

**ACTIVIDADES DE DELTA AMINOLEVULINICO
SINTETASA, CITOCROMO OXIDASA Y CONTENIDO DE
COMPONENTES DEL SISTEMA DE OXIDASAS DE FUNCION
MIXTA DURANTE LA DESNUTRICION PROTEICA
EXPERIMENTAL. RESPUESTA A LA REALIMENTACION^{1,2}**

Julia Araya y Manuel Ruz

**Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina
Santiago Norte, Universidad de Chile, Santiago, Chile**

RESUMEN

Se estudiaron las actividades de delta aminolevulínico sintetasa (DALS), citocromo oxidasa (E.C.1.9.3.1.), NADH citocromo b_5 reductasa (NADH red.), NADPH citocromo P_{450} reductasa (NADPH red.), contenidos de citocromo P_{450} (cit. P_{450}) y citocromo b_5 (cit. b_5), así como los niveles de hemoglobina y hematocrito, en tres grupos de ratas: a) desnutridas, b) en recuperación de la desnutrición, y c) controles.

Se encontró que durante la desnutrición proteica precoz los niveles sanguíneos de hemoglobina y hematocrito, así como la actividad de DALS en homogenizados de médula ósea y de hígado, estaban disminuidos. La actividad de NADH reductasa y los contenidos de cit. P_{450} y cit. b_5 en microsomas hepáticos también acusaron un significativo descenso. La actividad de

Manuscrito modificado recibido: 5-12-78.

- 1 Este trabajo fue financiado con fondos del Servicio de Desarrollo Científico y Creación Artística de la Universidad de Chile (Proyectos 1462 en 1975, y 3363 en 1976).
- 2 Comunicación preliminar presentada en: *XX Reunión Anual de la Sociedad de Biología, Pucón, Chile, noviembre de 1977.*

NADPH reductasa microsomal al igual que la de citocromo oxidasa mitocondrial no experimentaron cambios significativos, encontrándose en ratas desnutridas valores comparables a los de las ratas control.

Durante la fase de recuperación de la desnutrición, en que los animales recibieron una dieta con caseína (10 NDpCal⁰/o) suplementada con Fe y Cu, las actividades de enzimas hepáticas, los contenidos de cit. P₄₅₀ y cit. b₅ y el hematocrito, experimentaron un aumento espectacular alcanzando, al final del período de realimentación, valores comparables con los de las ratas control. Sin embargo, la actividad de DAL5 en homogenizado de médula ósea, así como el nivel de hemoglobina, permanecieron bajos.

Se discuten los resultados en relación a las actividades y a los contenidos disminuidos de enzimas, coenzimas, metabolitos o sustratos involucrados en la síntesis de hemoglobina en la médula ósea de la rata durante su recuperación de desnutrición.

INTRODUCCION

En estudios previos de desnutrición experimental en ratas cepa Wistar, de nuestro vivero, hemos observado la aparición de anemia hipocrómica y microcítica, y niveles disminuidos de hierro plasmático no heme, asociado a una acumulación de hierro en hígado, bazo y médula ósea (1-3). Demostramos, además, que la hemodilución no había sido causa de la anemia observada en este tipo de desnutrición experimental (3).

Al realimentar las ratas precozmente desnutridas con una dieta con 10 NDpCal⁰/o preparada a base de caseína, no pudimos normalizar los niveles de hemoglobina expresados en g/100 ml, aun cuando comprobamos que la realimentación sí logró estimular la salida de hierro desde los depósitos hacia la circulación (3).

Estos hechos nos hicieron pensar que la anemia, tanto durante la desnutrición como después de la realimentación, no era originada exclusivamente por la baja disponibilidad de hierro metabólico, sino que también podrían estar involucrados otros mecanismos indispensables para la biosíntesis de la hemoglobina.

La delta aminolevulínico sintetasa (delta ALS) es la enzima limitante en la síntesis del grupo heme (4). Su papel es sintetizar ácido delta aminolevulínico a partir de glicina y succinil Co A endógenos.

A su vez, el delta AL es indispensable para la síntesis del grupo heme (5). Este último grupo, además de estructurar la

hemoglobina, constituye parte esencial de la síntesis de otras hemoproteínas: citocromos y citocromo reductasas en retículo endoplasmático, y citocromo oxidasa mitocondrial.

Con base en esta información, nos preguntamos si la desnutrición proteica ejerce o no sobre estos parámetros alguna influencia que pudiese interferir con la síntesis de heme. Por las razones apuntadas, los objetivos del presente trabajo fueron evaluar en ratas con desnutrición proteica precoz y, luego realimentadas, los siguientes aspectos:

- a) ¿En qué medida está la enzima delta ALS comprometida durante la desnutrición proteica?
- b) ¿Cuál es el contenido y la actividad de sistemas enzimáticos que contienen el grupo heme o que interaccionan con él cuando éstos se encuentran bajo el "stress" nutricional que impone el bajo aporte de proteínas y la baja disponibilidad de oxígeno causada por la disminución de hemoglobina circulante?

