

modulados por la interrelación entre señales hormonales y señales (posiblemente metabolitos) provenientes de los nutrientes.

En este trabajo se resumirán los resultados de estudios dirigidos a establecer el papel de los nutrientes en la regulación de la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa y su posible influencia sobre las tasas de síntesis de ácidos grasos en el hígado.

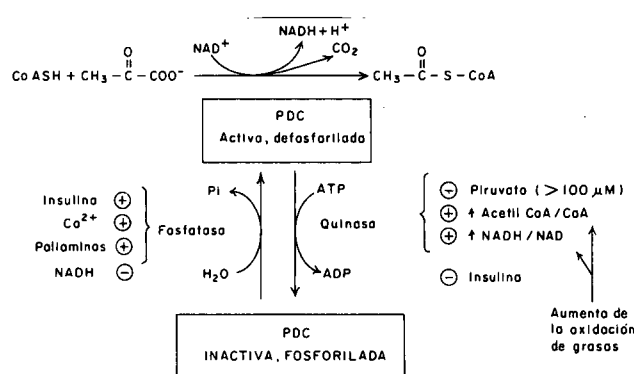
Papel del complejo de piruvato deshidrogenasa en el control del metabolismo de carbohidratos

La reacción catalizada por el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDC) ocupa una posición crucial en el metabolismo ya que a ese nivel se controla la velocidad con que se utiliza el piruvato proveniente de la degradación de carbohidratos tales como el glucógeno, la glucosa y la fructosa y algunos aminoácidos glucogenéticos tales como la alanina, para ser transformados en acetilCoA. En los tejidos lipogénicos, el acetilCoA puede oxidarse en el ciclo de Krebs o bien ser utilizado para la síntesis de esteroides o ingresar a la vía lipogénica y transformarse en ácidos grasos.

El complejo piruvato deshidrogenasa es un agregado multimolecular de enzimas cuya actividad es regulada mediante retroinhibición y por un mecanismo de fosforilación/ defosforilación en el cual intervienen dos enzimas interconvertidoras: una quinasa, que fosforila e inactiva al complejo y una fosfatasa que lo reactiva. Como se indica en el gráfico 2, estas enzimas reguladoras están sujetas a control alostérico por metabolitos efectores tales como el piruvato, el NADH y el acetilCoA (7).

GRAFICO 2

Regulación del complejo piruvato deshidrogenasa por modificaciones covalentes.



Del gran número de estudios sobre la regulación de la actividad de esta enzima en varios tejidos se ha podido concluir que la actividad del complejo presente en varios tejidos es afectada en forma diferente por factores hormonales y nutricionales. Así por ejemplo, la enzima del tejido adiposo es activada por la insulina a través de un aumento de la fracción activa (defosforilada) del complejo (8) mientras varios estudios realizados tanto in vivo como en sistemas in vitro indican que la actividad de la enzima hepática es menos sensible a la acción de esa hormona (9,10). La actividad del PDC en el tejido nervioso no es afectada por el ayuno, mientras que bajo esas condiciones la actividad de la enzima hepática, del músculo esquelético y cardíaco y del tejido adiposo es fuertemente inhibida (9,10). En cuanto a la enzima hepática, se ha demostrado que su actividad se incrementa rápidamente durante la transición ayuno-estado alimentado en forma simultánea con el incremento en la lipogénesis y glucogenogénesis

(11). En el hígado perfundido se ha demostrado que la adición de oleato o palmitato al líquido de perfusión ocasiona una reducción de la actividad en un 50%. A pesar de que se ha estudiado ampliamente las modificaciones de esta enzima en animales en ayunas o diabéticos, se conoce relativamente poco sobre la regulación del complejo en el animal sometido a manipulaciones dietarias. Estudios previos han mostrado que la actividad total del complejo hepático aumenta al administrar dietas ricas en fructosa o sacarosa a animales de experimentación (12,13). Este efecto ha sido también sugerido en hepatocitos cultivados (14). En relación con los efectos de las grasas dietarias, se ha propuesto que el complejo piruvato deshidrogenasa no tiene un papel importante en el control de la lipogénesis hepática por grasas ya que no se observó correlación entre los cambios de la actividad de la enzima, producidos después de la administración de varios tipos de dieta basadas a glucosa o fructosa, con las actividades máximas de enzimas lipogénicas claves. En esos estudios tampoco se observó correlación entre la actividad del complejo y las tasas de lipogénesis medidas en esos animales (5,16).

Estudios sobre la regulación de la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa por carbohidratos y lípidos dietarios

Los efectos que produce la administración de dietas ricas en carbohidratos suplementadas o no con varios tipos de grasa, se estudiaron en ratas de la cepa Sprague-Dawley provenientes del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental (Universidad Central de Venezuela). Para este fin, se administraron ad libitum dietas basadas en almidón o sacarosa a grupos de 4-6 animales durante 15 días. Las dietas empleadas se prepararon con almidón o sacarosa y fueron o no suplementadas con cantidades variables de grasas saturadas (mantequilla) o poliinsaturadas (aceites de maíz o de pescado). Los grupos control fueron mantenidos con una dieta de ratarina (Protinal, Valencia, Venezuela). La Tabla 1 muestra la composición de las dietas experimentales y la composición de ácidos grasos de las grasas utilizadas.

