

ARS PHARMACEUTICA

REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Tomo XXXII — Núms. 1-2-3 y 4 — 1991

Tomo XXXII - Núms. 1-2-3 y 4 - 1991

Director:

Prof. Dr. D. Jesús Cabo Torres

Director Ejecutivo:

Prof. Dr. José Luis Valverde

Consejo de Redacción:

Prof. Dr. Manuel Casares Porcel

Prof^a Dra. M.^a Teresa Correa
Sánchez

Prof^a Dra. M.^a José Faus Dader

Prof. Dr. D. Jesús González
López

Prof^a Dra. M.^a del Mar Herrado
del Pino

Prof. Dr. José Jiménez Martín

Prof. Dr. Eduardo Ortega
Bernaldo de Quirós

Secretario de Redacción:

D. José L. Campos Álvarez

Redacción y Administración:

Facultad de Farmacia

Granada - España

Dep. Legal: GR. núm. 17-1960

ISSN 0004-2927

Imprime:

Servicio de Publicaciones

Universidad de Granada

Campus Universitario de

Cartuja. Granada

Sumario

PAG.

- Efecto de cationes divalentes sobre la actividad fructosa 1, 6-bisfosfatasa purificadas de corteza renal de rata 3
- Fuentes para el conocimiento de los usos y prácticas medicinales en nueva España en el siglo XVI 11
- Praxis farmacéutica en la proposición quirúrgica de vaca de alfaró (I) 21
- Conectividad molecular. Su aplicación a algunas propiedades físico-químicas de un grupo de alcoholes 29
- El ácido N,N'bis (Carboximetil) -Meso-Djenkólico: Cn Diaminoácido con azufre tioeter y potencial de quelación dinucleante 37
- Interferencias nutricionales sobre el metabolismo glucídico 45
- Adaptación metabólica del ciclo de las pentosas fosfato de corteza renal de rata. II. Efecto de diferentes situaciones patológicas sobre el comportamiento cinético de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa 53
- Los xerofluents de la hoja de Linares 61
- Distribución y ecología del alcornoque en la provincia de Granada 77

- Hábitos alimenticios y frecuencia de consumo de alimentos en adolescentes escolarizados 91
- Pleitos entre el colegio de boticarios de Sevilla y la ciudad de el puerto de Santa María relativos a las inspecciones de boticas 99
- Consumo de bebidas alcohólicas y rendimiento escolar de los adolescentes de Granada 113
- Efecto de la tiourea y de la quinetina sobre la germinación y la producción de etileno en semillas termoinhibidas de *cicer arietinum* L. 121
- Crítica de libros 127

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.
UNIVERSIDAD DE GRANADA

EFFECTO DE CATIONES DIVALENTES SOBRE LA ACTIVIDAD
FRUCTOSA 1, 6-BISFOSFATASA PURIFICADAS DE
CORTEZA RENAL DE RATA

Sola, M. M.; Oliver, J.; Salto, R.; Gutiérrez, M. y Vargas, A. M.

RESUMEN

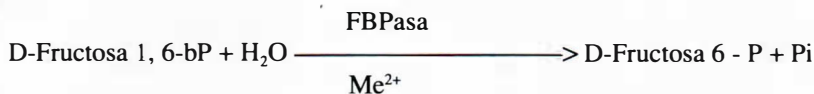
La fructosa 1, 6-bisfosfatasa es un enzima de gran importancia fisiológica, sobre todo en los tejidos gluconeogénicos como la corteza renal, por lo que existen diversos mecanismos para ejercer una estricta regulación de su actividad. Entre ellos, destacamos el papel de diversos cationes divalentes como efectores del enzima, al margen de que, también, sean imprescindibles para la catálisis. En este trabajo, se estudian las características cinéticas del enzima purificado a partir de corteza renal de rata, en función de la concentración de dos de los cationes más importantes para la actividad del enzima, magnesio y manganeso.

SUMMARY

Fructose 1, 6-bisphosphatase is an enzyme that plays an important physiologic role, especially in the gluconeogenic tissues, as kidney-cortex. There are several mechanisms to guarantee a strict regulation of its activity. We will emphasize the importance of divalent cations as enzyme effectors, leaving aside their role as catalytic ions. In this work we describe the kinetic characteristics of the purified enzyme from rat-kidney cortex, as a functions of the concentrations of the most important cations for the enzyme activity, magnesium and manganese.