MATERIAL Y METODOS

Animales

Desnutridos experimentalmente. Se amamantaron ratas recién nacidas, cepa Wistar, en camadas de 16 animales por cada rata nodriza. A los 21 días de edad fueron destetadas administrándoles una dieta aprotéica (Dieta 2) por 14 días más. A los 35 días de edad se sacrificó uno de los grupos, y el otro fue sometido a realimentación. En el grupo desnutrido sacrificado se midió: hematocrito (6) y hemoglobina (7) en sangre; actividad de citocromo oxidasa en mitocondrias hepáticas; actividad de delta ALS en homogenizados de hígado y en homogenizado de médula ósea; citocromo P₄₅₀ y b₅ NADH y NADPH citocromo c reductasas en microsomas de hígado. Se controló también la ingesta y evolución ponderal en todos los animales.

Desnutridos en vías de recuperación. El grupo de animales desnutridos que no fue sacrificado a los 35 días de edad, se realimentó con una dieta de caseína que contenía 10 NDpCal^o/o suplementada con Cu y Fe (Dieta 3). Las ratas, en este caso,

fueron sacrificadas sistemáticamente cada dos días entre los 35 y 65 días de edad, estudiándose los mismos parámetros medidos en el grupo anterior.

Control. Este grupo se integró con ratas recién nacidas amantadas en grupos de ocho por cada rata nodriza; luego a los 21 días de edad se destetaron a una dieta a base de caseína con 10 NDpCal⁰/o (Dieta 1). Las ratas fueron sacrificadas sistemáticamente cada dos días, desde los 35 días hasta los 60 días de edad, estudiándose los mismos parámetros que en los dos grupos ya descritos.

Todas las dietas así como el agua de bebida fueron ofrecidas *ad libitum*. La temperatura del vivero era de 25°C, con 75% de humedad.

Dietas

La composición de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 1.

Métodos

Medimos la actividad de delta AL sintetasa en homogenizados de hígado y en homogenizados de médula ósea, preparado en tres volúmenes de NaCl al 0.9% que contenían 0.5 mM de EDTA y 10 mM de Tris buffer a un pH de 7.4. Los homogenizados fueron incubados con 200 μ Moles de glicina y 20 μ Moles de EDTA. A esta concentración de EDTA, la producción de ácido delta aminolevulínico (delta AL) se estimula, y la de delta aminolevulínico dehidratasa se inhibe (8). Las incubaciones se hicieron a 37°C por una hora, con agitación en presencia de aire. El ácido delta aminolevulínico formado se determinó según el método de Urata y Granick (9), con ciertas modificaciones que consistieron en concentrar al vacío, en un liofilizador, los sobrenadantes de los incubados, después de precipitarlos con ácido tricloroacético al 25%. Esta modificación permitió cuantificar las pequeñísimas cantidades de delta AL generado por el sistema, usando un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 402.

En microsomas de hígado medimos el contenido de citocromo P₄₅₀ y cit b₅; la actividad de NADH b₅ citocromo reductasa y NADPH P₄₅₀ citocromo reductasa, y por último, constituyentes del sistema oxidasas de función mixta.

TABLA 1
COMPOSICION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES
(g/100 g de dieta)

Alimentación	Dieta No.	Caseína	Maíz	Grasa vegetal	Aceite de girasol	Vitaminas liposolubles**	Vitaminas hidrosolubles**	Mezcla mineral**	Almidón	Glucosa	Alphacel
Dieta con caseína ^a (10 NDpCal ^o /o)	1	32.5	17.5	10.0	5.0	2.0	3.0	5.0	7.5	12.5	5.0
Dieta proteica ^a	2	—	50.0	10.0	5.0	2.0	3.0	5.0	7.5	12.5	5.0
Dieta con caseína ^b (10 NDpCal ^o /o) suplementada con hierro y cobre	3	32.5	17.5	10.0	5.0	2.0	3.0	5.0	7.5	12.5	5.0

a Aporta 8.3 mg de Fe/100 g de dieta, y 2.5 mg de Cu/100 g de dieta.

b Aporta 57.6 mg de Fe/100 g de dieta, y 7.5 mg de Cu/100 g de dieta.

***** Obtenida de Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, EUA.

****** Véase referencia (3).

Los microsomas hepáticos fueron aislados como sigue: los hígados se extrajeron, se cortaron y luego fueron lavados varias veces con fosfato de potasio 0.1 M a un pH de 7.5. Luego se homogenizaron en el mismo buffer usando un homogenizador de teflón, a una concentración de 20^o/o peso/volumen. Los homogenizados se centrifugaron a 9,000 G durante 15 minutos en una centrífuga International modelo B-20. Los microsomas fueron obtenidos centrifugando el sobrenadante de 9,000 a 100,000 gravedades por 60 minutos en una ultracentrífuga Beckman L2-65B, y el "pellet" microsomal se sometió a suspensión en fosfato de potasio.

Los citocromos P₄₅₀ y b₅ fueron determinados según Omura y Sato (10), siendo el coeficiente de extinción molar de 91 mM⁻¹ cm⁻¹ para el citocromo P₄₅₀ y de 185 mM⁻¹ cm⁻¹ para el citocromo b₅. La NADPH citocromo c reductasa y el citocromo c NADH reductasa, se midieron siguiendo la reducción de citocromo c a 550 mμ con base en la técnica de Masters, Williams Jr. y Kamin (11) en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 402.

