

EXTRACTOS TESIS DOCTORALES

CATEDRA DE MATEMATICAS Y ESTADISTICA
(Prof. Dr. A. ALVAREZ PRIETO)

ESTUDIO Y ELIMINACION DE SUSTANCIAS PIROGENAS CONTENIDAS EN LOS ANTIBIOTICOS AMINOGLICOSIDOS

Por A. Alvarez Prieto

Un problema frecuente con que se encuentra la industria de los antibióticos, en general, y la de los antibióticos aminoglicósidos, en particular, es la eliminación de sustancias histaminoides y pirogénicas del producto acabado.

El objeto del presente trabajo ha sido el estudio de las fuentes microbianas generadoras de sustancias pirogénicas, así como la eliminación de éstas, en las diferentes etapas del proceso de extracción de los antibióticos aminoglicósidos a partir de los caldos de fermentación.

Los métodos internacionales para *determinar* la presencia de endotoxinas bacterianas en las soluciones para administración parenteral o intravenosa se basan en el efecto pirogénico de tales endotoxinas en el conejo, después que GREISMAN y HERNICK demostraran que el umbral de endotoxina para el hombre y el conejo eran, aproximadamente, iguales. Su estudio aportó una base objetiva para extrapolar las respuestas febriles del conejo al hombre, y estableció la validez de la «prueba de pirogénos» para las soluciones inyectables. Nosotros hemos empleado para nuestro trabajo el conejo blanco de Nueva Zelanda (N.Z.W.).

Se han hecho estudios comparativos de la eliminación de sustancias pirogénicas por los siguientes métodos:

- a) Adsorción por diferentes tipos de carbones activados.
- b) Tratamiento con resinas cambiadoras de iones.
- c) Empleo del gel del hidróxido de aluminio.
- d) Sulfato bórico.

e) Filtros especiales formados por capas de amianto-hidróxido de aluminio-amianto.

Así mismo estos estudios de adsorción se hicieron comparativamente en batch y en columna.

Para la realización práctica de nuestros ensayos de despirogenización hemos partido, en unos casos, de disoluciones de antibióticos aminoglicósidos procedentes de diferentes etapas del proceso industrial; y, en otros, se han utilizado soluciones apirógenas a las que se han añadido un lisado de gérmenes contaminantes habituales durante el proceso de extracción de los antibióticos aminoglicósidos.

La mezcla de gérmenes estaba formada por un 80 % de *Pseudomonadáceas* y un 20 % de *Enterobacteriáceas*.

El resumen de las conclusiones obtenidas es el siguiente:

1.-La pirogenicidad de las soluciones inyectables debe considerarse «positiva» a partir de un incremento de temperatura de 1,2°C, según hemos deducido del estudio matemático de los resultados experimentales relativos al comportamiento del pirotógeno standard internacional de referencia.

2.-Tanto las materias primas como los productos procedentes de la fase de fermentación, muestran una notable pirogenicidad, pero ésta carece prácticamente de significación, pues los mismos procesos industriales aplicados al caldo de fermentación para obtener sucesivamente los preluatos, eluatos ricos, soluciones ricas, etc., del antibiótico aminoglicósido correspondiente, llevan consigo una acción despirogenante con descenso a niveles perfectamente válidos.

3.1.-Queda demostrado que la reacción pirogénica de un antibiótico aminoglicósido es debida a ciertos gérmenes bacterianos contaminantes.

3.2.-Los gérmenes contaminantes habituales del progreso de recuperación de un antibiótico aminoglicósido, pertenecen a la familia de las *Pseudomonadáceas* en un 80 % y a las *Enterobacteriáceas* en un 20 %.

3.3.-La concentración de los eluatos y soluciones ricas, el tiempo de almacenamiento y la temperatura influyen en el crecimiento de tales gérmenes; el tiempo de almacenamiento no debe pasar de las 12 horas; la temperatura ideal para un control del desarrollo de los contaminantes es la de 8°C; elevadas concentraciones impiden igualmente el crecimiento de gérmenes.

4.1.-La efectividad del gel del hidróxido de aluminio como desgerminante y despirogenante es muy superior a la de los métodos usados habitualmente.

4.2.-Hay que destacar que, tanto si se usa en columnas de adsorción como en mezcla, es suficiente una concentración del 1 % para conseguir unos efectos que sólo son relativamente igualados por los carbones activados a una concentración del 20 al 50 %.

4.3.-No se ha detectado la presencia de aluminio en los productos finales.

4.4.-La retención de la actividad antibiótica por el hidróxido de aluminio es similar a la de los otros métodos de eliminación de pirotógenos, entre el 1,5 y el 3,5 %, valores aceptados como válidos por la industria farmacéutica.

5.-No podemos concluir con un rigor absolutamente científico, cuáles sean las reacciones químicas que tienen lugar en la acción despirogenante del hidróxido de aluminio; no obstante se puede asegurar que se trata de un fenómeno superficial de adsorción, relacionado con las modificaciones estructurales del retículo y consiguientes variaciones energéticas.

Las Figuras 1, 2, 3 y 4 aclaran los conceptos expresados.

STUDY AND REMOVAL OF PYROGENIC SUBSTANCES CONTAINED IN AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS

A frequent problem generally found in antibiotic industry, and specially in aminoglycoside antibiotic industry, is the removal of histaminoid and pyrogenic substances from finished product.

The purpose of this work has been to study the microbial sources generating pyrogenic substances as well as the removal of the latter in the different steps of extraction process of aminoglycoside antibiotics from fermentation broth.

