat ALDH d'alta Km de fetge, suggereix que la placenta posseeix majoritàriament isoenzims d'alta Km.

- Estabilitat tèrmica de l'ALDH de placenta purificada

També es determinà la corba de desnaturalització tèrmica a 45°C i 25°C de l'ALDH de placenta purificada. A 45°C, s'observà una ràpida inhibició de l'activitat enzimàtica, amb menys del 5 % de l'activitat inicial als 5 min d'incubació (Fig. 40a). El perfil de la corba de desnaturalització fou idèntic, ademés, a l'observat en l'homogenat de placenta (Fig. 39). Per altra banda, a 25°C es conservava el 90 % de l'activitat inicial als 5 min d'incubació (Fig. 40b).

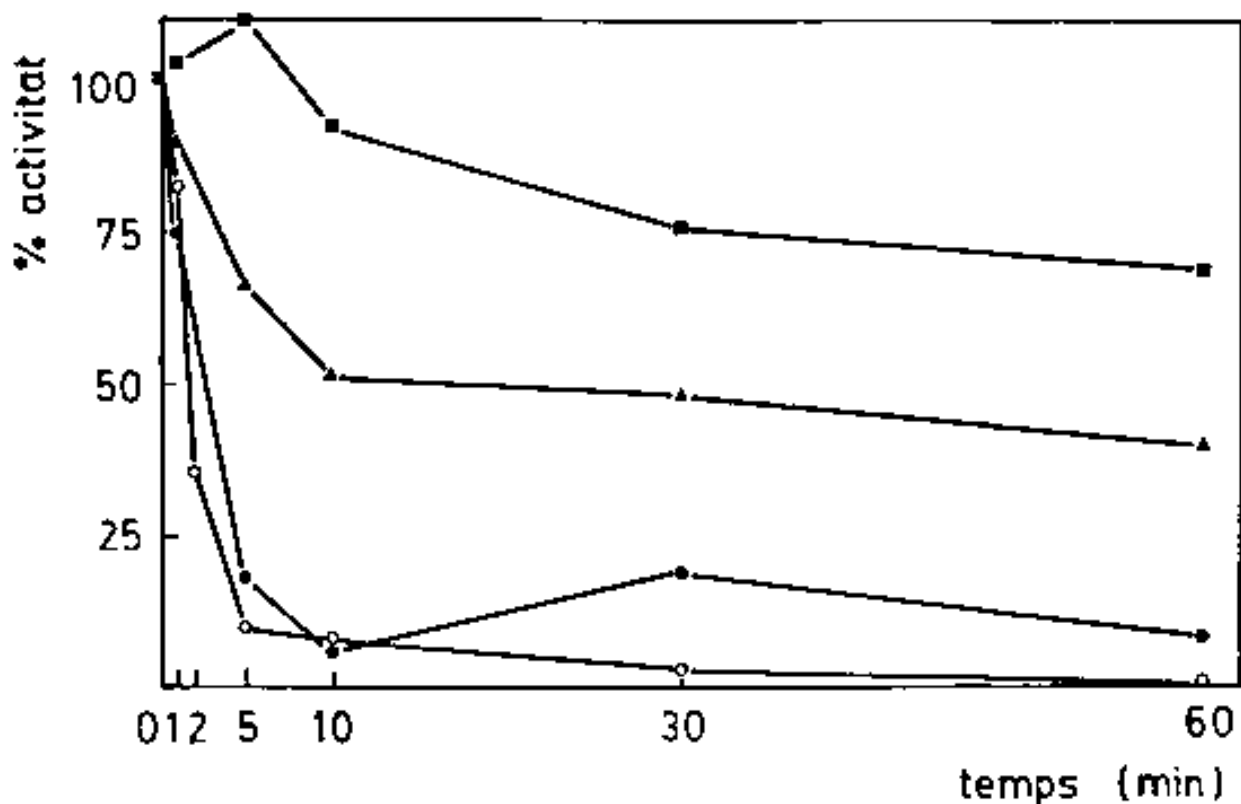


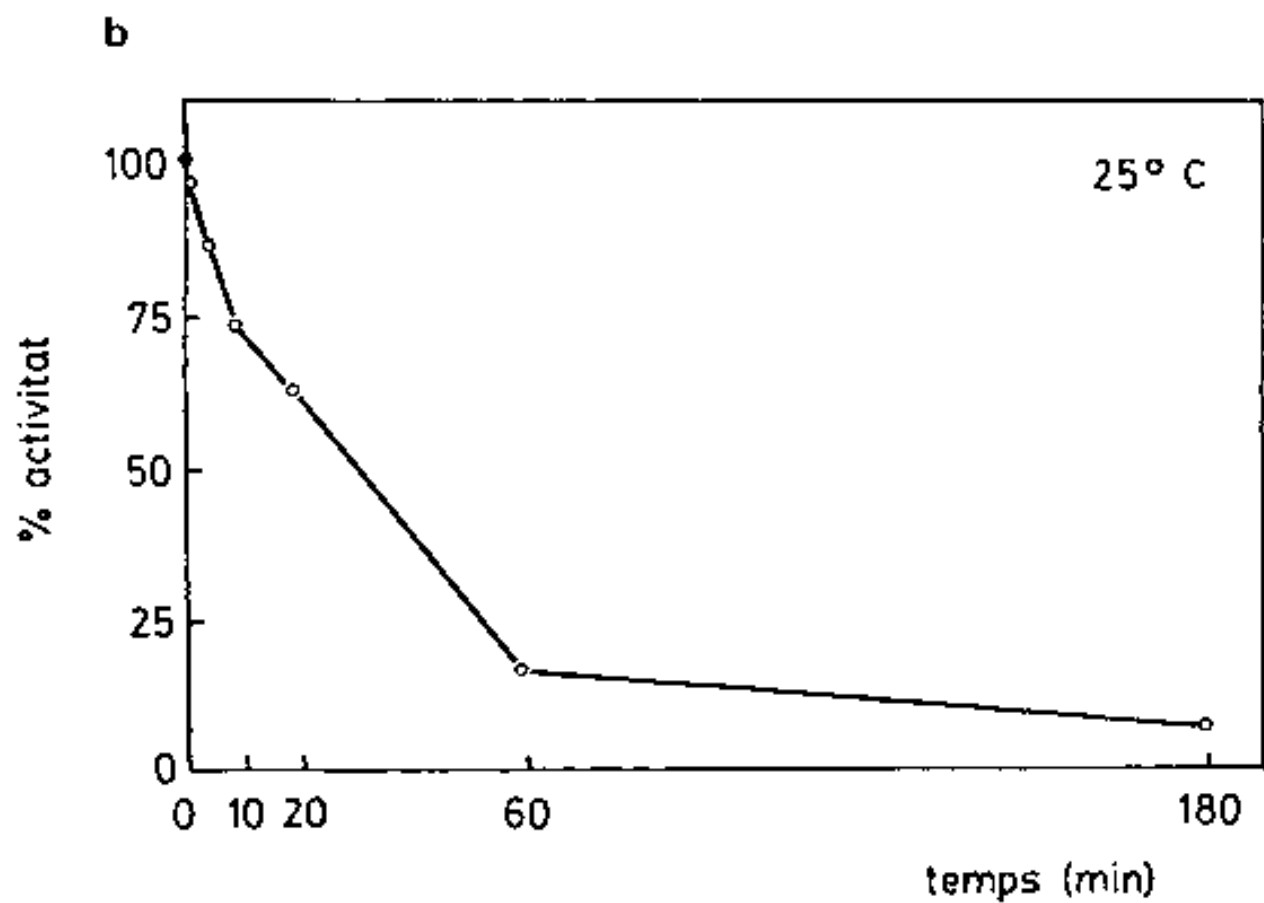
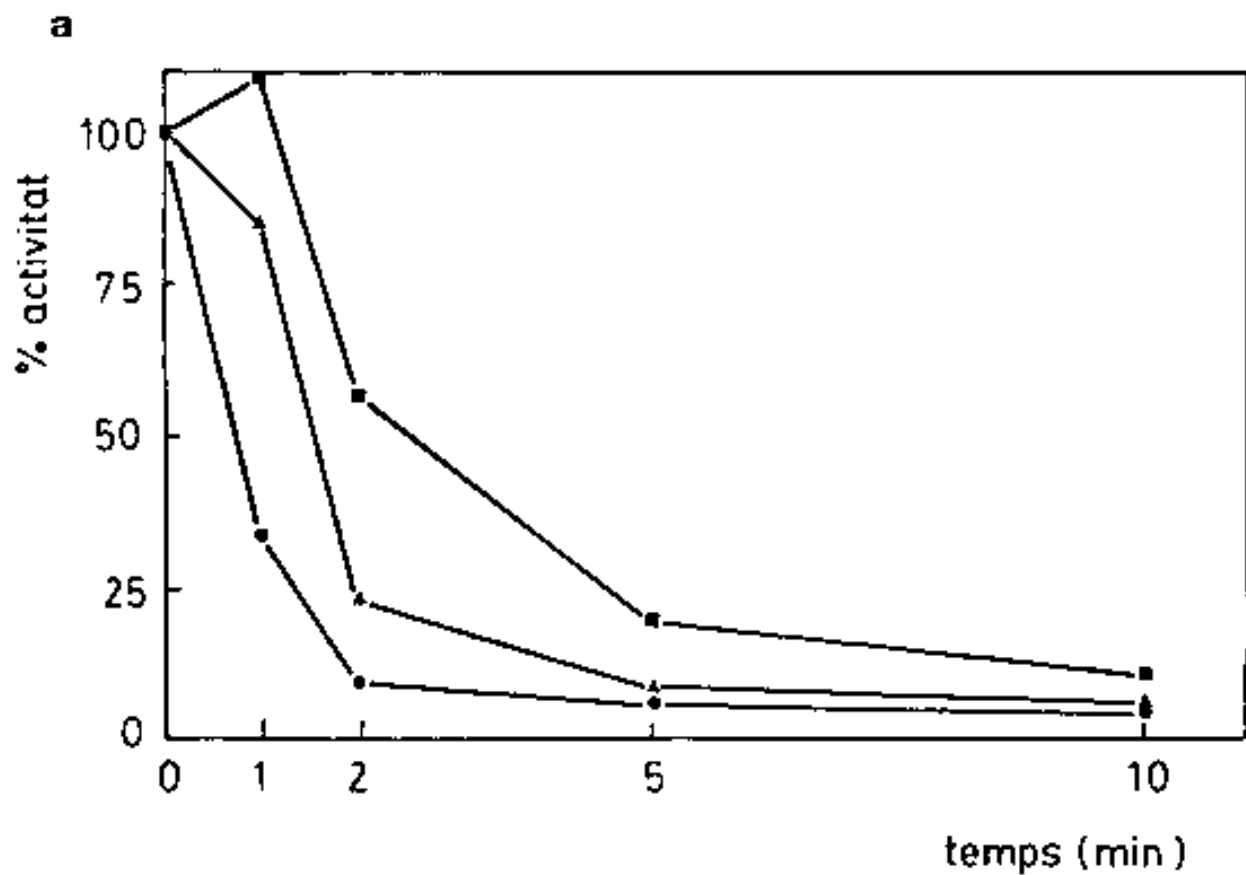
FIGURA 39 Corbes de desnaturalització tèrmica a 45°C de l'ALDH en homogenat de fetge i de placenta.

- Homogenat de fetge: Activitat ALDH de baixa Km, mesurada amb propanal 66µM (-■-), activitat ALDH total mesurada amb propanal 13,3 mM (-▲-), activitat ALDH d'alta Km, calculada per diferència de les activitats ALDH total i ALDH de baixa Km(-●-).
- Homogenat de placenta: activitat ALDH, mesurada amb propanal 13,3 mM (-○-) ( veure III. 2.5.4.) .

**FIGURA 40** Desnaturalització tèrmica de l'ALDH de placenta purificada a 45°C i 25°C (veure III. 2.5.4.). Activitat mesurada amb propanal 13,3 mM.

a) Corbes de desnaturalització tèrmica a 45°C de l'ALDH de placenta: sense agents estabilitzants(-●-), amb DDT 1 mM (-▲-), amb NAD<sup>+</sup> 0,5 mM (-■-).

b) Corba de desnaturalització tèrmica a 25°C de l'ALDH de placenta.



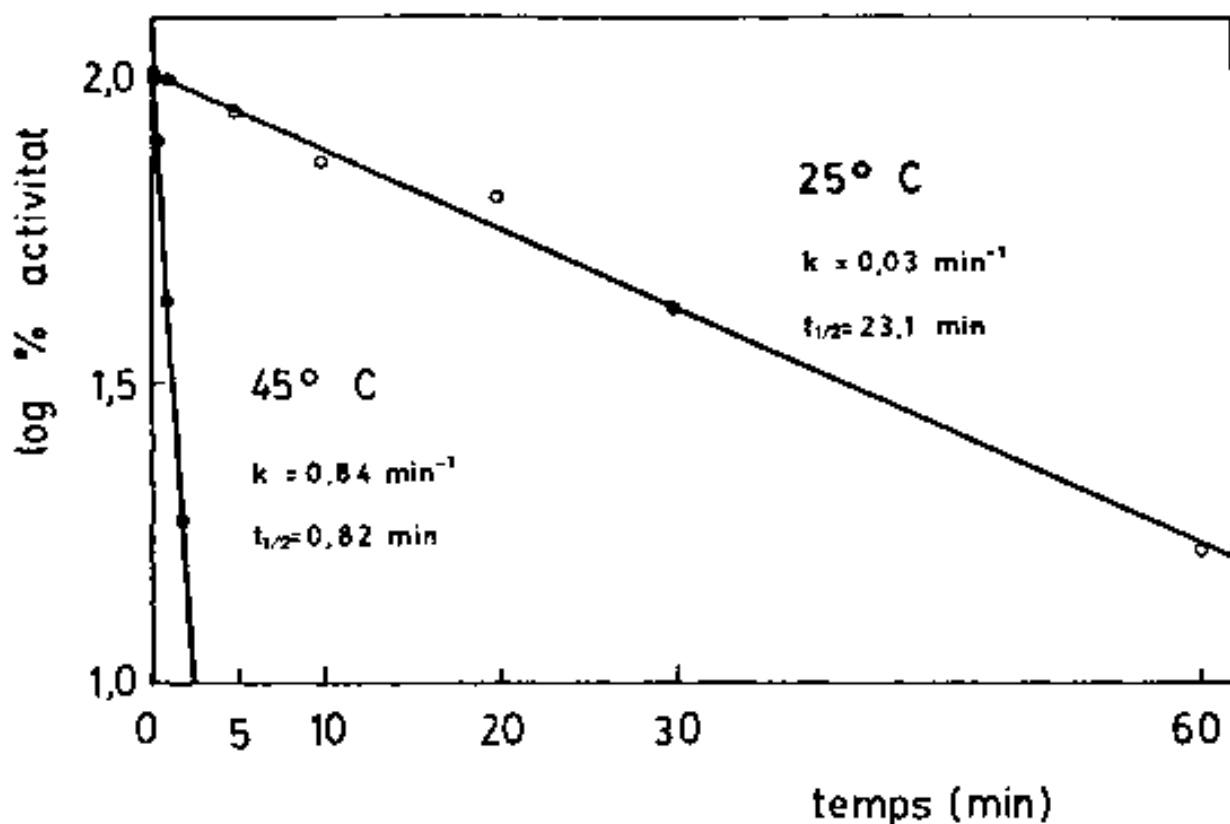


FIGURA 41 Desnaturalització tèrmica de l'ALDH de placenta purificada a 45°C i 25°C (continuació). Representació de log % activitat enfront del temps per a la determinació de k i  $t_{1/2}$ : 45°C (-●-) i 25°C (-○-).

Com es pot veure en la Fig. 40a, el NAD<sup>+</sup> i l'agent reductor DTT, a les concentracions usualment emprades, procuraren un efecte protector enfront de la inactivació per calor, sobretot durant els dos primers minuts d'incubació a 45°C. Aquesta protecció demostrava la importància de la interacció del coenzim amb el seu setí de fixació i del manteniment dels residus de cisteïna reduïts per a la conformació catalíticament activa. Ademés, suggeria que el NAD<sup>+</sup> s'uneix a l'enzim en absència de substrat.

Efectuant una nova representació de les dades de la Fig. 40a, en absència d'agents estabilitzants, i de la Fig. 40b, s'obtingué la Fig. 41, on es pogué calcular k (constant de desnaturalització tèrmica) i t<sub>1/2</sub> (temps mitjà de desnaturalització) a partir del pendent de la recta (veure III.2.3.). Així, a 45°C, k = 0,34 min<sup>-1</sup> i t<sub>1/2</sub> = 0,32 min. A 25°C la desnaturalització progressà molt més lentament, amb una k de 0,03 min<sup>-1</sup>, 30 vegades inferior, i un t<sub>1/2</sub> de 23 min.

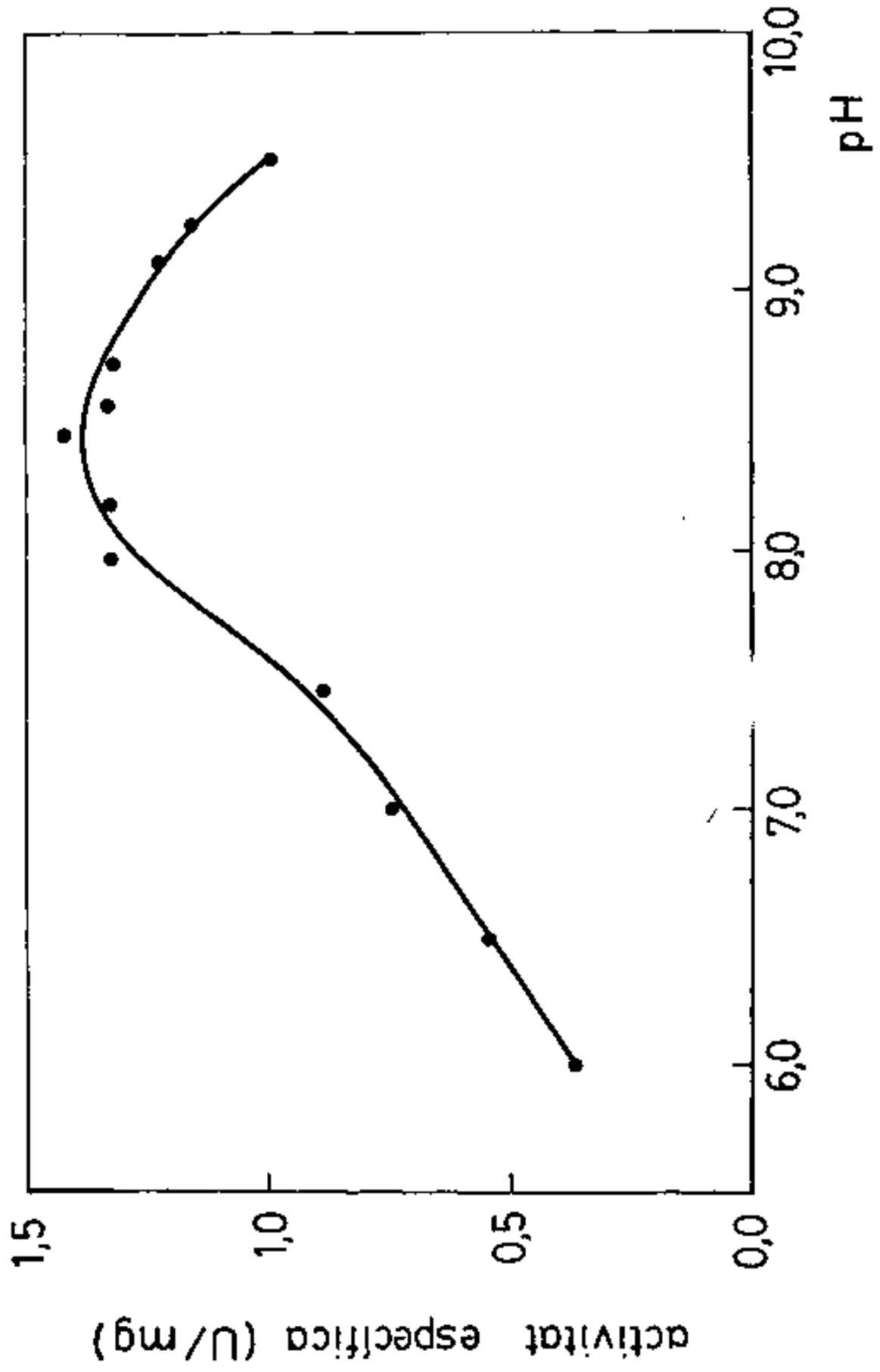
## 2.6. Caracterització cinètica de l'ALDH de placenta

### 2.6.1. pH òptim

El perfil d'activitat, mesurada amb propanal 13,3 mM (veure III.2.2.1.2.), enfront del pH del medi presentà un màxim a pH 8,35, similar al de les altres ALDH humanes (Fig. 42) (veure I.4.4.1.). El mateix pH òptim havia sigut observat en homogenat de placenta (dada no presentada).

A pH 7,0, l'enzim conservà encara el 50 % de l'activitat màxima. Quan s'emprà també glicina-NaOH 0,1 M, en lloc de pirofosfat sòdic-HCl 33 mM, per al rang de pH 9,25-10,0, es va produir una brusca davallada en l'activitat enzimàtica, de tal forma que a pH 9,25 l'activitat era pràcticament nul·la. En també glicina, l'activitat "background" en

**FIGURA 42** Perfil d'activitat de l'ALDH de placenta enfront del pH.  
pH 6,0 - 7,5 : tampó fosfat monossòdic-NaOH 33mM .  
pH 8,0 - 10,0 : tampó pirofosfat sòdic-HCl 33mM.





absència d'enzim era extraordinàriament elevada, suggerint que la reacció entre el propanal i el  $\text{NAD}^+$  es veu accelerada en alguna forma per la presència de glicina (veure III.2.1.5.2.).

### 2.6.2. Especificitat de coenzim

L'enzim utilitzà preferentment  $\text{NAD}^+$  com a coenzim, amb una  $K_m$  de 17  $\mu\text{M}$  a pH 8,5, una de les més baixes entre les presentades pels isoenzims de l'ALDH humana. També fou actiu amb  $\text{NADP}^+$ , però amb una  $K_m$  de 0,6  $\text{mM}$ : una velocitat màxima la meitat de la mostrada en presència de  $\text{NAD}^+$  (Taula XXV).

### 2.6.3. Especificitat de substrat

Per tal d'estudiar l'especificitat de substrat de l'ALDH de placenta, s'utilitzaren els aldehids que apareixen en la Fig. 43, ademés dels emprats en la caracterització cinètica de  $\chi$ -ADH (Fig. 28). Les mesures d'activitat es realitzaren a pH 8,5, en el qual l'enzim presenta pràcticament l'activitat màxima (veure IV.2.6.1.).

#### 2.6.3.1. Oxidació dels aldehids alifàtics

- Quasi bé tots els aldehids alifàtics investigats presentaren constants de Michaelis superiors a 1  $\text{mM}$  (Taula XXIV). Especialment, els valors observats per als aldehids alifàtics de cadena curta (20-100  $\text{mM}$ ) foren els més elevats de totes les ALDH estudiades fins el present. Així doncs, cal classificar l'ALDH de placenta com un isoenzim d'alta  $K_m$ , tal com es reflecteix en les propietats de l'homogenat del teixit (veure IV.2.1. i IV.2.5.4.). El formaldehid fou oxidat únicament a elevadíssimes concentracions de substrat. L'acetaldehid, amb una  $K_m$  de 22  $\text{mM}$ , no es pot considerar en absolut substrat fisiològic de l'enzim, malgrat l'elevat

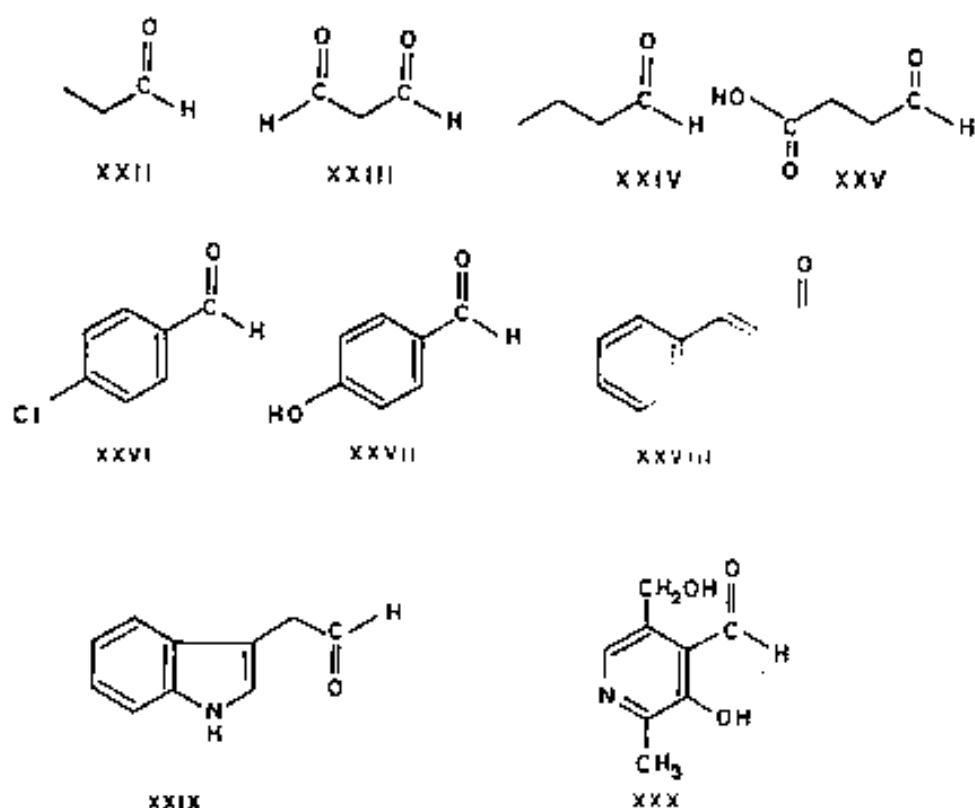


FIGURA 43 Estructures moleculars dels aldehyds  $\alpha$ -cetoats com a substrats de l'ALDH de placenta :  
 propanal (XXII), malondialdehid (XXIII), butanal (XXIV), semialdehid succínic (XXV), 4-clorobenzaldehid (XXVI), 4-hidroxibenzaldehid (XXVII), aldehid cinnàmic (XXVIII), indole-3-acetaldehid (XXIX), piridoxal (XXX).