La actividad de la citocromo oxidasa (E.C. 1.9.3.1.) se midió en mitocondrias de hígado aisladas según la técnica de Johnson y Hardy (12). Luego fue ensayada espectrofotométricamente, midiendo la oxidación de ferrocitocromo c reducido a 55 mμ, según recomendación de Smith (13).

Tanto la proteína mitocondrial como la microsomal fueron determinadas de acuerdo a la técnica de Lowry *et al.* (14).

RESULTADOS

La Figura 1 ilustra gráficamente la evolución del peso de ratas desnutridas experimentalmente, desnutridas en vías de recuperación, y de los animales control, pudiéndose evidenciar una clara diferencia en la evolución ponderal en los tres grupos experimentales. En el grupo desnutrido, el retardo en crecimiento se observa desde los primeros días, al ser sometidos a una lactancia insuficiente. Así, en el momento del destete el peso de este grupo solo alcanzó la mitad del que acusó el grupo control (21 g vs 47 g). La ganancia de peso observada en el grupo realimentado es sorprendente, pues la inclinación de la curva demuestra que la velocidad de crecimiento superó a la del grupo control. Sin embargo, no logró alcanzar el peso de las ratas control en el lapso experimental.

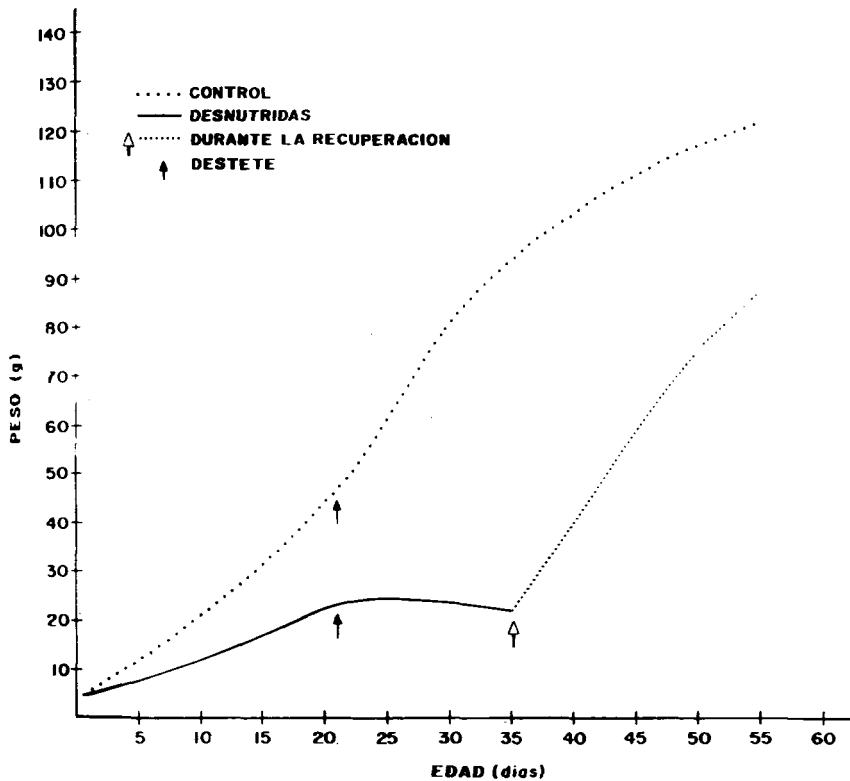


FIGURA 1

Evolución ponderal de ratas controles, desnutridas y durante la recuperación de la desnutrición

La Tabla 2 muestra la ingesta dietaria y los cambios de peso experimentados por las ratas durante los períodos de desnutrición experimental y realimentación, comparados con los del grupo control.

La Tabla 3 da cuenta de los niveles de hemoglobina y hematocrito determinados en los tres grupos experimentales. A los 35 días de edad las ratas desnutridas desde su nacimiento, y que luego se sometieron durante 14 días a una dieta sin proteínas, muestran una diferencia estadísticamente significativa ($P \ll 0.001$) en sus niveles de hematocrito y hemoglobina al ser comparadas con las controles. Se observa asimismo que al realimentarlas con la dieta

que contenía caseína (10 NDpCal⁰/o) suplementada con Cu y Fe (Dieta 3), se logró estimular levemente la síntesis de hemoglobina, estímulo que fue más evidente en la eritropoyesis, ya que el hematocrito se acercó a los valores encontrados en las ratas control.

La síntesis de ácido delta AL por homogenizados de hígado y médula en las ratas desnutridas, realimentadas, y en las del grupo control, se observa en la Tabla 4, así como el contenido de proteína hepática. Según se puede apreciar, la producción de delta AL, expresado por mg de proteína en la médula de las desnutridas, está significativamente disminuido ($P < 0.02$) en comparación con la producción de dicho ácido en los animales control, y que la realimentación estimuló la síntesis aun cuando ésta permaneció siendo significativamente menor que en las controles ($P < 0.05$). Cuando la formación de delta AL se expresa por gramo de tejido hepático fresco, por hora, ésta aparece significativamente inferior en las desnutridas ($P < 0.02$), lográndose una normalización al final del período de realimentación; no se observa lo mismo al expresar los valores por mg de proteína hepática. Cabe señalar que el contenido de proteína hepática en las desnutridas fue sólo el 59^o/o del observado en las controles, y que la realimentación logró elevar este porcentaje a 90^o/o.