Al final del período de dieta, se congelaron los hígados in situ con pinzas pre-congeladas en nitrógeno líquido. La actividad del PDC se determinó espectrofotométricamente en ensayos acoplados con la N-acetil transferasa. En los extractos obtenidos se determinó la actividad del complejo presente en la forma activa (PDCa) y luego de activación del complejo en presencia de una fosfatasa exógena, se determinó los valores de actividad total (PDCt) (15,17). Los resultados que se indican en el Gráfico 3A muestran que la dieta rica en almidón y libre de grasa produjo un aumento significativo de 1,3 veces en la actividad de PDCt en comparación con animales alimentados con ratarina. Cuando se suplementó esta dieta con aceite de maíz al 5%, se observó un descenso de la actividad en un 30%, obteniéndose valores cercanos a los observados en los animales control. Cuando el contenido de grasa se elevó a un 22% en peso, se obtuvo una reducción significativa de los valores de actividad total con respecto a los observados cuando el contenido de grasa de la dieta fue de 5%. También se observaron cambios en la fracción de enzima activa, la cual aumentó 1,5 veces en los animales sometidos a dietas libres en grasa en comparación con los controles (no se muestra en el gráfico 3; ver ref. 18). La adición de grasas causó un descenso del porcentaje de enzima activa desde un 16% obtenido en los animales sometidos a dietas libres de grasa hasta un 6,9% en animales a los cuales se administró dietas con contenidos de grasa superiores al 10%. La administración de dietas ricas hiperlipogénicas, ricas en sacarosa y libres de grasa (SLG), produjo cambios en la actividad del PDC más pronunciados que los obtenidos al administrar las dietas basadas en almidón. (Gráfico 3B). La actividad total se incrementó

unas 3 veces en los animales que recibieron dietas libres de grasa en comparación con los controles. La adición de grasas poliinsaturadas (aceites de maíz o pescado) causó un descenso de la actividad del PDC en comparación con las dietas libres de grasa. Sin embargo, la adición de grasa saturada (mantequilla) no produjo el mismo efecto inhibitorio. Los valores de actividad obtenidos de animales que recibieron dietas suplementadas con grasas poliinsaturadas fueron siempre mayores que los valores control, lo cual sugiere que la grasa pudo contrarrestar solo en forma parcial el efecto hiperlipogénico de la sacarosa. Los efectos de las dietas sobre la fracción de enzima activa fueron similares a los observados para la PDC total, sin embargo se observó que la reducción de los valores de PDCa es independiente del tipo de grasa utilizada y la adición de grasa saturada produjo un descenso en los valores de PDCa similar al producido por los aceites de maíz o pescado (<3% de la actividad total).

TABLA 1

A. Composición de las dietas experimentales					
Tipo de dieta:	L.G.	5%	10%	15%	22%
	Nutrientes (g/Kg dieta):				
Caseína	250	250	200	230	230
Carbohidrato (almidón o sacarosa)	650	600	600	520	450
Grasa	—	50	100	150	220

B. Composición de las grasas dietarias			
Tipo de ácido graso	Mantequilla	Aceite de Pescado	Aceite de Maíz
<12:0	—	8.2	—
12:0	3.0	—	—
14:0	12.6	14.8	—
16:0	38.9	15.3	15.2
16:1 (n-7)	3.8	12.8	—
18:0	11.5	0.6	—
18:1 (n-9)	28.4	16.0	29.9
18:2 (n-6)	1.7	—	54.9
18:3 (n-3)	—	4.9	—
20:5 (n-3)	—	21.6	—
22:6 (n-3)	—	5.8	—

Las dietas contenían solo un tipo de grasa, a excepción de la dieta al 15%, que contenía 5% de aceite de maíz y 10% de aceite de pescado. Todas las dietas fueron suplementadas con celulosa (5%), mezcla de minerales AIN (3,5%), mezcla de vitaminas AIN (1%), D, L, metionina (0,3%) y cloruro de colina (0,2%) obtenidos de Teklad Diets (Madison, WI, U.S.A.). Los siguientes materiales fueron obtenidos localmente: almidón de maíz (Pandock, Vzla), aceite de maíz de COPOSA (Acarigua, Vzla), Vitamina E (0,05%) y aceite de pescado de Labs. Schering (Caracas, Vzla) y mantequilla de Zarco (Estado Miranda, Vzla).