The international methods to determine the presence of bacterial endotoxins in the solutions used for parenteral or intravenous administration are based on the pyrogenic effect of these endotoxins in rabbits, after GREISMAN and HERNICK demonstrated that endotoxin limits for man and for rabbits were approximately the same. Its study provided an objective basis for extrapolating the febrile responses of rabbits to man, and established the validity of «pyrogen test» for injectable solutions. We have utilized the New Zealand white rabbit (N.Z.W.R.) in our work.

Comparative studies on pyrogenic substances removal have been carried out by the following methods:

- Adsorption by different types of active carbon.
- Treatment with ion exchange resins.
- Use of aluminium hydroxide gel.
- Adsorption by barium sulfate.
- Special filters formed by asbestos-aluminium hydroxide-asbestos

layers.

The above studies on adsorption have been carried comparatively on batch and column.

To perform practically our depyrogenization tests we have started, in some cases, from aminoglycoside antibiotic dissolutions proceeding from different steps of industrial process and, in other cases, from apyrogenic solutions

to which a lysate of usual contaminating microorganisms was added throughout the extraction process of aminoglycoside antibiotics.

The mixture of microorganisms was formed by 80 % of *Pseudomonadacea* and 20 % of *Enterobacteriaceae*.

The summary of the conclusions obtained is as follows:

1.-The pyrogenicity of injectable solutions must be considered as «positive» starting from a rise of temperature of 1.2°C, as we have deduced from the mathematical study of the experimental results concerning the behaviour of the International Reference Standard pyrogen.

2.-The raw materials used and the products proceeding from the fermentation step show a remarkable pyrogenicity, but this pyrogenicity has practically no signification since the industrial processes themselves applied to the fermentation broth to obtain the preeluates, rich eluates, rich solutions, etc., of the corresponding aminoglycoside antibiotics, successively, include a depyrogenic action with a decrease at perfectly valid levels.

3.1.-It has been demonstrated that the pyrogenic reaction of an aminoglycoside antibiotic is due to certain contaminating bacterial microorganisms.

3.2.-80 % of the usual contaminating microorganisms in a recovery process belongs to *Pseudomonadaceae* family, and 20 % to *Enterobacteriaceae* family.

3.3.-The concentration of eluates and rich solutions, the storing time, and the temperature influence the growth of said microorganisms; the storing time should not exceed 12 hours; the ideal temperature to control the contaminants development is 8°C; high concentrations prevent the microorganism growth too.

4.1.-The effectivity of aluminium hydroxide gel as degerminant and depyrogenant is much higher than that of methods currently used.

4.2.-It should be emphasized that a 1 % concentration used either in adsorption columns or in a mixture is sufficient to obtain some effects only relatively equal to those obtained by active carbon at a 20 %-50 % concentration.

4.3.-No presence of aluminium has been detected in finished products.

4.4.-The retention of antibiotic activity by aluminium hydroxide is similar to that of the other methods of pyrogens removal, between 1.5 % and 3.5 %. These values are accepted as valid by the pharmaceutical industry.

5.-We cannot establish, scientifically speaking, which are the chemical reactions occurring in the depyrogenizing action of aluminium hydroxide; however, we can affirm that there exists a superficial phenomenon of adsorption related to the structural modifications of the reticulum and the subsequent energetic variations.

Some of the above conclusions are represented in Figures 1, 2, 3 and 4.