Simultáneamente al descenso de la actividad de delta AL sintetasa, medida a través de la biosíntesis de delta AL, se aprecia en la Tabla 5 que la desnutrición provocó un descenso en los contenidos de citocromo P₄₅₀ y b₅ equivalente al 52^o/o, y una disminución en la actividad de NADH citocromo b₅ reductasa; no

TABLA 2

INGESTA DIETARIA Y CAMBIOS EN EL PESO CORPORAL DE RATAS DESNUTRIDAS, REALIMENTADAS, Y CONTROLES

Grupo	Edad		Dieta No.	Ingesta dietaria (g/rata/día)	Cambio de peso (g/rata/día)
	Inicial	Final			
Control	21	34	1	7.10	+3.48
Desnutrido	21	34	2	2.09	-0.05
Control	35	60	1	10.00	+1.58
Realimentado	35	60	3	5.57	+3.26

TABLA 3

NIVELES DE HEMOGLOBINA (g/100 ml) y HEMATOCRITO (o/o)
EN RATAS CON DESNUTRICION PROTEICA PRECOZ, EN VIAS DE
RECUPERACION, Y EN EL GRUPO CONTROL

Grupo	Edad (días)	Hemoglobina (g/100 ml)	Hematocrito (o/o)
Desnutridas	35	•10.5 ± 0.4 (21)	•33.1 ± 1.8 (21)
Realimentadas	60	*11.9 ± 0.4 (11)	*43.9 ± 0.7 (11)
Control	35	•14.7 ± 0.1 (27)	•48.0 ± 0.7 (27)
	60	*13.5 ± 0.4 (12)	*45.2 ± 0.6 (20)

$P^{\bullet} \ll 0.001$ $P^{\bullet} \ll 0.001$
 $P^* < 0.001$ $P^* < N.S.$

Las cifras entre paréntesis representan el número de casos.

N.S. = Diferencia estadística no significativa.

P = Límites de significancia de la distribución de Student.

obstante, la actividad de NADPH citocromo P_{450} reductasa permaneció casi sin variación. Se encontró, además, que la proteína microsomal estaba disminuida. La Tabla 5 también señala que la realimentación estimuló y normalizó el contenido y la actividad de los citocromos y de la proteína microsomal a los pocos días de realimentación. Como complemento de estos datos, las Figuras 2 y 3 muestran que al comienzo de la realimentación la inducción de los citocromos y reductasas fue espectacular en lo referente al citocromo P_{450} , en un 187% por mg de proteína de los observados en los controles al cuarto día de realimentación, normalizándose hacia el octavo día. Algo similar se observó con respecto al citocromo b_5 cuyo contenido se estimuló en 186% también al

TABLA 4
SINTESIS DE ACIDO DELTA AMINOLEVULINICO EN HOMOGENIZADO DE HIGADO Y
MEDULA OSEA DE RATAS DESNUTRIDAS, EN VIAS DE RECUPERACION
DE DESNUTRICION Y EN EL GRUPO CONTROL

	Grupos			p***
	Desnutridas	Realimentadas	Controles	
Edad días	35	60	35	
<i>Médula ósea</i>				
n moles AL x mg de proteína ⁻¹	● 0.96 ± 0.5 (10)	□ 1.83 ± 0.3 (5)	● □ 4.83 ± 1.3 (7)	□ < 0.05 ● < 0.02
µg de proteína/mg de médula ósea*	● 172 ± 15.0 (10)	204 ± 9.8 (5)	● 286 ± 24.3 (7)	● < 0.001
<i>Hígado</i>				
n moles AL x mg de proteína ⁻¹	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.01	
n moles AL/g de hígado x hora	● 10.9 ± 1.8 (9)	□ 17.2 ± 2.9 (5)	● □ 19.7 ± 2.7 (5)	● < 0.02 □ N.S.
mg de proteína/g de hígado**	● 131 ± 4.9 (30)	199 ± 3.1 (12)	● 220 ± 4.9 (30)	● << 0.001

Las cifras entre paréntesis representan el número de casos.

* Médula liofilizada.

** Tejido fresco.

*** Límites de significancia de la distribución de Student.

N.S. = Diferencia estadística no significativa.

TABLA 5

CONTENIDO DE CITOCROMO P₄₅₀, CITOCROMO b₅, NADH CITOCROMO c REDUCTASA, NADPH CITOCROMO c REDUCTASA, PROTEÍNA MICROSOMAL Y PESO DE HIGADO DE RATAS CONTROLES, DESNUTRIDAS Y CON OCHO DIAS DE REALIMENTACION