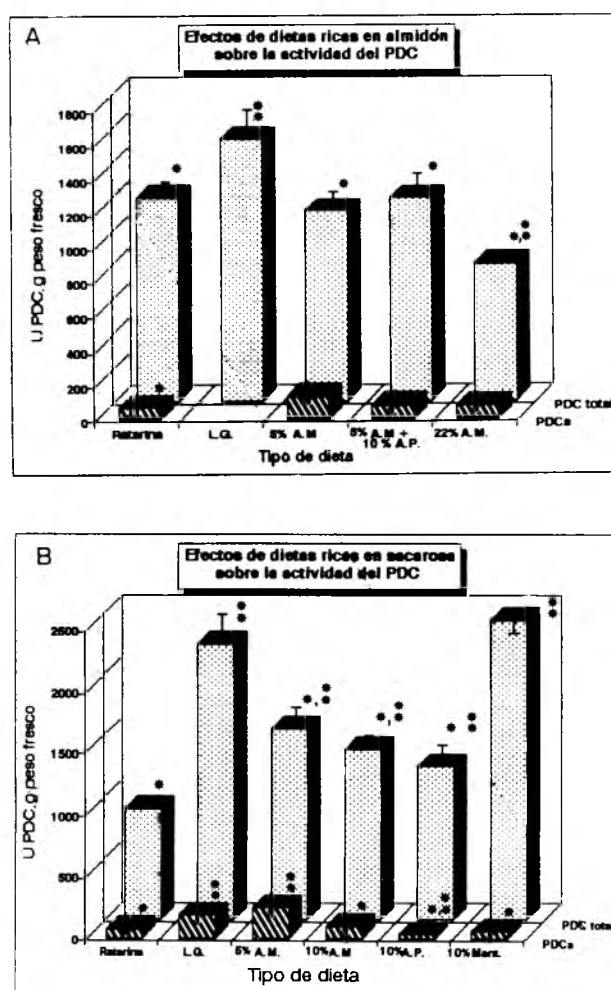
La composición de ácidos grasos fué determinada después de transmetilación de acuerdo con Stahl (1987). Los derivados metilados de los ácidos grasos fueron cuantificados por cromatografía gas-líquido en una columna (1.83 m de largo x 4mm de diámetro interno) empacada con 4% adipato PEG en Chromosorb AW (80-100 de mesh) usando un cromatógrafo Hewlett-Packard 5880-A. La temperatura del horno fué de 200°C y el flujo de N₂ 60ml/min. Los ácidos grasos fueron identificados por sus tiempos de retención en comparación con estándares conocidos. L.G. libre de grasa.

Se ha demostrado que las grasas poliinsaturadas, en particular aquellas ricas en ácidos grasos de cadena larga de la serie w₃, tales como el aceite de pescado (ver Tabla 1), son efectivos inhibidores de la lipogénesis hepática y reprimen la expresión de las enzimas reguladoras de esa vía, mientras que las grasas saturadas tienen pobre o ninguna capacidad para inhibir ese proceso (1,5). Los resultados presentados anteriormente sugieren que el complejo piruvato deshidrogenasa es regulado de una forma semejante a lo observado

para las enzimas lipogénicas claves. Sin embargo, debido a que la actividad del PDC es regulada por otros mecanismos, no es posible concluir en base a los resultados anteriormente presentados que los cambios observados en la actividad total son debidos a cambios en el contenido de esta enzima en las mitocondrias hepáticas. A continuación, se describen los resultados de experimentos adicionales que permitieron establecer que las modificaciones observadas en los valores de PDCt corresponden a cambios en el contenido de enzima inmunoreactiva presente en los extractos.

GRAFICO 3

Efectos de varios tipos de grasas sobre la actividad del PDC en el hígado de ratas alimentadas con dietas en base a almidón o sacarosa.



Los animales fueron alimentados durante dos semanas con ratarina (controles) o con dietas basadas en almidón (Gráfico 3A) o sacarosa (Gráfico 3B), las cuales fueron o no suplementadas con aceite de maíz (A.M.) o de pescados marinos (A.P.) a los niveles indicados. En los extractos de hígado se determinó la actividad de PDCa y PDC total mediante un método espectrofotométrico acoplado a la N-acetil transferasa (15,17).

Las barras representan los valores promedio \pm S.E.M de 4-6 animales. * indica que los valores difieren significativamente de los valores de los animales alimentados con dietas libres de grasa, $p < 0,05$.

** indica que los valores son significativamente distintos del control, $p < 0,05$

L.G., libres de grasa.

Estudios sobre las variaciones del contenido de PDC en el hígado de ratas sometidas a varias condiciones dietarias

La obtención de anticuerpos específicos dirigidos contra los componentes del complejo piruvato deshidrogenasa fué un requisito indispensable para realizar las determinaciones inmunológicas. Para este fin se purificó hasta homogeneidad la enzima de corazón de bovino y con esta preparación se inocularon conejos albinos, de los cuales se obtuvieron antisueros policlonales que reaccionaron con alta especificidad contra todos los componentes proteicos del complejo de rata, a excepción del componente E3 (19). Se empleó la técnica de «immunoblotting» cuantitativa para determinar los niveles de enzima inmunoreactiva presente en los extractos de animales sometidos a las distintas manipulaciones dietarias. En el siguiente gráfico se muestran los «immunoblots» obtenidos al colocar cantidades crecientes de extractos provenientes de animales control y sometidos a dietas ricas en sacarosa y libres de grasa. (Gráfico 4).