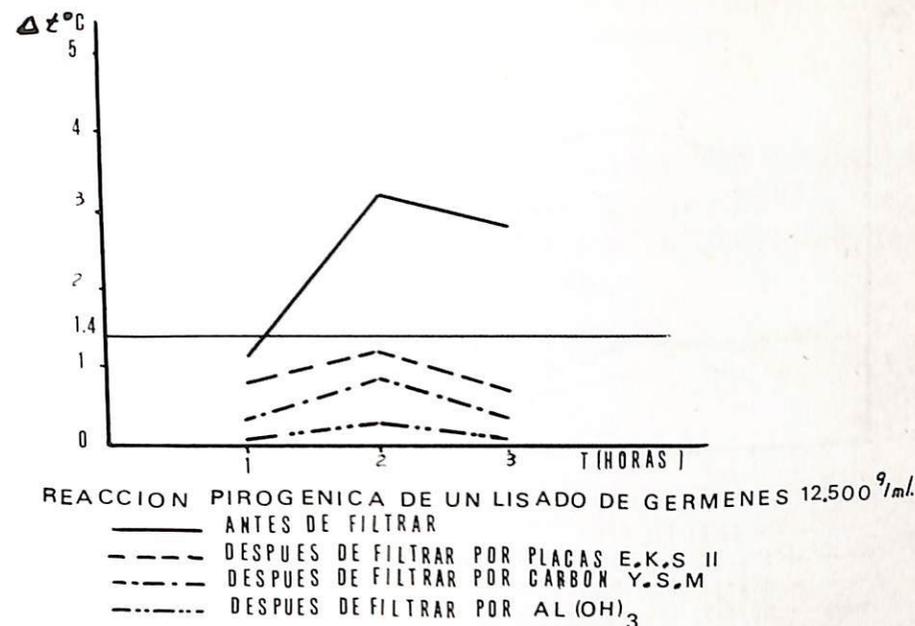


FIG. 1

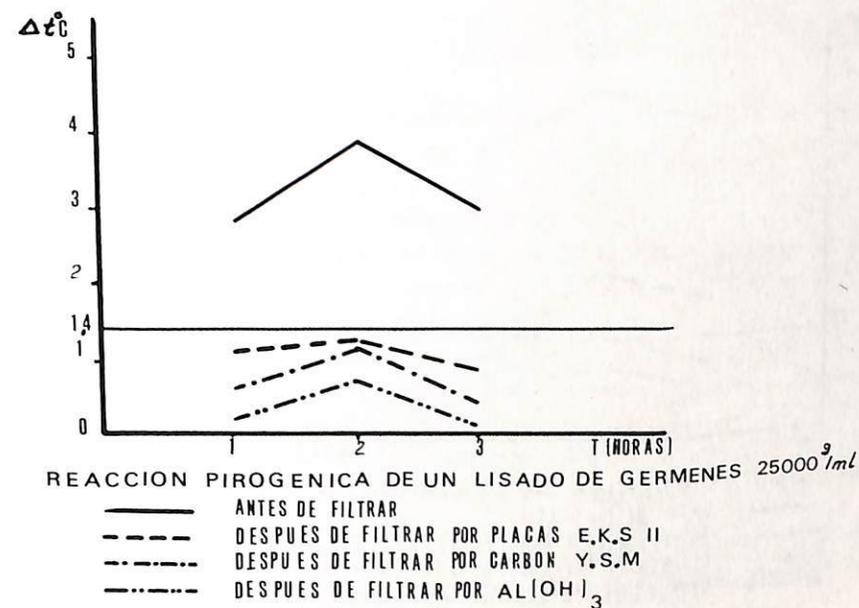
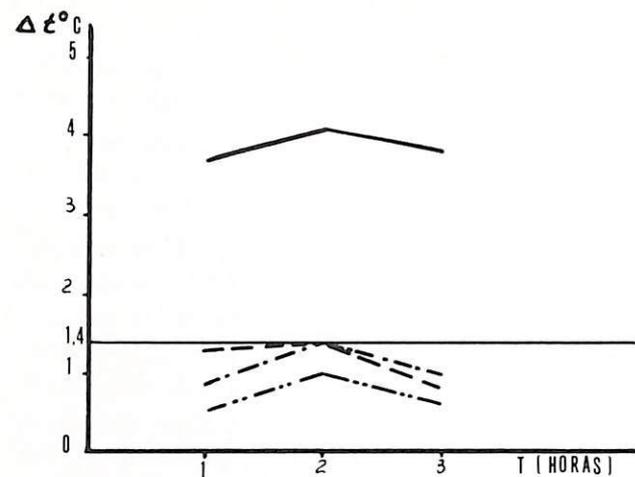
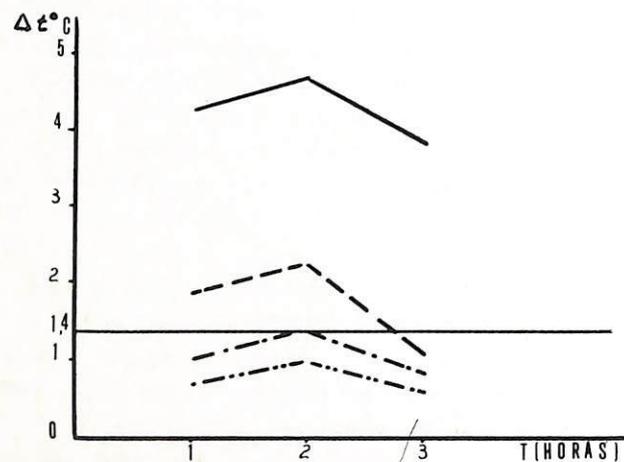


FIG. 2



REACCION PIROGENICA DE UN LISADO DE GERMESES 50,000 ^g/ml.
 — ANTES DE FILTRAR
 - - - - - DESPUES DE FILTRAR POR PLACAS E.K.S II
 - · - · - - DESPUES DE FILTRAR POR CARBON Y.S.M
 · · · · · DESPUES DE FILTRAR POR AL(OH)₃

FIG. 3



REACCION PIROGENICA DE UN LISADO DE GERMESES 100,000 ^g/ml.
 — ANTES DE FILTRAR
 - - - - - DESPUES DE FILTRAR POR PLACAS E.K.S II
 - · - · - - DESPUES DE FILTRAR POR CARBON Y.S.M
 · · · · · DESPUES DE FILTRAR POR AL(OH)₃

FIG. 4

«MODIFICACIONES ESTRUCTURALES PROVOCADAS EN
 EL HIGADO DEL RATON ALBINO POR LA
 ADMINISTRACION REITERADA DE TETRACLORURO DE
 CARBONO»

Por José Manuel Martínez Rodríguez

El motivo de este trabajo ha sido el confusionismo existente cuando se pretende etiquetar a un proceso patológico hepático como cirrosis. Observamos que la mayor parte de los autores califican de cirrosis, a procesos parasitarios cuyo estadio final no es sino una fibrosis (ESPINOSA), ya que en dichos procesos no se dan las características histopatológicas necesarias para calificarlos como tal.

Por ello, hemos querido abordar la dinámica de las lesiones anatomopatológicas provocadas en hígados de ratones albinos, tras la administración reiterada de tetracloruro de carbono y poder comprobar si el cuadro final puede ser considerado como una cirrosis.

Al iniciar la revisión bibliográfica, nos llamó la atención que una de las mayores preocupaciones de los autores consultados, era la forma de producirse la fibrosis hepática, así como el lugar de procedencia de las fibras colágenas, no existiendo unanimidad entre los mismos, ni en lo que se refiere a la distribución del tejido fibroso en el hígado de los animales de experimentación, ni tampoco a la forma de producirse la fibrosis hepática, así como el origen y procedencia de los elementos fibrilares.

Se realizaron 4 experiencias en las que se utilizaron 235 ratones, de edades comprendidas entre 6 y 12 meses al comienzo de las mismas. Estos ratones recibieron diariamente, por vía oral-endogástrica, 0,5 ml de una solución de Cl₄C en parafina, de concentración variable, según la experiencia, de forma que la dosis diaria de sustancia activa fue de 8, 2 y 4 ml por K.p.v., alcanzándose un total de 135 dosis.