Grupo	Edad (días)	Citocromo P ₄₅₀ (n moles x mg de prot. ⁻¹)	Citocromo b ₅ (n moles x mg de prot. ⁻¹)	NADH citocromo c reductasa (n moles de cit. c reducido x min ⁻¹ x mg de prot. ⁻¹)	NADPH citocromo c reductasa (n moles de cit. c reducido x min ⁻¹ x mg de prot. ⁻¹)	Proteína microsomal (mg de prot. x g de híg. ⁻¹)	Hígado (g de híg. 100 g de rata ⁻¹)
Control	35	0.274 ± 0.00	0.197 ± 0.00	63.72 ± 1.89	7.04 ± 0.04	21.3 ± 0.89	4.98 ± 0.16
Desnutridas	35	0.144 ± 0.03	0.105 ± 0.02	22.94 ± 0.08	6.94 ± 0.06	13.5 ± 0.33	3.88 ± 0.02
		P < 0.02	P < 0.01	P ≪ 0.001	P N.S.	P < 0.01	P < 0.01
Control	43	0.397 ± 0.00	0.248 ± 0.01	102.7 ± 2.44	9.77 ± 0.13	19.3 ± 1.49	5.24 ± 0.16
Realimentadas	43	0.405 ± 0.02	0.266 ± 0.02	105.7 ± 5.08	10.87 ± 0.53	21.4 ± 1.69	6.24 ± 0.06
		P N.S.	P N.S.	P N.S.	P N.S.	P N.S.	P < 0.01

P = Límite de significancia de la distribución de Student.

N.S. = Diferencia estadística no significativa.

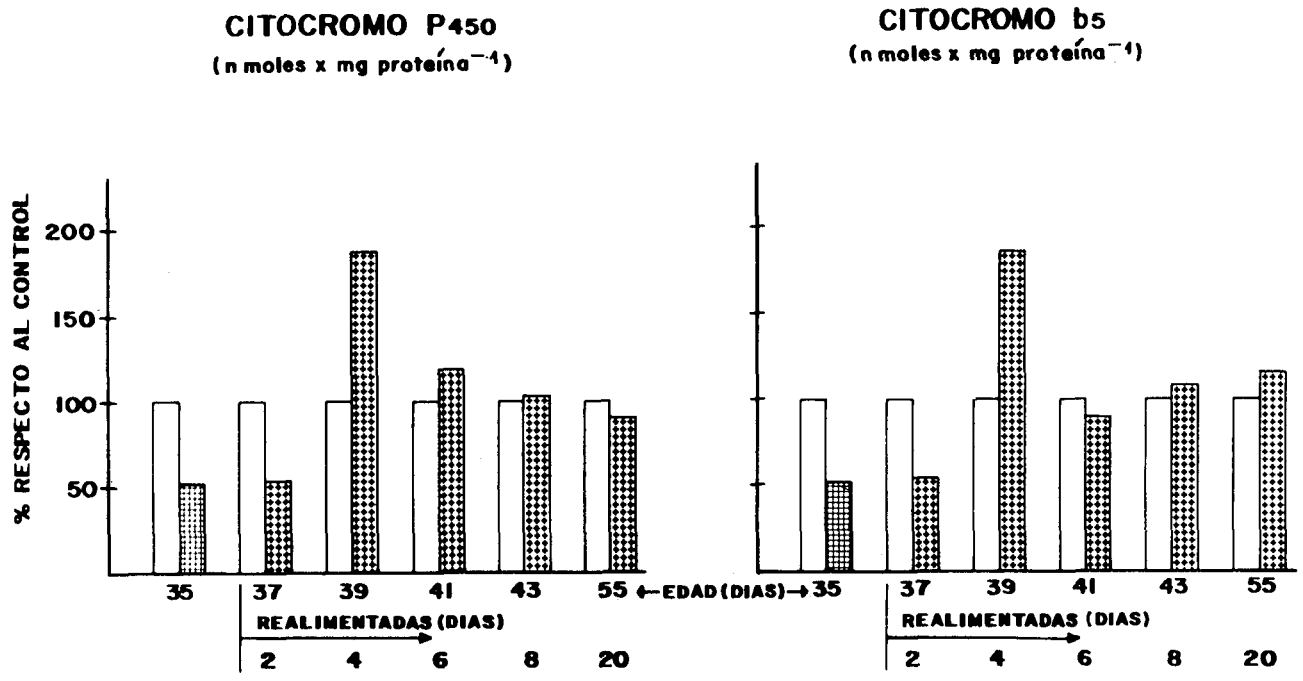


FIGURA 2

Contenido de citocromo P₄₅₀ y citocromo b₅ en ratas controles , desnutridas , y en recuperación la desnutrición , expresado en nanomoles por mg de proteína microsomal