INTRODUCCIÓN

La D-Fructosa 1, 6-bisfosfato 1-fosfohidrolasa (Fructosa 1, 6-bisfosfatasa; E.C. 3.1.3.11.) cataliza la reacción irreversible:



Esta reacción constituye una etapa importante en la ruta gluconeogénica de gran mayoría de sistemas vivos debido a su carácter de irreversibilidad. La máxima actividad fructosa 1, 6-bisfosfatasa ha sido observada en tejidos animales con gran capacidad gluconeogénica como hígado y riñón, sin embargo, se conoce que está ampliamente distribuida en otros tejidos como músculo, mucosa intestinal, glándula mamaria, corazón, tejido adiposo, cerebro, placenta y linfocitos.

Generalmente, la fructosa 1, 6-bisfosfatasa es un enzima tetramérico, constituido por cuatro subunidades idénticas y con un peso molecular de 140.000 daltons. Intracelularmente, se encuentra localizado como un enzima soluble en el citoplasma. Presenta, como características cinéticas más generales, la inhibición causada por su sustrato, la Fructosa 1, 6-bisfosfato (1), y la regulación alostérica por AmP (2) y Fructosa 2, 6-bisfosfato (3).

La etapa catalizada por este enzima es objeto de una profunda regulación hormonal al ser crucial en el ciclo de sustrato entre las hexosas fosfato y, por tanto, en la regulación de la gluconeogénesis. El incremento de su actividad provocado por algunas hormonas puede estar mediado fundamentalmente por tres mecanismos: fosforilación del enzima, modificación de los niveles de sus efectores y cambios en su propia concentración.

Aunque el enzima de hígado de rata es sustrato de proteína quinasas dependientes de AMP cíclico, su papel en la regulación es contradictorio, ya que hay descritos cambios en la actividad del enzima (4) y en la sensibilidad alostéricos (5) en función del estado de fosforilación, mientras que en otros trabajos no se observan estas modificaciones (6-9). Otros datos descritos sobre la fosforilación del enzima, de orígenes diferentes al hígado de rata, aportan aún más dudas en cuanto a su significado fisiológico. A excepción del grupo de Mendicino (10), que describieron la fosforilación de la fructosa 1, 6-bisfosfatasa de riñón de cerdo por una proteína quinasa del mismo origen, y del de Rittenhouse (11), que observaron fosforilación *in vivo* de la fructosa 1, 6-bisfosfatasa de levadura, ningún grupo de investigadores han podido demostrar que el enzima de otros orígenes sea susceptible de fosforilarse (76, 12, 13). Respecto a la modificación de los niveles de sus principales efectores, la concentración de fructosa 2, 6-bisfosfato en la célula está regulada de forma compleja a través de los mecanismos hormonales de modulación del enzima que cataliza su síntesis y su degradación (14-16). Por otra parte, ha sido descrito que en hígado se produce un incremento de la actividad del enzima y de su RNA mensajero en animales diabéticos, respuestas revertida por insulina (17,18). La carga energética, por su parte, también es objeto de regulación hormonal.

Las propiedades reguladoras del enzima renal son poco conocidas. En este trabajo, se estudia la importancia de la concentración de los cationes divalentes, magnesio y manganeso, sobre la actividad del enzima purificado a partir de corteza