Los animales eran sacrificados por dislocación cervical, en los días que previamente habíamos señalado y 24 horas después de haber recibido la última

«MODIFICACIONES ESTRUCTURALES PROVOCADAS EN EL HIGADO DEL RATON ALBINO POR LA ADMINISTRACION REITERADA DE TETRACLORURO DE CARBONO»

Por José Manuel Martínez Rodríguez

El motivo de este trabajo ha sido el confusionismo existente cuando se pretende etiquetar a un proceso patológico hepático como cirrosis. Observamos que la mayor parte de los autores califican de cirrosis, a procesos parasitarios cuyo estadio final no es sino una fibrosis (ESPINOSA), ya que en dichos procesos no se dan las características histopatológicas necesarias para calificarlos como tal.

Por ello, hemos querido abordar la dinámica de las lesiones anatomopatológicas provocadas en hígados de ratones albinos, tras la administración reiterada de tetracloruro de carbono y poder comprobar si el cuadro final puede ser considerado como una cirrosis.

Al iniciar la revisión bibliográfica, nos llamó la atención que una de las mayores preocupaciones de los autores consultados, era la forma de producirse la fibrosis hepática, así como el lugar de procedencia de las fibras colágenas, no existiendo unanimidad entre los mismos, ni en lo que se refiere a la distribución del tejido fibroso en el hígado de los animales de experimentación, ni tampoco a la forma de producirse la fibrosis hepática, así como el origen y procedencia de los elementos fibrilares.

Se realizaron 4 experiencias en las que se utilizaron 235 ratones, de edades comprendidas entre 6 y 12 meses al comienzo de las mismas. Estos ratones recibieron diariamente, por vía oral-endogástrica, 0,5 ml de una solución de Cl_4C en parafina, de concentración variable, según la experiencia, de forma que la dosis diaria de sustancia activa fue de 8, 2 y 4 ml por K.p.v., alcanzándose un total de 135 dosis.

Los animales eran sacrificados por dislocación cervical, en los días que previamente habíamos señalado y 24 horas después de haber recibido la última

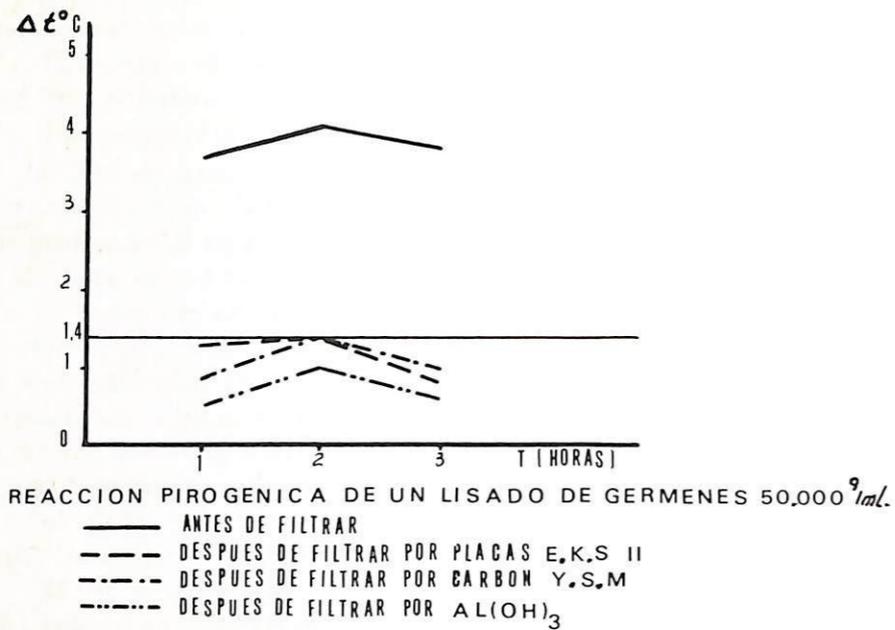


FIG. 3

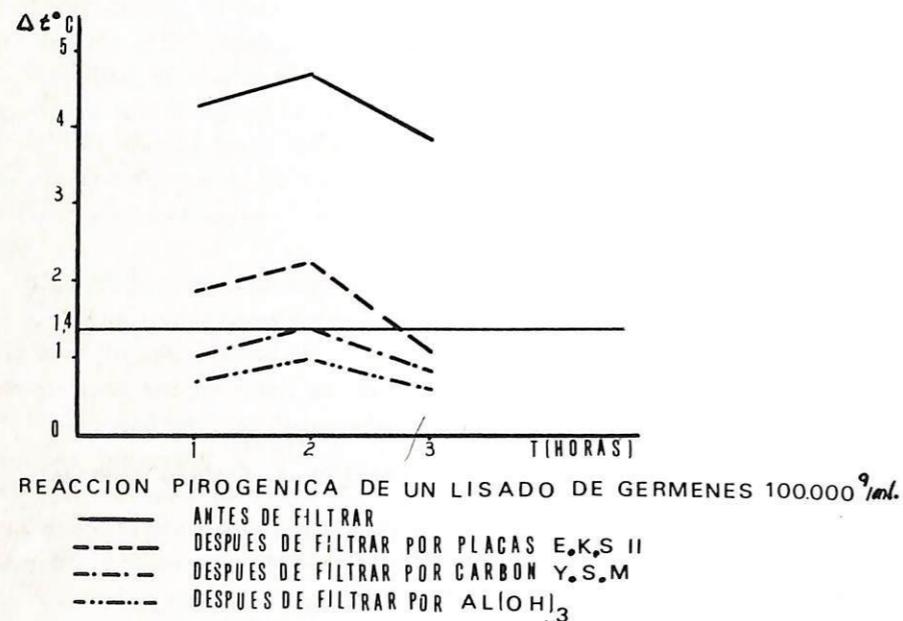


FIG. 4

dosis. A continuación, realizábamos la necropsia de los mismos y procedíamos a la extracción del hígado. Una vez estudiadas las características macroscópicas, tallábamos pequeños bloques que introducíamos en los fijadores. Tras su inclusión en parafina, los cortes obtenidos se teñían siguiendo las técnicas histológicas de rutina y cuando era necesario con técnicas específicas de coloración.