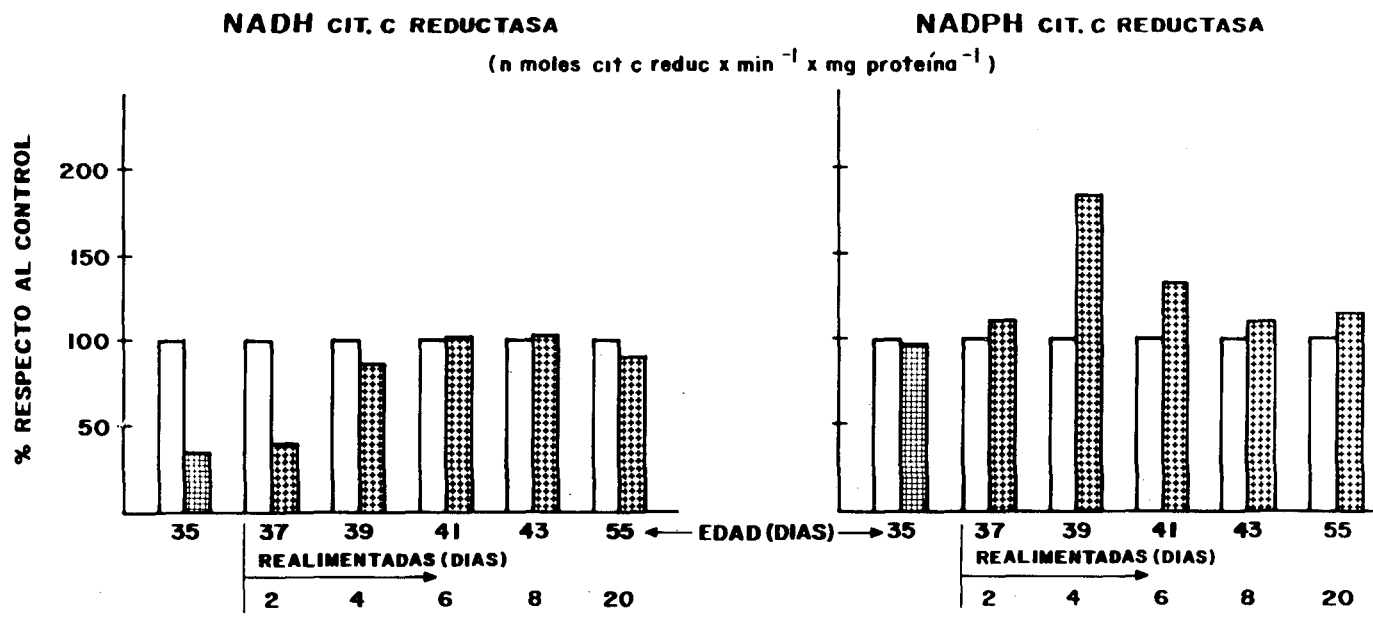


FIGURA 3

Actividades de NADH y NADPH citocromo reductasas en ratas controles , desnutridas y en recuperación de la desnutrición , expresada en nanomoles de citocromo c reducido por minuto y por mg de proteína microsomal.

40. día de realimentación, lográndose valores similares al del grupo control al 80. día.

La actividad de NADH citocromo c reductasa también fue estimulada al 60. día de realimentación, para alcanzar valores que no excedieron el de los normales. La actividad de NADPH reductasa que no experimentó gran variación durante la desnutrición, fue estimulada al 40. día de realimentación en un 183% del valor encontrado en los controles de edad similar, alcanzando 100% de actividad al 80. día de realimentación.

Cabe destacar que la comparación de los contenidos de citocromos y las actividades de citocromo reductasas microsomales hepáticas durante la realimentación, con los contenidos y actividades observadas durante la desnutrición, reveló una diferencia significativa. El estímulo de la realimentación es tan espectacular que, en el caso del citocromo P₄₅₀, el valor fue 400% veces superior al 40. día de realimentación.

Por otro lado, la Tabla 6 indica la actividad de citocromo oxidasa en los grupos experimentales, medida a través de la oxidación aeróbica de ferrocitocromo c reducido con ácido ascórbico. De acuerdo a los datos, la diferencia entre los valores obtenidos en ratas desnutridas y los encontrados en ratas control de edad similar, no tuvo significación estadística.

DISCUSION

El primer paso en la biosíntesis de las porfirinas y del grupo heme involucra la condensación de glicina y succinil coenzima A, activados por fosfato de piridoxal. La enzima que cataliza esta reacción es la delta aminolevulínico sintetasa (delta AL sintetasa) y es de importancia fundamental, ya que controla la biosíntesis de heme hepático (5). Jacob, Monod y Wollman, resumidos por Lowff (15) proponen dos mecanismos para controlar esta primera enzima de una cadena biosintética. Uno sería su inhibición por el producto final heme, y el otro, su represión por el producto final.

London, Burns y Karibian (16) han demostrado que el heme agregado a reticulocitos de conejo disminuye la incorporación de glicina en el heme de la hemoglobina, evidenciando inhibición de la enzima. El modelo de desnutrición experimental usado por nosotros, en el que encontramos bajos niveles de hemoproteínas — lo que sería indicativo de una baja disponibilidad de heme en

TABLA 6

ACTIVIDAD DE CITOCROMO OXIDASA (E.C. 1.9.3.1.) EN
MITOCONDRIAS HEPATICAS DE RATAS DESNUTRIDAS Y
CONTROLES

Grupo	Edad (días)	n moles de ferrocitocromo c oxidado x mg de proteína ⁻¹ x min ⁻¹
Desnutridas	35	162 ± 18.3 (13)
Controles 35	35	123 ± 13.7 (15)

P = N. S.

P = Límite de significancia de la distribución de Student.

N.S. = Diferencia estadística no significativa.