TAULA XXIV. Constants cinètiques de l'ALDH de placenta humana a pH 8,5<sup>a</sup>.

Substrat <sup>b</sup>	[S] <sub>max</sub> (mM) <sup>c</sup>	K <sub>m</sub> o [S] <sub>0,5</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (M <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
formaldehid	200	110	180	1.600
acetaldehid	100	22	150	6.800
propanal	200	24	500	21.000
butanal	40	58	450	7.800
octanal	4	4,0	130	33.000
malondialdehid	20	8,8	33	3.700
semialdehid succínic	1	0,03	9,6	320.000

<sup>a</sup> Activitat mesurada en tampó pirofosfat sòdic-HCl 33 mM, pH 8,5, amb NAD<sup>+</sup> 0,5 mM, segons es descriu a III. 2.1.2.

<sup>b</sup> Les estructures moleculars d'alguns dels substrats apareixen en les Figs. 2B i 43.

<sup>c</sup> Concentració màxima de substrat atesa en l'assaig. En molts casos vingué limitada per la solubilitat del substrat.

valor de  $k_{cat}$  ( $180 \text{ min}^{-1}$ ). El propanal (XXII) fou també un dels millors substrats en termes de  $k_{cat}$ , pel que s'utilitzà en la determinació de l'activitat estàndard i en els estudis d'inhibició per substrat.

- En la cinètica realitzada amb propanal (XXII), l'enzim presentà inhibició per substrat a concentracions superiors a 20 mM, trobant-se el màxim d'activitat prop de 40 mM. Amb propanal 200 mM es detectà el 50 % de l'activitat màxima i el 20 % de la velocitat màxima teòrica ( $V_{max}$ ) (Fig. 44a). Els valors experimentals de  $v$  i  $[S]$  s'ajustaren a l'equació donada per Cleland (64) per a la inhibició per substrat (veure III.2.2.3.):

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

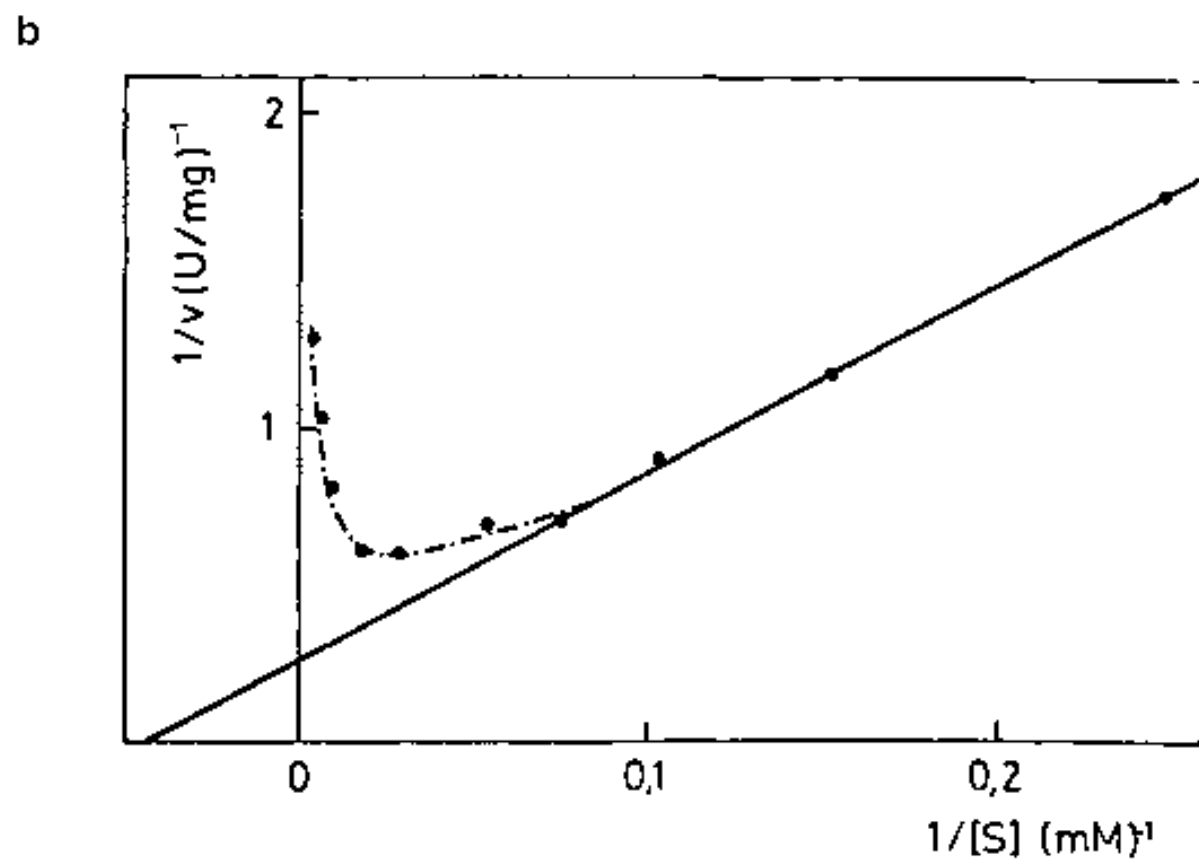
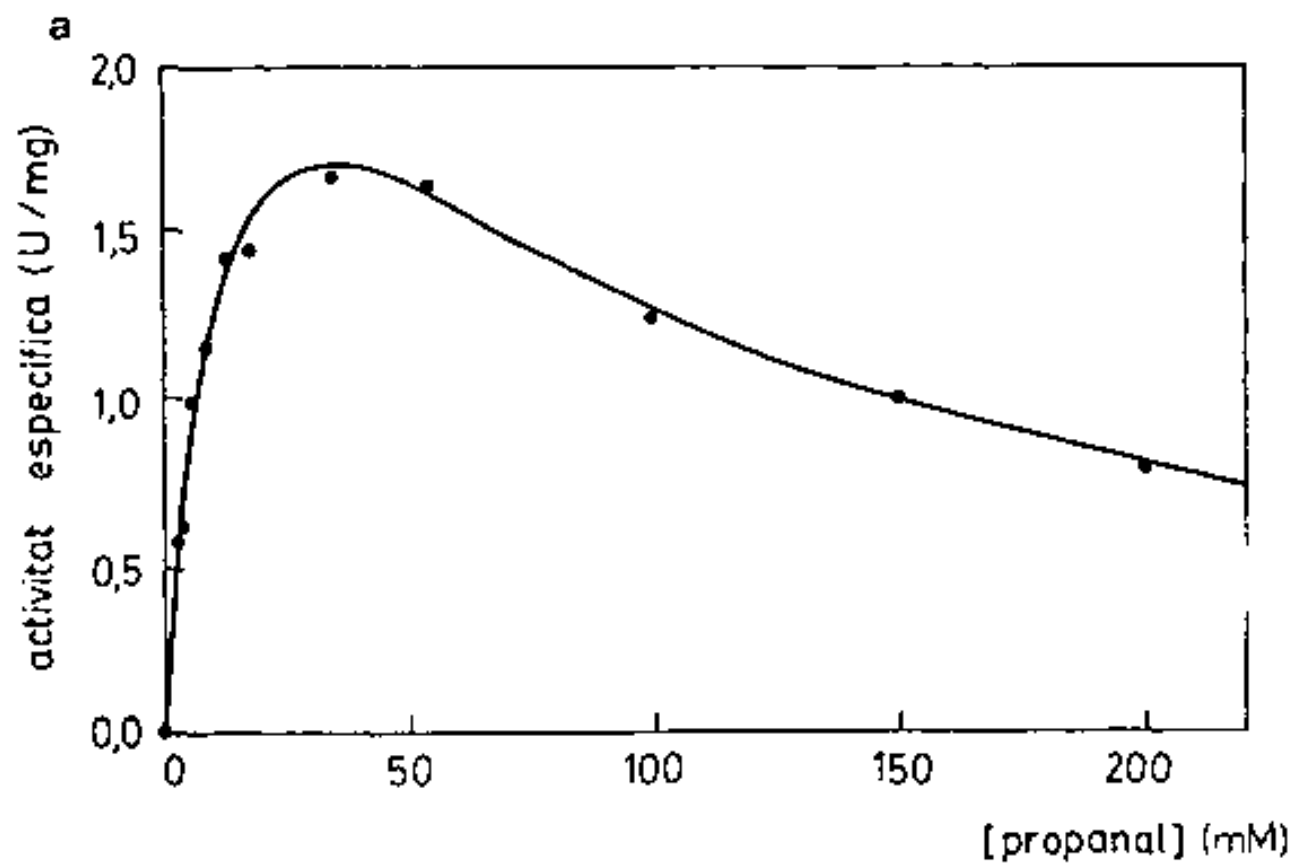
calculant-se els valors de  $K_m$ ,  $K_i$  i  $V_{max}$ , que foren iguals a 23,4 mM, 50,3 mM i 4,0 U/mg, respectivament. Valors aproximats de  $K_m$  i  $V_{max}$  havien sigut obtinguts de la representació de Lineweaver-Burk (Fig. 44b).

La inhibició per substrat observada podria ser deguda a diverses causes (64): Formació de complexos abortius del tipus enzim-NADH-propanal o enzim-propanal, inhibició inespecífica com a conseqüència de les elevades concentracions de substrat emprades (presència d'inhibidors contaminants en les solucions de propanal, variació de la constant dielèctrica del medi, etc.). Donada l'elevada reactivitat química del propanal no es pot descartar la unió covalent i irreversible de l'aldehid a residus d'aminoàcids situats en la superfície de l'enzim, ni la formació de complexos amb el  $\text{NAD}^+$ , que podria afectar directament a l'activitat enzimàtica. Així, quan la concentració de propanal fou de 200 mM, la velocitat de formació del complex propanal- $\text{NAD}^+$  fou unes 20 vegades superior que en presència de propanal 13,3 mM (veure III.2.1.5.2.). Per altra banda, malgrat la preparació acurada de les solucions de propanal (veure III.1.1.2.), durant l'emmagatzement podien haver-se format petites quantitats d'àcid carboxílic per oxidació, o de la forma hidratada de l'aldehid, que podrien actuar com a inhibidors de l'enzim (76).

Aquesta inhibició de l'ALDH a elevades concentracions de substrat s'havia observat anteriorment en homogenats del teixit, i també amb

FIGURA 44 Cinètica de l'ALDH de placenta amb propanal.

- a) Corba de saturació de l'enzim amb propanal.
- b) Representació de Lineweaver-Burk dels valors experimentals de  $v$  i  $[S]$  per al càlcul de  $K_m$  i  $V_{max}$  aparents.



acetaldehid i butanal com a substrats (dades no presentades). La inhibició per substrat es coneix també en altres formes de l'ALDH de mamífer (156) i en algunes deshidrogenases  $\text{NAD}^+$ -depenents, com els isoenzims  $\alpha$  i  $\beta_1, \beta_2$  de l'ADH (35), i la LDH (141).

- S'estudiaren també alguns dels productes resultants de l'oxidació dels substrats de l'ADH de placenta (veure IV.1.8.1.1.). La  $K_m$  per a l'octanal (XV) fou excessivament alta com per a eliminar eficientment el producte d'un dels millors substrats de l'ADH de placenta. Citral (XVI) i retinal (XVII), productes d'oxidació del geraniol i retinol respectivament, no foren oxidats en absolut per l'ADH de placenta (Taula XXIV). La presència de dobles enllaços en la cadena carbonada d'aquests aldehids no sembla afavorir la seva oxidació per part de l'enzim.

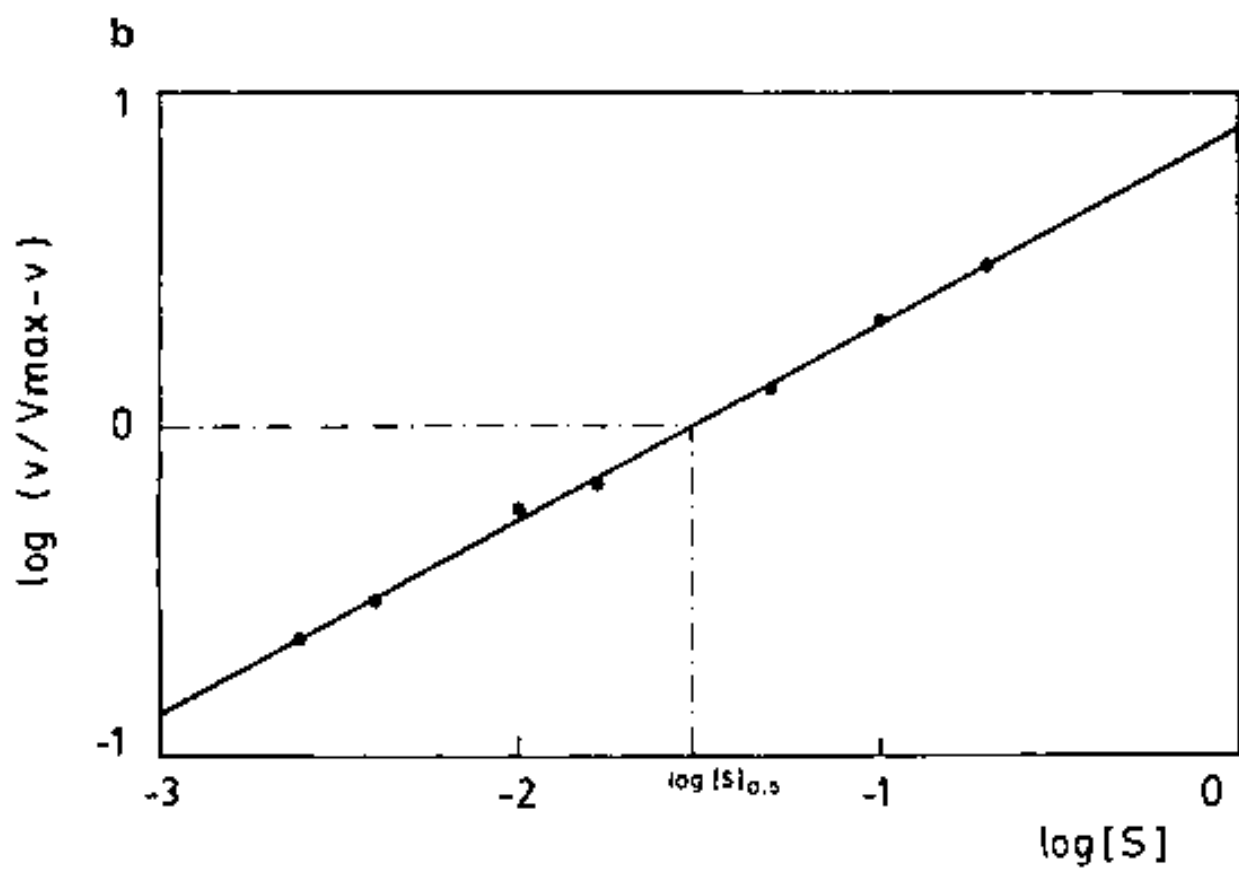
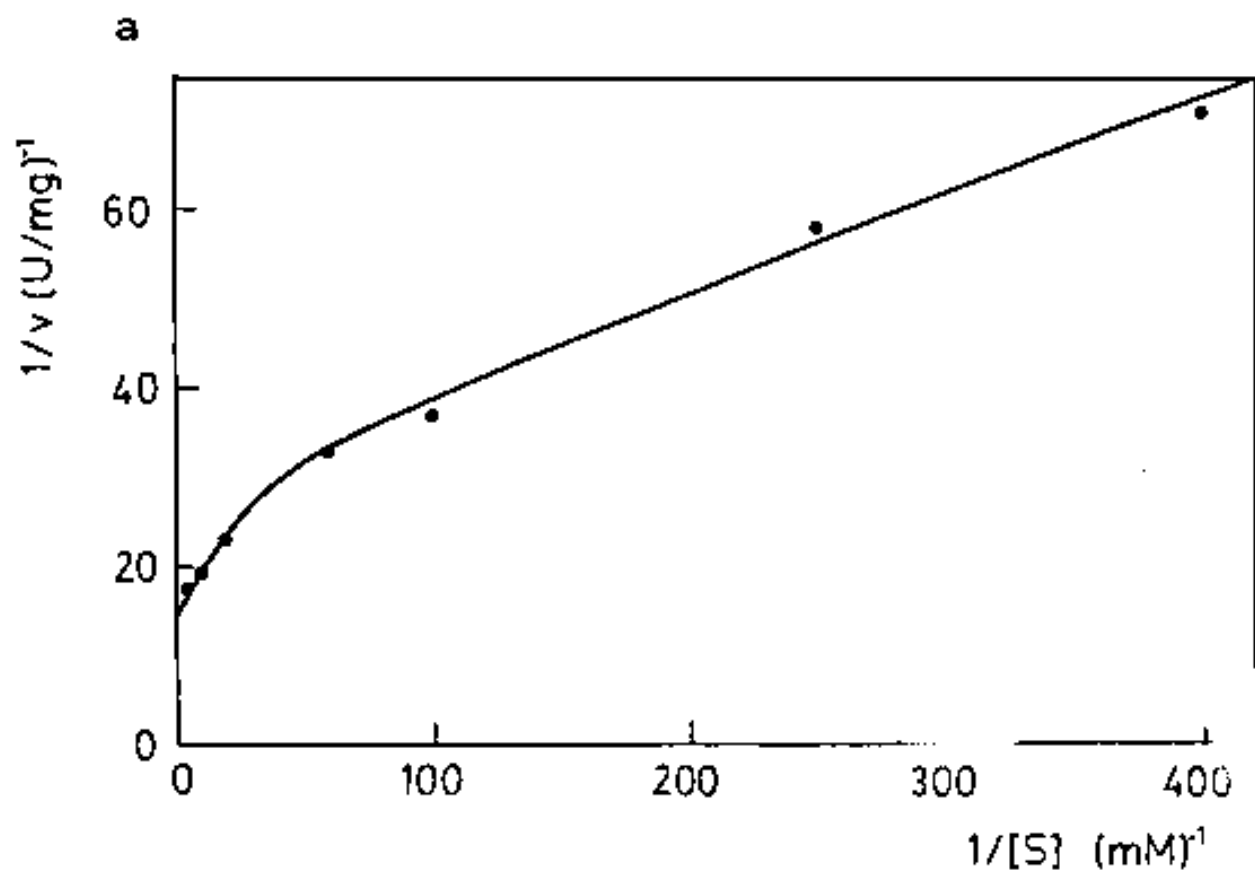
- El malondialdehid (XXIII), producte altament citotòxic resultant de la peroxidació dels lípids (veure V.5.2.), fou oxidat amb una  $k_{cat}$  de  $33 \text{ min}^{-1}$ , segurament per la seva similitud estructural amb el propanal. La seva  $K_m$  (8,8 mM) semblà però massa elevada per a una efectiva eliminació d'aquest compost, que en l'interior de la cèl·lula es troba en concentracions de l'ordre de  $10^{-6} \text{ M}$  (141).

#### 2.6.3.2. Oxidació del semialdehid succínic

L'únic aldehid de tots els examinats que presentà una  $K_m$  sensiblement inferior a  $10^{-3} \text{ M}$  fou el semialdehid de l'àcid succínic (XXV), metabolit de la via de l'àcid 4-aminobutíric (GABA). Malgrat la seva baixa  $k_{cat}$ , 50 vegades menor que la del propanal, l'enzim va exhibir una  $K_m$  de  $5 \mu\text{M}$  quan l'activitat es mesurà a baixa concentració de substrat ( $2,5\text{-}16,6 \mu\text{M}$ ). A alta concentració de semialdehid succínic ( $0,05\text{-}1 \text{ mM}$ ) s'observà una aparent activació per substrat, el que resultà en una cinètica bifàsica amb una segona  $K_m$  de  $49 \mu\text{M}$ , també força baixa (Fig. 45a). Amb tot això, el semialdehid succínic fou el més específic dels aldehids assajats ( $k_{cat}/K_m = 330.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

- FIGURA 45** Cinètica de l'ALDH de placenta amb semialdehid succínic.
- a) Representació de Lineweaver-Burk utilitzada per al càlcul de  $K_m$  i  $V_{max}$  aproximades a alta i baixa concentració de substrat.
  - b) Representació de Hill per al càlcul de  $n$  i  $[S]_{0,5}$ .





S'estudià, a continuació, amb més profunditat la cinètica no michaeliana presentada per l'ALDH de placenta enfront d'aquest substrat. Suposant un comportament cooperatiu entre les subunitats de l'enzim, es calculà el coeficient de Hill ( $h$ ), que resultà igual a 0,59, indicant cooperativitat negativa per a la cinètica de saturació amb semialdehid succínic (Fig. 45b). La constant de semisaturació ( $[S]_{0,5}$ ) fou de 30  $\mu\text{M}$  (veure III.2.2.4.). El semialdehid succínic fou l'únic substrat per al que l'enzim mostrà cooperativitat negativa. Altres isoenzims de l'ALDH, com ALDH II, presenten un comportament bifàsic, encara que enfront de acetaldehid i propanal, substrats per als quals l'ALDH de placenta mostra inhibició per substrat.

És interessant fer notar que els valors de  $[S]_{0,5}$  del semialdehid succínic (XXV) i de la  $K_m$  del corresponent aldehid alifàtic de 4 carbonis, butanal (XXIV), difereixen en més de 1.000 vegades. Aquest fenomen podria reflectir una especial configuració del centre actiu de l'enzim per a la fixació del substrat a través del grup carboxil del semialdehid (veure també IV.2.6.3.3.).

#### 2.6.3.3. Oxidació dels aldehids aromàtics

Els valors de  $K_m$  per als aldehids aromàtics foren molt similars entre si i, en general, menors que per als aldehids alifàtics (aproximadament, 1 mM), amb un valor de  $k_{cat}$  variable segons la naturalesa del grup substituent en l'anell benzènic (Taula XXV). Per al benzaldehid (XVIII), la  $k_{cat}$  fou extraordinàriament baixa (8,7  $\text{min}^{-1}$ ). Amb això, l'ALDH de placenta es distingia clarament dels isoenzims ALDH I i ALDH II, que presenten valors de  $K_m$  per al benzaldehid de l'ordre de 0,5  $\mu\text{M}$ , conservant entre el 30 i el 60 % de la velocitat màxima mesurada amb acetaldehid (Taula VIII).

L'oxidació del grup carbonil resultà afavorida per la presència d'un grup nitro en posició 3 de l'anell aromàtic, com en el 3-nitrobenzaldehid (XIX). En canvi, la presència d'un substituent de naturalesa polar en

TAULA XXV. Constants cinètiques de l'ALDH de placenta humana a pH 8,5 (continuació)<sup>a</sup>.

Substrat <sup>b</sup>	[S] <sup>màx</sup> (mM) <sup>c</sup>	K <sub>m</sub> (mM)	kcat (min <sup>-1</sup> )	kcat/K <sub>m</sub> (M <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )
benzaldehyd	10	0,6	8,7	15.000
4-clorobenzaldehyd	5	1,2	9,3	8.000
3-nitrobenzaldehyd	10	1,3	110	86.000
NAD <sup>+</sup> <sup>e</sup>	1,2	0,017	-	-
NADP <sup>+</sup> <sup>c</sup>	3,5	0,62	-	-

<sup>a</sup> Activitat mesurada en tampó pirofosfat sòdic-HCl 33 mM, pH 8,5, excepte en el casos indicats, NAD<sup>+</sup> 0,5 mM (veure III. 2.1.2.).

<sup>b</sup> Les estructures moleculars d'alguns dels substrats apareixen en les Figs. 28 i 43.

<sup>c</sup> Concentració màxima de substrat atesa a l'assaig. En molts casos vindrà limitada per la solubilitat del substrat.

<sup>d</sup> Activitat mesurada en tampó fosfat monossòdic-NaOH 33 mM, pH 7,5.

<sup>e</sup> Activitat mesurada amb propanal 13,3 mM.

TAULA XXVI. Aldehids amb els que no es detectà activitat ALDH<sup>a</sup>.

Substrat <sup>b</sup>	[S] màx (mM) <sup>c</sup>
citral	1
retinal	0,2
4-hidroxibenzaldehid	0,1
vainillina	33
aldehid cinnàmic	2
indole-3-acetaldehid	10
piridoxal	1

<sup>a</sup> Assaig realitzat en tampó pirofosfat-sòdic-HCl 33 mM, pH 8,5, NAD<sup>+</sup> 0,5 mM

<sup>b</sup> Les estructures moleculars dels possibles substrats apareixen en les Figs. 28 i 43.

<sup>c</sup> Concentració màxima de substrat atesa en l'assaig. En molts casos vingué limitada per la solubilitat del substrat.

posició 4 no va contribuir particularment a la catàlisi, com en el cas del 4-clorobenzaldehyd (XXVI), o bé la va impedir totalment, com en el cas del 4-hidroxibenzaldehyd (XXVII) o de la vainillina (XXI) (Taula XXVI). El 4-hidroxibenzaldehyd és substrat d'altres formes de l'ALDH de mamífer (262), i la vainillina posseeix una estructura similar a la d'alguns derivats de neurotransmissors, com el DOPAL, que és un bon substrat de l'isoenzim ALDH II (130). Per altra banda, no es detecta activitat enfront de l'aldehyd cinnàmic (XXVIII) (Taula XXVI), producte d'oxidació del millor substrat de l'ADH de placenta, l'alcohol cinnàmic (VIII) (veure IV.1.8.1.1.).

L'indole-3-acetaldehyd (XXIX), derivat del metabolisme de la serotonina, que ha sigut proposat com a substrat fisiològic d'ALDH I i ALDH II i d'altres formes de l'ALDH de mamífer (77, 305) per la seva baixa  $K_m$  i elevada eficiència catalítica (Taula VII), no fou oxidat per l'enzim. Finalment, el piridoxal (XXX), compost relacionat directament amb el cofactor fosfat de piridoxal, tampoc fou substrat de l'ALDH de placenta, probablement pel caràcter hidrofílic dels grups propers al grup carbonil (Taula XXVI).