La discusión de nuestros resultados la hemos basado en los tres parámetros que sirven para calificar de cirrosis a determinadas alteraciones hepáticas.

Dentro del primer parámetro, es decir la alteración celular, nuestros resultados coinciden en líneas generales con los de los autores consultados y reseñados en la bibliografía, aunque en ocasiones existen diferencias cuantitativas o describen la instauración de las lesiones más precozmente que nosotros, creemos sea debido a que han utilizado otro tipo de animales, así como diferente vía de administración y número de dosis. Ninguno de los autores bibliografiados han llegado a administrar 135 dosis.

La desaparición de la basofilia citoplasmática de los hepatocitos, observada por nosotros a las 24 horas coincide con lo señalado por STOWELL y LEE y WAHI y cols., aunque nosotros señalábamos también una degeneración acidófila.

Igualmente estamos de acuerdo con los resultados descritos por GLYNN y HIMSWORTH, ATERMAN, RUBIN y cols., respecto a los primeros procesos regresivos hepatocíticos como son: degeneración hidrópica de las células parenquimatosas en posición subcapsular, alrededor de la vena centrolobulillar o afectando a las células que constituyen la placa basal.

En cuanto a la evolución de las lesiones de la célula hepática, nuestros resultados concuerdan en aspectos fundamentales con los obtenidos por GARDNER y cols., MYREN, RUBIN y cols., OBERLING y cols., y THOMPSON y cols.

Aunque la necrosis centrolobulillar observada a las 24 horas por GARDNER y cols., y la desaparición de esta zona necrosada a los 6 días, sin observar signos de regeneración no coincide plenamente con nuestros resultados, ya que la necrosis centrolobulillar fue observada por nosotros a los 9 días, así como esteatosis de las células que limitaban la zona de necrosis. Aspecto en el que coincidimos con RUBIN y cols., que señalan la necrosis centrolobulillar a los 10 días.

Por el contrario nuestras experiencias no coinciden con las realizadas por LEEVY y cols., cuando señalan la aparición de un exudado inflamatorio en la porción central del lobulillo a las 6 horas de administrado el tóxico, hecho que nosotros encontramos a los 5 días.

Tampoco estamos de acuerdo con CAMERON y cols., y ATERMAN, cuando señalan que la necrosis se produce en la región periportal y perilobulillar, hecho debido quizás a que han utilizado distinta vía de administración. Es-

tando de acuerdo con las aseveraciones de STENGER, que dice que las lesiones producidas por el tetracloruro de carbono se corresponden directamente con la vía de administración, así como con el tiempo que se hallen los animales expuestos a la acción del mismo.

SMITH y JONES, señalan que uno de los rasgos más notable de la cirrosis es el infiltrado de células mononucleares especialmente en el espacio porta. Infiltrado que nosotros observamos a partir del tercer día alrededor de los lobulillos y posteriormente alrededor de la vena centrolubulillar y en otras zonas, unas veces como infiltrados nodulares y otras difusos.

El segundo parámetro, es el momento de la aparición de las fibras así como su procedencia y origen. Estamos de acuerdo con ATERMAN en señalar que la formación de tejido fibroso tiene lugar después de un tiempo variable y dependiente posiblemente de la susceptibilidad de los animales.

Después de 25 dosis, las fibras partían de la vena centrolobulillar extendiéndose ampliamente constituyendo una tupida red entre cuyas mallas existían células balonizadas, extremo en el que estamos de acuerdo con BOLLMAN y LACQUET y en desacuerdo con CAMERON y KARUNARATNE que consideran que el tejido fibroso procede exclusivamente del espacio porta.

Tras la administración de 55 dosis observamos un claro aumento de fibras procedentes tanto de los espacios periportales como de la vena centrolubulillar, formando una intrincada red, que se hacía más severa en aquellas zonas del lobulillo que ofrecían lesiones más severas. Doble procedencia que ha sido igualmente defendida y observada por LEINATI, RUBIN y cols., y ESCALONA ZAPATA.

A partir de la 75 dosis comprobamos un aumento progresivo de la fibrosis y la existencia de seudolóbulos tal como ocurre en las cirrosis denominadas portales por LATUFF y SCHAFFNER según la clasificación propugnada por ANTHONY y cols. Consideramos se trata de una cirrosis septal. Esta evolución de las lesiones hasta llegar a un cuadro de cirrosis concuerda con lo descrito por ATERMAN y RUBIN y cols.

Respecto a la procedencia de las fibras ya hemos señalado aquellos autores que consideran proceden exclusivamente del espacio porta, los que dicen lo hacen de la vena centrolubulillar y otros como POPPER y cols., que señalan tres lugares a partir de los cuales se produciría la fibrosis: alrededor de las células hepáticas, de los conductos biliares y en los espacios porta. Nosotros hemos observado que en un primer estadio las fibras proceden de la vena centrolubulillar, posteriormente se forman a partir de los espacios porta y alrededor de las células hepáticas lesionadas.