Las cifras entre paréntesis representan el número de casos.

el medio — no permite explicar que la baja actividad encontrada pueda deberse a este mecanismo. Más bien, podríamos postular que la desnutrición proteica, en la que el animal no tiene acceso a aminoácidos exógenos, es la que provocaría una disminución de estos últimos a nivel celular, afectando así su disponibilidad en el medio para sintetizar la cadena polipeptídica de la sintetasa del ácido delta aminolevulínico. Al suministrarles aminoácidos a las ratas a través de la proteína dietaria durante el período de realimentación, logramos inducir la actividad de la enzima a nivel hepático, aunque a nivel de la médula ósea ese estímulo fue menor.

Tschudy *et al.* (17) han informado de un mecanismo a través del cual la glucosa dietaria inhibe la síntesis de delta aminolevulínico sintetasa inducida por drogas (18, 19), en ratas, llamando a esta inhibición efecto de la glucosa o represión de catabolitos. Dichos investigadores demostraron que la alimentación con hidratos de carbono inhibe marcadamente la inducción de delta AL sintetasa producida por alilisopropilacetamida (AIA) activador de la enzima, bastando 30 g de sacarosa/kg de peso corporal/día/rata, para

disminuir a la tercera parte los μ moles de delta AL formados durante la inducción de la enzima por AIA.

El mecanismo a través del cual estaría reprimida la síntesis de delta ALS, según postulan Tschudy y colaboradores (17), lo explicaría el exceso de alfa cetoglutarato y succinato, catabolitos de la glucosa que a su vez son precursores de la síntesis de delta AL. Nuestro grupo experimental de ratas desnutridas tuvo acceso a una dieta casi exclusivamente a base de hidratos de carbono. La ingesta de glucosa, sin tomar en cuenta todos los otros hidratos de carbono, alcanzó una cifra superior a 30g/kg de peso corporal/día/rata, que fue la usada por los citados autores en su investigación (17). Al realimentar a la rata desnutrida, una parte importante de los hidratos de carbono fue reemplazada por caseína (32.5 g/100 g de dieta), disminuyendo así el aporte de glucosa y suministrando a la célula aminoácidos para síntesis proteica, a los que, como mencionamos antes, la rata no tuvo acceso durante la fase de desnutrición.

Podríamos postular que la ausencia de aminoácidos dietarios y el exceso de glucosa tendrían un efecto adicional en la inhibición de la actividad de delta ALS durante la desnutrición proteica precoz. Al reponer los aminoácidos a través de la dieta durante la realimentación y, simultáneamente, disminuir el aporte de glucosa, se logró una inducción de la enzima a nivel hepático, que fue suficiente para normalizar la síntesis de algunas de las hemoproteínas disminuidas. No se observó lo mismo en la actividad de delta ALS en la médula ósea, donde la inducción fue muy pequeña durante la realimentación. No descartamos la posibilidad que en la cadena biosintética de la hemoglobina, no sólo sea la síntesis de porfirinas la que esté disminuida sino que, además, la actividad intracelular de otras enzimas esté afectada y que los niveles de los cofactores involucrados en dicha biosíntesis también estén disminuidos.

La biosíntesis de hemoproteínas microsomales depende de la disponibilidad del grupo heme y éste, a su vez, del AL formado. Al cuantificar el contenido de algunos citocromos microsomales hepáticos encontramos que, en las ratas desnutridas, los contenidos de citocromo P_{450} , citocromo b_5 y actividad de NADH citocromo b_5 reductasa, estaban disminuidos en un 50% de los valores encontrados en las ratas control. Al mismo tiempo, observamos que la formación de delta AL a nivel hepático estaba disminuida en la misma proporción. La realimentación estimuló la síntesis de delta AL y aumentó los contenidos de los citocromos

estudiados, encontrándose que en éstos la inducción fue tan espectacular que a los 4 días de realimentación el contenido de los mismos llegó a ser 180% mayor, incluso que el de los controles, alcanzando valores normales después de 6 a 8 días de realimentación. Este estímulo en la síntesis de delta AL no fue tan espectacular, ya que sólo después de 25 días de realimentación logramos valores normales. El ácido AL formado por inducción de la proteína dietaria y la disminución de hidratos de carbono favorecieron en forma importante algunas de las hemoproteínas estudiadas, tales como citocromo P₄₅₀, cit. b₅, NADH cit. c red. y NADPH cit. c reductasa. Los citocromos y reductasas son componentes del sistema de oxidasas de función mixta microsomal, y este sistema es el responsable de metabolizar drogas aumentando su polaridad para facilitar su excreción.

La desnutrición severa provocó un descenso en el contenido y actividad de estos componentes, hecho que es de importancia fundamental en la terapia con drogas durante la desnutrición. Es importante señalar que en los primeros días de realimentación estos componentes experimentan un estímulo sorprendente, a tal grado que el animal en recuperación metabolizaría drogas o fármacos a una velocidad mucho mayor que el animal control.

La anemia provocada durante la desnutrición experimental disminuye el oxígeno transportado a las células. Nuestros resultados indicaron que el aporte disminuido de oxígeno no redujo la actividad de citocromo oxidasa en las mitocondrias de hígado de rata, hallazgo demostrativo de que la actividad de esta enzima es independiente de la concentración de oxígeno a esos niveles.