#### 2.6.3.4. Inhibició de l'activitat ALDH amb 4-hidroxibenzaldehyd

El 4-hidroxibenzaldehyd, malgrat que no fou oxidat per l'ALDH de placenta, actuà en canvi com a potent inhibidor de l'activitat ALDH quan s'empraven propanal o semialdehyd succínic com a substrats. El grau d'inhibició va dependre del tipus de substrat i de les concentracions de substrat i d'inhibidor, però no de l'ordre en que s'afegien a la barreja de reacció. Així, amb 4-hidroxibenzaldehyd 100  $\mu\text{M}$ , l'activitat mesurada amb propanal 13,3 mM resultà inhibida en un 90 %, mentre que la mesurada amb semialdehyd succínic 0,1 mM va ser inhibida en un 67 %. No fou possible, però, la determinació del tipus d'inhibició, degut a la cinètica no michaeliana que apareix amb aquests substrats (veure IV.2.6.3.2.).

Per altra banda, les dades experimentals suggerien que el 4-hidroxibenzaldehid es fixava fortament a l'enzim, probablement en el centre actiu, en competició amb el substrat. Aquest fet, juntament amb l'anàlisi de les estructures moleculars del 4-hidroxibenzaldehid (XXVII) i del semialdehid succínic (XXV), recolzaven la suposició de la participació dels grups polars d'aquestes molècules en la seva interacció amb el seti catalític de l'enzim (veure IV.2.6.3.2.).

#### 2.6.4. Activitat esterasa de l'ALDH de placenta

Ademés de l'activitat deshidrogenasa enfront dels aldehids, l'ALDH de placenta mostra activitat esterasa enfront dels esters aromàtics, acetat de 4-nitrofenil i acetat de 1-naftil, anàlogament als isoenzims de baixa Km de l'ALDH (105, 274, 307). Aquesta característica de l'isoenzim de placenta suggereix un mecanisme catalític similar al postulat per a les ALDH de baixa Km, el qual explica la coexistència d'ambdós tipus d'activitat en el mateix centre actiu. Probablement també en el cas de l'ALDH de placenta, la hidròlisi dels esters i l'oxidació dels aldehids passarien per la formació d'un intermedi covalent (veure I.4.2.).

Els valors de Km per als dos esters estudiats (aproximadament, 1 mM) (Taula XXVII), foren molt més alts que els dels isoenzims ALDH I i ALDH II enfront de l'acetat de 4-nitrofenil, 3,6  $\mu$ M (274) i 1,5  $\mu$ M (307), respectivament. La velocitat màxima observada per a la hidròlisi de l'acetat de 4-nitrofenil fou de 0,42 U/mg, valor comparable a les 0,7 U/mg mesurades per a la reacció de deshidrogenació a pH 7,0 (amb propanal 13,3 mM). Un comportament similar es dona en els isoenzims ALDH I i ALDH II, en que les velocitats màximes d'hidròlisi són de 0,13 U/mg (105) i 0,06 U/mg (307), respectivament, lleugerament inferiors a les velocitats màximes de deshidrogenació. A diferència dels isoenzims de baixa Km, però, l'enzim de placenta no va mostrar estimulació de l'activitat esterasa en presència de  $\text{NAD}^+$  0,5 mM, el que indicava diferències substancials amb les altres formes de l'ALDH quant al seti de fixació del  $\text{NAD}^+$  i la seva influència sobre el centre actiu.

TABLA XXVI]. Constants cinètiques de l'ALDH de placenta humana (activitat esterasa) <sup>a</sup>.

Substrat	[S]màx (mM) <sup>b</sup>	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (M <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
acetat de 4-nitrofenil <sup>c</sup>	2	0,4	50	150.000
acetat de 1-naftil <sup>d</sup>	2	1,9	120	61.000

<sup>a</sup> Veure III. 2.1.3.

<sup>b</sup> Concentració màxima de substrat alesa en l'assaiq. En molts casos vingué limitada per la solubilitat del substrat (veure III. 1.1.2.4.)

<sup>c</sup> Activitat mesurada amb propanal 13,3 mM.

<sup>d</sup> Activitat mesurada en tempó pirofosfat sòdic-HCl 33mM, pH 8,5.

### 2.6.5. Inhibició de l'ALDH de placenta amb disulfiram

Quan es va incubar ALDH de placenta purificada (17,7 nM), lliure de DTT (veure III.2.2.6.3.), en presència de disulfiram 40 µM, durant 10 min a 25°C, l'activitat mesurada amb propanal 13,3 mM va resultar inhibida en un 99,6 % (veure I.4.4.1.4.). En canvi, quan el tampó d'incubació (pirofosfat sodic-HCl 33 mM, pH 8,5) contenia, además, NAD<sup>+</sup> 0,5 mM o DTT 1 mM, l'enzim conservà el 100 % de l'activitat inicial. Quan DTT 1 mM s'afegia a la barreja de reacció després de la incubació amb disulfiram 40 µM, només es recuperava el 10 % de l'activitat inicial.

L'efecte protector proporcionat pel NAD<sup>+</sup> es podria explicar per la presència d'algun o alguns residus de cisteïna, essencials per a l'activitat o per al manteniment de la configuració activa, propers al seti d'interacció del coenzim. La unió del NAD<sup>+</sup> a l'enzim impediria la reacció del disulfiram amb aquests residus. Per altra banda, es recolzava la hipòtesi de la formació del complex enzim-NAD<sup>+</sup> en absència de substrat (veure IV.2.5.4.). L'efecte protector de l'agent reductor DTT, afegit en excés al tampó d'incubació, es podria interpretar per la seva reacció amb el disulfiram lliure, reduint-el completament a dietilditiocarbamat, similarment al que succeeix en la reacció dels grups tiol de les cisteïnes amb el disulfiram (veure I.4.4.1.4.).



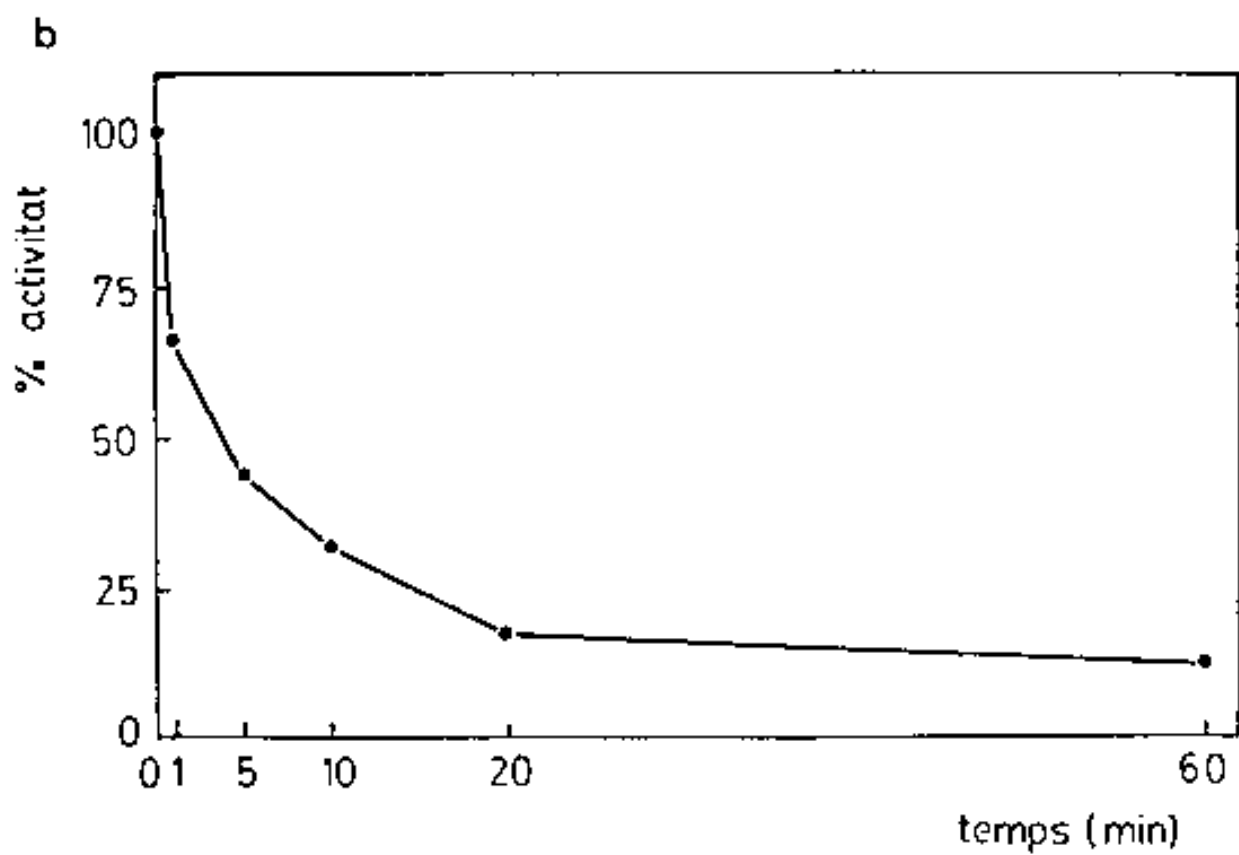
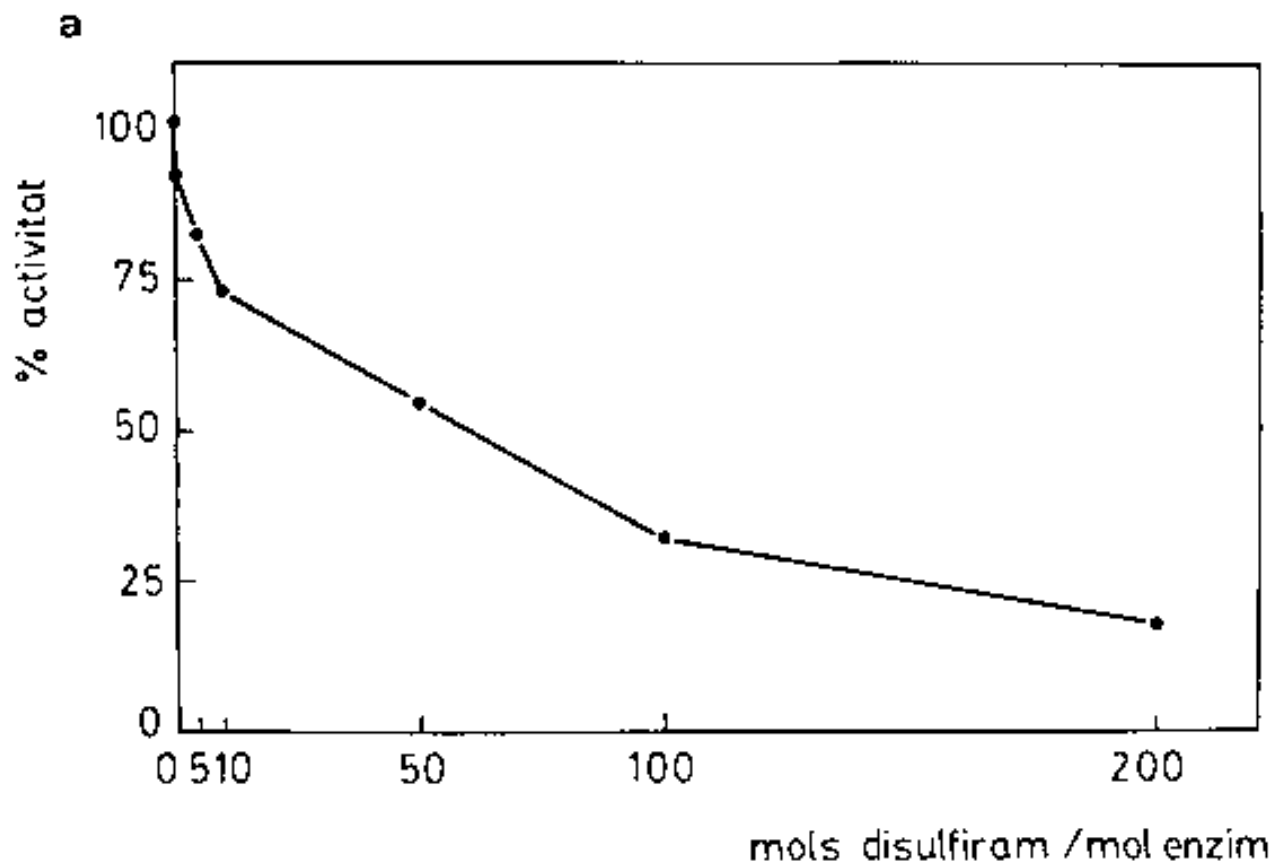
El dietilditiocarbamat format, a diferència del disulfiram, seria incapaç de reaccionar amb els residus de cisteïna i, per tant, l'enzim restaria actiu (177). Per altra banda, el DTT no podria revertir els complexos covalents ja formats entre el disulfiram i els grups tiols.



Per tal d'investigar si la reacció de l'enzim amb el disulfiram seguia una estequiometria determinada, s'estudia el grau d'inhibició atès en funció de la concentració de disulfiram, després de 10 min d'incubació a 25°C. Estudis previs realitzats amb l'enzim pur havien aconsellat no perllongar les incubacions a 25°C més de 10 min, degut a la pèrdua d'activitat enzimàtica per desnaturalització tèrmica (veure IV.2.5.4.). 60 molècules de disulfiram per molècula d'enzim (disulfiram 0,5 µM) causaren un 50 % d'inhibició en l'activitat (Fig. 46a), el que indicava una mitjana susceptibilitat de l'ALDH de placenta al disulfiram, similar a la d'alguns isoenzims mitocondrials de l'ALDH de mamífer (97, 117, 177, 275). En aquest sentit, l'isoenzim citoplasmàtic ALDH II és molt més sensible al disulfiram, doncs és completament inhibït a una relació molar de disulfiram de 4:1. En canvi, contràriament a l'ALDH de placenta, la seva activitat es restaura completament al afegir l'agent reductor 2-mercaptoetanol 12 mM a la barreja de reacció (309). Aquest diferent comportament entre ALDH II i l'ALDH de placenta indicaria per a aquesta última un mecanisme d'inhibició per disulfiram diferent del proposat per Vallari i Pietruszko (308) per a ALDH II, potser més semblant al mecanisme general d'acció del disulfiram quan és emprat a elevades concentracions, postulat per Neims i col. (230) (veure I.4.4.1.4.). El disulfiram modificaria l'ALDH de placenta, quedant unit covalentment a l'enzim, en lloc de promoure únicament la formació de ponts disulfur entre cisteïnes properes.

Per altra banda, donada la irreversibilitat de la modificació, s'estudià la cinètica de la inhibició de l'ALDH de placenta amb disulfiram, emprant una relació molar constant d'inhibidor de 100:1 (disulfiram 0,84 µM), obtenint-se la corba de la Fig. 46b. Paral·lelament, s'efectuaren els controls adequats a 25°C, en absència de disulfiram. La inactivació per disulfiram no fou instantània, però sí bastant ràpida. Al cap de 4 min d'incubació a 25°C, l'activitat de l'enzim havia disminuït ja en un 50 % respecte de l'activitat control. Durant els 10 primers minuts, la velocitat de la inhibició fou molt més ràpida que en els minuts posteriors. Les incubacions a temps llarg, podrien facilitar la reacció del disulfiram amb residus de cisteïna normalment inaccessibles,

- FIGURA 46** Inhibició de l'ALDH de placenta amb disulfiram  
(veure III. 2.2.7.3.)
- a) Representació del percentatge d'activitat residual enfront de la relació molar disulfiram:enzim, després d'incubar durant 10 min.
  - b) Cinètica de la inhibició de l'ALDH de placenta amb disulfiram, a una relació mol disulfiram: mol d'enzim de 100:1. El % d'activitat es calculà respecte a l'enzim control, incubat en les mateixes condicions, a 25°C, sense disulfiram.



a causa de la desestabilització de l'enzim pel calor. Això explicaria la pèrdua progressiva d'activitat, fins arribar a la inhibició total a les 3 h.

#### 2.6.6. Efecte dels ions divalents sobre l'activitat ALDH

La presència de diferents concentracions d'ions  $Mg^{2+}$  en la barreja de reacció, des de 0,5 mM fins a 4 mM, no va afectar l'activitat de l'ALDH de placenta, mesurada amb propanal 13,3 mM a pH 7,0. Aquest comportament contrastava amb el dels isoenzims ALDH I i ALDH II de fetge que, en presència de similars concentracions de cations divalents, la seva activitat es veu estimulada i inhibida, respectivament (310, 311).

#### 2.7. Localització intracel·lular de $\chi$ -ADH i de l'ALDH de placenta

Per tal de conèixer la localització precisa en l'interior de la cèl·lula dels enzims objecte d'aquest estudi, s'aprofitaren els avantatges de tipus metodològic que comporta el treball amb teixit placentari (veure III.4.1. i IV.1.9.). Es realitzaren, doncs, dos fraccionaments subcel·lulars utilitzant teixit fresc procedent de dues placentes diferents, i es mesuraren les activitats ADH, ALDH i d'enzims marcadors específics dels diferents compartiments subcel·lulars (veure III.4.1.). Els resultats obtinguts apareixen en la Taula XXVIII i la Fig. 47.

L'activitat ADH, mesurada amb octanol 1,0 mM, es localitzà exclusivament en la fracció citosòlica, amb més d'un 93 % de l'activitat total (Taula XXVIII) i una activitat específica relativa de 1,49 (Fig. 47), confirmant el resultat obtingut en l'experiment preliminar (veure IV.1.9.).  $\chi$ -ADH es revelava com a un excel·lent enzim marcador de la fracció soluble.

TAULA XXVIII. Distribució intracel·lular de l'ADH, ALDH i enzims marcadors en la placenta humana<sup>a</sup>.

Enzim <sup>b</sup>	Activitat total <sup>c</sup> (N+E) (mU/g de teixit)	% activitat total					Rendiment <sup>d</sup>
		M	M	P	S		
ADH	14,47	1,6	0,0	0,0	93,5	95,1	
ALDH	8,85	8,3	58,5	5,8	40,1	112,7	
GDH	319,80	16,0	52,4	13,4	6,4	88,7	
MAO	1,29	0,0	58,3	10,8	5,6	80,4	
NADPH-cit C red	229,10	13,9	25,8	43,2	13,5	96,4	
LDH	6.522,00	4,2	0,9	1,8	78,8	85,7	
Proteïna		36,0	7,4	8,2	62,6	114,2	
Concentració (N+E) (mg/g de teixit)							

<sup>a</sup> Els valors presentats són la mitjana de dos experiments diferents. Fraccions: N, nuclear; E, extracte citoplasmàtic; M, mitocondrial; P, microsomal; S, sobrenedant final o citosol. E fou el sobrenedant de la primera centrifugació. Pel fraccionament de E es van obtenir N, P i S (veure III. 4.1.1.)

<sup>b</sup> ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDH, aldehid deshidrogenasa (ALDH total); GDH, glutamat deshidrogenasa; MAO, monoamino oxidasa; NADPH-cit C red, NADPH-citocrom C reductasa; LDH, lactat deshidrogenasa.

<sup>c</sup> Les activitats enzimàtiques es mesuraren tal com s'explica a III. 4.1.4.

<sup>d</sup> Rendiment = (N+M+P+S)/(N+E). N+E = 100 % d'activitat.

Quant a l'ALDH, més d'un 60 % de l'activitat mesurada amb propanal 13,3 mM es mostrà clarament associada amb les fraccions particulades, majoritàriament mitocondrials. De l'activitat ALDH mitocondrial, més d'un 40 % aparegué oclosida o s'hagué d'alliberar mitjançant tractament amb el detergent Triton X-100 al 1 % (en les condicions del fraccionament), el que podria indicar la possible unió de l'enzim mitocondrial a membranes (304). En les condicions rutinàries d'homogenització (veure III.1.4.1.), l'addició de Triton X-100 no incrementava els valors d'activitat ALDH. El citosol també presentà una activitat considerable (40,1 %) que no sembla provenir de contaminació mitocondrial, tal com ho indicà la baixa recuperació dels enzims marcadors glutamat deshidrogenasa (GDH, matriu mitocondrial) i monoamino oxidasa (MAO, membrana mitocondrial externa) en el sobrenedant final (Taula XXVIII). Malgrat que el teixit placentari es rentà amb tampó isotònic per tal d'eliminar en el possible la sang residual, part de l'activitat citosòlica observada podria provenir dels eritròcits (veure IV.2.1.).

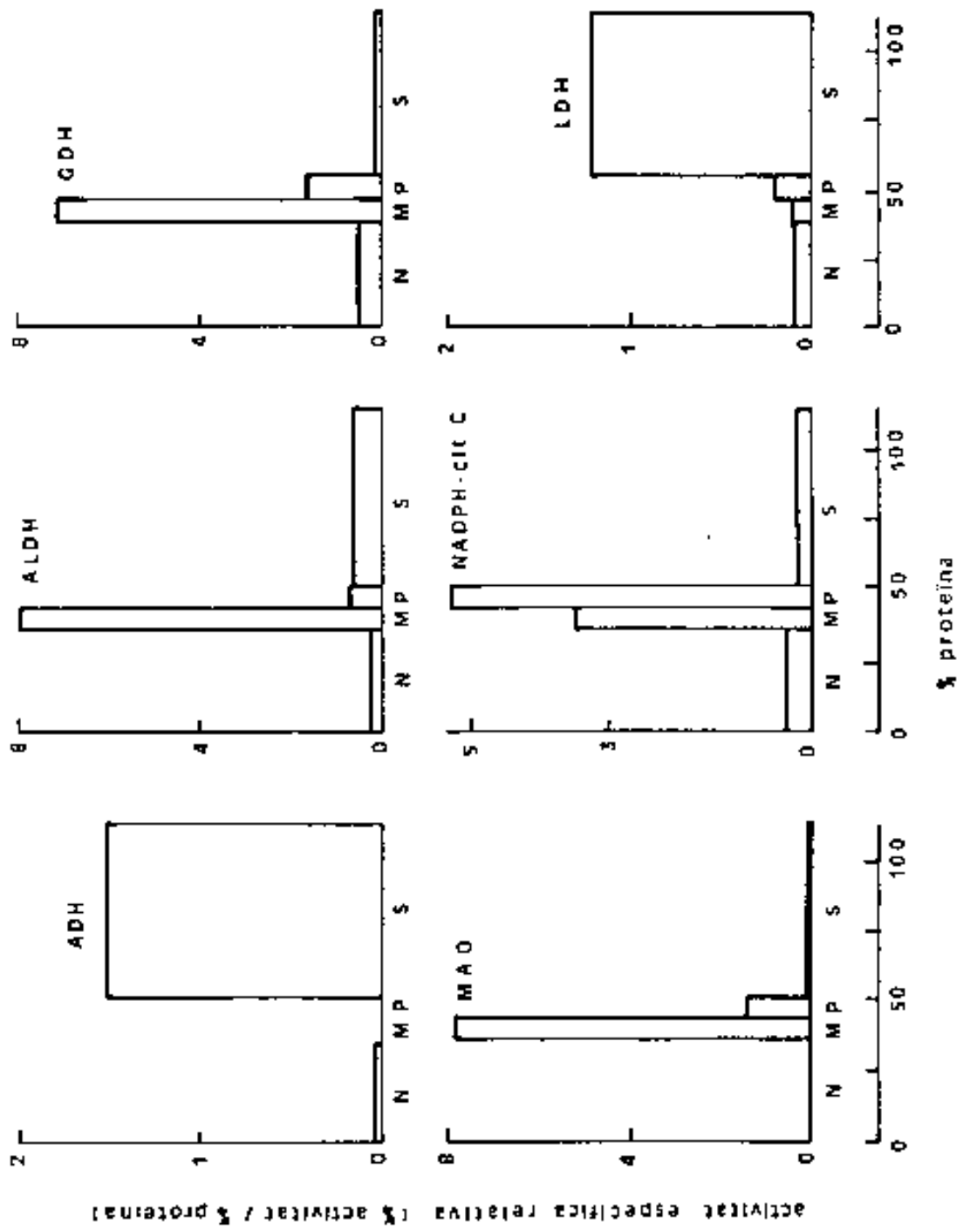
La completa homogenització del teixit i puresa de les fraccions subcel·lulars es veurà dificultada per l'elevada quantitat de teixit conjuntiu en la placenta. Així, les activitats enzimàtiques detectades en la fracció nuclear tindrien el seu origen en les restes de cèl·lules o fraccions no completament disgregades durant l'homogenització. La considerable recuperació d'activitat GDH, marcador mitocondrial, en la fracció nuclear (16 %) demostrà que els mitocondris contaminarien aquesta fracció. Amb això, podem concloure que l'activitat ALDH detectada en la fracció nuclear (11,9 %) té també probablement un origen mitocondrial.

Els anteriors resultats són comparables als obtinguts també en placenta humana per Kouri i col. (181), que trobaren més del 50 % de l'activitat ALDH en mitocondris, encara que utilitzant acetaldehid com a substrat. Si es refereixen les dades de la Taula XXVIII a concentració de proteïna, és la fracció mitocondrial la que posseeix una activitat específica relativa més elevada per a l'ALDH, amb un valor de 7,91 (Fig. 47).

**FIGURA 47** Activitat específica relativa de l' ADH, ALDH i d'enzims marcadors en les diferents fraccions subcel·lulars de la cèl·lula placentària.

Enzims: ADH, alcohol deshidrogenasa ( $\chi$ -ADH) ; ALDH, aldehyd deshidrogenasa (ALDH total) ; GDH, glutamat deshidrogenasa; MAO, monoamino oxidasa; NADPH-cit C red, NADPH-citocrom C reductasa; LDH, lactat deshidrogenasa.

Fraccions: N, nuclear ; M, mitocondrial; P, microsomal; S, sobrenedant final o citosol.





L'activitat ALDH mesurada amb  $\text{NADP}^+$  com a coenzim va exhibir la mateixa distribució que l'activitat mesurada amb  $\text{NAD}^+$  (dades no presentades). En la fracció microsomal no es detectà activitat amb  $\text{NADP}^+$ , el que indicà l'absència de la típica forma microsomal d'alta  $K_m$  i activa amb  $\text{NADP}^+$ , detectada en altres espècies (275). L'activitat de baixa  $K_m$ , mesurada amb propanal  $66 \mu\text{M}$ , fou pràcticament indetectable en totes les fraccions, a excepció de la fracció citosòlica, on representà un 11 % de l'activitat ALDH total.