renal. La concentración de estos cationes puede verse modificada en respuesta a diferentes situaciones fisiológicas y patológicas, lo que se traduce en graves alteraciones en la regulación de la gluconeogénesis renal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar adultas mantenidas con dieta estándar y acceso libre al agua. Los reactivos generales y específicos empleados procedían de las firmas Boehringer, Sigma y Merck y eran, todos ellos, de la máxima pureza. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se procedía, inmediatamente, a la extracción y demedulación de los riñones. El proceso de purificación de la fructosa 1, 6-bisfosfatasa a partir de la corteza renal se realizó según el método descrito en (19). La determinación de la actividad fructosa 1, 6-bisfosfatasa fue llevada a cabo espectrofotométricamente (20).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestra la curva de actividades enzimática de la fructosa 1, 6-bisfosfatasa en función del pH. Los valores experimentales de pH del medio de ensayo que aparecen representados son los medidos en la cubeta de reacción inmediatamente después de realizada la determinación de actividad. La curva obtenida presenta un claro perfil acampanado con un máximo de actividad enzimática para valores de pH entre 7,2 y 7,5. Ha sido demostrado que el enzima nativo puede ser convertido a una forma "alcalina" mediante la acción de gran variedad de enzimas proteolíticos lisosomales (21,22). La modificación en la estructura primaria de la proteína provoca cambios conformacionales en el enzima que adopta una forma de mayor relajación (23). Estos cambios estructurales traen como consecuencia la variación en las características de actividad y regulación del enzima, haciendo que presente un pH óptimo alcalino, menor sensibilidad a la inhibición por AMP (23), pérdida de activación por cationes monovalentes (24) y menor efecto inhibitor de altas concentraciones de sustrato (25). El hecho de que el pH óptimo de nuestra preparación enzimática se encuentra en su forma nativa, manteniendo intactas las propiedades reguladoras, sin haber sufrido degradación proteolítica a lo largo del proceso de purificación. La posible importancia fisiológica de la regulación de la fructosa 1, 6-bisfosfatasa por proteólisis no ha sido exhaustivamente estudiada pero se conoce que es sustrato de proteasas lisosomales endógenas que son liberadas durante el ayuno (26) o después de la administración de glucagon a los animales (27).

La fructosa 1, 6-bisfosfatasa presenta requerimiento absoluto de cationes divalentes tales como Mg^{2+} o Mn^{2+} para llevar a cabo su actividad catalítica. Sin embargo, para el enzima de algunos orígenes ha sido descrita inhibición de la actividad cuando se señala a concentraciones elevadas de estos iones.

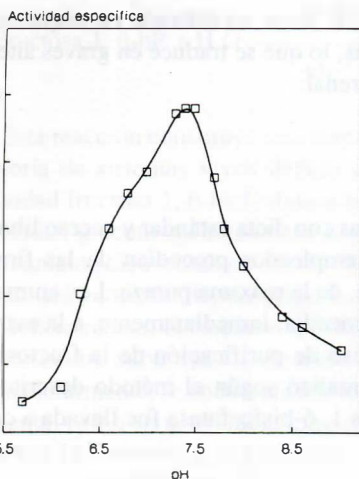


Figura 1.- Efecto del pH sobre la actividad de la fructosa 1,6-bisfosfatasa de corteza renal de rata. Los resultados se expresan en unidades/mg de proteína. Las determinaciones se realizaron con fructosa 1,6-bisfosfato 0,1 mM y Mg^{2+} 5 mM.

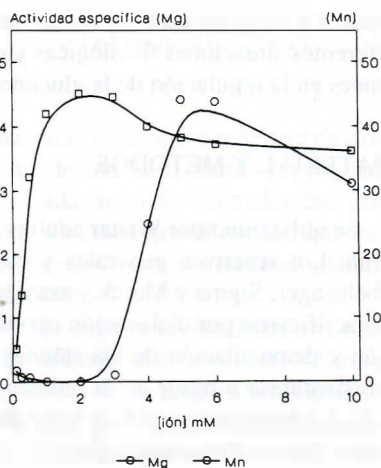


Figura 2.- Actividad de la fructosa 1,6-bisfosfatasa de corteza renal de rata en función del tipo y concentración de catión divalente. Los resultados se expresan en unidades/mg de proteína. Las determinaciones se realizaron con fructosa 1,6-bisfosfato 10 μ M.

Para conocer la respuesta del enzima de corteza renal a la variación de los niveles de cationes divalentes, determinamos su actividad enzimática a lo largo de un amplio rango de concentraciones de Mg^{2+} y Mn^{2+} . Los resultados obtenidos están reflejados en la Figura 2. Se aprecia que con Mn^{2+} Los valores de velocidad son mucho más elevados que con Mg^{2+} pero son requeridos niveles de Mn^{2+} muy altos, superiores a 3 mM, para que el enzima presente actividad, mientras que concentraciones superiores a 6 mM ya producen inhibición enzimática. El comportamiento para el Mg^{2+} es claramente distinto, ya que existe un respuesta de carácter hiperbólico cuando los niveles son bajos aunque, al igual que con Mn^{2+} , un incremento de la concentración puede provocar descenso en la actividad del enzima.