En cuanto al mecanismo por el cual se produce la fibrosis, estamos de acuerdo con PÉREZ TAMAYO y consideramos que se produce por un aumento del tejido conectivo debido al colapso, como consecuencia de la desaparición de los hepatocitos y por el desarrollo de una cicatriz en zonas parenquimatosas

lesionadas, es decir admitimos la neoformación de fibras conjuntivas, estando en desacuerdo con aquellos autores que la niegan.

El tercer aspecto lo constituye los fenómenos regenerativos hepatocíticos generalmente nodulares.

En nuestras experiencias a partir de las 24 horas observamos un incremento de la actividad divisionaria de los hepatocitos. A los 10 días esta actividad mitótica era muy intensa y se localizaba en la zona media del lobulillo y zona perilobulillar. Observaciones que coinciden con las reflejadas por OBERLING y cols., LEEVY y cols., HOFFMAN y cols., LEINATI y POST y HOFFMAN.

No coinciden nuestras observaciones por el contrario con lo señalado por MORRISON y cols. y BECKER, que manifiestan que es de la porción media del lobulillo donde se produce la respuesta inicial y máxima mitótica.

En nuestras experiencias como resultado de la actividad mitótica de la célula hepática, a partir de los 80 días se observó la existencia en posición subcapsular de pseudolobulillos, que se hicieron más patentes a partir de las 110 dosis.

Otro aspecto que queremos señalar, y no es mencionado por otros autores, es la aparición de una hipertrofia canalicular, así como una hiperplasia que en ocasiones adquiría carácter adenomatoso.

Considerando los resultados anteriormente expuestos, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. Las primeras lesiones que aparecen en el hígado de ratones albinos intoxicados experimentalmente con tetracloruro de carbono son: pérdida de la basofilia citoplasmática, degeneración acidófila y degeneración hidrópica de los hepatocitos. Este último proceso regresivo se localiza con preferencia en posición subcapsular o alrededor de la vena centrolubulillar.

2. Las lesiones anteriormente citadas evolucionan hacia una necrosis centrolubulillar y esteatosis de los hepatocitos que limitan exteriormente la zona necrosada. Dentro del lobulillo y también alrededor de los mismos coexisten con los procesos necróticos, infiltrados inflamatorios difusos y nodulares.

3. Como consecuencia de las alteraciones celulares se produce una fibrosis hepática, cuyos elementos fibrilares proceden tanto de los elementos mesenquimales de la vena centrolubulillar como del tejido conjuntivo de los espacios porta y del interior del propio lobulillo.

4. El tejido fibroso dependiente de la activación inflamatoria del conjuntivo portal, al romper la membrana lobulillar avanza en forma de tabiques conectivos en sentido centripeto hacia la vena centrolubulillar originando pseudolobulaciones así como alteraciones de la arquitectura lobulillar.

5. Durante el curso del proceso de intoxicación experimental con tetracloruro de carbono en ratones albinos, se produce un incremento de la activi-

dad mitótica de los hepatocitos, que aún cuando es más intensa en la zona media del lobulillo, se manifiesta igualmente en otras zonas del mismo.

6. Como consecuencia de la regeneración hepatocítica junto con la fibrosis, se producen nódulos regenerativos especialmente localizados en posición subcapsular.

7. El cuadro anatomopatológico final, de la intoxicación experimental con tetracloruro de carbono a ratones albinos, es el de una cirrosis septal multilobular y micronodular.

«STRUCTURAL MODIFICATIONS INDUCED IN THE LIVER OF ALBINO MICE BY THE REPEATED ADMINISTRATION OF CARBON TETRACHLORIDE»

A study has been carried out on the anatomopathological lesions in the liver of albino mice after administration of the carbon tetrachloride. The animals were slaughtered at different intervals until 135 days afterwards.

The first hepatocytic regressive processes, consisting in an acidophile and hydropic degeneration, appeared some days later. These lesions were more patent in subcapsular position.

As the number of doses administered increase the lesions also increased in extension and intensity until a centrolobular necrosis and a steatosis of hepatocytes that limited the external area of the necrotic focus were formed. At the same time the presence of some diffuse and nodular focuses were observed into the small lobules as well as around them.

During the mid-phase of the research, and as a result of the cell destruction, a liver fibrosis was produced with conjunctive fibers coming from both the center lobular vein and the connective tissue from the portal spaces and the internal small lobule around the parenchymatous cells.

The conjunctive tissue proceeding from the centrolobular vein developing in a centrifugal direction contacts the portal conjunctive tissue that goes towards the centrolobular vein in a centripetal direction forming septums which will induce the pseudolobulations.

Throughout the experiments there was a well defined increase in mitotic activity of hepatocytes which together with fibrosis gave rise to the formation of regenerative nodules specially located in subcapsular position.

The anatomopathological picture formed at the end of the experimental was that of a micronodular and multilobular septal cirrhosis.

**«LA INGESTION VOLUNTARIA, EN RELACION CON EL
CONTENIDO ENERGETICO DE LA RACION, EN CORDEROS
EN CRECIMIENTO»**

Por Florentino Fernández Bermúdez

RESUMEN

Se ha estudiado la Ingestión Voluntaria de alimentos líquidos y sólidos por corderos durante el período de lactancia artificial y en el período posterior al destete. Para ello, se han utilizado noventa y seis corderos de raza Churra. Los animales fueron separados de sus madres dentro de la hora siguiente al nacimiento y criados artificialmente con sustitutivos lácteos.

Los corderos recibieron una mezcla del calostro producido por las ovejas paridas el mismo día, en la cantidad equivalente al 25 % del peso al nacimiento. Una vez consumida la cantidad preestablecida de calostro, recibieron un sustitutivo lácteo preparado en agua a la temperatura ambiente para contener 180 g de sólidos con 20 g de grasa por Kg de sustitutivo.