**CAPITOL V**

**DISCUSSIO**

## Capítol V : DISCUSSIÓ

### 1. COMPARACIÓ DE L'ADH DE PLACENTA AMB L'ISOENZIM $\chi$ -ADH DE FETGE I AMB ISOENZIMS ANÀLEGS PRESENTS EN ALTRES ESPÈCIES

#### 1.1. L'ADH de placenta presenta propietats similars als isoenzims de l'ADH de mamífer

En la Taula XXIX es comparen les propietats observades per a l'ADH de placenta i les propietats generals de les ADH de mamífer. Quant a les propietats físico-químiques de l'enzim de placenta, el pes molecular total, prop de 80.000 dalton, i l'estructura dimèrica, així com el contingut en zinc i la susceptibilitat a la inhibició per agents quelants de metalls, són característiques de totes les ADH de mamífer estudiades fins el present. La inhibició de l'activitat amb agents quelants de metalls, juntament amb la presència de 2 àtoms de zinc per subunitat, indica que al menys un dels àtoms de zinc és imprescindible per a l'activitat enzimàtica, i que probablement està implicat en el mecanisme catalític de l'enzim (veure I.32.). Algunes propietats cinètiques com el pH òptim per a l'oxidació dels alcohols, l'especificitat de coenzim, la participació d'interaccions hidrofòbiques en la fixació del substrat, i el mecanisme cinètic seqüencial ordenat BiBi, amb la unió del coenzim prèvia a la del substrat, són també comunes a quasi totes les ADH de mamífer. Malgrat tot, algunes característiques cinètiques són peculiars de l'ADH de placenta.

#### 1.2. L'ADH de placenta és idèntica a l'isoenzim $\chi$ -ADH de fetge

La mobilitat electroforètica de l'ADH de placenta, d'acord amb un baix punt isoelèctric, és molt diferent de la majoria dels isoenzims de

TAULA XXIX Comparació de les propietats moleculars i cinètiques de l'ADH de placenta i l'ADH de mamífer.

Propietat	ADH placenta	ADH mamífer <sup>a</sup>
pes molecular dímer	74.000	~ 80.000
pes molecular monòmer	37.000	~ 40.000
Zn ( àtoms/molècula)	4,08	4
inhibició amb agents quelants	sí	sí
coenzim	NAD <sup>+</sup> (H)	NAD <sup>+</sup> (H)
pH òptim d'oxidació	10,8	10,0
activitat pH10,0 / activitat pH 7,5	~ 20	~ 2
mecanisme cinètic	seqüencial ordenat BiBi	seqüencial ordenat BiBi
mobilitat electroforètica a pH 7,6	anòdica	catòdica
saturació amb etanol	no	sí
especificitat de substrat	restringida (alcohols cadena llarga)	molt àmplia
inhibició amb 4-metilpirazole 12 mM	no	sí

<sup>a</sup> Propietats generals dels isoenzims catòdics de l'ADH en diverses espècies de mamífer.

mamífer més estudiats, tots ells catòdics. En canvi, és idèntica a la de l'isoenzim  $\chi$ -ADH, últim dels isoenzims de l'ADH descoberts en fetge (239, 319). L'ADH de placenta humana presenta ademés propietats cinètiques diferents de la dels isoenzims de les classes I i II de fetge, com la manca d'una cinètica de saturació amb etanol, substrat més emprat per a la caracterització de l'ADH, o d'inhibició amb 4-metilpirazole, inhibidor clàssic de l'ADH (Taula XXIX). Les seves propietats són idèntiques, però, a les de  $\chi$ -ADH de fetge, descrites per Parés i Vallee (239) i Wagner i col. (319), podent-se afirmar sense dubtes que es tracta del mateix isoenzim (veure IV.1.7.).

### 1.3. $\chi$ -ADH és l'únic isoenzim de l'ADH present en placenta

A diferència del fetge, que posseeix les tres classes d'isoenzims de l'ADH, la placenta només presenta l'isoenzim  $\chi$ -ADH, com ho demostren l'anàlisi de l'homogenat del teixit per electroforesi en gel de midó i el perfil d'elució de la cromatografia en DEAE-cel·lulosa. Ademés, les propietats singulars de  $\chi$ -ADH es reflecteixen clarament en l'homogenat de placenta, pràcticament inactiu a baixes concentracions d'etanol, i són les determinants de la pràcticament nul·la capacitat de metabolització d'etanol d'aquest òrgan a pH fisiològic (veure IV.1.1.).

$\chi$ -ADH és, doncs, l'únic isoenzim de l'ADH present en placenta humana. La concentració d'aquest isoenzim en placenta és de 5 mg/Kg de teixit (Taula XIII), molt baixa si la comparem amb els 100 mg de  $\chi$ -ADH/Kg de teixit, aproximadament, que s'estima hi ha en el fetge (239, 319). Per altra banda, en cap de les placentes estudiades no hem detectat variants al·lèliques de  $\chi$ -ADH, d'acord amb el descrit en fetge per altres autors (5, 239). En aquest sentit, no s'ha observat mai  $\chi_2$ -ADH en absència de  $\chi_1$ -ADH, ni viceversa, el que fa suposar que una banda electroforètica deriva de l'altra com a conseqüència d'una modificació posttraduccional (5). No existeix, doncs, variabilitat isoenzimàtica en la població, pel que la placenta difícilment podria donar compte de la diferent susceptibilitat dels fetus enfront de l'etanol ingerit per la mare.

Igualment, queden descartades hipotètiques anàlisis rutinàries de la placenta, teixit d'origen fetal, per a la determinació de la dotació isoenzimàtica del futur nadó.

Cal afegir que la placenta no és l'únic òrgan que conté un sol o només alguns dels isoenzims hepàtics. Així, els isoenzims amb subunitats  $\beta$  són els únics, ademés de  $\xi$ -ADH, que existeixen en pulmó, pell i arrel de cabell, mentre que els isoenzims amb subunitats  $\gamma$  són únics, juntament amb  $\chi$ -ADH, en estómac, intestí i ronyó de fetus (veure 1.3.5.1.2.).  $\xi$ -ADH és també probablement l'únic isoenzim present en fetge durant les primeres etapes del desenvolupament fetal (veure 4.1.8.). D'altres isoenzims, com  $\pi$ -ADH, són específics d'un òrgan determinat, en aquest cas el fetge (85). Aquesta desigual distribució tissular suggereix que els isoenzims podrien jugar papers metabòlics específics en cada un d'aquests òrgans.

#### 1.4. $\chi$ -ADH és l'isoenzim de l'ADH amb una especificitat de substrat més restringida

En comparació als isoenzims de les classes I i II de l'ADH humana, la gama de possibles substrats de  $\chi$ -ADH (classe III) apareix molt restringida. Les Taules XXX i XXXI són molt reveladores en aquest aspecte, al recollir les constants d'especificitat,  $k_{cat}/K_m$ , de les tres classes d'isoenzims per als substrats més representatius. Metanol, 1,2-etanodiol i ciclohexanol, entre els alcohols, i ciclohexanona, entre els compostos carbonílics, no són substrats de  $\chi$ -ADH en absolut. La diferència de comportament més significativa entre els isoenzims es produeix enfront dels compostos aromàtics alcohol benzílic i benzaldehid. En les classes I i II, aquests són els substrats per als quals les relacions  $k_{cat}/K_m$  són de les més elevades, i per tant, es troben entre els substrats més específics.  $\chi$ -ADH, en canvi, els oxida molt pòbrament. L'escassa activitat detectada amb aquests compostos no sembla atribuïble a impediments estèrics en la fixació de l'anell aromàtic en el seti catalític, com podria ser el cas dels compostos esteroides, ja que

TAULA XXX. Constants d'especificitat de les classes I, II i III de l'ADH humana enfront dels alcohols<sup>a</sup>.

$$\frac{k_{cat}}{K_m} \times 10^{-5} \text{ (M}^{-1}\text{,min}^{-1}\text{)}$$

Substrat	classe I <sup>b</sup>	classe II ( $\pi$ -ADH) <sup>c</sup>	classe III ( $\chi$ -ADH)
metanol	0,0008	0	0 <sup>d</sup>
1,2-etanodiol	0,01	0,002	0 <sup>d</sup>
ciclohexanol	230	0,002	0 <sup>d</sup>
alcohol benzílic	230	790	0,008 <sup>e</sup>
etanol	1,4	0,04	0,002 <sup>e</sup>
octanol	320	710	7
àcid 16-hidroxi- dodecanoic	120	60	10

<sup>a</sup> Activitat mesurada en tampó glicina-NaOH, pH 10,0.

<sup>b</sup> Resultats obtinguts amb l'isoenzim  $\alpha_1$  per Wagner i col. (318).

<sup>c</sup> Dades obtingudes de Dirlow i col. (85).

<sup>d</sup> Dades facilitades per Parés i Vallee (241).

<sup>e</sup> Valor calculat a partir del pendent de la recta resultant de la representació de v enfront de [S].

TAULA XXXI. Constants d'especificitat de les classes I, II i III de l'ADH humana enfront dels aldehids o cetones<sup>a</sup>,

$$\frac{k_{cat}}{K_m} \times 10^{-5} (\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$$

Substrat	classe I <sup>a</sup>	classe II (T-ADH) <sup>a</sup>	classe III (X-ADH)
ciclohexanona	18	2	0 <sup>a</sup>
benzaldehyd	93	450	0,015 <sup>c,d</sup>
acetaldehyd	8,5	0,8	0,002 <sup>b,c,d</sup>
pentanal	780	170	1,6 <sup>b,c,d</sup>
octanal	8.700	1.800	1,5 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Dades obtingudes de Deetz i col. (76). Activitat mesurada en tampó TES 50 mM, pH 7,0, NADH 0,213 mM. En la classe I, els resultats corresponen a l'isoenzim  $\alpha_1$ .

<sup>b</sup> Dades facilitades per Parés i Vallee (239).

<sup>c</sup> Activitat mesurada en tampó fosfat monossòdic-NaOH 0,1 M, pH 7,5, NADH 0,26 mM.

<sup>d</sup> Valor calculat a partir del pendent de la recta resultant de la representació de v enfront de [S] (veure III.2.2.2.).



molècules com l'alcohol cinnàmic o els nitrobenzaldehids es compten entre els millors substrats.

Així doncs, de l'estudi del comportament cinètic de  $\chi$ -ADH enfront de diferents substrats es desprèn que  $\chi$ -ADH és el més específic dels isoenzims de l'ADH, doncs únicament pot oxidar amb certa eficiència alcohols i aldehids alifàtics de cadena llarga, com octanol i octanal, alguns compostos aromàtics substituïts, com l'alcohol cinnàmic o els nitrobenzaldehids, i els  $\omega$ -hidroxiàcids. Només per a aquests últims, però, els valors de  $K_m$  són propers als mostrats pels isoenzims de les classes I i II, essent la relació  $k_{cat}/K_m$  de l'ordre de les observades per a aquests isoenzims. És significatiu el fet de que, per a cap dels substrats de  $\chi$ -ADH, la relació  $k_{cat}/K_m$  no és millor que la dels altres isoenzims (Taula XXX).

La majoria dels isoenzims de l'ADH de fetge dels mamífers estudiats són també, com  $\chi$ -ADH, més específics per als alcohols hidrofòbics de cadena llarga, però les seves  $K_m$  són molt més baixes i, ademés, els alcohols alifàtics primaris de cadena curta, com l'etanol, són bons substrats (245, 318).

Una especial conformació del seti d'interacció del coenzim i del seti de fixació del substrat podrien explicar les especials característiques cinètiques d'aquest isoenzim, tal com proposen Deetz i col. (76). La determinació completa de l'estructura primària de les subunitats de l'isoenzim, i l'assignació dels residus essencials per a la catàlisi mitjançant estudis d'inhibició i de marcatge per afinitat, serviran per a comprendre en un futur pròxim les diferències observades.

### 1.5. $\chi$ -ADH és un isoenzim de l'ADH humana

Les propietats cinètiques úniques de  $\chi$ -ADH, sobretot la pobra oxidació de l'etanol, podrien posar en dubte la seva condició d'isoenzim de l'ADH. Malgrat algunes de les propietats cinètiques exposades,  $\chi$ -ADH

oxida l'etanol i altres alcohols de variades estructures, i catalitza la reducció d'aldehids, pel que cal considerar-el com a isoenzim de les altres formes de l'ADH hepàtica (veure 1.3.4.).

Per altra banda, els estudis immunològics (5) i la inexistència de formes híbrides entre les subunitats de  $\chi$ -ADH i les subunitats dels isoenzims de les altres classes de l'ADH humana (24) suggereixen que  $\chi$ -ADH difereix en la seva estructura respecte als altres isoenzims. Tanmateix, les propietats físico-químiques que defineixen l'enzim purificat com una ADH de mamífer (veure U.1.1.), les dades de les composicions d'aminoàcids (319), nombre de cisteïnes (Taula I), i les dades preliminars sobre l'estructura primària (166), indiquen que les subunitats de  $\chi$ -ADH presenten una homologia seqüencial notable amb les altres subunitats analitzades fins ara  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\delta$  (53, 139).

#### 1.6. Un isoenzim anàleg a $\chi$ -ADH és comú a diverses espècies de mamífer

Les propietats de  $\chi$ -ADH no són exclusives d'un isoenzim de l'espècie humana. Recentment, s'han descobert isoenzims amb propietats similars a  $\chi$ -ADH en el fetge i tots els teixits examinats d'altres mamífers, tals com la mona (71), el cavall (72), la rata (172) i el ratolí (10). La mobilitat electroforètica anòdica, la manca de saturació amb etanol i la insensibilitat al 4-metilpirazole són també les constants que defineixen a aquesta nova classe d'isoenzims. Altres classes d'isoenzims de l'ADH humana també semblen tenir el seu corresponent en diverses espècies de mamífer (10, 39, 70, 71, 72, 172).

En la Taula XXXII, s'han recollit els valors de Km de  $\chi$ -ADH i dels isoenzims anàlegs per als principals substrats, estudiats per diferents autors en cinc espècies diferents. Invariablement per a tots ells, metanol, etanol, ciclohexanol, alcohol benzílic i acetaldehid no són substrats en absolut o són oxidats molt pòbrament. Per als alcohols alifàtics primaris, la Km disminueix al augmentar la longitud de la cadena hidrocarbonada, demostrant-se novamet la importància de les

TAULA XXXII. Valors de les Km de X-ADH humana i d'isoenzims anàlegs d'altres espècies de mamífer.

Km (mM) a pH 10,0

Substrat	Espècie					Ratolí <sup>c</sup>
	Home	Mono <sup>b,c</sup>	Cavall <sup>c</sup>	Rata <sup>d</sup>		
metanol	n.a. <sup>a</sup>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
etanol	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
pentanol	30 <sup>a</sup>	19	33	80	n.s.	n.s.
hexanol	5,5 <sup>a</sup>	n.d.	5,8	17	5,92	5,92
octanol	0,6	0,5	0,4	0,3	1,58	1,58
Àcid 12-hidroxi- dodecanoic	0,055 <sup>a</sup>	0,2	0,04	0,06	n.d.	n.d.
ciclohexanol	n.a. <sup>a</sup>	n.a.	n.a.	133	n.a.	n.a.
alcohol benzílic	n.s.	n.d.	n.d.	n.s.	n.s.	n.s.
acetaldehid	n.s. <sup>a</sup>	n.s.	n.d.	n.s.	n.s.	n.s.

<sup>a</sup> Parés i Vallee (241). <sup>b</sup> Dafeldecker i col. (71). <sup>c</sup> Dafeldecker i Vallee (72). <sup>d</sup> Julià (172).  
<sup>e</sup> Algar i col. (10). <sup>f</sup> Activitat mesurada a pH 7,5. n.a., no es detectà activitat, n.s., no s'observà saturació, n.d., no determinat.

interaccions hidrofòbiques en la fixació del substrat.

Quant a les característiques moleculars, els isoenzims anàlegs a  $\chi$ -ADH posseeixen les típiques propietats de les ADH de mamífer (veure 1.3.1.). El pes molecular de les subunitats obtingut en aquest estudi per a  $\chi$ -ADH, lleugerament inferior a 40.000, sembla característic dels isoenzims anàlegs, ADH-2 de rata i ADH-B2 de ratolí, ambdós amb subunitats de 39.000 dalton (10, 172).

### 1.7. La placenta de rata posseeix un isoenzim de l'ADH anàleg al de la placenta humana

En placenta de rata hem detectat, també com en placenta humana, un únic isoenzim de l'ADH. La seva mobilitat, anòdica, es idèntica a la de l'isoenzim ADH-2 de fetge de rata, descrit per Julia i col. (171). És la primera vegada que s'observa activitat ADH en placenta de rata. ADH-2 de rata posseeix propietats anàlogues a l'isoenzim  $\chi$ -ADH humà (172) (Taula XXXII). Així, la baixa afinitat de l'enzim per l'etanol es reflecteix en la nul·la activitat dels homogenats de placenta de rata enfront d'etanol 33 mM, tal com succeeix en la placenta humana (veure IV.1.1.). Els estudis realitzats per altres autors no havien detectat mai activitat ADH en placenta de rata, sense dubte per la utilització de baixes concentracions d'etanol o acetaldehid (269, 278). La mesura de l'activitat amb octanol 1,0 mM ha fet possible la seva detecció. Per altra banda, la presència d'ADH-2 en placenta de rata no és gens sorprenent, doncs a l'igual que  $\chi$ -ADH, l'isoenzim ADH-2 s'ha observat en tots els teixits de rata examinats fins el present (veure V.1.9.) (172).

Aquest resultat, juntament amb altres analogies observades per a les altres classes d'isoenzims, descobreix profundes relacions interespecífiques quant a tipus, propietats i distribució dels isoenzims de l'ADH i ens permet postular l'existència d'isoenzims similars al  $\chi$ -ADH en la placenta i tots els teixits de les espècies que apareixen en la Taula XXXII i, probablement, de molts altres mamífers.

La placenta podria ser un bon model per a la ràpida detecció d'isoenzims similars al  $\chi$ -ADH en altres espècies, mitjançant l'anàlisi electroforètica dels homogenats, o per mesura de la relació activitat etanol 33 mM/activitat octanol 1 mM, tal com s'indica a IV.1.10, o utilitzant una concentració de 4-metilpirazole inhibitoria per a totes les formes de l'ADH a excepció de l'isoenzim anàleg a  $\chi$ -ADH. En cas de confirmar-se la presència exclusiva d'aquest isoenzim en la placenta d'aquests animals, es podria procedir a la seva purificació a partir d'aquest teixit, i al seu estudi, sense interferències d'altres classes d'isoenzims.

1.8.  $\chi$ -ADH és el primer isoenzim de l'ADH humana que s'expressa en el fetge durant el desenvolupament

Els estudis de desenvolupament de l'activitat ADH en el fetge s'han realitzat, per primera vegada, correlacionant activitats enfront de diferents substrats amb l'aparició dels diversos isoenzims en electroforesi en gel de midó. L'observació de  $\chi$ -ADH en un homogenat d'un fetus humà de 24 setmanes, juntament amb la presència majoritària de l'isoenzim ADH-2, anàleg al  $\chi$ -ADH humà, en fetus de rata, indiquen la primerenca aparició dels isoenzims de la classe III. Aquest resultat ha sigut corroborat per Adinolfi i col. (5), al detectar  $\chi$ -ADH en tots els òrgans examinats de fetus humans de 16 i 22 setmanes de gestació. Igualment, s'ha observat la progressiva aparició en fetge de rata dels isoenzims catòdics, anomenats ADH-3 (171), durant els quatre darrers dies de la gestació, amb una aparent constància dels nivells d'ADH-2.

La relació activitat etanol 33 mM/activitat octanol 1,0 mM, juntament amb l'anàlisi electroforètica, podria ser un bon indicador del contingut isoenzimàtic d'un òrgan en un determinat estadi del desenvolupament.

Novament es mostren estretes semblances entre l'ADH de rata, animal d'experimentació més emprat en els estudis del metabolisme de l'alcohol,

i l'home, ésser que pateix directament les conseqüències de l'abús de l'alcohol. Mantenint les lògiques reserves degut a les diferències interespecífiques, pensem que la rata pot constituir un bon model per a l'estudi del desenvolupament de l'activitat ADH. Seria molt interessant estendre l'estudi realitzat a altres òrgans i a l'etapa postnatal del desenvolupament. La utilització de diferents concentracions de l'inhibidor 4-metilpirazole permetria discernir més fàcilment l'activitat deguda a isoenzims anàlegs a  $\chi$ -ADH de la de les altres formes de l'ADH.

#### 1.9. Ubiquïtat de $\chi$ -ADH

L'evidència presentada de que  $\chi$ -ADH és l'únic isoenzim de l'ADH en placenta humana no sembla un fet casual, ja que recentment s'ha descobert que  $\chi$ -ADH és precisament l'únic dels isoenzims de l'ADH humana que apareix en tots els òrgans estudiats.

$\chi$ -ADH s'ha observat en tots els fetges d'adults i d'infants examinats fins ara, incloïnt fetges de fetus de 16 setmanes de gestació (5). Així mateix,  $\chi$ -ADH s'ha trobat en tots els altres òrgans i teixits humans d'adult i de fetus estudiats, encara que en menor quantitat que en el fetge (5). Igualment, un isoenzim similar en propietats a  $\chi$ -ADH (veure U.1.6.), s'ha mostrat extensament distribuït en tots els teixits investigats de tres espècies diferents: ratolí (142), cavall (144) i rata (172). Així doncs, a diferència dels isoenzims de les classes I i II, que es presenten només en determinats teixits,  $\chi$ -ADH sembla caracteritzar-se per la seva ubiquïtat i per l'aparició en les primeres etapes del desenvolupament fetal. Tot plegat, juntament amb el fet probable de la conservació del gen que codifica per a  $\chi$ -ADH en diferents espècies, suggereix que aquest isoenzim podria jugar un paper destacat en el metabolisme d'alcohols i aldehids (veure U.4.1.).

### 1.10. $\chi$ -ADH és un enzim citoplasmàtic

El punt isoelèctric més baix de  $\chi$ -ADH, juntament amb les seves peculiars propietats cinètiques, podrien indicar una distribució intracel·lular específica per a aquesta forma de l'ADH. Així, s'ha suggerit que diferències en la càrrega entre els isoenzims podrien afectar a la seva localització topogràfica en l'interior de la cèl·lula (218). Per altra banda, en la fracció microsomal de les cèl·lules de variis teixits, s'ha detectat una activitat d'oxidació d'alcohols de cadena llarga  $NAD^+$ -dependent i insensible al pirazole (167a). Els fraccionaments subcel·lulars realitzats per altres autors havien sigut efectuats en homogenat de fetge que, al contenir la barreja d'isoenzims de les tres classes, no permet distingir la localització específica dels isoenzims individuals. La placenta, al posseir un únic isoenzim de l'ADH i poder-se processar poques hores després de deixar d'ésser funcional, ha sigut un òrgan idoni per a realitzar aquest tipus d'estudi.

Tots els fraccionaments subcel·lulars duts a terme en teixit placentari han revelat la presència inequívoca de l'ADH de placenta en el citoplasma cel·lular, el mateix compartiment subcel·lular on s'han detectat les altres formes de l'ADH de mamífer (198, 235, 256).

Aquest resultat ens permet afirmar que l'isoenzim  $\chi$ -ADH, tant de placenta com de qualsevol òrgan, es troba en el citoplasma cel·lular. Extrapolant aquest resultat a altres espècies, és molt probable que els isoenzims anàlegs al  $\chi$ -ADH (veure U.1.6.) es trobin en el mateix compartiment subcel·lular.

## 2. COMPARACIÓ DE L'ALDH DE PLACENTA AMB ELS ISOENZIMS DE L'ALDH DE FETGE I ALTRES ALDH MÉS ESPECÍFIQUES

### 2.1. L'ALDH de placenta presenta propietats diferents als altres isoenzims de l'ALDH humana

L'ALDH de placenta posseeix algunes de les propietats físico-químiques de les ALDH de mamífer, com l'extrordinària inestabilitat en el si d'un medi oxidant. Aquesta característica, juntament amb la sensibilitat enfront del disulfiram, presuposen un elevat contingut en residus de cisteïna, anàlogament als isoenzims de fetge humà ALDH I i ALDH II (136). En quant a les propietats cinètiques, l'ALDH de placenta presenta trets comuns amb les ALDH humanes conegudes fins ara, com la capacitat d'oxidació d'acetaldehid i propanal (encara que amb una menor eficiència), la baixa  $K_m$  per al  $NAD^+$ , l'activitat esterasa i el pH òptim.

Amb tot, la majoria de propietats físico-químiques de l'ALDH de placenta, són inèdites dins del sistema d'isoenzims conegut de l'ALDH humana, tals com pes molecular i nombre de subunitats (veure V.2.2.), punt isoelèctric, estabilitat tèrmica i efecte dels metalls divalents.

### 2.2. L'ALDH de placenta és un isoenzim de baix pes molecular i estructura dimèrica

El pes molecular de l'ALDH de placenta, 114.000 dalton, determinat per cromatografia de gel filtració, així com la seva naturalesa dimèrica són característiques úniques en una ALDH humana.

Alguns dels primers treballs publicats sobre els isoenzims de baixa



Km de l'ALDH humana havien descrit igualment pesos moleculars sensiblement inferiors a 200.000, obtinguts també mitjançant cromatografia de gel filtració (182). Tanmateix, estudis posteriors dels mateixos isoenzims, utilitzant altres tècniques per a la determinació del pes molecular, com l'electroforesi en gel amb gradient de poliacrilamida, demostraren que ALDH I i ALDH II posseeixen pesos moleculars de 225.000 i 245.000, respectivament, i una estructura tetramèrica (117, 147). Així mateix, els pesos moleculars d'ALDH III i ALDH IV, observats per Harada i col. (125) en fraccions molt poc purificades, foren de 252.000 i 257.000, respectivament, postulant-se per analogia amb els isoenzims ALDH I i ALDH II que la forma activa d'aquests isoenzims seria també un tetràmer.