GRAFICO 4

Detección inmunológica del PDC en extractos de hígado de ratas alimentadas con ratarina o con dietas ricas en sacarosa y libre de grasa



Se obtuvieron extractos crudos de hígado a partir de muestras congeladas bajo N_2 líquido de animales alimentados con ratarina o con una dieta rica en sacarosa y libre de grasa por 2 semanas. Los extractos fueron precipitados con 0,12 vol de PEG al 35% a pH 6,40-6,45. Los precipitados obtenidos fueron disueltos en SDS al 5% mediante una breve sonicación. Se tomaron alícuotas que contenían hasta 150 μ g de proteína y se cargaron en geles de poliacrilamida al 10% (Laemmli, 1970). Después de la corrida electroforética, los polipéptidos separados fueron transferidos a papel de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979), incubados sucesivamente con suero anti-PDC (diluido 1:100 en PBS mas Tween-20 al 0,05%) y luego con un conjugado Proteína A-fosfatasa alcalina (diluido 1:10.000). Las bandas de color púrpura se desarrollaron con azul de tetrazolio y 5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato. Los «blots» fueron sacados y cada carril separado en tiras. Para hacer los registros desintomométricos, se sumergieron las tiras en aceite de cedro para hacerlas transparentes y se registró la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Gilford acoplado a un transportador lineal de geles.

Carriles 1 y 8,5 μ g de proteína; carriles 2 y 9, 10 μ g; carriles 3 y 10, 25 μ g; carriles 4 y 11, 75 μ g; carriles 5 y 12, 10 μ g. S. corresponde a 50 ng PDC purificada de bovino utilizada como estándar. La flecha indica la dirección de separación electroforética.

Puede observarse que las variaciones en las cantidades de PDCt se corresponden con cambios en la actividad total de enzima. No se observaron modificaciones en el patrón polipeptídico que puedan ser atribuidas a modificaciones físicas o químicas de los constituyentes del complejo. La adición de grasa poliinsaturada (aceites de maíz o de pescado) a la dieta disminuyó la cantidad de enzima inmunodetectable en los extractos (18), mientras que en los animales a los cuales se adicionó manteca no se observaron cambios con

relación a los animales que recibieron dietas ricas en sacarosa y libres de grasa (18). En base a estos resultados fue posible también concluir que no hubo cambios en las proporciones relativas de los principales constituyentes del complejo y que los cambios observados reflejan modificaciones coordinadas en la expresión de los polipéptidos del complejo de PDC. Puede apreciarse que las variaciones en la actividad de PDCt se corresponden con los cambios observados en la cantidad de enzima presente en el tejido y no pueden ser atribuidas a modificaciones físicas o químicas en las moléculas enzimáticas que constituyen el complejo. Puede también concluirse en base a estos resultados que no hubo modificaciones en las proporciones relativas de los componentes principales del complejo y que los cambios observados reflejan modificaciones coordinadas en la expresión de los componentes del complejo (18).

Estudios sobre las modificaciones de la actividad de PDC en comparación con otras enzimas lipogénicas y su correlación con las tasas de lipogénesis hepática

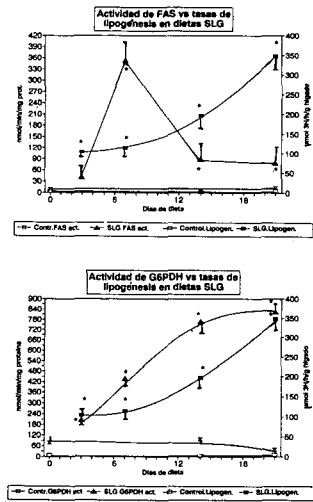
Los experimentos antes descritos arrojan evidencia que sugiere que la expresión de los componentes enzimáticos del complejo piruvato deshidrogenasa está modulada por varios nutrientes en forma similar a otras enzimas hepáticas. Nos propusimos establecer comparaciones entre la cinética de la respuesta de la PDC y la de dos enzimas lipogénicas hepáticas en animales de experimentación sometidos a manipulaciones dietarias que causaron la inducción o represión enzimáticas. También se exploraron las posibles correlaciones que existen entre los niveles de actividad del complejo y las tasas de lipogénesis determinadas en esos animales, las cuales sirven como un índice del flujo de carbonos a través del complejo. Para este propósito se hicieron determinaciones de la actividad de PDCt y PDCa en los extractos de hígado así como también de las actividades de FAS y G6PDH en fracciones citosólicas (20,21). Las tasas de lipogénesis fueron determinadas en base a la incorporación de 3H_2O en los lípidos saponificables hepáticos (22). Esta serie de experimentos se realizó con animales adaptados a un patrón de alimentación por «meal feeding» en el cual los animales fueron entrenados a ingerir el alimento durante una sola comida al día en un período de tres horas, comprendido entre las 8:00 am y las 11:00 am. Los animales fueron sacrificados a las 9:00 am. Las ratas fueron inyectadas con solución salina que contenía nembutal y 1mCi de 3H_2O . Quince minutos después se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca para estimar la actividad específica del plasma y muestras de hígado bajo nitrógeno líquido. El tipo de régimen dietario utilizado nos permitió determinar las variaciones de actividades enzimáticas y tasas de lipogénesis durante la fase posprandial en iguales condiciones para todos los animales, minimizándose así las variaciones de actividad de PDCa o de las tasas de lipogénesis, que pudieran ser causadas por diferencias en el patrón de alimentación de los animales.