En el primer experimento se estudió, en primer lugar, el consumo de sustitutivos lácteos y alimentos sólidos. Posteriormente, una vez destetados los corderos, se estudió el consumo de alimentos concentrados y groseros administrados a libre disposición. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales durante un período de 100 días y se destetaron a los 35 días de edad. En la primera prueba una vez finalizada la fase de alimentación láctea se formaron tres grupos de ocho animales que recibieron un mismo pienso compuesto y como alimentos voluminosos heno de alfalfa, paja de lentejas o paja de trigo. En la segunda prueba, se formaron dos grupos de doce corderos que consumieron heno de alfalfa como alimento voluminoso y dos piensos compuestos de distinto contenido energético.

En el segundo experimento se estudiaron los efectos de la alimentación en grupo sobre el consumo de alimentos así como la duración de la crisis del

destete. Se utilizaron dieciocho corderos que se mantuvieron agrupados durante los 65 días de duración de la prueba. Los animales se destetaron a los 35 días de edad y recibieron heno de alfalfa como alimento voluminoso y el mismo pienso compuesto utilizado en la primera prueba del experimento 1.

En el tercer experimento, se utilizaron treinta corderos de los cuales 24 se mantuvieron para estudiar la Ingestión Voluntaria y 6 para determinar la Digestibilidad de las raciones administradas. Para el estudio de la Ingestión Voluntaria se formaron tres grupos de ocho animales que fueron destetados a los 10,5 Kg de peso, se mantuvieron en jaulas individuales hasta alcanzar los 22 Kg de peso vivo y recibieron tres piensos compuestos de diferente contenido energético. Se partió de una ración de alto contenido energético y posteriormente se formularon otras dos de menor concentración. Para ello, se empleó como diluyente, paja de trigo molida. La prueba de digestibilidad se realizó con seis corderos que recibieron los mismos piensos de la prueba de Ingestión Voluntaria, repitiéndose dos veces con los mismos animales, distribuyéndose en la segunda repetición de modo que todos los animales cambiasen de tratamiento.

Durante el primer día de vida la ingestión de calostro fue del orden de 400 g completándose en el segundo día la cantidad equivalente al 25 % del peso al nacimiento. El consumo de sustitutivo se elevó rápidamente, de forma que a los 35 días de edad fue próximo a 2.500 g, en la primera prueba y a 2.200 g en la segunda. Los índices de transformación de la Materia seca del sustitutivo fueron de 1,376 en la primera prueba y de 1,344 en la segunda. Los aumentos de peso diarios fueron de 225 g y 208 g en la primera y segunda pruebas, respectivamente.

El consumo de alimentos fue muy bajo durante el período de lactancia artificial y aumentó con la edad de los animales.

El destete se realizó de forma brusca en todos los experimentos y determinó una pérdida de peso de los corderos relacionada con la denominada «crisis del destete». La duración de la crisis, es decir el tiempo necesario para recuperar el peso perdido al destete fue variable para los corderos de cada experimento. Se comprobó la existencia de correlaciones entre la duración de la crisis del destete y el peso de los corderos ($r = 0,57$), el consumo de alimentos sólidos antes del destete ($r = -0,54$), el consumo de sólidos en los días siguientes al destete ($r = -0,83$) y el contenido energético de los alimentos sólidos consumidos durante la fase de alimentación láctea ($r = -0,71$). Por otro lado, se comprobó que la crisis del destete es menor si se mantienen agrupados los corderos que si se mantienen en jaulas individuales.

A partir del peso al destete y el consumo de alimentos sólidos durante la fase de alimentación láctea es posible predecir con gran seguridad la duración de la crisis del destete mediante ecuaciones de regresión múltiple.

El consumo de alimentos sólidos fue bajo después del destete, elevándose durante el transcurso de las pruebas.

En la primera prueba, el consumo de heno de alfalfa fue mayor que el de paja, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los consumos de paja de lentejas y paja de trigo. La relación Forraje : Concentrado establecida voluntariamente por los corderos osciló entre los valores de 14:86 a 5:95 para el heno de alfalfa; 9:91 a 0:100 para la paja de lentejas y 4:96 a 0:100 para la paja de trigo. En la segunda prueba, las diferencias existentes entre los consumos de pienso compuesto, heno de alfalfa o materia seca total por los corderos de los dos grupos no fueron estadísticamente significativas. En conjunto, la relación Forraje : Concentrado establecida voluntariamente por los corderos de ambos grupos osciló entre los valores extremos de 64:36 y 10:90.

A partir de los datos obtenidos se llegó a la conclusión de que al aumentar en una unidad el porcentaje de concentrado consumido, la ingestión de alimentos groseros disminuye en 1 g/Kg de $PV^{0.75}$.

En el tercer experimento las diferencias existentes en el consumo de Energía metabolizable al administrar las raciones más energéticas no fueron estadísticamente significativas pero sí lo fueron las diferencias existentes al administrar estas raciones y la de menor contenido energético. Se considera que los corderos ajustaron su ingestión energética a un nivel constante al recibir las raciones de mayor contenido energético.

A partir de los datos obtenidos en este trabajo se desarrolló un sistema que permite predecir la ingestión de alimentos por corderos de raza Churra, durante el período comprendido entre el destete y los 22 Kg de peso vivo. Para ello, se determinó la relación existente entre la Ingestión de Energía metabolizable y el contenido energético de la ración. El punto de cambio de respuesta en que al aumentar el contenido energético de la ración el consumo de energía permanece constante se calculó por medio de un proceso iterativo utilizando un sistema de ecuaciones lineales ajustadas por el método de mínimos cuadrados tomándose el punto que determinó en el sistema una varianza residual menor. Este punto estuvo próximo a el contenido energético de 2,8 Mcal de E. metabolizable/Kg de M. seca con la cual es posible un consumo de 252 Kcal de E. metabolizable/Kg de $PV^{0.75}$ que cubre las necesidades totales de los corderos para el máximo crecimiento.