Pietruszko (244) demostrà que el pes molecular aparentment més petit d'ALDH I, observat ocasionalment en la cromatografia de gel filtració, es podia deure a interaccions de l'enzim amb la matriu dels gels de Sephadex, profusament emprats en aquest tipus d'experiments. Tanmateix, de llavors ençà, s'han determinat molts pesos moleculars d'isoenzims l'ALDH, entre ells els de ALDH I i ALDH II (310), mitjançant cromatografia de gel filtració, amb resultats comparables als aconseguits per altres mètodes (300).

Per a l'ALDH de placenta, s'han utilitzat gels de dos tipus diferents de matriu per a la determinació del pes molecular, obtenint-se un resultat similar en cada un d'ells (veure III.1.4.B.). Això suggereix que no han existit interaccions, fora de l'efecte de la filtració molecular, entre l'enzim i la matriu dels gels i que, per tant, el resultat obtingut es fiable. La precaució que es va prendre per a evitar interaccions fou l'ús d'un tampó de força iònica elevada, amb un pH proper al punt isoelèctric de l'enzim (fosfat monossòdic-NaOH 30 mM, EDTA 1mM, DTT 1 mM, pH 7,3).

Per altra banda, el pes molecular de les subunitats, 63.000 (superior en 10.000 dalton al dels altres isoenzims de l'ALDH humana), indica una estructura dimèrica per a l'ALDH de placenta. En oposició al cas de l'ALDH humana, on no existren antecedents d'isoenzims dimèrics, han

aparegut diversos treballs que demostren que variis isoenzims de l'ALDH de diferents espècies poden presentar-se en forma dimèrica, al menys "in vitro". Així, Takahashi i Weiner (291), demostraren que l'isoenzim mitocondrial de fetge de cavall duplicava l'activitat específica en presència de  $Mg^{2+}$  per un mecanisme que implicava la dissociació de l'enzim tetramèric en dímers. En el cas de l'ALDH de placenta, el pes molecular es va determinar en presència de fosfat i EDTA, pel que la major part del cations divalents presents en el medi haurien estat quelats. Ademés, no es va detectar cap heterogeneïtat en el perfil d'elució de la columna de gel filtració ni variació en l'activitat específica de l'enzim en les fraccions recollides, pel que no es probable per a l'ALDH de placenta un mecanisme de dissociació similar al de l'enzim de cavall. Ting i Crabbe (300) purificaren una ALDH dimèrica de cristal·lí de bou amb un pes molecular de 114.000 dalton, determinat en Sephadex G-200 i per equilibri de sedimentació, demostrant que la forma dimèrica no era deguda a la presència de metalls divalents.

La major part d'ALDH amb pesos moleculars inferiors a 200.000 han sigut descrites en rata i ratolí. Siew i col. (275) purificaren una ALDH mitocondrial d'alta  $K_m$  (Enzim II) a partir de fetge de rata, amb un pes molecular de 67.000 (veure U.2.7.). Més recentment, Algar i Holmes (11) han aïllat també una ALDH mitocondrial d'alta  $K_m$  (AHD-1) en fetge de ratolí. L'enzim actiu és un dímer de pes molecular 134.000, amb subunitats de 63.000 (veure U.2.7.). L'estructura dimèrica proposada per a AHD-1 es consistent, ademés, amb el polimorfisme observat en els gens que codifiquen per a aquest isoenzim (143). Per altra banda, totes les ALDH citosòliques induïbles en fetge de rata per diferents tipus de xenobiòtics (veure 1.4.4.2.3.) presenten pesos moleculars entre 110.000 i 165.000, amb  $K_m$  per a l'acetaldehid i propanal de l'ordre de  $10^{-3}M$ .

L'existència de formes dimèriques de baix pes molecular en altres espècies, juntament amb altres propietats de l'ALDH de placenta anàlogues a les d'aquests isoenzims (veure U.2.7.), recolza els nostres resultats i l'estructura dimèrica que proposem.

### 2.3. L'ALDH de placenta presenta una elevada especificitat de substrat

L'ALDH de placenta posseeix una especificitat de substrat molt menys àmplia, comparada amb els isoenzims ALDH I i ALDH II de fetge, els quals oxiden una gran varietat d'aldehids alifàtics i aromàtics amb similar eficiència (Taula VII). En el cas de l'isoenzim de placenta, els aldehids alifàtics només són oxidats a una velocitat apreciable a concentracions molt elevades de substrat, indicant que es tracta d'un isoenzim d'alta  $K_m$ . Els aldehids aromàtics són pobres substrats de l'ALDH de placenta, a excepció del 3-nitrobenzaldehyd, que presenta una de les constants d'especificitat ( $k_{cat}/K_m$ ) més elevades. En general, els aldehids de cadena llarga, com citral i retinal no són bons substrats. L'enzim és, en canvi, força eficient en la hidròlisi dels esters aromàtics. Això no obstant, l'examen dels valors de  $K_m$  que presenten la majoria d'aldehids i esters revela que difícilment poden ser substrats fisiològics de l'enzim.

L'únic substrat d'entre els estudiats que és actiu a baixes concentracions és el semialdehyd succínic, el qual presenta la constant d'especificitat més elevada. L'especificitat de l'ALDH de placenta per al semialdehyd succínic es reflecteix clarament en la Taula XXXIII. En ella s'observa que a concentracions no excessivament baixes de substrat (0,1 mM), la majoria dels aldehids alifàtics i aromàtics no superen entre el 20 i el 30 % de l'activitat mostrada enfront del semialdehyd succínic. La cadena carbonada amb un grup polar en el seu extrem, o bé en posició 4, podria ser un dels requeriments estereoquímics del substrat fisiològic de l'ALDH de placenta (veure V.5.2.).

És important assenyalar que un mateix enzim, l'ALDH de placenta, presenta dos tipus de comportament cinètic ben diferent enfront de substrats diversos: inhibició per substrat amb els aldehids alifàtics de cadena curta, com el propanal (veure IV.2.6.3.1.), i cooperativitat negativa amb semialdehyd succínic (veure IV.2.6.3.2.). Comportaments similars han sigut observats en diferents ALDH de mamífer (93). El coneixement dels mecanisme cinètic de l'enzim ajudaria sense dubte a

TABLA XXXIII. Velocitat d'oxidació de varis aldehids a una concentració de 0,1 mM per part de l'ALDH de placenta.

Aldehids	% activitat <sup>a</sup>
semialdehid succínic	100
propanal	32
benzaldehid	19
butanal	12
acetaldehid	10
formaldehid	2,5
4-hidroxibenzaldehid	0

<sup>a</sup> Activitat mesurada en tampó pirofosfat sòdic-HCl 33mM, pH 8,5, NAD<sup>+</sup> 0,5 mM.

l'explicació teòrica d'aquest fenomen.

#### 2.4. L'ALDH de placenta posseeix propietats similars a l'isoenzim hepàtic ALDH IV

Fins el present, els isoenzims d'alta Km de l'ALDH humana han estat molt poc estudiats, no havent-se caracteritzat totalment. El menor interès despertat per part d'aquests isoenzims, al no jugar probablement cap paper fisiològic en l'eliminació de l'acetaldehid, i la dificultat de la seva purificació a partir del teixit hepàtic, expliquen aquest fet. L'existència d'un únic isoenzim en placenta (veure U.2.5.) ha permès la seva purificació, sense contaminacions per part d'altres formes isoenzimàtiques. Després de la caracterització d'aquest isoenzim, considerem que disposem de suficients evidències de la similitud de l'ALDH de placenta amb un dels isoenzims de fetge, concretament ALDH IV. A l'aiguait de les dades de la caracterització completa de l'isoenzim hepàtic, l'estudi comparatiu amb l'ALDH de placenta s'ha basat en les propietats observades per a ALDH IV per dos grups d'investigadors de forma independent (109, 125).

- Propietats estudiades directament en l'homogenat de fetge, mitjançant electroforesi en gel de midó (125):

La mobilitat electroforètica de l'ALDH de placenta, lleugerament anòdica a pH 7,6, és idèntica a la del grup de bandes menys anòdic, que en el fetge es coneix amb el nom de ALDH IV (veure U.2.4.). Per altra banda, l'ALDH de placenta s'ha mostrat com un isoenzim altament termolàbil (veure U.2.5.4.), característica observada també per Harada i col. (125) per a la banda corresponent a ALDH IV, directament sobre un gel de midó, després de separar els isoenzims per electroforesi.

- Propietats estudiades en l'isoenzim purificat a partir de fetge (109):

A continuació es comparen les principals propietats de l'ALDH de

TAULA XXXIV

Comparació de les propietats moleculars i cinètiques de l'ALDH de placenta i d'ALDH IV de fetge.

Propietat	ALDH placenta	ALDH IV fetge <sup>a</sup>
pes molecular total	114.000 <sup>b</sup>	139.500-175.000 <sup>c</sup>
pes molecular subunitats	63.000	69.200
nombre de subunitats	2	2
pI	6,65-6,80	6,77-6,89
pH òptim <sup>d</sup>	8,35	8,45
activitat específica (U/mg) <sup>d</sup>	1,43	2,21
especificitat de substrat	molt restringida	molt restringida
Km propanal (mM), pH 8,5	23	18
Km o 1S10,5semmialdehid	30	82
succinic (µM), pH 8,5	17	15
Km NAD <sup>+</sup> (µM), pH 8,5 <sup>d</sup>	600	348
Km NADP <sup>+</sup> (µM), pH 8,5 <sup>d</sup>	sí	sí
activitat esterasa		

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

<sup>b</sup> Determinat per cromatografia de gel filtració. <sup>c</sup> Determinat per electroforesi en gel amb gradient de poliàcrilamida.

<sup>d</sup> Activitat mesurada en tampó pirofosfat sòdic-HCl 33 mM, pH 8,5, amb propanal 13,3 mM, a 25°C.

placenta i de l'isoenzim ALDH IV de fetge, purificat per Forte-McRobbie i Pietruszko (109) en un treball preliminar que ha sigut presentat recentment al "Second Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism". Encara que les dades aportades per aquests autors són provisionals i necessiten confirmació posterior, considerem interessant la seva inclusió en la Taula XXXIV per a la interpretació i discussió dels nostres resultats.

L'isoenzim purificat a partir de placenta i ALDH IV de fetge posseeixen propietats moleculars molt similars, entre les que destaquen especialment el pes molecular, inferior a 200.000 i determinat emprant dues tècniques diferents, i l'estructura dimèrica (Taula XXXIV). Ambdós isoenzims, ALDH de placenta i ALDH IV, presenten dues bandes de punts isoelèctrics molt propers quan són analitzats per electroforesis en gels de poliacrilamida. Les propietats cinètiques són pràcticament idèntiques, compartint ambdós isoenzims un mateix pH òptim, l'elevada Km per al propanal, l'activitat amb NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup> com a coenzims, l'activitat esterasa i una especificitat de substrat molt restringida comparada amb els isoenzims ALDH I i ALDH II (veure V.2.3.), amb una elevada eficiència enfront del semialdehid succínic (Taula XXXIV).

De tot l'exposat, podem concloure que l'ALDH de placenta i l'isoenzim ALDH IV de fetge són isoenzims estretament relacionats, sinó idèntics. La identificació definitiva d'ambdues formes requerirà, però, la caracterització més exhaustiva de l'isoenzim hepàtic i la confrontació posterior amb les propietats observades en la forma de placenta.

#### 2.5. La placenta humana posseeix majoritàriament un sol isoenzim de l'ALDH

La visualització directa dels isoenzims de l'ALDH de placenta per electroforesis en gel de midó no ha estat possible a partir d'homogenat, segurament degut a l'escassa activitat present en comparació amb el fetge

(veure IV.2.1.) i a l'elevat contingut en LDH (veure IV.2.4.). Teng (294), al analitzar homogenats de placenta amb la mateixa tècnica, tampoc havia pogut detectar cap banda d'activitat ALDH. Tanmateix, la purificació de l'ALDH de placenta, separant-la de la principal proteïna contaminant, la LDH (veure IV.2.2.), ha permès la visualització de l'enzim en els gels d'electroforesi i d'electrofocalització, així com la comparació de les propietats de l'enzim pur amb les observades en l'homogenat.

Malgrat que l'ALDH de placenta purificada apareix homogènia segons l'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (veure IV.2.5.2.) i en la cromatografia de gel filtració (veure IV.2.5.1.), altres tipus d'anàlisi han revelat una certa heterogeneïtat en la preparació d'enzim. Així, l'electroforesi en gel de midó (veure IV.2.4.) i l'electrofocalització en gel de poliacrilamida (veure IV. 2.5.3.) mostren més d'una banda amb activitat ALDH. L'isoenzim ALDH IV, purificat a partir de fetge i similar en propietats a l'ALDH de placenta (veure V.2.3.), presenta també com aquest últim dues bandes mitjançant electrofocalització (109). ALDH IV, juntament amb altres isoenzims de l'ALDH humana, tals com ALDH II i ALDH III, mostren també varies bandes quan homogenats de fetge i d'estómac són analitzats mitjançant electroforesi de gel de midó (veure IV.2.4.) (91, 221, 302). Així com l'heterogeneïtat d'ALDH III es deu a l'existència de polimorfisme en la població (91, 221), la família de bandes conegudes com ALDH IV s'atribueix a modificacions posttraduccionals a partir d'una única cadena polipeptídica, o bé a la manipulació de la mostra (91). L'heterogeneïtat de l'ALDH de placenta podria tenir el mateix origen.

L'estabilitat tèrmica i les propietats cinètiques, tals com el pH òptim d'oxidació del propanal, la  $K_m$  per al propanal, i la inhibició per substrat a elevades concentracions de propanal, són molt similars en l'homogenat i en l'enzim purificat. Així mateix, la major part de l'activitat de l'homogenat elueix en un únic pic en la cromatografia de DEAE-cel·lulosa.



Tot plegat indica que la placenta humana presenta un sol isoenzim majoritari, que hem anomenat ALDH de placenta, i que és el principal responsable de l'activitat ALDH en els homogenats. Si es confirmés la identitat entre aquest isoenzim i ALDH IV de fetge, ALDH IV seria l'únic isoenzim de la placenta humana.

En home, l'isoenzim ALDH IV ha sigut observat en fetge, ronyó, cor, pulmó, intestí, pell, anell de cabell i fibroblasts (113). Isoenzims anàlegs a ALDH IV en altres espècies, com AHD-1 de ratolí (veure V.2.7.), es troben també àmpliament distribuïts en tots els teixits de l'organisme i presenten també varies bandes quan són analitzats electroforèticament (266). L'aparent ubiqüitat d'ALDH IV i els seus anàlegs en altres espècies podria justificar la seva més que probable presència en placenta. ALDH I i ALDH II també han sigut detectats en molts dels òrgans estudiats (veure I.4.4.). La seva presència en el teixit placentari, però, es altament improbable, degut a l'escassa activitat ALDH de baixa Km, encara que ALDH II podria aparèixer eventualment en els homogenats com a petita contaminació provient de la sang (veure IV.2.1.). ALDH III, encara que isoenzim d'alta Km com l'ALDH de placenta, es localitza solament en alguns teixits molt determinats, tals com estómac, pulmó i testicles (91, 113). Altres autors tampoc no l'han detectat en el teixit placentari (221). Es diferencia clarament d'ALDH IV per la seva major mobilitat electroforètica (veure IV.2.4.) i per una gran activitat enfront del benzaldehid, característica que no presenta l'ALDH de placenta.

## 2.6. L'ALDH de placenta és un isoenzim majoritàriament mitocondrial

Una de les característiques més notables observades en l'ALDH de placenta humana és la seva localització en la fracció mitocondrial de la cèl·lula, al igual que l'isoenzim de fetge humà de baixa Km, ALDH I (veure I.4.4.1.3.). No es pot descartar, però, que l'isoenzim de placenta es trobi també normalment en el citoplasma, encara que en menor proporció, ja que l'activitat ALDH d'alta Km detectada en la fracció

citoplasmàtica no sembla deguda a l'alliberació d'ALDH per part dels mitocondris durant el fraccionament subcel·lular (veure IV.2.7.).

Els nostres resultats recolzen en part els obtinguts, tant en placenta humana com de rata, per Kouri i col. (181), que, realitzant un fraccionament molt més simple i sense controlar la puresa de les fraccions, mesuraren l'activitat ALDH utilitzant acetaldehid com a substrat. Aquests autors observaren l'activitat ALDH total repartida equitativament entre les fraccions mitocondrial i citoplasmàtica. L'activitat mesurada a baixa concentració de substrat fou, com en el nostre cas, unes 10 vegades menor que la mesurada a concentració elevada, indicant el predomini en placenta de formes d'alta Km.

Koivula (179), al investigar la localització subcel·lular de l'ALDH en biòpsies de fetge humà, assignà també a la fracció mitocondrial el 50 % de l'activitat ALDH total, mesurada amb propanal 9 mM. Ademés, la suspensió mitocondrial posseïa un 20-30 % més d'activitat quan era mesurada amb propanal 9 mM que quan s'utilitzava propanal 60  $\mu$ M, el que suggeria l'existència d'un isoenzím d'alta Km. Tanmateix, quan una mostra de l'extracte mitocondrial s'aplicà a una columna de DEAE-cel·lulosa, equilibrada amb Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, no es detecta cap pic amb activitat ALDH d'alta Km. L'autor, però, va observar l'elució, durant el rentat de la columna amb tampó de pH 7,6, d'una ALDH activa amb NADP<sup>+</sup>, proposant l'existència d'una ALDH mitocondrial d'alta Km activa amb NADP<sup>+</sup> que seria anàloga a la descrita en altres espècies de mamífer (veure IV.2.7.). És molt probable que l'isoenzím esmentat fós ALDH IV que, amb un punt isoelectric proper a la neutralitat, no restaria unit a la resina a pH 7,6.

En un treball que acaba de ser publicat (juny 1985), Duley i col. (91) efectuen un fraccionament subcel·lular en biòpsies de fetge humà, visualitzant mitjançant electroforesis els isoenzims presents en cada una de les fraccions. Les bandes corresponents a ALDH IV apareixen tant en la fracció mitocondrial com en la citoplasmàtica, encara que no s'especifica la contribució respectiva a l'activitat total en l'homogenat

de fetge. La presència de l'isoenzim ALDH IV en el citosol s'atribueix, contràriament a l'observat per nosaltres per a l'ALDH de placenta, a un trencament dels mitocondris durant el procés d'homogenització (9).

En el cas del fraccionament realitzat en placenta no ens ha estat possible la identificació directa per electroforesi de l'isoenzim o isoenzims presents en les fraccions mitocondrial i citosòlica. Malgrat que els extractes cel·lulars es concentraren exhaustivament per centrifugació i ultrafiltració, no es detectaren bandes d'activitat ALDH quan s'intentaren visualitzar en electroforesi de gel de midó (veure V.2.5.). Per tal d'assignar inequívocament l'ALDH de placenta a una o ambdues fraccions seria necessari realitzar la purificació a partir dels respectius extractes subcel·lulars. Disposem, però, d'altres evidències més indirectes, basades en estudis realitzats en altres espècies, que apunten que l'ALDH de placenta i ALDH IV es localitzarien molt probablement en els mitocondris (veure V.2.7.).

## 2.7. Un isoenzim mitocondrial anàleg a l'ALDH de placenta és comú a diverses espècies de mamífer

Encara que és arriscat fer extrapolacions entre les diferents espècies animals, és important assenyalar que les propietats físico-químiques i cinètiques de l'ALDH de placenta i d'ALDH IV són molt similars a les descrites per a un isoenzim mitocondrial d'alta Km que des de fa temps es coneix en altres espècies de mamífer (Taula XXXV). Aquest isoenzim ha sigut purificat i caracteritzat només parcialment en rata (275) i ratolí (11). Comparat sovint amb un isoenzim mitocondrial de baixa Km, anàleg a l'isoenzim ALDH I d'home, no es considera imprescindible en la regulació dels nivells d'acetaldehid dins de la cèl·lula.

En fetge de rata, alguns autors havien demostrat que una part de l'activitat ALDH mitocondrial estava localitzada fora de la membrana interna, doncs observaven que es produïa oxidació d'aldehids  $\text{NAD}^+$

-dependent, no acoblada a la cadena respiratòria (118, 290, 293). Posteriorment, es detectà un isoenzim d'alta Km, actiu amb NADP<sup>+</sup>, unit a la membrana mitocondrial externa i que requeria de l'addició de detergents per a la seva solubilització (145, 178, 304). Siew i col. (275) purificaren parcialment aquest isoenzim (Enzim II), observant les propietats que apareixen en la Taula XXXV i demostrant la seva localització en l'espai intermembranal dels mitocondris.

A part dels treballs realitzats en rata, Algar i Holmes (11) han purificat i caracteritzat recentment un isoenzim mitocondrial d'alta Km a partir de fetge de ratolí (AHO-I), amb les propietats que es resumeixen en la Taula XXXV.

Com podem observar en la Taula XXXV, les propietats físico-químiques de l'ALDH de placenta són anàlogues a les dels isoenzims de rata i ratolí: un pes molecular de les subunitats proper a 60.000, punt isoelèctric proper a la neutralitat, termolabilitat i sensibilitat al disulfiram. El mateix succeeix amb les propietats cinètiques, i al presentar els tres isoenzims la mateixa especificitat de coenzim, activitat amb NADP<sup>+</sup>, una elevada Km per als aldehids de cadena curta poca o nul·la activitat enfront del formaldehid.

La similitud de les propietats generals i localització subcel·lular de l'ALDH de placenta i ALDH IV de fetge humà amb les de l'isoenzim mitocondrial d'alta Km de rata ens podria suggerir la localització dels primers en la membrana mitocondrial externa o espai intermembranal. En canvi, ALDH I podria localitzar-se en l'interior de la matriu mitocondrial, anàlogament als isoenzims mitocondrials de baixa Km observats en rata (145, 178, 275, 304).

Durant molts anys, el coneixement parcial i fragmentari que es posseïa sobre els isoenzims de l'ALDH de diverses espècies de mamífer no ha permès la racionalització de les múltiples dades experimentals de que es disposava. Així, s'ha afirmat que hi hauria importants diferències entre les espècies quant a nombre, tipus, propietats i localització

TAULA XXXV

Propietats moleculars de l'isoenzim de l'ALDH mitocondrial d'altra Km en varies espècies.

Propietats	Home (ALDH placentari)	Rata (EnzimII) <sup>a</sup>	Ratoli (ALD-I) <sup>b</sup>	Espècie
pes molecular total	114.000	67.000	134.000	
pes molecular subunitats	63.000	n.d.	63.000	
nombre subunitats	2	n.d.	2	
pI	6,65-6,8	6,64	6,87-7,68	
Km acetaldehid (mM)	22	1,5	0,78-1,4	
Km formaldehid (mM)	112	n.a.	15,3	
Km NAD <sup>+</sup> (µM)	17	60	10-29	
activitat amb NADP <sup>+</sup>	sf	sf	n.d.	
inhibició amb disulfiram	sf	sf	sf	
termoestabilitat	inestable	inestable	inestable	

<sup>a</sup> Siew i col(275). <sup>b</sup> Algar i Holmes (11)

n.d., no determinat.  
n.a., no es detectà activitat.

subcel·lular dels isoenzims (249). En aquesta perspectiva, el nostre treball contribueix a completar l'esquema de l'ALDH humana, aportant la caracterització d'un nou isoenzim i descobrint importants analogies interespecífiques.

## 2.8. L'ALDH de placenta podria considerar-se una semialdehid succínic deshidrogenasa

L'extraordinària especificitat manifestada per l'ALDH de placenta enfront del semialdehid succínic (veure V.2.3.) suggereix que aquest podria ser el seu substrat natural. El semialdehid succínic és un metabolit intermediari de la via de l'àcid 4-aminobutínic (GABA), que constitueix una via alternativa per al pas d'oxoglutarat a succinat en el cicle de Krebs (Fig. 48). Un dels enzims d'aquesta via es la semialdehid succínic deshidrogenasa (semialdehid succinat:NAD<sup>+</sup>-oxidoreductasa, EC 1.2.1.16.), aldehid deshidrogenasa específica que catalitza el pas de semialdehid succínic a succinat i que és activa a molt baixes concentracions de substrat (60).

La comparació de les propietats de l'ALDH de placenta i de la semialdehid succínic deshidrogenasa (SSDH) purificada a partir de cervell humà i de rata per Cash i col. (58, 59), revela importants semblances més enllà de la coincidència en l'oxidació del semialdehid succínic a molt baixes concentracions (Taula XXXVI). Així, la SSDH es localitza, com l'ALDH de placenta, en la fracció mitocondrial de la cèl·lula, encara que també es troba en els sinaptosomes en les cèl·lules neuronals (276). L'estructura de la SSDH de cervell es també similar a la de l'ALDH de placenta, amb un pes molecular de 145.000 dalton, determinat en una columna de Sephadex G-200, i dues subunitats de 69.500 (27, 59).