El Gráfico 5 muestra los resultados de las variaciones de la actividad de las enzimas FAS y G6PDH en función del tiempo de dieta. Para este experimento, se emplearon ratas alimentadas con ratarina (controles) o sometidas a dietas ricas en sacarosa y libres de grasa por un período variable entre 0 y 21 días. Puede apreciarse que en los animales alimentados con dietas tipo SLG, la actividad de FAS mostró un gran incremento transitorio que alcanzó un máximo a los 7 días para luego decrecer y estabilizarse en un valor 10 veces superior al observado en los animales control. La actividad de G6PDH se elevó mas gradualmente que la actividad de FAS y a los 14 días de dieta alcanzó su máximo valor, 14 veces superior a los valores control. Las tasas de lipogénesis incrementaron unas 30 veces en los primeros 3 días y

posteriormente continuaron aumentando en forma gradual a medida que se prolongó el tiempo de administración de la dieta. El gran incremento inicial de las tasas de lipogénesis (80 veces los valores del control a los tres días) estuvo acompañada por un aumento en la actividad de FAS (5 veces), pero relativamente menores cambios en las actividades de PDC y G6PDH, lo cual pone en evidencia la importancia de los mecanismos alostéricos y por fosforilación/ defosforilación en la regulación del proceso. A pesar de que la actividad máxima de FAS se observó a los 7 días de dieta y no estuvo correlacionada con un aumento similar en las tasas de lipogénesis, se observó buena correlación entre el incremento de las tasas de lipogénesis y los valores de actividad máxima de todas las enzimas estudiadas. La actividades de PDCt y PDCa también incrementaron al prolongarse el tiempo de dieta, pero se elevaron mas gradualmente y alcanzaron un valor máximo de 3 veces los valores control a los 14 días de dieta (Gráfico 6). La correlación entre las tasas de lipogénesis y las actividades de PDCa y PDCt fué mejor durante la primera semana de dieta, ya que la actividad de PDCa se duplicó luego de 7 días, pero luego no incrementó significativamente, mientras que las tasas de lipogénesis se triplicaron entre la primera y la tercera semana.

GRAFICO 5

Efectos de la administración de dietas ricas en sacarosa y libres de grasa sobre la actividad del complejo sintetasa de ácidos grasos (FAS) y glucosa 6P deshidrogenasa (G6P DH) y sobre las tasas de lipogénesis hepática

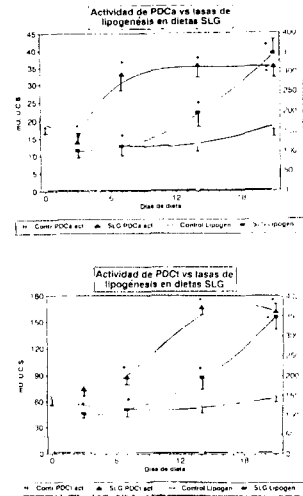


Se utilizaron animales alimentados por el régimen de «meal feeding» con dietas ricas en sacarosa y libres de grasa. Los animales se sacrificaron una hora después del inicio de la fase posprandial en grupos de 4-6 ratas. Entre diez y quince minutos antes del sacrificio cada animal recibió una inyección intraperitoneal de una solución que contenía nembutal sódico a una dosis de 60 mg/Kg de peso corporal y 1 mCi de ³H₂O. Se obtuvieron muestras de hígado que fueron pulverizadas bajo nitrógeno líquido en las cuales se determinó la incorporación del isótopo en los ácidos grasos. Una segunda porción de tejido fué homogenizada y fraccionada por ultracentrifugación a 105.000 g por 1 h. Las actividades enzimáticas y la concentración de proteínas se determinaron en las fracciones citosólicas de acuerdo a métodos previamente descritos (20,21). Una porción adicional de tejido se utilizó para determinar la síntesis de ácidos grasos in vivo (22).