Estos resultados están de acuerdo con los descritos para el enzima de otros orígenes en la inhibición encontrada a altas concentraciones de cationes divalentes, pero difieren de ellos en que, en los otros casos, la respuesta para el Mg^{2+} es de carácter sigmoidal y la $[Mn^{2+}]_{0.5}$ es muy inferior a la del Mg^{2+} (28, 29). Se ha considerado la existencia de dos sitios de unión para los cationes divalentes, uno activador y otro de baja afinidad responsable de la inhibición (30), sin embargo, la inhibición por altas concentraciones de Mg^{2+} puede deberse a la formación de un quelato entre el ión y la fructosa 1, 6-bisfosfato incapaz de unirse al centro activo (31). El Mn^{2+} ha sido observado como un activador del enzima más efectivo que el Mg^{2+} (28), presentando una $S_{0.5}$ en el rango μ M, sin embargo, para la fructosa 1, 6-

bisfosfatasa de levadura, se han descrito curvas de actividad en función de la concentración de Mn^{2+} donde no se observaba velocidad de reacción a valores inferiores a 1 mM (32). Por otra parte, el Mn^{2+} aparece también como inhibidor del enzima a altas concentraciones (29, 32), aunque no ha sido aclarado su mecanismo.

En la Figura 3 se muestran los resultados de actividad obtenidos para un amplio rango de concentración de proteína en cubeta. Podemos observar que no existe una relación lineal entre ambos sino que aparecen curvas de perfil sigmoideal para las tres condiciones establecidas de ión divalente.

El carácter sigmoideal de la curva es muy acentuado cuando la actividad está ensayada en presencia de Mn^{2+} , mientras que con igual concentración de Mg^{2+} aparece una relación de dependencia casi lineal aunque con un efecto de saturación a las más altas concentraciones de proteína. Cuando el nivel de Mg^{2+} es bajo, observamos que se produce disminución de la actividad fructosa 1, 6-bisfosfatasa al incrementarse la concentración de proteína en el medio, sin embargo, este efecto puede deberse, más que a procesos de agregación molecular, a un descenso de la cantidad de Mg^{2+} disponible, por debajo de la concentración requerida para la actividad catalítica, debido a captación de iones por las moléculas de enzima en exceso.

En la Figura 4 se muestran los resultados de una curva de actividad fructosa 1, 6-bisfosfatasa en función de la concentración de fructosa, 1, 6-bisfosfato y a diferentes concentraciones de iones divalentes. Fue utilizada una cantidad de proteína en el medio de ensayo de $2 \mu\text{g/ml}$. Esta concentración se encuentra en el rango

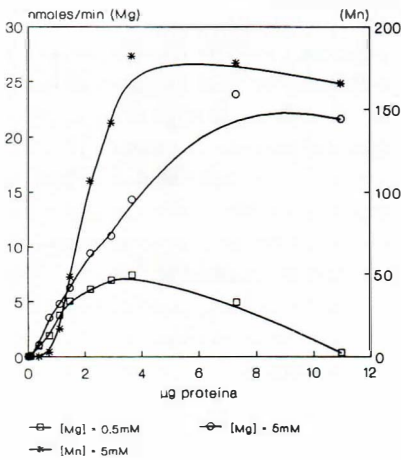


Figura 3.- Efecto de la concentración de fructosa 1,6-bisfosfatasa sobre su actividad, en presencia de Mg^{++} o Mn^{++} . Las determinaciones se realizaron con fructosa 1,6-bisfosfato $10 \mu\text{M}$.

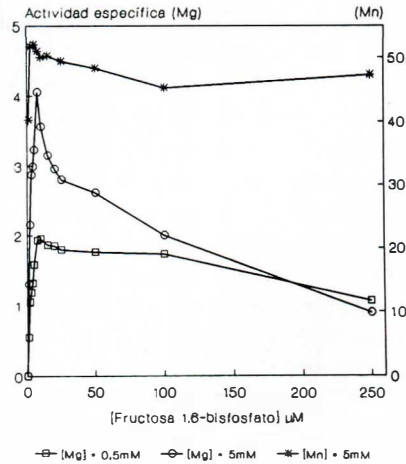


Figura 4.- Actividad de la fructosa 1,6-bisfosfatasa de corteza renal de rata en función de la concentración de sustrato, en presencia de diferentes concentraciones de Mg^{++} o Mn^{++} . La velocidad de reacción se expresa en unidades/mg de proteína.

donde existe mayor proporcionalidad para todas las condiciones estudiadas. Observamos, como dato más destacable, la inhibición enzimática producida al elevar la concentración del propio sustrato de la reacción.