Com es pot veure en la Taula XXXVI, la resta de propietats físico-químiques són molt similars entre ambdós enzims. Així, el punt isoelèctric proper a la neutralitat, la termolabilitat, la inestabilitat en absència d'agents reductors i la susceptibilitat a la inhibició per

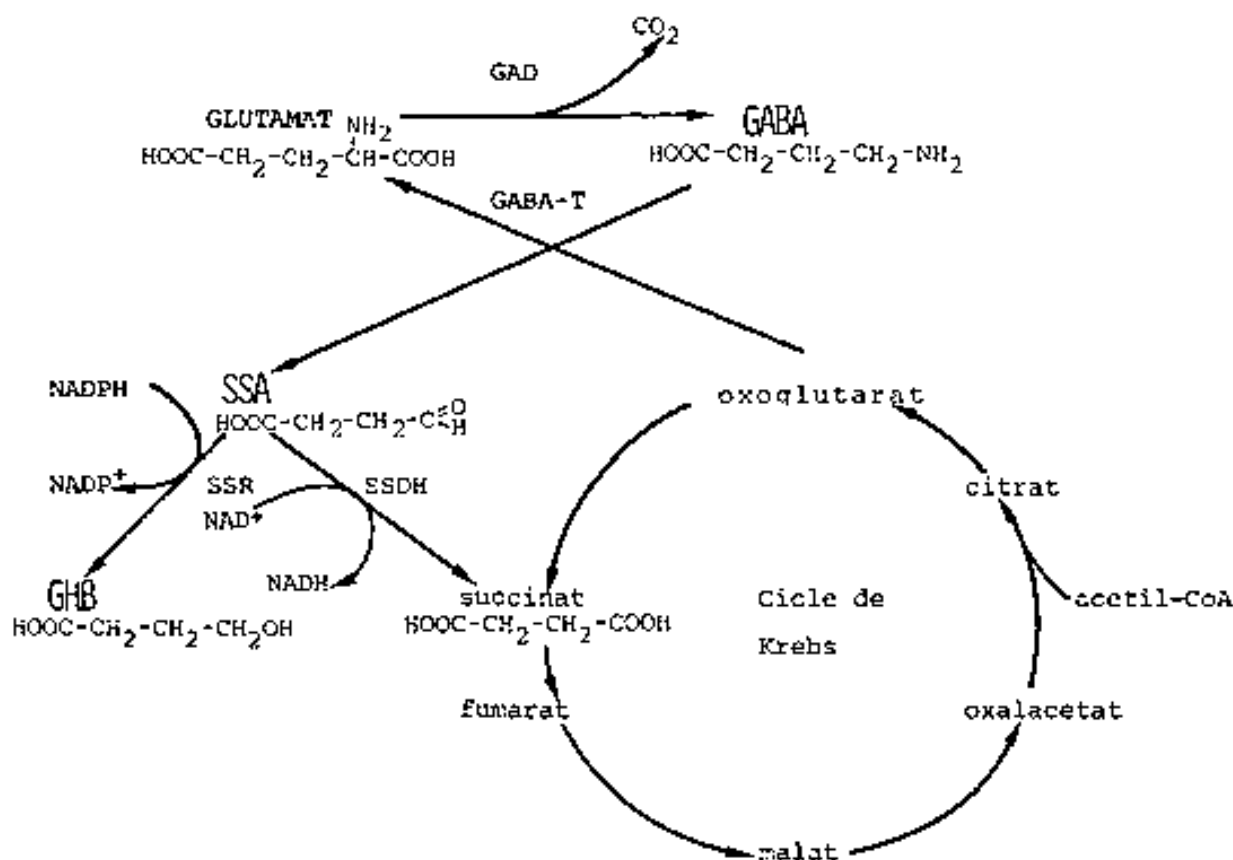


FIGURA 48 Via alternativa de l'àcid 4-aminobutíric i la seva relació amb el cicle de Krebs.

GABA, àcid 4-aminobutíric; SSA, semialdehid succínic; GHB, 4-hidro xibutirat; GAD, glutamat descarboxilasa; GABA-T, 4-aminobutirat transaminasa; SSDH, semialdehid succínic dehidrogenasa; SSR, semialdehid succínic reductasa.

reactius específics per a cisteïnes (8, 59, 173).

Quant a les propietats cinètiques, el pH òptim proper a 8,5, l'activitat amb NADP<sup>+</sup>, la baixa Km per al semialdehid succínic i la inhibició competitiva del 4-hidroxibenzaldehid, són comuns a l'ALDH de placenta i a la SSDH de cervell (Taula XXXVI). En aquest sentit, cal afegir que el 4-hidroxibenzaldehid, com en el cas de l'ALDH de placenta, no és substrat de la SSDH, a diferència de les ALDH d'àmplia especificitat de substrat, que sí l'oxiden (262).

Tal com succeeix amb l'ALDH de placenta humana, que és una ALDH d'alta Km, la SSDH de cervell de rata presenta també activitat a elevades concentracions d'aldehids alifàtics i aromàtics, encara que la velocitat d'oxidació és molt menor comparada amb la del semialdehid succínic. Així, amb acetaldehid 0,1 mM, la SSDH presenta el 0,5 % de l'activitat mesurada amb semialdehid succínic (58), mentre que l'ALDH de placenta en mostra un 10 % (Taula XXXIII).

Ademés, com en el cas de l'ALDH de placenta, alguns autors han observat que la LDH contamina sovint les preparacions de SSDH (262), interferint també en la tinció per activitat dels gels d'electroforesi (173).

Malgrat les estretes semblances que acabem d'assenyalar entre les propietats d'ambdós enzims, existeixen també algunes divergències, entre les que destaquen una major activitat específica de la SSDH enfront del semialdehid succínic, i la inhibició per substrat de la SSDH enfront del semialdehid succínic a concentracions superiors a 0,1 mM (262), en contraposició a l'aparent activació que mostra l'ALDH de placenta amb aquest substrat (veure IV. 2.6.3.2.). De moment, la identitat entre l'ALDH de placenta i la SSDH de cervell no passa de ser una especulació teòrica. Per tal de provar experimentalment aquesta hipòtesi, caldria purificar la SSDH a partir de cervell i aprofundir en l'estudi estructural i cinètic d'ambdós enzims. L'ALDH d'alta Km purificada per nosaltres podria, sense ser idèntica a la SSDH de cervell, estar relacionada estructuralment i evolutivament amb ella o amb algun dels



TAULA XXXVI. Comparació de les propietats de l'ALDH de placenta i de la SSDH de cervell.

Propietat	ALDH placenta	SSDH cervell <sup>a</sup>
localització subcel·lular	mitocondrial	mitocondrial <sup>b</sup>
pes molecular total	114.000	145.000
pes molecular subunitats	63.000	69.000
pI	6,65-6,80	7,2
interferència LDH en gels de midó	si	si
pH òptim	8,35	8,6
Km semialdehid succínic ( $\mu\text{M}$ )	30	3,7
Km NAD <sup>+</sup> ( $\mu\text{M}$ )	17	16
activitat amb NADP <sup>+</sup>	si	si
inhibició amb 4-hidroxi- -benzaldehid	si	si
sensibilitat al medi oxidant	si	si
termoestabilitat	inestable	inestable <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Cash i col. (59), <sup>b</sup> Sims i Davis (276), <sup>c</sup> Kammerlat i Veldstra (173), <sup>d</sup> Albers i Koval (8).  
SSDH i semialdehid succínic deshidrogenasa.

seus isoenzims (59). En cas de ser certa aquesta hipòtesi i confirmar-se per altra banda la identitat de l'ALDH de placenta amb l'isoenzim ALDH II de fetge (veure V.2.4.), estariem en disposició d'assignar una funció específica a un dels isoenzims de l'ALDH humana.

### 3. CAPACITAT GLOBAL DE METABOLITZACIÓ DE L'ALCOHOL DE LA PLACENTA HUMANA

La placenta humana no posseeix pràcticament activitat ADH ni ALDH a les concentracions d'etanol i acetaldehid que poden aparèixer en la sang materna després de la ingestió d'alcohol. Això és degut a que la placenta a terme presenta un sol tipus d'isoenzim, tant per a l'ADH com per a l'ALDH, amb molt baixa afinitat per a ambdós substrats.

#### 3.1. L'ADH de placenta no pot protegir al fetus enfront de l'etanol que es troba en la sang materna

Suposem el cas d'una dona amb alcoholisme crònic, que presenta nivells d'etanol i d'acetaldehid en sang permanentment elevats (207, 217, 234). Amb etanol 33 mM, concentració atesa en cas d'intoxicació severa, l'activitat de l'ADH de placenta humana en condicions fisiològiques és de 0,02 mU/g de teixit (veure IV.1.1.). Si la placenta humana pesa aproximadament uns 500 g, l'òrgan sencer oxidarà només 10 nmol d'etanol/min. Per altra banda, si el flux sanguini a través de la placenta és de 500-600 ml/min (181) i, donat que l'etanol difon lliurement, travessaran la barrera materno-fetal uns 16 mmols d'etanol/min, el que excedeix en un milió de vegades la capacitat de la placenta.

Així doncs, la totalitat de l'etanol present en la sang materna passarà a la circulació i teixits fetals. Donat que el fetus no té desenvolupada la seva dotació isoenzimàtica i posseeix majoritàriament l'isoenzim  $\gamma$ -ADH (veure V.1.8.), tampoc podrà eliminar l'etanol, si no és per nova difusió a través de la placenta i dilució en la circulació materna. Els nivells idèntics d'etanol en sang materna i fetal, mesurats per diferents autors, recolzen els resultats obtinguts (255, 320, 322).

De fet, inclús s'ha detectat acumulació d'etanol per sobre de la concentració materna en el líquid amniòtic de rates intoxicades amb alcohol (46).

### 3.2. L'ALDH de placenta no pot protegir al fetus enfront de l'acetaldehid que es troba en la sang materna

L'acetaldehid pot atènyer concentracions de 20  $\mu\text{M}$  en la sang perifèrica d'una mare alcohòlica (314). Si ademés existeix una disminució crònica o temporal de la funcionalitat hepàtica, o una deficiència en els isoenzims de l'ALDH de baixa  $K_m$ , la capacitat d'eliminació dels nivells d'acetaldehid es pot veure alterada seriosament, podent-se arribar a concentracions de més de 100  $\mu\text{M}$  (314, 233) (veure I.4.4.1.5.). Cal dir que existeix una correlació directa entre nivells d'acetaldehid anormalment elevats en mares alcohòliques i incidència de la síndrome d'alcoholisme fetal en la seva descendència (314). Ademés, en estudis realitzats amb animals model, l'acetaldehid s'ha mostrat citotòxic, mutagènic i teratogènic a concentracions per damunt de 40  $\mu\text{M}$  (314).

En presència d'acetaldehid 0,18 mM, concentració superior a la que es pot donar "in vivo", l'activitat de l'ALDH de placenta humana és de 0,49 mU/g de teixit (veure IV.2.1.). Efectuant càlculs similars als presentats en la secció V.3.1., el flux d'acetaldehid a través de la placenta (10  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) superaria en 40 vegades la capacitat d'oxidació de l'enzim placentari (0,25  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ). Aquests resultats indiquen que la placenta humana "per se" no posseeix suficient activitat ALDH per tal d'impedir el pas de l'acetaldehid cap a la circulació fetal, tal com ja havien suggerit Kouri i col. (181).

Per altra banda, donada l'existència d'activitat ALDH en els eritròcits (veure I.4.4.1.2.), es podria pensar en la contribució de la sang que irriga la placenta al metabolisme de l'acetaldehid en el sistema fetoplacentari. Cal tenir en compte, però, que la major part de la sang present en la placenta es d'origen fetal (44), desconeixent-se si

posseeix, com la sang d'adult, l'isoenzim ALDH II. La disponibilitat de sang placentària permetria realitzar aquest estudi en home. En cas de que la capacitat d'oxidació d'acetaldehid de la sang fetal fós similar a la de l'adult, estimem que podria arribar a oxidar com a màxim un 5 % de l'acetaldehid que travessa la placenta.

Al metabolisme oxidatiu de l'acetaldehid, hem d'afegir la seva eliminació per unió covalent a l'hemoglobina, que a concentracions d'acetaldehid de 200  $\mu\text{M}$  és de 0,55 nmol/mg d'hemoglobina/h (153), o 0,1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  per a tota la sang continguda en les proximitats de la placenta. També cal esperar la unió covalent de l'acetaldehid a les proteïnes de les membranes feto-placentàries i microvellositats de la placenta, abundantment regades per la sang.

De tot l'exposat, no es pot descartar que l'acetaldehid pogués ser eliminat en una petita part per l'ALDH d'eritròcit present en el sistema feto-placentari, més que pel teixit placentari o el fetge del fetus, i també per unió a proteïnes placentàries. D'aquesta forma, els nivells d'acetaldehid podrien ser lleugerament més baixos en la sang fetal que en la sang materna.

En home, no es coneix si la barrera feto-placentària restringeix el pas d'acetaldehid. En principi, la naturalesa liposoluble de l'acetaldehid (176) fa pensar en la seva lliure difusió a través de la placenta. Pel contrari, experiments realitzats amb rates sotmeses a intoxicació aguda i crònica, assenyalen que en placenta i fetus els nivells d'acetaldehid són inferiors als de la sang materna (120, 176). Això s'atribueix a l'existència en rata d'una ALDH placentària que oxidaria l'acetaldehid durant el seu pas cap al fetus (277). Diversos estudis recolzen aquesta idea demostrant que la rata posseeix una ALDH de placenta d'origen mitocondrial força activa a baixes concentracions d'acetaldehid (181, 278). Aquest no sembla, però, el cas de la placenta humana, en la que predomina una ALDH activa només a elevada concentració de substrat (veure IV.2.1.).

Per altra banda, Guerni i col. (120) han observat diferències en la

concentració relativa d'acetaldehid en el fetus i en la placenta respecte a la sang materna, depenent del dia de gestació. Així, la concentració d'acetaldehid en placenta és el 30 % i 50 %, respecte de la materna, els dies 15 i 19 de gestació, respectivament. Aquesta variació podria ser deguda a una disminució del metabolisme de l'acetaldehid en la placenta a mesura que avança la gestació. Sjöblom i col. (278) havien trobat que l'activitat ALDH en placenta de rata el dia 20 de gestació era una tercera part de l'observada el dia 14, mentre que l'activitat ALDH en fetge de fetus s'incrementava quatre vegades en el mateix període. Aquest fet estaria d'acord amb el postulat segons el qual la placenta funcionaria com un fetge auxiliar del fetus en les primeres etapes de la vida fetal, deixant d'assumir alguns papers metabòlics a mesura que el fetge anés adquirint noves capacitats (317). Per tal de comprovar aquest punt, caldrà aprofundir en un futur en l'estudi de l'activitat ALDH en placentes humanes obtingudes en diferents períodes gestacionals.

En resum, dels estudis realitzats en homogenats de teixit placentari i de les propietats cinètiques de l'ADH i de l'ALDH de placenta, es pot afirmar que la placenta humana a terme no posseeix cap sistema enzimàtic de metabolització de l'alcohol capaç de protegir al fetus de manera eficient enfront de les concentracions d'etanol i acetaldehid que es troben en la sang materna després de la ingestió de begudes alcohòliques. El fetus apareixeria desprotegit, especialment en les primeres etapes del desenvolupament al no disposar tampoc de cap isoenzim hepàtic de l'ADH suficientment actiu amb etanol (veure V.1.B.) i, probablement, al no posseir completa la dotació isoenzimàtica de l'ALDH (veure I.5.2.). Tot plegat explicaria la lliure difusió de l'etanol i d'una part important de l'acetaldehid cap al fetus i podria contribuir a l'elevada incidència de la síndrome d'alcoholisme fetal en fills de mares alcohòliques.

#### 4. POSSIBLE PAPER FISIOLÒGIC DE L'ADH I DE L'ALDH EN EL METABOLISME DE LA PLACENTA

Etanol i acetaldehid apareixen entre els substrats més pòbrament oxidats per part de  $\chi$ -ADH i de l'ALDH de placenta, respectivament, pel que es evident que la funció d'aquests enzims en la placenta no es l'eliminació d'aquests tòxics (veure U.3.).

En general, donada l'àmplia especificitat de substrat de l'ADH i l'ALDH de fetge de mamífer, són moltes les funcions que els han estat assignades, des de la mateixa eliminació de l'etanol i l'acetaldehid fins a la metabolització dels alcohols i aldehids presents en els aliments d'origen vegetal, passant per la interconversió d'alguns metabolits com retinol i retinal, i altres alcohols i aldehids isoprenoides (245). L'única certesa és que no es coneix encara la funció específica d'aquests enzims, si la tenen, ni molt menys la de cada una de les seves formes isoenzimàtiques. Per altra banda, el nombre de possibles substrats es pràcticament inabastable, doncs la majoria dels compostos intermedis de les vies metabòliques tenen grups hidroxils o carbonils susceptibles de participar en reaccions d'oxidació-reducció. Per això s'ha treballat amb substrats-model amb diferents estructures moleculars representatives dels compostos fisiològicament actius, ja sigi endògens o exògens, més comuns en l'organisme.

En general, hem constatat que productes resultants de l'oxidació dels millors substrats de  $\chi$ -ADH, com octanal i aldehid cinnàmic, no són bons substrats de l'ALDH de placenta. Es més, els requeriments estructurals dels substrats per a ambdos enzims semblen força diferents. Mentre  $\chi$ -ADH és més actiu enfront de substrats hidrofòbics de cadena llarga, com octanol i  $\omega$ -hidroxiàcids, ALDH de placenta és més eficient amb substrats de cadena curta com propanal o semialdehid succínic. Malgrat que no s'han assajat tots els múltiples possibles substrats, això

podria indicar que ambdós isoenzims no actuen coordinadament en l'eliminació dels alcohols i, per tant, no formarien part en principi de la mateixa via metabòlica. La manca de complementarietat metabòlica entre  $\chi$ -ADH i l'ALDH en la placenta contrasta amb la situació observada en els teixits rics en activitat ADH, els quals també posseeixen una activitat ALDH elevada i d'àmplia especificitat de substrat, el que permet, al menys en teoria, una eficaç eliminació dels aldehids produïts per l'ADH (256, 71).

Una altra possibilitat és que  $\chi$ -ADH i l'ALDH de placenta tinguessin funcions catabòliques en vies alternatives, actuant com a reductasa i deshidrogenasa, respectivament, enfront de diferents tipus d'aldehids. Cal recordar que, a pH fisiològic, la kcat de  $\chi$ -ADH enfront de l'octanal es unes 5 vegades superior a la mostrada enfront de l'alcohol corresponent, octanol (veure IV.1.8.2.). Mentre alguns substrats, com l'octanal i el 3-nitrobenzaldehyd, poden ser reduïts per  $\chi$ -ADH i també oxidats per l'ALDH de placenta, altres mostren preferència per una de les dues vies esmentades. Així, el semialdehyd succínic és oxidat per l'ALDH de placenta, però no és reduït per  $\chi$ -ADH (76), mentre que el citral és reduït pel primer enzim i no és oxidat pel segon. En aquesta especificitat podrien influir decisivament la longitud de la cadena hidrocarbonada, la presència de dobles enllaços i la posició de grups polars respecte del grup carbonil.

En aquest sentit, hem observat que petites modificacions en l'estructura de la molècula de substrat comporten sovint canvis notables en les constants cinètiques i, per tant, en l'especificitat. Així, en el cas de la  $\chi$ -ADH, variacions com la posició del grup hidroxil al final o enmig de la cadena carbonada, l'aparició d'un grup hidrofílic proper o allunyat del grup alcohol, la presència d'un doble enllaç en posició 2 o els substituents de l'anell aromàtic, poden fer variar considerablement les constants cinètiques. En el cas de l'ALDH de placenta, un important exemple del que acabem de dir és l'efecte sobre les constants cinètiques de la presència del grup carboxil en el semialdehyd succínic respecte del butanal. Es desconeix, però, el significat real d'aquestes observacions



per a la determinació del veritable substrat o substrats d'aquests isoenzims "in vivo". En general, és remarcable l'elevada especificitat de substrat de l'ADH i l'ALDH de placenta comparades amb les respectives famílies d'isoenzims, el que recolzaria la hipòtesi d'una funció fisiològica ben definida.

#### 4.1. Possible funció de l'isoenzim $\alpha$ -ADH

En el cas concret de l'isoenzim  $\alpha$ -ADH, es tracta d'un isoenzim singular quant a que es troba en tots els teixits de l'organisme, pel que sembla difícil assignar-li una funció específica en el teixit placentari. La presència d'aquest enzim en la placenta podria fer pensar "a priori" en un possible paper en el metabolisme hormonal, extraordinàriament actiu en aquest òrgan. Tanmateix, la manca d'activitat enfront dels esteroides més comuns ha demostrat que no és així.

L'oxidació del retinol per part de  $\alpha$ -ADH podria suggerir la seva participació en el metabolisme d'aquesta important vitamina, imprescindible per al correcte desenvolupament i creixement del fetus. Amb tot, la baixa activitat enfront d'aquest substrat i la manca d'activitat amb retinal posen en dubte la significació real d'aquesta hipòtesi.

La poca o nul·la activitat amb derivats del metabolisme de les catecolamines, com el 2-(4-hidroxí-3-metoxifenil)etanol, el 2-(4-hidroxí-3-metoxifenil)etanodiol i la vainillina, o de la serotonina, com el 2-(5-hidroxiindol-3-yl)etanol, exclou una possible participació en el metabolisme d'aquests neurotransmissors.

La presència ubíqua de  $\alpha$ -ADH més aviat podria relacionar-se amb funcions generals del metabolisme o de defensa cel·lular, en processos tals com el recanvi dels constituents de les membranes, com alcohols de cadena llarga o derivats d'àcids grassos, o en l'eliminació dels productes de la peroxidació dels lípids (veure també U.4.2.). En aquest

sentit, és molt reveladora l'especificitat mostrada enfront d'alcohols i aldehids de cadena llarga, com l'octanol i l'octanal i l'elevada afinitat pels  $\omega$ -hidroxiàcids.

#### 4.2. Possible funció de l'ALDH de placenta

Donada l'especificitat de substrat de l'ALDH de placenta, són dues les funcions que podem atribuir a aquest enzim en el metabolisme de la placenta, i, per extensió, a molts teixits de l'organisme si es confirmés la identitat amb l'isoenzim ALDH IV.

- En primer lloc, l'especificitat de substrat mostrada per l'ALDH de placenta enfront del semialdehid succínic (veure V.2.4.) i la seva similitud amb la SSDH de cervell (veure V.2.8.) suggereixen un paper de l'enzim en l'oxidació d'aquest substrat. De moment es desconeix, però, el significat metabòlic que podria tenir la presència d'una SSDH en placenta, a diferència del cervell, on se li atribueix una funció definida dins de la via del GABA (Fig. 48). Així, en el cervell dels mamífers, el GABA, precursor del semialdehid succínic, participa activament en el subministre d'energia i es creu que actua com a neurotransmissor inhibitor de la transmissió sinàptica en el sistema nerviós central. La concentració de GABA en el cervell és molt elevada (2-10 mM) (215), mentre que la de semialdehid succínic és de només 0,1  $\mu$ M, pel que la SSDH de cervell ha de ser activa a molt baixes concentracions de substrat (60).

No es disposa de dades sobre els nivells de GABA ni de semialdehid succínic en altres teixits diferents del cervell, tals com la placenta, encara que es creu que serien molt baixos. En el plasma, no s'ha detectat GABA (215). En canvi, l'activitat SSDH s'ha observat extensament distribuïda en varis òrgans de rata, entre els que destaquen per ordre d'importància, cervell i fetge, cor, ronyó i melsa, desconeixent-se, però, el seu significat (173). Mentrestant no s'investigui la presència en placenta d'altres isoenzims de la via del GABA, com la glutamat

descarboxilasa (GAD) o la GABA transaminasa (GABA-T) (Fig. 48) i no es coneixen les concentracions de GABA i del seu derivat en el teixit placentari, no es podrà assignar definitivament a l'ALDH de placenta el paper metabòlic que suggerim.

- Un altre paper de l'ALDH de placenta podria consistir en l'eliminació del malondialdehid i altres aldehids citotòxics, com els 4-hidroxiálkenals, que es produeixen com a conseqüència de la peroxidació dels lípids. La peroxidació dels lípids és un procés complex que implica la formació i propagació de radicals lipídics, amb un consum elevat d'oxigen, isomerització de dobles enllaços en lípids insaturats i destrucció dels lípids constituents de les membranes cel·lulars, produint-se una gran varietat de compostos tòxics, com alcohols, cetones, aldehids i èters. L'especial susceptibilitat de les membranes cel·lulars a la peroxidació dels lípids (48), juntament amb l'existència d'ALDH en diferents compartiment subcel·lulars, ha suggerit a diferents autors la possible participació dels seus isoenzims en l'eliminació dels aldehids tòxics produïts durant aquest procés. En fetge de rata, s'han observat diferents isoenzims de l'ALDH, capaços d'oxidar el malondialdehid. L'isoenzim mitocondrial d'alta Km (Enzim 11), anàleg a l'ALDH de placenta (veure U.2.4) presenta una Km de 7,3 mM per al malondialdehid (140), molt pròxima a l'obtinguda per nosaltres per a l'isoenzim de placenta humana (8,8 mM).

Quant als 4-hidroxiálkenals (19), es coneix molt poc sobre el seu metabolisme, però s'ha demostrat repetidament que els mitocondris poden oxidar alguns d'aquests aldehids, amb producció de NADH, a un pH òptim de 8,8, suggerint la participació d'alguna ALDH (252). L'existència d'un grup polar en la posició 4 de la cadena carbonada d'aquests aldehids, juntament amb els requeriments estereoquímics dels substrats de l'ALDH de placenta (veure U.2.3.), suggereixen que els 4-hidroxiálkenals podrien ser bons substrats de l'enzim. En un pròxim futur, tenim planejat sintetitzar en el nostre laboratori aquest tipus de compostos i assajar-els com a substrats, no solament de l'ALDH de placenta sinó també de  $\alpha$ -ADH. En cas de ser oxidats, podríem contribuir al coneixement d'un

nou sistema de defensa cel·lular enfront la peroxidació dels lípids.

Finalment, no podem deixar d'esmentar la hipòtesi de que els enzims ADH i ALDH, amb totes les seves formes isoenzimàtiques, incloïnt les detectades en placenta, tenen una funció àmplia de desintoxicació enfront d'alcohols i aldehids de molt variades estructures. Podrien constituir sistemes de protecció de l'organisme, i es podrien contemplar de manera conjunta amb els sistemes oxidatius mitocondrials, els sistemes de control de l'equilibri red-ox citoplasmàtics, etc.

Capítol VI : CONCLUSIONS

1. La placenta humana s'ha revelat com un òrgan de gran versatilitat per a l'estudi d'alguns dels isoenzims hepàtics. El teixit placentari es pot processar poc temps després de deixar d'ésser funcional, el que possibilita l'anàlisi d'un elevat nombre de mostres i facilita els processos de purificació d'enzims i de fraccionament subcel·lular.
2. Totes les placentes humanes a terme analitzades presenten un únic isoenzim de l'ADH, de mobilitat anòdica en electroforesi en gel de midó i molt poc actiu a baixes concentracions d'etanol, no existint variabilitat genètica en la població estudiada.
3. S'ha purificat l'ADH de placenta mitjançant cromatografia de bescanvi iònic en DEAE-cel·lulosa i cromatografia d'afinitat en 5'AMP-Sepharose. L'enzim ha resultat homogeni en electroforesi en gel de poliacrilàmida amb dodecil sulfat sòdic i en cromatografia de gel filtració en Sephadex G-200 Superfine.
4. Les propietats físico-químiques de l'ADH de placenta, tals com un pes molecular aproximat de 80.000, 2 subunitats idèntiques, 2 àtoms de zinc per subunitat, i algunes de les seves propietats cinètiques, tals com la capacitat d'oxidar etanol i alcohols alifàtics primaris, pH òptim d'oxidació dels alcohols entre 10 i 11, especificitat pel coenzim NAD(H) i el mecanisme seqüencial ordenat BiBi, són similars a les dels isoenzims hepàtics més coneguts de l'ADH. Podem afirmar, doncs, que l'ADH de placenta és un isoenzim de l'ADH de fetge.
5. De les propietats electroforètiques i cinètiques, i de la resistència a l'inhibició amb 4-metilpirazole, podem concloure que l'ADH de placenta és idèntica a l'isoenzim de la classe III,  $\chi$ -ADH, purificat a partir de fetge per Parés i Vallee.