Los Gráficos 7 y 8 muestran los resultados obtenidos con otra serie de experimentos en los cuales se utilizaron animales que fueron alimentados con una dieta rica en sacarosa y libre de grasa por un período de 21 días y luego la dieta fue sustituida por otra basada en sacarosa, pero a la cual se adicionó aceite de pescado al 10% (SLG+FO) (ver Tabla 1). Se observó que la adición de grasas poliinsaturadas a la dieta produjo un rápido descenso de las actividades de FAS, G6PDH y PDCt. El descenso de las actividades enzimáticas estudiadas estuvo correlacionado positivamente con la reducción de las tasas de lipogénesis. En cuanto a la PDCt, se observó una respuesta similar a la de las enzimas FAS y G6PDH, sin embargo, al cabo de 7 días, los valores de actividad de esas enzimas habían alcanzado valores similares al control, mientras que la PDCa y PDCt al igual que las tasas de lipogénesis se igualaron con los valores control a los 14 días de dieta.

GRAFICO 6

Efectos de la administración de dietas ricas en sacarosa y libres de grasa sobre la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC t y PDCa) y sobre las tasas de lipogénesis hepáticas.



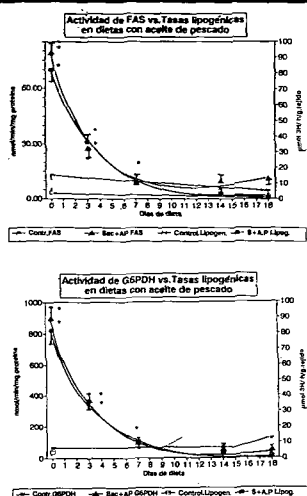
Se utilizaron animales alimentados por el régimen de «meal feeding» con dietas ricas en sacarosa y libres de grasa. Los animales se sacrificaron una hora después del inicio de la fase posprandial en grupos de 4-6 ratas. Entre diez y quince minutos antes del sacrificio cada animal recibió una inyección intraperitoneal de una solución que contenía nembutal sódico a una dosis de 60 mg/Kg de peso corporal y 1 mCi de ³H₂O. Se obtuvieron muestras de hígado que fueron pulverizadas bajo nitrógeno líquido en las cuales se determinó la incorporación del isótopo en los ácidos grasos (22) y la fracción de enzima activa (PDCa)(15,17). Después de incubar alícuotas de los extractos con una fosfatasa aislada del hígado de paloma, se determinó la actividad total (PDCt) y la actividad de la citrato sintetasa (C.S.).

La actividad del complejo se expresó como μmol de acetilCoA/min en función de la actividad de citrato sintetasa, esto permitió corregir diferencias en la extracción del tejido así como variaciones en el contenido de grasa y proteína del hígado causadas por los distintos tratamientos (15)

Para facilitar las comparaciones, se incluyeron los valores de las tasas de lipogénesis graficadas en el gráfico 5.

GRAFICO 7

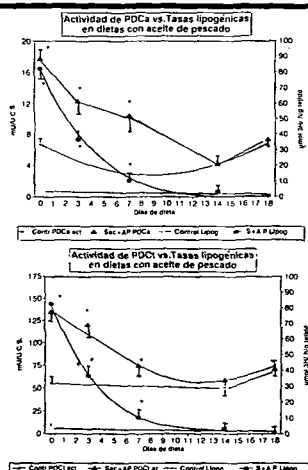
Efectos de la administración de dietas basadas en sacarosa y suplementadas con aceite de pescado al 10% sobre la actividad del complejo sintetasa de ácidos grasos (FAS) y glucosa 6P dehidrogenasa (G6PDH) y sobre las tasas de lipogénesis hepáticas.



Se utilizaron animales alimentados por el régimen de «meal feeding» con dietas ricas en sacarosa y libres de grasa durante 21 días. Al final de ese período (tiempo 0), se cambió la dieta por otra a la cual se adicionó aceite de pescado al 10% en peso. Los animales se sacrificaron una hora después del inicio de la fase posprandial en grupos de 4-6 ratas. Entre diez y quince minutos antes del sacrificio cada animal recibió una inyección intraperitoneal de una solución que contenía nembutal sódico a una dosis de 60 mg/Kg de peso corporal y 1 mCi de $^3\text{H}_2\text{O}$. Otros detalles experimentales se describen en la leyenda del gráfico 5.

GRAFICO 8

Efectos de la administración de dietas basadas en sacarosa y suplementadas con aceite de pescado al 10% sobre la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDCt y PDCa) y sobre las tasas de lipogénesis hepáticas.



Se utilizaron animales alimentados por el régimen de «meal feeding» con dietas ricas en sacarosa y libres de grasa durante 21 días. Al final de ese período (tiempo 0), se cambió la dieta por otra a la cual se adicionó aceite de pescado al 10% en peso. Los animales se sacrificaron una hora después del inicio de la fase posprandial en grupos de 4-6 ratas. Entre diez y quince minutos antes del sacrificio cada animal recibió una inyección intraperitoneal de una solución que contenía nembutal sódico a una dosis de 60 mg/Kg de peso corporal y 1 mCi de $^3\text{H}_2\text{O}$. Otros detalles experimentales se describen en la leyenda del gráfico 6.