Debido a este comportamiento cinético hay una imposibilidad obvia de realizar una estimación adecuada de los valores de V_{max} y $K_{0,5}$ por ajuste de los resultados experimentales a una ecuación matemática típica. Nosotros hemos realizado una aproximación a los valores reales considerando, cuando fue posible, que el enzima sigue una cinética de carácter michaeliano para concentraciones de sustrato inferiores a aquella con la que se obtiene la mayor actividad. Según esto, los resultados son ajustados por regresión lineal mediante una representación de Lineweaver-Burk y los parámetros cinéticos obtenidos por extrapolación. Sin embargo, hay que reiterar que estos valores son sólo aproximados y que han sido calculados para efectos comparativos entre las diferentes condiciones de ensayo, por lo que hay que considerarlos con gran reserva.

En presencia de Mg^{2+} 5 mM la inhibición por sustrato es acusada, la actividad máxima se alcanza a 7,5 μM de fructosa 1,6-bisfosfato y a concentraciones superiores a 10 μM comienza a producirse el descenso de la velocidad de reacción. Nuestros resultados indican que, en estas condiciones, el enzima presenta una V_{max} igual a 5,72 unidades $\times mg^{-1}p$ y una $[fructosa\ 1,6-bisfosfato]_{0,5}$ de 3,36 μM . Con la más baja concentración de Mg^{2+} , encontramos un comportamiento semejante, presentándose la mayor actividad enzimática con fructosa 1,6-bisfosfato entre 7,5 y 10 μM . En este caso obtenemos una V_{max} de 2,9 unidades $\times mg^{-1}p$ y la $[fructosa, 1,6-bisfosfato]_{0,5}$ es 4,17 μM . Esta variación de la $K_{0,5}$ para el sustrato, en función del nivel de Mg^{2+} , puede inducirnos a pensar que éste es no sólo un cofactor para la reacción sino también un efector del enzima.

El Mn^{2+} se comporta, como veíamos anteriormente, como un fuerte activador de la fructosa 1,6-bisfosfatasa produciendo un gran aumento en su actividad enzimática. Además, como se deduce de los resultados mostrados en la Figura 4, el efecto activador lo realiza también disminuyendo considerablemente el valor de $[fructosa\ 1,6-bisfosfato]_{0,5}$, ya que se alcanza el máximo valor de actividad a 2 μM , de sustrato. Por otra parte, se ha descrito que la presencia de Mn^{2+} como cofactor produce desensibilización del enzima frente a la inhibición por su propio sustrato (33).

El mecanismo por el cual la fructosa 1,6-bisfosfato produce su acción inhibitoria no ha sido aclarado todavía. Según nuestros resultados, debido a que el sustrato se une al enzima únicamente por el centro activo, ya que se demuestra la inexistencia de un centro alostérico para el sustrato (19), hay que considerar la inhibición como un proceso estrictamente cinético.

La importancia fisiológica que puede presentar la regulación de la fructosa 1,6-bisfosfatasa por Mg^{2+} o Mn^{2+} , a la vista de los datos conocidos de concentración de cationes libres y de los valores de sus correspondientes K_{dis} y $S_{0,5}$, y dado que el enzima, cuando actúa con Mg^{2+} o Mn^{2+} como cofactor, es muy sensible incluso a ligeros cambios de la concentración de iones metálicos en el entorno celular, es clara. Más aún, si consideramos que estos iones no sólo ejercen su activación