6.  $\chi$ -ADH presenta una especificitat de substrat més restringida que els isoenzims de les classes I i II, transformant només amb certa eficiència alcohols i aldehids alifàtics de cadena llarga i  $\omega$ -hidroxiàcids. A pH fisiològic l'enzim és més eficient en la reducció d'aldehids, encara que les seves constants d'especificitat són molt baixes comparades amb les dels altres isoenzims.
7. S'ha detectat per primera vegada activitat ADH en placenta de rata, associant-se com en placenta humana a un únic isoenzim, ADH-2, que posseeix ademés propietats anàlogues a  $\chi$ -ADH i a altres isoenzims de varies espècies de mamífer.
8. Dels estudis realitzats en placenta i fetge de fetus humans, i en els mateixos teixits de rata, podem concloure que l'isoenzim  $\chi$ -ADH, en home, i ADH-2, en rata, són els primers isoenzims de l'ADH que s'expressen durant el desenvolupament fetal.
9. S'ha determinat per primera vegada la localització subcel·lular de l'isoenzim  $\chi$ -ADH de l'ADH humana. La  $\chi$ -ADH de placenta, com probablement tots els altres isoenzims de l'ADH humana, es localitza en la fracció citoplasmàtica soluble.
10. La placenta humana a terme presenta una ALDH d'alta Km enfront dels aldehids alifàtics de cadena curta com acetaldehid i propanal. La major part d'aquesta activitat s'ha localitzat en la fracció mitocondrial de la cèl·lula placentària.
11. S'ha desenvolupat un mètode de purificació per a l'ALDH de placenta humana, que comporta tres cromatografies successives: de bescanvi iònic en DEAE-cel·lulosa, d'afinitat en 5'AMP-Sepharose i de gel filtració en Sephacryl S-300. L'enzim obtingut apareix homogeni segons el criteri de puresa d'electroforesi en gel de poliacrilàmida amb dodecil sulfat sòdic.

12. L'ALDH de placenta humana s'ha mostrat altament inestable en el si d'una atmosfera oxidant, i susceptible a la inhibició per disulfiram. La introducció de condicions anaeròbiques i la utilització d'agents reductors durant l'aïllament i emmagatzement de l'enzim han comportat un notable augment en l'estabilitat de l'enzim.
13. L'ALDH de placenta presenta algunes propietats similars a les d'altres isoenzims de l'ALDH humana, tals com la sensibilitat al medi oxidant i al disulfiram, la capacitat d'oxidar acetaldehid i propanal, el pH òptim proper a 9 i l'activitat esterasa. Per altra banda, la major part de les propietats moleculars de l'ALDH de placenta, tals com un pes molecular de 114.000, estructura dimèrica, punt isoelèctric prop de la neutralitat i l'extraordinària inestabilitat tèrmica, no havien sigut descrites anteriorment en una ALDH humana, diferint notablement de les dels isoenzims hepàtics més estudiats, ALDH I i ALDH II.
14. Les propietats físico-químiques i cinètiques de l'ALDH humana són similars a les observades recentment per Forte-McRobbie i Pietruszko per a l'isoenzim ALDH IV de fetge humà, suggerint una identitat entre ambdós formes que, ademés, serien probablement anàlogues a un isoenzim mitocondrial d'alta  $K_m$  present en el fetge d'altres espècies de mamífer.
15. L'ALDH de placenta humana presenta una elevada especificitat per als aldehids de cadena curta, especialment per al semialdehid succínic. La similitud de les propietats moleculars i cinètiques de l'ALDH de placenta amb les de la semialdehid succínic deshidrogenasa de cervell podria suggerir que l'enzim de placenta és un isoenzim de la semialdehid succínic deshidrogenasa.

16. La veritable funció fisiològica de  $\gamma$ -ADH i de l'ALDH de placenta ens és desconeguda. Malgrat tot podem afirmar que:
- a) La ubiqüitat de  $\gamma$ -ADH, la seva presència exclusiva en placenta i la seva primera aparició durant el desenvolupament fetal, juntament amb l'especificitat de substrat, suggereixen un important paper metabòlic d'aquest isoenzim, que podria consistir en l'eliminació d'alcohols o aldehids alifàtics de cadena llarga.
  - b) L'especificitat de substrat de l'ALDH de placenta suggereix que aquest enzim podria participar en l'oxidació del semialdehid succínic o d'altres aldehids amb un grup polar en posició 4 respecte del grup carbonil, com els 4-hidroxiàlkenals.
  - c) L'estudi de l'especificitat de substrat indica que els requeriments estereoquímics dels dos enzims estudiats són diferents, el que fa improbable la seva participació en una mateixa via metabòlica.
17. Dels estudis realitzats en homogenat de placenta i de les propietats cinètiques dels enzims purificats, es pot afirmar que la placenta humana a terme no posseeix cap sistema enzimàtic de metabolització de l'alcohol capaç de protegir al fetus enfront de l'etanol i de l'acetaldehid que es poden trobar en la sang materna. El fetus sofriria directament els efectes tòxics d'aquestes substàncies, en la mateixa concentració aproximadament en que es troben en la mare, explicant-se l'elevada incidència de la síndrome d'alcoholisme fetal en la població.



**CAPITOL VI**

**CONCLUSIONS**

**CAPITOL VII**

**BIBLIOGRAFIA**

Capitol VII : BIBLIOGRAFIA

- (1) Abel, E.L. (1981). Psychol. Bull. 20 , 564-581.
- (2) Abel, E.L. (1982). Hum. Biol. 54 , 421-453.
- (3) Adachi, J. i Mizoi, Y. (1983). Jpn. J. Pharmacol. 33 , 531-539.
- (4) Adinolfi, A.; Adinolfi, M.; Hopkinson, D.A.; Harris, H. (1978). J. Immunogenet. 5 , 283-296.
- (5) Adinolfi, A.; Adinolfi, M.; Hopkinson, D.A. (1984). Ann. Hum. Genet. 43 , 1-10.
- (6) Agarwal, D.P.; Dethling, J.; Wolken, S.; Harada, S.; Goedde, H.W. (1982). Alcohol Clin. Exp. Res. 6 , 432.
- (7) Agarwal, D.P.; Toban-Rojas, L.; Harada, S.; Goedde, H.W. (1983). Pharmacol. Biochem. Behav. 18 (S1), 89-95.
- (8) Albers, R.W. i Koval, G.J. (1961). Biochim. Biophys. Acta 52 , 29-35.
- (9) Alderman, J.; Sanner, C.G.; Gordon, E.R.; Lieber, C.S. (1992) a "Enzymology of Carbonyl Metabolism: Aldehyde Dehydrogenase and Aldo/Keto Reductase". Ed. H. Weiner, B. Nermuth, Alan R. Liss, New York, pp. 77-89.
- (10) Algar, E.M.; Seeley, T.-L.; Holmes, R.S. (1992). Eur. J. Biochem. 137 , 139-147.
- (11) Algar, E.M. i Holmes, R.S. (1995). Int. J. Biochem. 17 , 51-60.
- (12) Allanson, S. i Dickinson, F.M. (1984). Biochem. J. 223 , 163-169.
- (13) Andersson, L.; Jonvall, H.; Akesson, A.; Mosbach, K. (1974). Biochim. Biophys. Acta 364 , 1-8.
- (14) Antonson, D.L. i Vanderhoof, J.A. (1983). Digest. Dis. Sci. 28 , 604-608.
- (15) Arcas, R.; Jimenez, R.; Cruz, M. (1978). Arch. Pediat. 29 , 147-154.
- (16) von Bahr-Lindstrom, H.; Hempel, J.; Jonvall, H. (1984). Eur. J. Biochem. 141 , 37-42.

- (17) Baldwin, V.J.; MacLeod, P.M.; Genirschke, K. (1952) a "Birth Defects: Original An Series". March of Dimes Birth Defects Foundation. Vol. 18, 3A, pp. 89-94.
- (18) Beaconsfield, P.; Birdwood, G.; Beaconsfield, R. (1980). *Inv. Ciencia.* n° 49, pp. 54-64.
- (19) Benedetti, A.; Comporti, M.; Fulceri, R.; Esterbauer, H. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 792 , 171-181.
- (20) Bennett, A.F.; Buckley, P.D.; Blackwell, L.F. (1983). *Biochemistry* 22 , 776-784.
- (21) *Biochemica Catalogue* Boehringer (1970), Boehringer Mannheim.
- (22) *Bio-Rad Technical Bulletin* No. 82-1089 (1982), Bio-Rad Laboratories, Richmond. .
- (23) Blackwell, L.F.; Bennett, A.F.; Buckley, P.D. (1983). *Biochemistry* 22 , 3784-3791.
- (24) Blair, A.H.; Bodley, F.H. (1969). *Can. J. Biochem.* 47 , 265-272.
- (25) Blakley, P.M. i Scott, W.J., Jr. (1984). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72 , 355-363.
- (26) Blakley, P.M. i Scott, W.J., Jr. (1984). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72 , 364-371.
- (27) Blaner, W.S. i Chuchich, J. (1979). *J. Biol. Chem.* 254 , 1794-1798.
- (28) *BMDP, Statistical Software*, Univ. California Press (1981).
- (29) Bodley, F.H.; Blair, A.H. (1971). *Can. J. Biochem.* 49 , 1-5.
- (30) Bonnichsen, R.K. (1950). *Acta Chem. Scand.* 4 , 715-716.
- (31) Bosron, W.F.; Li, T.-K.; Dafeldecker, W.P.; Vallee, B.L. (1979). *Biochemistry* 18 , 1101-1105.
- (32) Bosron, W.F.; Li, T.-K.; Vallee, B.L. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91 , 1549-1555.
- (33) Bosron, W.F.; Li, T.-K.; Vallee, B.L. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 , 5784-5788.
- (34) Bosron, W.F.; Magnes, L.J.; Li, T.-K. (1983). *Biochem. Genet.* 21 , 735-744.

- (35) Bosron, W.F.; Magnes, L.J.; Li, T.-K. (1983). *Biochemistry* 22 , 1852-1857.
- (36) Bosron, W.F.; Crabb, D.W.; Li, T.-K. (1983). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (S1), 223-227.
- (37) Bosron, W.F.; Yin, S.-J.; Li, T.-K. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1545.
- (38) Bosron, W.F.; Yin, S.-J.; Li, T.-K. (1985) a "Enzymology of Carbonyl Metabolism 2. Aldehyde Dehydrogenase, Aldo-Keto Reductase, and Alcohol Dehydrogenase". Ed. T.G. Flynn, H. Weiner. Alan R. Liss, New York, pp. 193-206.
- (39) Bosron, W.F.; Gaither, J.W.; Magnes, L.J. (1985). *Alcohol Clin. Exp. Res.* 9 , 228-234.
- (40) Bradford, M. (1976). *Anal. Biochem.* 72 , 248-254.
- (41) Branden, C.-I.; Eklund, H.; Nordstrom, S.; Boije, T.; Soderlund, G.; Zeppezauer, E.; Ohlsson, I.; Akesson, A. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70 , 2439-2442.
- (42) Branden, C.-I.; Jonvall, H.; Eklund, H.; Furugren, B. (1975) a "The Enzymes". 3rd. ed. Vol. 11, pp. 103-190.
- (43) Branden, C.-I. i Eklund, H. (1980) a "Dehydrogenases Requiring Nicotinamide Coenzymes". Ed. J. Jeffery. Birkhauser, Basel, pp. 41-84.
- (44) Brandes, J.M.; Roth, E.F., Jr.; Berk, P.D.; Bottone, E.; Milano, C.T.; Sarkoz, L.; Zaroulis, C.G. (1983). *Transfusion* 23 , 325-327.
- (45) Brien, J.F. i Loomis, C.W. (1983). *Can. J. Phys. Pharmacol.* 31 , 1-22.
- (46) Brien, J.F.; Loomis, C.W.; Tranmer, J.; McGrath, M. (1983). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 146 , 181-186.
- (47) Brown, N.A.; Goulding, E.H.; Fabro, S. (1979). *Science* 206 , 573-575.
- (48) Buege, J.A. i Aust, S.D. (1978) a "Methods in Enzymology". Ed. S. Fleischer, L. Packer. Acad. Press. New York. Vol. 52, pp. 302-310.
- (49) Buhler, R.; Hess, M.; von Wartburg, J.-P. (1982). *Am. J. Pathol.* 108 , 89-99.
- (50) Buhler, R. i von Wartburg, J.-P. (1982). *Fabs Lett.* 144 , 125-139.

- (51) Buhler, R. i von Wartburg, J.-P. (1982). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 6 , 506-511.
- (52) Buhler, R.; Hempel, J.; von Wartburg, J.-P.; Jonvall, H. (1984). *Febs Lett.* 173 , 360-366.
- (53) Buhler, R.; Hempel, J.; Kaiser, R.; de Zalenski, C.; von Wartburg, J.-P.; Jonvall, H. (1984). *Eur. J. Biochem.* 145 , 447-453.
- (54) Buhler, R.; Hempel, J.; Kaiser, R.; von Wartburg, J.-P.; Vallee, B.L.; Jonvall, H. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 , 6320-6324.
- (55) Buhler, R. i von Wartburg, J.-P. (1984). *Febs Lett.* 178 , 249-252.
- (56) Campbell, M.A. i Fantel, A.G. (1983). *Life Sci.* 32 , 2641-2647.
- (57) Casanova-Schmitz, M.; David, R.M.; Heck, H.A. (1984). *Biochem. Pharmacol.* 33 , 1137-1142.
- (58) Cash, C.; Cieselski, L.; Martre, M.; Mandel, P. (1977). *Biochimie* 59 , 257-268.
- (59) Cash, C.D.; Martre, M.; Ossola, M.; Mandel, P. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 554 , 26-36.
- (60) Cash, C.D.; Martre, M.; Rumigny, J.F.; Weissman-Nanopoulos, O.; Mandel, P. (1982) a "Enzymology of Carbonyl Metabolism". Ed. H. Weiner, B. Wermuth. Alan R. Liss, New York, pp. 379-395.
- (61) Ciotti, M.M. i Kaplan, N.O. (1957) a "Methods in Enzymology". Ed. S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Acad. Press, New York, Vol III, pp. 890-899.
- (62) Cleland, W.W. (1963). *Biochim. Biophys. Acta* 62 , 104-137.
- (63) Cleland, W.W. (1977). *Adv. Enzymol.* 45 , 272-387.
- (64) Cleland, W.W. (1979) a "Methods in Enzymology". Acad. Press, New York. Vol. 63A, pp. 500-513.
- (65) Cornell, N.W. (1983). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (S1), 215-225.
- (66) Crabbe, M.J.C.; Ting, H.-H.; Halder, A.B. (1982) a "Enzymology of Carbonyl Metabolism: Aldehyde Dehydrogenase and Aldo/Keto Reductase". Ed. H. Weiner, B. Wermuth. Alan R. Liss, New York, pp. 329-346.

- (67) Crews, F.T.; Majchrowicz, E.; Neeks, R. (1983). *Psychopharmacol.* 91 , 208-213.
- (68) Criado, A. (1984) a "El País (28-10-84)", p. 28.
- (69) Crow, K.E.; Kitson, T.M.; Macgibbon, A.K.H.; Batt, R.D. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 350 , 121-128.
- (70) Dafeldecker, W.P.; Pares, X.; Vallee, B.L.; Bosron, W.F.; Li, T.-K. (1981). *Biochemistry* 20 , 856-861.
- (71) Dafeldecker, W.P.; Meadow, P.E.; Pares, X.; Vallee, B.L. (1981). *Biochemistry* 20 , 6729-6734.
- (72) Dafeldecker, W.P. i Vallee, B.L. (1982). *J. Prot. Chem.* 1 , 59-69.
- (73) Dalziel, K. (1957). *Acta Chem. Scand.* 11 , 397-398.
- (74) Damgaard, S.E. (1982). *Eur. J. Biochem.* 125 , 593-603.
- (75) Davis, M.E. i Walsh, M. (1970). *Science* 167 , 1005-1007.
- (76) Deetz, J.S.; Luehr, C.A.; Vallee, B.L. (1984). *Biochemistry* 23 , 6822-6828.
- (77) Deitrich, R.A. (1966). *Biochem. Pharmacol.* 15 , 1911-1922.
- (78) Deitrich, R.A.; Bludeau, P.; Stock, T.; Roper, M. (1977). *J. Biol. Chem.* 262 , 6169-6176.
- (79) Deitrich, R.A.; Baker, R.C. (1984). *Alcohol, Clin. Exp. Res.* 8 , 487-490.
- (80) Dickinson, F.M. i Dalziel, K. (1967). *Biochem. J.* 104 , 165-172.
- (81) Dickinson, F.M.; Hart, G.J.; Kitson, T.M. (1981). *Biochem. J.* 199 , 573-579.
- (82) Dickinson, F.M. i Hart, G.J. (1982). *Biochem. J.* 205 , 443-448.
- (83) Diczfalusy, E. i Manauso, G. (1969) a "Foetus and Placenta". Ed. A. Klopfer, E. Diczfalusy. Blackwell Sci.Pub., Oxford, pp. 191-248.
- (84) Direccion General de Salud Publica (1984), a "Estudio de los Habitos de Bebidas Alcoholicas de la Poblacion Adulta Española". Servicio de Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, pp. 5-149.
- (85) Dittlow, C.C.; Holmquist, B.; Morelock, M.M.; Vallee, B.L. (1984). *Biochemistry* 23 , 6363-6368.

- (86) Donohue, T.M.; Tuma, D.J.; Sorrell, M.F. (1983). *Lab. Invest.* 52, 226-239.
- (87) Draper, L.R.; Gyure, L.A.; Hall, J.G.; Robertson, D. (1983). *Gut* 24, 399-404.
- (88) Dubied, A.; von Wartburg, J.-P.; Bohlken, G.P.; Plapp, B.U. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 1464-1470.
- (89) Duester, G.; Hatfield, G.W.; Buhler, R.; Hempel, J.; Jonvall, H.; Smith, M. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4055-4059.
- (90) Duester, G.L.; Hatfield, G.W.; Smith, M. (1984). Abstracts of the Second Congress of the International Society for Medical Research on Alcoholism and Research Society on Alcoholism, Santa Fe, USA, p. 248.
- (91) Duley, J.A.; Harris, D.; Holmes, R.S. (1985). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 9, 263-271.
- (92) Duncan, R.J.S. + Tipton, K.F. (1971). *Eur. J. Biochem.* 22, 257-262.
- (93) Duncan, R.J.S. + Tipton, K.F. (1971). *Eur. J. Biochem.* 22, 538-543.
- (94) Duncan, R.J. (1977). *Biochem. J.* 161, 123-130.
- (95) de Duve, C.; Pressman, B.C.; Gianetto, R.; Wattiaux, R.; Appelmans, F. (1955). *Biochem. J.* 60, 604-617.
- (96) Dworschack, R.T. + Plapp, B.U. (1977). *Biochemistry* 16, 111-116.
- (97) Eckfeldt, J.; Mope, L.; Takro, K.; Yonetani, T. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 236-240.
- (98) Eckfeldt, J.H. + Yonetani, T. (1976). *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 717-722.
- (99) Edson, C.R. + Pietruszko, R. (1979). *Fed. Proc.* 38, 377.
- (100) Eklund, H. (1983). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (S1), 73-81.
- (101) Eriksson, C.J.P. (1983). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (S1), 141-150.
- (102) Erwin, U.G. + Deitrich, R.A. (1966). *J. Biol. Chem.* 15, 3533-3539.



- (103) Fasman, G.D. (1976) a "Handbook of Biochemistry and Molecular Biology". Ed. G.D. Fasman. 3rd. ed. Vol. 11, p.336.
- (104) Feldman, R.I. i Weiner, H. (1972). J. Biol. Chem. 247 , 260-272.
- (105) Ferencz-Biro, K. i Pietruszko, R. (1984). Biochem. Biophys. Res. Commun. 118 , 97-102.
- (106) Ferre, J.L. (1983). Test de Licenciatura.
- (107) Ferre, J.L. Comunicacio personal.
- (108) Fersht, A. (1985) a "Enzyme Structure and Mechanism". W.H. Freeman, New York. 2nd. ed.
- (109) Forte-McRobbie, C.M. i Pietruszko, R. (1984). Abstracts of the Second Congress of the International Society for Medical Research on Alcoholism and Research Society on Alcoholism, Santa Fe, p. 91.
- (110) Freixa, F. (1983). Ciencia 3 , 460.
- (111) Geokas, M.C.; Lieber, C.S.; French, S.; Halsted, H. (1981). Ann. Int. Med. 95 , 198-211.
- (112) Goedde, H.W.; Harada, S.; Agarwal, D.P. (1979). Hum. Genet. 51 , 331-334.
- (113) Goedde, H.W. i Agarwal, D.P. (1981). J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19 , 179-189.
- (114) Goedde, H.W.; Agarwal, D.P. ; Harada, S. (1993) a "Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research". Ed. H. Weiner, B. Vermuth. Alan R. Liss, New York, Vol. 8, pp. 175-193.
- (115) Goldstein, D.B. i Chin, J.H. (1981). Fed. Proc. 40 , 2073-2076.
- (116) Good, N.E. i Izawa, S. (1968) a "Methods in Enzymology". Vol. 24, Part B, pp. 53-68.
- (117) Greenfield, N.J. i Pietruszko, R. (1977). Biochim. Biophys. Acta 483 , 35-45.
- (118) Grunnet, N. (1973). Eur. J. Biochem. 35 , 236-243.
- (119) Guerni, C. i Grisolia, S. (1983). Pharmacol. Biochem. Behav. 19 (S1), 45-50.
- (120) Guerni, C.; Esquifino, A.; Sanchis, R.; Grisolia, S. (1984) a "Mechanism of Alcohol Damage in Utero". Ciba Foundation. Symposium 105. Pitman, Londres, pp. 85-102.

- (121) Guerni, C. i Sanchis, R. (1985). Alcohol (en premsa).
- (122) Hagerman, D.D. (1969) a "Foetus and Placenta". Ed. A. Flopper, E. Diczfalusy. Blackwell Sci. Publ., Oxford, pp. 413-469.
- (123) Hald, J. i Jacobson, E. (1948). Lancet 255, 1001-1004.
- (124) Handbook of Chemistry and Physics (1974). Ed. R.C. Weast. CRC Press, Cleveland. 55th. ed.
- (125) Harada, S.; Agarwal, D.P.; Goedde, H.W. (1980). Life sci. 26, 1773-1780.
- (126) Harada, S.; Misawa, S.; Agarwal, D.P.; Goedde, H.W. (1980). Am. J. Hum. Genet. 32, 8-15.
- (127) Harada, S.; Agarwal, D.P.; Goedde, H.W. (1981). Lancet 2, 982.
- (128) Harada, S.; Agarwal, D.P.; Goedde, H.W. (1982). Misuse 3, 107-115.
- (129) Harada, S.; Agarwal, D.P.; Goedde, H.W.; Tagaki, S.; Ishikawa, B. (1982). Lancet, oct. 9.
- (130) Harada, S.; Agarwal, D.P.; Goedde, H.W. (1982) a "Enzymology of Carbonyl Metabolism: Aldehyde Dehydrogenase and Aldo/Keto Reductase". Ed. H. Weiner, B. Wermuth. Alan R. Liss, New York, pp. 147-153.
- (131) Harada, S.; Agarwal, D.P.; Goedde, H.W.; Ishikawa, B. (1983). Pharmacol. Biochem. Behav. 18 (S1), 151-153.
- (132) Harris, H. i Hopkinson, D.A. (1976) a "Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics". North-Holland Pub. Co., Amsterdam, pp. 3-4.
- (133) Hart, G.J. i Dickinson, f.M. (1977). Biochem. J. 163, 261-267.
- (134) Havre., P.; Abrams, M.A., Connall, R.J.M.; Yu, L.C.; Szczepanik, P.A.; Felchan, H.B.; Klein, P.; Kong, M.S.; Mangolis, J.M.; Landau, B.R. (1977). Arch. Biochem. Biophys. 182, 14-23.
- (135) Hempel, J. i Pietruszko, R. (1979). Alcohol. Clin. Exp. Res. 3, 95-98.
- (136) Hempel, J.; Reed, D.M.; Pietruszko, R. (1982). Alcohol. Clin. Exp. Res. 6, 417-425.

- (137) Hempel, J.; von Bahr-Lindstrom, H.; Jonnvall, H. (1983). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (S1), 117-121.
- (138) Hempel, J.; Kaiser, R.; Jonnvall, H. (1984). *FEBS Lett.* 173 , 367-373.
- (139) Hempel, J.; Buhler, R.; Kaiser, R.; Holmquist, B.; de Zalenski, C.; von Wartburg, J.-P.; Vallee, B.L.; Jonnvall, H. (1984). *Eur. J. Biochem.* 145 , 437-445.
- (140) Hjelle, J.J. i Petersen, D.R. (1983). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 70 , 57-66.
- (141) Holbrook, J.J.; Liljas, A.; Steindel, S.J.; Rossman, M.G. a "The Enzymes". Ed. P.D. Boyer. Acad. Press, New York. 3rd. ed. Vol. 6, 191-292.
- (142) Holmes, R.S. (1978). *Comp. Biochem. Physiol.* 61 B, 339-346.
- (143) Holmes, R.S. (1978). *Biochem. Genet.* 16 , 1207-1218.
- (144) Holmes, R.S. (1984). *Comp. Biochem. Physiol.* 78 B, 131-139.
- (145) Horton, A.A. i Barnett, M.C. (1975). *Arch. Biochem. Biophys.* 167 , 426-436.
- (146) Hsu, L.C.; Tani, K.; Fujiyoshi, T.; Kurachi, K.; Yoshida, A. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 , 3771-3775.
- (147) Ikawa, M.; Impraim, C.C.; Wang, B.; Yoshida, A. (1983). *J. Biol. Chem.* 258 , 6282-6287.
- (148) Ikuta, T.; Fujiyoshi, T.; Kurachi, K.; Yoshida, A. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 , 2703-2707.
- (149) Impraim, C.; Wang, A.; Yoshida, A. (1982). *Am. J. Hum. Gen.* 34 , 837-841.
- (150) Inoue, K.; Nishimukai, H.; Yamasawa, K. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 569 , 117-123.
- (151) Inoue, K.; Ohbora, Y.; Fukunaga, M.; Yamasawa, K. (1979). *Jpn. J. Stud. Alcohol* 14 , 363-368.
- (152) Inoue, K.; Fukunaga, M.; Yamasawa, K. (1980). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 , 295-297.
- (153) Inoue, K.; Fukunaga, M.; Yamasawa, K.; Komura, S. (1983). *Biochim. Biophys. Acta* 759 , 264-269.