Para facilitar las comparaciones se incluyeron los valores de las tasas de lipogénesis mostradas en el gráfico 7.

CONCLUSIONES

En resumen, se ha presentado evidencia de que la síntesis del complejo mitocondrial que cataliza la descarboxilación del piruvato en el hígado es regulada por nutrientes. El tipo y cantidad de carbohidrato y grasas presentes en la dieta son factores que modulan la actividad del complejo hepático. Los cambios en la actividad total de esta enzima que producen distintos tipos de dieta están acompañados por cambios en la cantidad de proteína inmunoreactiva. Los niveles de actividad y de proteína total se elevaron 1,3 veces en el hígado de animales en respuesta a una dieta rica en almidón y libre de grasa. Este efecto se potenció al sustituir al almidón por sacarosa, obteniéndose un aumento de 3 veces en los niveles de enzima activa y total. Los efectos estimulatorios de las dietas ricas en carbohidratos y libres de grasa se redujeron sustancialmente al suplementar las dietas con aceites de maíz o pescado, mostrando el aceite de pescado la mayor respuesta inhibitoria. La adición de grasa saturada (mantequilla) a las dietas causó una notable reducción de la PDCa pero, a diferencia de la grasa poliinsaturada, no afectó el incremento de los niveles y actividad total del complejo que se observó en los animales alimentados con dietas libres de grasa. Se observó que tanto la actividad de PDCt como las actividades de FAS y G6PDH están correlacionadas con los cambios en las tasas de lipogénesis provocadas por varias manipulaciones dietarias. Estos resultados sugieren que la actividad de PDC se modifica en forma coordinada con las de otras enzimas vinculadas con la lipogénesis y por tanto podría contribuir a la elevación o reducción de la síntesis de ácidos grasos producidas por nutrientes.

Un aumento en la tasa de oxidación de piruvato permitiría una mayor disponibilidad de acetilCoA para la vía lipogénica y de este modo se estimularía la síntesis de ácidos grasos. Este efecto podría, al menos en parte, contribuir al aumento en la síntesis de triacilgliceroles hepáticos observado durante la administración crónica de dietas ricas en sacarosa o fructosa. El efecto estimulador de las dietas ricas en carbohidratos así como el efecto inhibitorio de las grasas podría ser atribuido a la activación o inhibición del complejo por metabolitos que alteran las tasas de fosforilación/ defosforilación del complejo. Esta explicación se apoya en el hecho que el piruvato es un inhibidor de la PDCa quinasa y por tanto activa al complejo, mientras que la oxidación de los ácidos grasos genera productos (acetilCoA y NADH) que actúan como activadores de la PDCa quinasa y por tanto inhiben la enzima (ver Fig.2). Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo sugieren que a largo plazo opera un mecanismo que permite regular la actividad del complejo a través de modificaciones de la cantidad de enzima presente en las mitocondrias hepáticas. Este último mecanismo implica alteraciones coordinadas en las tasas de expresión de los genes que codifican los polipéptidos constituyentes del complejo y presumiblemente contribuye a regular la capacidad lipogénica del tejido.

Los cambios observados en la actividad del PDC fueron en general mas lentos y de menor magnitud que las modificaciones observadas en la actividad de las enzimas FAS y G6PDH. Esto puede ser atribuido a que la vida media del complejo (8,1 días; ref. 23) es mucho mayor que la de otras enzimas lipogénicas, que oscila entre 1 y 3 días (24,25). También es necesario considerar que, a diferencia de otras enzimas estudiadas en relación con la regulación de la lipogénesis, el PDC es un complejo de gran tamaño, de localización mitocondrial y sus componentes proteicos están codificados por varios genes nucleares (26). Por estas razones, la regulación de la expresión de esta enzima podría mostrar mayor complejidad que la de las enzimas

citosólicas, ya que posiblemente existen elementos adicionales de control que coordinen la expresión de los varios genes, la traslocación de los polipéptidos precursores al interior de las mitocondrias y su posterior ensamblaje en el compartimiento matriz-membrana interna.

Es también necesario señalar que aunque hay suficiente evidencia acumulada que indica que la PDC tiene un papel importante en la regulación de la lipogénesis por los nutrientes, aún no han sido establecidas claramente las relaciones que existen entre el estado de fosforilación del complejo y el flujo a través de esa enzima bajo diferentes condiciones metabólicas (27).