actuando directamente sobre el enzima sino que, además, producen cambios significativos en la regulación originada por efectores tan importantes como AMP y fructosa 2,6-bisfosfato (8-34).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) NIMMO H. G. and TIPTON K. F. *Eur. J. Biochem.* 58: 567-574 (1975).
- (2) McGRANE M. M., ELMAGHRABI M. R. and PILKIS S. J. *J. Biol. Chem.* 258: 10445-10454 (1983).
- (3) PILKIS S. J., ELMAGHRABI M. R., PILKIS J. and CLAUS T. H. *J. Biol. Chem.* 256: 3619-3622 (1981).
- (4) RIOU J. P., CLAUS T. H., FLOCKHART D. A., CORBIN J. D. and PILKIS S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:4615-4619 (1977).
- (5) EKDAHL K. N. and EKMAN D. J. *Biol. Chem.* 260:14173-14179 (1985).
- (6) RITTENHOUSE J., CHATTERJEE T., MARCUS F., REARDON I. and HEINRIKSON R. L. *J. Biol. Chem.* 258:7648-7652 (1983).
- (7) CLAUS T. H., SCHLUMPF T., ELMAGHRABI M. R., McGRANE M. M. and PILKIS S. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100: 716-723 (1981).
- (8) MEEK D. W. and NIMMO H. G. *Biochem. J.* 222:131-138 (1984).
- (9) VIDAL H., ROUX B. and RIOU J. P. *Arch. Biochem. Biophys.* 248:604-611 (1986).
- (10) MENDICINO J., LEIBACH F. and REDDY S. *Biochem.* 17:4662-4669 (1978).
- (11) RITTENHOUSE J., MOBERLY L. and MARCUS F. *J. Biol. Chem.* 262:10114-10119 (1987).
- (12) MARCUS F. and HOSEY M. M. *J. Biol. Chem.* 255:2481-2486 (1980).
- (13) MOSEY M. M. and MARCUS F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:91-94 (1981).
- (14) ELMAGHRABI M. R., CLAUS T. H., PILKIS J., FOX E. and PILKIS S. J. *J. Biol. Chem.* 257:7603-7607 (1982).
- (15) CLAUS T. H., ELMAGHRABI M. R., REGEN Z., STEWART H. B., McGRANE M. M., KOUNTZ P. D., NYFELER F., PILKIS J. and PILKIS S. J. *Curr. Top. Cell. Regul.* 23:57-86 (1984).
- (16) PILKIS S. J., FOX E., WOLFE L., ROTHBARTH L., COLOSIA A., STEWART H. B. and ELMAGHRABI M. R. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 478:1-19 (1986).
- (17) TAUNTON O. D., STIFEL F. B., GREENE H. L. and HERMAN R. H. *J. Biol. Chem.* 249: 7228-7233 (1974).
- (18) ELMAGHRABI M. R., PILKIS J., MARKER A. J., COLOSIA A., D'ANGELO G., FRASIER B. A. and PILKIS S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8430-8434 (1988).
- (19) VARGAS A. M., SOLA M. M. and BOUNIAS M. J. *Biol. Chem. En prensa* (1990) ELMAGHRABI M. R.
- (20) MENDICINO J., OLIVER R. M. and KRATOWICH N. J. *Biol. Chem.* 247:6643-6648 (1972).
- (21) PONTREMOLI S., MELLONI E., DE FLORA A. and HORECKER B. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 661-664 (1973).
- (22) MARCUS F., EDELSTEIN I., SAIDEL L. J., KEIM P. S. and HEINRIKSON R. L. *Arch. Biochem. Biophys.* 209: 687-696 (1981).
- (23) DZUGAJ A., HEYDUK T., BUCZYŁKO J. and KOCHMAN M. *Arch. Biochem. Biophys.* 239: 486-490 (1985).
- (24) COLOMBO G. and MARCUS F. *J. Biol. Chem.* 248: 2743-2745 (1973).
- (25) PONTREMOLI S. and HORECKER B. L. *Curr. Top. Cell. Regul.* 2: 173-199 (1970).
- (26) MELLONI E., PONTREMOLI S., SALAMINO S., SPARATORE B., MICHETTI M. and HORECKER B. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1499-1502 (1981).
- (27) SCHWORER C. M. and MORTIMORE G. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3146-3173 (1979).
- (28) TEJWANI G. A., PEDROSA F. O., PONTREMOLI S. and HORECKER B. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:2692-2695 (1976).
- (29) LUI F. and FROMM H. J. *Arch. Biochem. Biophys.* 260: 609-615 (1988).

- (30) TASHIMA Y. and YOSHIMURA N. *J. Biochem.* 78: 1161-1169 (1975).
- (31) MARCUS C. J., GELLER A.M. and GANCEDO C. *Arch. Biochem. Biophys.* 218: 478-482 (1982).
- (32) GANCEDO J. M., MAZON M. J. and GANCEDO C. *Arch. Biochem. Biophys.* 218: 478-482 (1982).
- (33) VAN TOL A., BLACK W. J. and HORECKER B. L. *Arch. Biochem. Biophys.* 151: 591-596 (1972).
- (34) MIZUNUMA H. and TASHIMA Y. *Arch. Biochem. Biophys.* 226: 257-264 (1983).