- (154) Inoue, K.; Fukunaga, M.; Kiriya, T.; Komura, S. (1984). *Alcohol Clin. Exp. Res.* 8, 319-322.
- (155) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 5939-5941.
- (156) Jakoby, W.B. (1963) a "The Enzymes". Ed. P.D. Boyer, H. Lardy i K. Myrback. Acad. Press, New York. Vol. 7, p. 203.
- (157) Jenkins, W.J. i Peters, T.J. (1978). *Clin. Sci. Mol. Med.* 55, 11-12.
- (158) Jenkins, W.J. i Peters, T.J. (1980). *Lancet* 1, 628-629.
- (159) Jenkins, W.J. i Peters, T.J. (1983). *Cell Biochem. Func.* 1, 37-40.
- (160) Joly, J.-G. (1982) a "Brain Peptides and Hormones". Ed. R. Collu i col. Raven Press, New York, pp. 367-377.
- (161) Jones, K.L.; Smith, D.W.; Uilleland, C.N.; Streissguth, A.P. (1973). *Lancet* 1, 1267-1271.
- (162) Jones, K.L.; Smith, D.W.; Streissguth, A.P.; Myrianpoulos, N.C. (1974). *Lancet* 1, 1076-1078.
- (163) Jones, P.J.H.; Leichter, J.; Lee, M. (1981). *Life Sci.* 29, 1153-1159.
- (164) Jonvall, H. (1970). *Eur. J. Biochem.* 16, 25-40.
- (165) Jonvall, H.; von Bahr-Lindstrom, H.; Jany, K.-D.; Ulmer, W.; Froschle, M. (1984). *Febs Lett.* 165, 190-196.
- (166) Jonvall, H. (1984). Comunicacio personal.
- (167) Jonvall, H.; Hempel, J.; Vallee, B.L.; Sosnon, W.F.; Li, T.-K. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3024-3028.
- (168) Juchau, M.R. (1980). *Pharmacol. Ther.* 8, 501-524.
- (169) Julia, P. (1982). Tesi de Llicenciatura.
- (170) Julia, P.; Farras, J.; Pares, X. (1983). *Biochem. J.* 213, 547-550.
- (171) Julia, P.; Farras, J.; Pares, X. (1985). *Exp. Eye Res.* (acceptat per a publicacio)
- (172) Julia, P. Comunicacio personal.

- (173) Kammeraat, C. i Veldstra, H. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 151 , 1-10.
- (174) Kaufman, M.H. i Woollam, D.H.M. (1981). *Br. J. Exp. Path.* 62 , 357-361.
- (175) Kennedy, L.A. (1984). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 149 , 518-522.
- (176) Kesaniemi, Y.A. i Sippel, H.W. (1975). *Acta Pharmacol. Toxicol.* 47 , 43-48.
- (177) Kitson, T.M. (1975). *Biochem. J.* 151 , 407-412.
- (178) Koivula, T. i Koivusalo, M. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* 397 , 9-23.
- (179) Koivula, T. (1975). *Life Sci.* 16 , 1563-1570.
- (180) Koshland, D.E., Jr. (1970) a "The Enzymes". Ed. P.D. Boyer. Academic Press, New York, 3a. ed. Vol 1, pp. 342-396.
- (181) Kouri, M.; Koivula, T.; Koivusalo, M. (1977). *Acta Pharmacol. Toxicol.* 40 , 460-464.
- (182) Kraemer, R.J. i Deitrich, R.A. (1968). *J. Biol. Chem.* 243 , 6402-6408.
- (183) Krasner, J.; Tischler, F.; Yaffe, S.J. (1976). *J. Med.* 7 , 323-332.
- (184) Krebs, H.A. i Perkins, J.R. (1970). *Biochem. J.* 118 , 635-644.
- (185) Kricka, L.J. i Clarck, P.M. (1979) a "Biochemistry of Alcohol and Alcoholism". Ellis Horwood.
- (186) Lad, P.J.; Shoemaker, W.J.; Leffert, H.L. (1984). *Develop. Biol.* 105 , 526-529.
- (187) La Droitte, Ph.; Lamboeuf, Y.; de Saint Blanquat, G. (1984). *Life Sci.* 35 , 1221-1229.
- (188) Laemmli, U.K. (1970). *Nature* 227 , 680.
- (189) Lange, L.G. i Vallee, B.L. (1976). *Biochemistry* 15 , 4681-4686.
- (190) Lange, L.G.; Sytkowski, A.J.; Vallee, B.L. (1976). *Biochemistry* 15 , 4687-4693.

- (191) Lebsack, M.E.; Gordon, E.R.; Lieber, C.S. (1981). *Feb. Proc.* 40 , 717.
- (192) Lee, T.Ch. (1979). *J. Biol. Chem.* 254 , 2892-2896.
- (193) Lee, V.H.L. (1983). *J. Pharm. Sci.* 72 , 239-244.
- (194) Leicht, W.; Heinz, F.; Freimüller, B. (1979). *Eur. J. Biochem.* 89 , 189-196.
- (195) Li, T.-K. ; Magnes, L.J. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63 , 202-208.
- (196) Li, T.-K.; Bosron, W.F.; Dafeidecker, W.P.; Lange, L.G.; Vallee, B.L. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 , 4378-4381.
- (197) Li, T.-K. (1977) a "Advances in Enzymology". Ed. Alton Meister. John Wiley, New York. Vol. 45, pp. 427-483.
- (198) Lieber, C.S. ; DeCarli, L.M. (1970). *J. Biol. Chem.* 245 , 2505-2512.
- (199) Lieber, C.S. (1973). *Adv. Exp. Med. Biol.* 35 , 57-75.
- (200) Lieber, C.S.; Teschke, R.; Hasumura, Y.; DeCarli, L.M. (1975). *Fed. Proc.* 34 , 2060-2074.
- (201) Lieber, C.S. (1977) a "Metabolic Aspects of Alcoholism". Ed. C.S. Lieber. University Park, Baltimore, pp. 1-29.
- (202) Lin, W.-J. (1980). *Life Sci.* 28 , 595-601.
- (203) Lindahl, R. (1977). *Biochem. J.* 164 , 119-123.
- (204) Lindahl, R. ; Evces, S. (1984). *J. Biol. Chem.* 259 , 11986-11990.
- (205) Lindahl, R. ; Evces, S. (1984). *J. Biol. Chem.* 259 , 11991-11996.
- (206) Lindahl, R. ; Evces, S. (1984). *Biochem. Pharmacol.* 33 , 3383-3389.
- (207) Lindros, K.O.; Stowell, A.; Pikkarainen, P.; Salaspuro, M. (1980). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 (S1), 119-124.
- (208) Lindros, K.O. (1983). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 7 , 70-75.
- (209) Lineweaver, H. ; Burk, D. (1934). *J. Am. Chem. Soc.* 56 , 658-666.
- (210) LKB. Ultrasmöld. LKB-Produkter, Bromma.

- (211) Lowry, D.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R. (1951). *J. Biol. Chem.* 193 , 265-275.
- (212) Lloret, J.; Muñoz, J.; Puig, X. (1983). *Ciencia* 3 , 476-481.
- (213) MacGibbon, A.K.H.; Blackwell, L.F.; Buckley, P.D. (1977). *Eur. J. Biochem.* 77 , 93-100.
- (214) MacGibbon, A.K.H.; Motion, L.R.; Crow, K.E.; Buckley, P.D.; Blackwell, L.F. (1979). *Eur. J. Biochem.* 96 , 585-595.
- (215) Maker, H.S.; Clarke, D.D.; Lajtha, A.L. (1976) a "Basic Neurochemistry". Ed. G.J. Siegel, R.W. albers, R. Katzman, B.W. Agranoff. Little Brown and Co. Boston. 2nd. ed.
- (216) Mani, J.-D. i Dormand, J. (1971). *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 272 , 3210.
- (217) Maring, J.-A.; Weigand, K.; Bremer, H.D.; von Wartburg, J.-P. (1983). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (S1), 135-138.
- (218) Market, C.L. (1975) a "Isozymes". Ed. C.L. Market. Acad. Press, New York. Vol. 1 , pp. 1-9.
- (219) Martin-Santos, R. i Torrens, M. (1983). *Ciencia* 3 , 472-475.
- (220) Maxwell, E.S. i Topper, Y.J. (1961). *J. Biol. Chem.* 236 , 1032-1037.
- (221) Meier-Tackmann, D.; Agarwal, D.P.; Saha, N.; Goedde, H.W. (1984). *Enzyme* 32 , 170-177.
- (222) Mezey, E. i Holt, P.R. (1971). *Exp. Mol. Pathol.* 15 , 148.
- (223) Merrill, C.R.; Goldman, D.; Sedman, S.A.; Ebert, M.H. (1981). *Science* 211 , 1437.
- (224) Milner-White, E.J. (1984). *Trends Biochem. Sci.* 9 , 517-519.
- (225) Mizoi, Y.; Ijiri, I.; Tatsuno, J.; Kijima, T.; Fujiwara, S.; Adachi, J.; Hishida, S. (1979). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 10 , 303-311.
- (226) Mizoi, Y.; Tatsuno, Y.; Adachi, J.; Kogame, M.; Fukunaga, T.; Fujiwara, S.; Hishida, S.; Ijiri, I. (1983). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (S1), 127-133.
- (227) Morozov, P.U. (1984) a "Appendices to Research Protocol on the WHO Collaborative Study on Ethnic Differences in Alcohol Related Enzymes".

- (228) Moser, K.; Papenberg, J.; von Wartburg, J.-P. (1968). *Enzymol. Biol. Clin.* 2, 447.
- (229) Nakayasu, H.; Mihara, K.; Sato, R. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 697-703.
- (230) Neims, A.H.; Coffey, S.; Hellerman, L. (1966). *J. Biol. Chem.* 241, 3036-3040.
- (231) Nilius, R.; Zipprich, B.; Krabbe, S. (1983). *Hepato-Gastroenterol.* 30, 134-136.
- (232) Nordlie, R.C. i Arion, W.J. (1966) a "Methods in Enzymology". Ed. W.A. Wood. Academic Press, New York. Vol. IX, pp. 619-625.
- (233) Nuutinen, H.; Lindros, K.O.; Salaspuro, M. (1983). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 7, 163-167.
- (234) Nuutinen, H.U.; Salaspuro, M.P.; Valle, M.; Lindros, K.O. (1984). *Eur. J. Clin. Invest.* 14, 306-311.
- (235) Nyberg, A.; Schubert, J.; Nordmann, J. (1953). *Acta Chem. Scand.* 7, 1170-1172.
- (236) Ogilvie, J.W. i Whitaker, S.C. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 445, 525-536.
- (237) O'Shea, K.S. i Kaufman, M.H. (1979). *J. Anat.* 128, 65-76.
- (238) Palmer, K.R. i Jenkins, W.J. (1982). *Gut* 23, 729-733.
- (239) Pares, X. i Vallee, B.L. (1981). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 122-130.
- (240) Pares, X.; Farnes, J.; Vallee, B.L. (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1047-1055.
- (241) Pares, X. i Vallee, B.L. Comunicacio personal.
- (242) Pharmacia Fine Chemicals. "Sephadex-Theorie et Pratique de la Filtration sur Gel", Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala.
- (243) Pietruszko, R.; Crawford, K.; Lester, D. (1973). *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 50-60.
- (244) Pietruszko, R.; Greenfield, N.J.; Edson, C.R. (1977) a "Alcohol and Aldehyde Metabolising Systems". Ed. R. Thurman, H.R. Drott, J.R. Williamson i col. Acad. Press, New York, Vol. 11, pp. 195-202.



- (245) Pietruszko, R. (1979) a "Biochemistry and Pharmacology of Ethanol". Ed. E. Majchrowicz i E.P. Noble. Plenum Press, New York, Vol. 1, pp. 87-105.
- (246) Pietruszko, R. (1980) a "Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research". Alan R. Liss, New York, Vol. 4, 107-130.
- (247) Pietruszko, R.; Reed, D.H.; Vallani, R.C.; Major, L.F.; Saini, N.; Hawley, J. (1981). Alcohol. Clin. Exp. Res. 5, 78-84.
- (248) Pietruszko, R.; Yonetani, T. (1981) a "Methods in Enzymology". Ed. J.M. Lowenstein. Academic Press, New York, Vol. LXXI, pp. 772-781.
- (249) Pietruszko, R. (1983) a "Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research". Alan R. Liss, New York, Vol. 8, pp. 195-217.
- (250) Pikkarainen, P.H. i Raiha, N.C.R. (1967). Pediat. Res. 1, 165-168.
- (251) Pikkarainen, P.H. (1971). Life Sci. 10 (11), 1359-1364.
- (252) Poli, G.; Dianzani, M.U.; Cheeseman, K.H.; Slater, T.F.; Lang, J.; Esterbauer, H. (1985). Biochem. J. 227, 629-638.
- (253) Racker, E. (1949). J. Biol. Chem. 177, 883-892.
- (254) Raiha, N.C.R.; Koskinen, M.; Pikkarainen, P. (1967). Biochem. J. 103, 623-626.
- (255) Randall, C.L. (1977) a "Alcohol and Opiates". Ed. K. Blum. Acad. Press, New York, pp. 91-107.
- (256) Raskin, N.H. i Sokoloff, L. (1972). J. Neurochem. 19, 273-282.
- (257) Raul, F.; Doffoel, M.; Marescaux, J.; Bockel, R.; Grenier, J.F. (1981). Gut 23, 926-967.
- (258) Rawat, A.K. (1976). Ann. N.Y. Acad. Sci. 273, 175-187.
- (259) Reyner, M. (1966). Acta Chem. Scand. 23, 1119-1129.
- (260) Ricciardi, B.R.; Saunders, J.B.; Williams, R.; Hopkinson, D.A. (1983). Clin. Chim. Acta 130, 85-94.
- (261) Ricciardi, B.R.; Saunders, J.B.; Williams, R.; Hopkinson, D.A. (1983). Pharmacol. Biochem. Behav. 18 (S1), 61-65.
- (262) Rivett, A.J. i Tipton, K.F. (1981). Eur. J. Biochem. 117, 187-193.

- (263) Rosett, H.L. (1979) a "Biochemistry and Pharmacology of Ethanol". Ed. E. Majchrowicz i E.P. Noble. Plenum Press, New York, Vol. II, pp. 485-509.
- (264) Rosett, H.L. i Weiner, L. (1984) a "Alcohol and the Fetus". Oxford University Press, Inc.
- (265) Rouach, H.; Clement, M.; Orfanelli, M.-T.; Janvier, B.; Nordmann, R. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 795, 125-129.
- (266) Rout, U.K. i Holmes, R.S. (1985). *Comp. Biochem. Physiol.* 81 B, 647-651.
- (267) Rovinski, B. i Hosein, E.A. (1983). *Biochim. Biophys. Acta* 735, 407-417.
- (268) Rubin, E. i Rottenberg, H. (1983). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (S1), 7-13.
- (269) Sanchis, R. (1985). Tesi Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.
- (270) Sanny, C.G. (1985). *Alcohol Clin. Exp. Res.* 9, 225-262.
- (271) Schmidt, E. (1970) a "Methods of Enzymatic Analysis". Ed. H.U. Bergmeyer., pp. 651-656.
- (272) Segel, I.H. (1975) a "Enzyme Kinetics". John Wiley and Sons, New York.
- (273) Shanbour, L.L. i Kuo, Y.-J. (1979) a "Biochemistry and Pharmacology of Ethanol". Ed. E. Majchrowicz i E.P. Noble. Vol. II, pp. 45-62.
- (274) Sidhu, R.S.; Blair, A.H. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 7894-7898.
- (275) Siew, C.; Deitrich, R.A.; Erwin, U.G. (1976). *Arch. Biochem. Biophys.* 176, 638-649.
- (276) Sims, K.L. i Davis, G.A. (1973). *Eur. J. Biochem.* 35, 450-453.
- (277) Sippel, H.W. i Kesaniemi, Y.A. (1975). *Acta Pharmacol. Toxicol.* 37, 49-55.
- (278) Sjoblom, M.; Pilstrom, L.; Morland, J. (1978). *Enzyme* 23, 108-115.
- (279) Skursky, L.; Kovan, J.; Stachova, M. (1979). *Anal. Biochem.* 99, 65-71.

- (280) Smith, L. i Packer, L. (1972). Arch. Biochem. Biophys. 148 , 270-275.
- (281) Smith, M.; Hopkinson, D.A.; Harris, H. (1971). Ann. Hum. Genet. 34 , 251-271.
- (282) Smith, M.; Hopkinson, D.A.; Harris, H. (1972). Ann. Hum. Genet. 35 , 243-253.
- (283) Smith, M.; Hopkinson, D.A.; Harris, H. (1973). Ann. Hum. Genet. 36 , 401-414.
- (284) Smolen, A; Petersen, D.R.; Collins, A.C. (1981). Dev. Pharmacol. Ther. 3 , 31-49.
- (285) Soler, X. (1985). Tesi de Licenciatura.
- (286) Sreenathan, R.; Padmanabham, R.; Singh, S. (1982). Drug Alcohol Depend. 9 , 339-350.
- (287) Strydom, D.J.; Vallee, B.L. (1982). Anal. Biochem. 123 , 422-429.
- (288) Sun, A.Y. (1983) a "Neural Membranes". Ed. G.Y. Sun, N. Bazan, J.-Y. Wu, G. Porcellati, A.Y. Sun. Humana Press, Clifton, pp. 317-340.
- (289) Sund, H. i Theorell, H. (1963) a "The Enzymes". ed. P.D. Boyer, H.A. Lardy, K. Myrback. Acad. Press, New York. Vol. 7, pp. 25-83.
- (290) Tabor, C.W.; Tabor, H.; Rosenthal, S.M. (1954). J. Biol. Chem. 208 , 644-661.
- (291) Takahashi, K. i Weiner, H. (1980). J. Biol. Chem. 255 , 8206-8209.
- (292) Talbot, B.G.; Qureshi, A.A.; Cohen, R.; Thirion, J.-P. (1981). Biochem. Genet. 19 , 813-829.
- (293) Tank, A.W. i Weiner, H. (1977) a "Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems". Ed. R.G. Thurman, J.R. Williamson, H.R. Drott, B. Chance. Acad. Press, New York. Vol. II, pp. 175-183.
- (294) Teng, Y.-S. (1981). Biochem. Genet. 19 , 107-114.
- (295) Terron, F. (1985) a "El País (14-6-85), segons document final del Plan Nacional contra la Droga, elaborat pel Ministerio de Sanidad y Consumo"
- (296) Thomas, M.; Halsall, S.; Peters, T.J. (1982). Lancet 2 , 1057-1059.

- (297) Thomsen, K. i Hiersche, H.-D. (1969) a "Foetus and Placenta", pp. 61-137.
- (298) Thorne, C.I.R. (1978) a "Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry". Elsevier North Holland, Biomed. Press, Vol. B104, 1-18.
- (299) Thurman, R.G.; Kaffman, F.A.; Ji, S.; Lemasters, J.J.; Conway, J.G.; Belinsky, S.A.; Kashiwagi, T.; Matsamura, T. (1983). Pharmacol. Biochem. Behav. 18 (S1), 415-419.
- (300) Ting, H.-H. i Crabbe, J.C. (1983). Biochem. J. 215 , 351-359.
- (301) Tipton, K.F.; Henehan, G.T.M.; McCrodden, J.M. (1983). Biochem. Soc. Trans. 11 , 59-61.
- (302) Tipton, K.F.; McCrodden, J.M.; Weir, D.G.; Ward, K. (1983). Alcohol Alcoholism 18 , 219-225.
- (303) Tipton, K.F.; Houslay, M.D.; Turner, A.J. (1977) a "Essays in Neurochemistry and Neuropharmacology". Ed. M.B.H. Youdim, W. Lovenberg, D.F. Sharman, J.R. Laguardo. John Wiley and Sons, London, pp. 103-138.
- (304) Tottmar, S.O.C.; Petterson, H.; Kressling, K.-H. (1973). Biochem. J. 135 , 577-586.
- (305) Tottmar, G. i Hellstrom, E. (1983). Pharmacol. Biochem. Behav. 18 (S1), 103-107.
- (306) Towell, J.F.; Cho, J.-K.; Roh, B.L.; Wang, R.I.H. (1983). Clin. Pharmacol. Ther. 33 , 517-521.
- (307) Vallari, R.C. i Pietruszko, R. (1981). Arch. Biochem. Biophys. 212 , 9-19.
- (308) Vallari, R.C. i Pietruszko, R. (1982). Science 216 , 637-639.
- (309) Vallari, R.C. i Pietruszko, R. (1983). Pharmacol. Biochem. Behav. 18 (S1), 97-102.
- (310) Vallari, R.C. i Pietruszko, R. (1984). J. Biol. Chem. 259 , 4922-4926.
- (311) Vallari, R.C. i Pietruszko, R. (1984). J. Biol. Chem. 259 , 4927-4933.
- (312) Vallee, B.L. i Bazzone, T.J. (1983) a "Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research". Ed. M.C. Rattazzi, J.G. Scandalios, G.S. Witt. Alan R. Liss, New York. Vol. 8, pp. 219-244.

- (313) Veghelyi, P.U.; Ostovics, M.; Kardos, G.; Leisztner, L., Szaszovenszky, E.; Igali, S.; Imves, J. (1978). *Acta Paediat. Hung.* 17 , 171-189.
- (314) Veghelyi, P.U. (1983). *Lancet* 2 , 53-54.
- (315) Veillon, C. i Vallee, B.L. (1978). a "Methods in Enzymology". Acad. Press, New York. Vol 54 , 446-484.
- (316) Vendemiale, G.; Jayatilake, E.; Shaw, S.; Lieber, C.S. (1984). *Life Sci.* 34 , 1065-1073.
- (317) Vitee, C.A. (1962). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 94 , 1648-1694.
- (318) Wagner, F.W.; Burger, A.R.; Vallee, B.L. (1983). *Biochemistry* 22 , 1857-1863.
- (319) Wagner, F.W.; Pares, X.; Holmquist, B.; Vallee, B.L. (1984). *Biochemistry* 23 , 2193-2199.
- (320) Waltman, R. i Iniquez, E. (1972). *Obstet. Gynecol.* 40 , 180-185.
- (321) Wunderlich, S.M.; Baliga, B.S.; Munro, H.N. (1979). *J. Nutr.* 109 , 1534-1541.
- (322) von Wartburg, J.-P. (1983) a "Child Health and Development". Ed. D. Jeanneret. S. Karger, Basel. Vol. 2, pp. 1-13.
- (323) von Wartburg, J.-P.; Buhler, R.; Maring, J.-A.; Pestalozzi, D. (1983). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (S1), 123-125.
- (324) von Wartburg, J.-P. i Buhler, R. (1984). *Lab. Invest.* 50 , 5-15.
- (325) Weber, K.; Osborn, M. (1969). *J. Biol. Chem.* 244 , 4406-4412.
- (326) Weiner, H.; King, P.; Hu, J.H.J.; Bensch, W.R. (1974) a "Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems". Ed. R.G. Thurman, T. Yonetani, J.R. Williamson, B. Chance. Acad. Press, New York, pp. 101-113.
- (327) Weiner, H. (1979) a "Biochemistry and Pharmacology of Ethanol". Ed. E. Majchrowicz, E.P. Noble. Plenum Press, New York. Vol.I, pp. 107-124.
- (328) Weiner, H. (1982) a "Enzymology of Carbonyl Metabolism: Aldehyde Dehydrogenase and Aldo/Keto Reductase". Ed. H. Weiner, B. Wermuth. Alan R. Liss, New York, pp. 1-9.
- (329) Weiner, H. i Takahashi, K. (1983). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (S1), 109-112.

- (330) Weiner, H.; Hu, J.H.J.; Sanny, C.G. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 3853-3855.
- (331) Weiner, H. (1979) a "Biochemistry and Pharmacology of Ethanol". Ed. E. Majchrowicz ; E.P. Noble. Plenum Press, New York. Vol. I, pp. 125-144.
- (332) Whatman Publication 607 A. Whatman, Maidstone.
- (333) White, A.; Handler, P.; Smith, E.L.; Hill, R.L.; Lehman, I.R. (1978) a "Principles of Biochemistry". Ed. J.D. Jeffers, A. Macnow. McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo. 6a. ed., pp. 1001.
- (334) Winter, A.; Ek, K.; Andersson, U.-B. (1977). *LKB Application Note* 250.
- (335) Wratten, C.C. i Cleland, W.W. (1963). *Biochemistry* 2, 935-941.
- (336) Yin, S.-J.; Bosron, W.F.; Magnes, L.J.; Li, T.-K. (1984). *Biochemistry* 23, 5847-5853.
- (337) Yin, S.-J.; Bosron, W.F.; Li, T.-K.; Ohnishi, K.; Okuda, K.; Ishii, H.; Tsuchiya, M. (1984). *Biochem. Genet.* 22, 169-180.
- (338) Yoshida, A.; Impraim, C.C.; Huang, I.-Y. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 12430-12436.
- (339) Yoshida, A.; Huang, I.-Y.; Ikawa, M. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 258-261.
- (340) Yoshihara, H.; Sato, N.; Kamada, T.; Abe, H. (1983). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (S1), 425-428.







Servei de Biblioteques

Reg. 224953

Sig. TUAB / 2820

Ref. 14506