REFERENCIAS

- Clarke SD. Metabolic adaptations to dietary fats in Dietary Fats and Cancer, Alan R. Liss, Inc, 1986, pp 531-553.
- Clarke S.D & DB Jump. Regulation of hepatic gene expression by dietary fats: a unique role for polyunsaturated fatty acids. In Nutrition and Gene Expression. Berdanier CD & JL Hardgrove (eds.) CRC Press, Boca Raton, Fl. U.S.A. 1993, pp.227-245.
- Iritani N. Nutritional and hormonal regulation of lipogenic enzyme gene expression in rat liver. *Eur.J. Biochem.* 205: 433-442, 1992.
- Vrána A & P Fábry. Metabolic effects of high sucrose or fructose intake. *Wld.Rev. Nutr.Diet.* Vol.42, 1983, pp 56-101.
- Herzberg GA. The influence of dietary fats acid composition on lipogenesis. *Adv.Nutr. Res.* 5:221-53, 1983.
- Clarke SD & S Abraham. Gene expression: nutrient control of pre- and posttranscriptional events. *FASEB J.* 6:3146-52, 1992.
- Reed LJ, FH Pettit, SJ Yeaman, WM Teague & DM Bleile. Structure, function and regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex in *Enzyme Regulation and Mechanisms of Action*, Ed. P. Mildnard, B Ries, Oxford Pergamon, 1980, pp. 47-56.
- Denton RM, PW Midgley, GA Rutter, AP Thos & J McCormack. Studies into the mechanism whereby insulin activates pyruvate dehydrogenase complex in adipose tissue. *Ann. New York Acad. Sci.* 573: 285-96, 1989.
- Wieland OH. The mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Rev.Physiol. Biochem. Pharmacol.* 96:124-70, 1983.
- Da Silva LA. Efectos del tipo de dieta, el ayuno y la diabetes experimental sobre la actividad del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa. Trabajo especial de grado para optar a la Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, 1990.
- Sugden MC & MJ Holness. The role of regulation of tissue pyruvate dehydrogenase complex activity during the starved-to-fed transition. *Ann. New York Acad. Sci.* 573:314-36, 1989.
- Vrána A, J Raulin, C Loriette a& L Kazdová. Basal pyruvate dehydrogenase activity in the liver, adipose tissue and brain of rats with fructose-induced hypertriglyceridemia. *Nutr. Rep. Intern.* 28:1437-45, 1983.
- Chicco A, R Gutman, M Basilico & Y Lombardo. Pyruvate dehydrogenase (PDH) activity in heart, liver and adipose tissue of rats fed a sucrose-rich diet. *Nutr. Rep. Intern.* 33:465-75, 1986.
- Carmona A. & RA Freedland. Comparison among the lipogenic potential of various substrates in rat hepatocytes: the differential effects of fructose-containing diets on hepatic lipogenesis. *J.Nutr.* 119:1304-10, 1989
- Coore HG, RM Denton, BR Martin & PJ Randle. Regulation of adipose tissue pyruvate dehydrogenase by insulin and other hormones. *Biochem. J.* 125:115-27, 1971.
- Herzberg GR & M Rogerson. Hepatic fatty acid synthesis and triglyceride secretion in rats fed fructose- or glucose-based diets containing corn oil, tallow or marine oil. *J.Nutr.* 118:1061-67, 1988.
- Da Silva LA, OL De Marcucci & A Carmona. Adaptive changes in total pyruvate dehydrogenase activity in lipogenic tissues of rats fed high-sucrose or high-fat diets. *Comp.Biochem.Physiol.* 103 A, 407-11, 1992.
- Da Silva LA, OL De Marcucci & ZR Kuhnle. Dietary polyunsaturated fats suppress the high-sucrose-induced increase of rat liver pyruvate dehydrogenase levels. *Biochim.Biophys. Acta* 1169:126-34, 1993.
- De Marcucci OL, A Hunter & JG Lindsay. Low immunogenicity of the common lipoamide dehydrogenase subunit (E3) of mammalian pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complexes. *Biochem.J.* 226:509-17, 1985.
- Deutsch J. in *Methods in enzymatic analysis.* Bergmeyer, H.U. 3rd Ed. Verlag Chemie pp. 190-97, 1984.
- Bruckdorfer KR, IH Khan & V Yudkin. Fatty acid synthetase activity in the liver and in adipose tissue of rats fed with various carbohydrates. *Biochem.J.*, 129:439-46, 1972.
- Gardemer R, G Durand & G Pascal. Relative contribution of the main tissues and organs to body fatty acid synthesis in the rat. *Lipids* 18:223-28, 1983.
- Weinberg MB & MF Utter. Effect of thyroid hormone on the turnover of rat liver pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase. *J.Biol. Chem.* 254:9492-99, 1979.
- Gibson DM, RTL Lyons, DF Scott & Y Muto. Synthesis and degradation of the lipogenic enzymes of rat liver. *Advan. Enzyme Regul.* 10:187-204, 1972.
- Numa S & S Yamashita. Regulation of lipogenesis in animal tissues. *Curr. Top. Cell Regul.* 8:197-223, 1974.
- De Marcucci OL, G Gibb, GM Dick & JG Lindsay. Biosynthesis, import and processing of precursor polypeptides of mammalian mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem.J.* 251:817-23, 1988.
- Park O, D Cesar, D Faix, K Wu, CHL Shackleton & M Hellerstein. Mechanisms of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. Activation of hepatic pyruvate dehydrogenase through inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochem.J.* 282:53-7, 1992.