Chance (20) ha demostrado que la interacción entre el citocromo a₃ y el oxígeno es una consecuencia más bien de las interacciones con otros componentes de la cadena respiratoria. En nuestro estudio, durante la fase de desnutrición proteica precoz, ni el O₂ disminuido ni la baja disponibilidad de ácido delta AL lograron alterar la actividad de citocromo oxidasa.

SUMMARY

ACTIVITIES OF DELTA AMINO LEVULINIC SYNTHETASE, CYTOCHROME OXIDASE, AND CONTENT OF THE OXIDASE SYSTEM COMPONENTS, AS A MIXED FUNCTION DURING EXPERIMENTAL PROTEIN MALNUTRITION

Activities of delta amino levulinic synthetase (DALS), cytochrome oxidase (E. C. 1.9.3.1.), NADH cytochrome b_5 reductase (NADH red.), NADPH cytochrome P_{450} reductase (NADPH red.), contents of cytochrome P_{450} (cyt. P_{450}) and cytochrome b_5 (cyt. b_5), and levels of hemoglobin and hematocrit were studied in three groups of rats: a) malnourished, b) during recovery from malnutrition, and c) controls.

During severe protein malnutrition blood levels of hemoglobin and hematocrit were found to be decreased as well as DALS' activity in homogenized bone marrow and liver. The activity of NADH red. and contents of cyt. P_{450} and cyt. b_5 in hepatic microsomes were also found significantly depressed. The microsomal activity of NADPH red. as well as mitochondrial cytochrome oxidase did not present significant changes, since values obtained in malnourished rats were similar to those found for the control group.

While recovering from malnutrition, when rats were fed a casein based diet (10 NDpCa1%) supplemented with Fe and Cu, the hepatic enzymatic activities, the cytochrome contents of P_{450} and b_5 , and hematocrit experienced a spectacular increase, reaching towards the end of the refeeding period values which could be compared to those found in the control group. Nevertheless, DALS' activity in homogenized bone marrow and hemoglobin levels remained low.

Results are discussed in relation to depressed activities and contents of enzymes, coenzymes, metabolites and substrates involved in the hemoglobin synthesis in the rat bone marrow, during recovery from malnutrition.

BIBLIOGRAFIA

1. Araya, J. & M. A. Tagle. Hepatic and circulating (non-heme) iron during recovery from malnutrition in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.*, 26:482-483, 1973.
2. Araya, J., C. Bosco, R. Cepeda & A. Strozzi. *Bol. Hosp. San Juan de Dios*, 21:244, 1974.
3. Araya, J. Metabolismo del hierro durante la recuperación de la rata

- desnutrida. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 25:261-272, 1975.
4. Shemin, D. The biosynthesis of porphyrins. En: **The Harvey Lectures. Series 50 (1954-1955)**. New York, Academic Press, 1956, p. 258-284.
 5. Granick, S. & A. Kappas. Steroid introduction of porphyrin synthesis in liver cell culture. I. Structural basis and possible physiological role in the control of heme formation. *J. Biol. Chem.*, 242:4587-4593, 1967.
 6. Canaan, R. K. Hemoglobin standard. *Science*, 127:1376-1378, 1958.
 7. Guest, G. M. & V. E. Siler. A centrifuge method for the determination of the volume of cells in blood. *J. Lab. Clin. Med.*, 19:757-768, 1934.
 8. Marver, H. S., D.P. Tschudy, M.G. Perloth & A. Collins. δ aminolevulinic acid synthetase. I. Studies in liver homogenates. *J. Biol. Chem.*, 241:2803-2809, 1966.
 9. Urata, G. & S. Granick. Biosynthesis of δ -aminoketones and the metabolism of aminoacetone. *J. Biol. Chem.*, 238:811-820, 1963.
 10. Omura, T. & R. Sato. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239:2370-2378, 1964.
 11. Masters, B.S.S., C. H. Williams, Jr. & H. Kamin. (92), The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver. En: **Methods in Enzymology (Vol. 10)**. R.W. Estabrook and M. E. Pullman (Eds.). New York, Academic Press, 1967, p. 565-573.
 12. Johnson, D. & H. Lardy. Isolation of liver or kidney mitochondria. En: **Methods in Enzymology (Vol. 10)**. R.W. Estabrook and M.E. Pullman (Eds.). New York, Academic Press, 1967, p. 94-95.
 13. Smith, L. Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase. En: **Methods of Biochemical Analysis (Vol. II)**. D. Glick (Ed.). New York, Interscience Publishers, Inc., 1955, p. 427-434.
 14. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr & R. J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
 15. Lowff, A. En: **Biological Order**. Cambridge, Mass., The MIT Press, 1962.
 16. London, I. M., G. P. Burns & B. Karibian. The regulation of hemoglobin synthesis and the pathogenesis of some hypochromic anemias. *Medicine*, 43:789-802, 1964.
 17. Tschudy, D.P., F. H. Welland, A. Collins & G. Hunter, Jr. The effect of carbohydrate feeding in the induction of δ -aminolevulinic acid synthetase. *Metabolism*, 13:396-406, 1964.
 18. Epps, H.M.R. & E.F. Gali. *Biochem.*, 36:69, 1942.
 19. Monod, J. *Growth*, 11:223, 1947.
 20. Chance, B. Cellular oxygen requirements. *Fed. Proc.*, 16:671-680, 1957.