THE EFFECT OF ENERGY CONTENT IN THE DIET ON THE VOLUNTARY INTAKE IN GROWING LAMBS

SUMMARY

Three experiments were carried out to study the voluntary feed intake of milk replacers, concentrates and roughages by young growing lambs. A total of 96 Churra lambs from birth until they were 100 days old were used.

The intake of solid food was small during the milk feeding period and increased thereafter with the age of the animals. Once the administration of milk replacers was stopped, the lambs went through a «weaning crisis», which was less severe in the group fed than in the individually fed lambs. The length of this crisis could be predicted by multiple regression equations using the weaning weight and the solid feed intake during the milk feeding period as variables.

The roughage : concentrate ratio was voluntarily established by the lambs and ranged between values of 14:86 to 5:95, 9:91 to 0:100 and 4:96 to 0:100 for the lambs fed alfalfa hay, lentil straw and wheat straw respectively.

Our data indicate that increasing the percentage of concentrate ingested by one unit, the intake of roughage decreases by $1 \text{ g/kg}^{0.75}$. We developed a system to predict the feed intake by lambs from weaning until they reached a live weight of 22 kg by relating the metabolizable energy intake and the energy concentration of the diet.

The statistical study of our data showed the existence of a turning point in the lambs response that was close to an energy concentration of 2.8 Mcal of metabolizable energy/kg dry matter, which corresponds with an intake of 252 kcal of metabolizable energy/kg^{0.75} to cover the requirements for maximum growth.

ESTUDIO DE LOS CAROTENOIDES Y OTROS LIPIDOS DE *Aristaeomorpha foliacea* Y *Heterocarpus dorsalis**

Por Juan Antonio Fernández Aguado

El trabajo objeto de esta tesis se ha llevado a cabo sobre dos especies de decápodos procedentes de aguas mozambiqueñas, capturadas en aguas profundas, una de ellas, *Aristaeomorpha foliacea* no ajena a nuestros mercados tradicionales, la otra *Heterocarpus dorsalis* extraña a los caladeros habituales de las flotas europeas y ambos inexplorados en los aspectos aquí investigados: la composición lipídica de sus músculos y caparazones.

Este estudio se divide en dos capítulos, uno destinado a los lípidos en general y otro a los carotenoides que se ha segregado del resto de los componentes grasos en virtud de razones de metodología experimental y del muy distinto significado biológico que los carotenoides tienen.

En el capítulo referente a los lípidos en general las muestras se extrajeron por el método de Folch; los resultados obtenidos permiten establecer que la riqueza lipídica alcanzada por los caparazones es notablemente más alta que la de los músculos.

Alícuotas de los extractos lipídicos fueron sometidas a fraccionamiento en columnas de ácido silícico/celita. La fracción eluida con cloroformo sometida a análisis cromatográfico en lámina fina reveló estar constituida por lípidos apolares, la eluida con acetona por glicolípidos y la eluida con metanol por fosfolípidos. La distribución en clases de la tasa lipídica global en ambas especies y los dos tejidos estudiados revela que el principal papel desempeñado en ellos por los lípidos es el estructural dada la elevada proporción de fosfolípidos y glicolípidos que, especialmente en *Heterocarpus dorsalis*, representan conjuntamente más de la mitad de los lípidos totales de ambos tejidos.

* Extracto de la tesis doctoral del mismo título.
An. Fac. Vet. León, 1980, 26, 191-194.

The intake of solid food was small during the milk feeding period and increased thereafter with the age of the animals. Once the administration of milk replacers was stopped, the lambs went through a «weaning crisis», which was less severe in the group fed than in the individually fed lambs. The length of this crisis could be predicted by multiple regression equations using the weaning weight and the solid feed intake during the milk feeding period as variables.

The roughage : concentrate ratio was voluntarily established by the lambs and ranged between values of 14:86 to 5:95, 9:91 to 0:100 and 4:96 to 0:100 for the lambs fed alfalfa hay, lentil straw and wheat straw respectively.

Our data indicate that increasing the percentage of concentrate ingested by one unit, the intake of roughage decreases by $1 \text{ g/kg}^{0.75}$. We developed a system to predict the feed intake by lambs from weaning until they reached a live weight of 22 kg by relating the metabolizable energy intake and the energy concentration of the diet.

The statistical study of our data showed the existence of a turning point in the lambs response that was close to an energy concentration of 2.8 Mcal of metabolizable energy/kg dry matter, which corresponds with an intake of 252 kcal of metabolizable energy/kg^{0.75} to cover the requirements for maximum growth.

ESTUDIO DE LOS CAROTENOIDES Y OTROS LIPIDOS DE *Aristaeomorpha foliacea* Y *Heterocarpus dorsalis**

Por Juan Antonio Fernández Aguado

El trabajo objeto de esta tesis se ha llevado a cabo sobre dos especies de decápodos procedentes de aguas mozambiqueñas, capturadas en aguas profundas, una de ellas, *Aristaeomorpha foliacea* no ajena a nuestros mercados tradicionales, la otra *Heterocarpus dorsalis* extraña a los caladeros habituales de las flotas europeas y ambos inexplorados en los aspectos aquí investigados: la composición lipídica de sus músculos y caparazones.

Este estudio se divide en dos capítulos, uno destinado a los lípidos en general y otro a los carotenoides que se ha segregado del resto de los componentes grasos en virtud de razones de metodología experimental y del muy distinto significado biológico que los carotenoides tienen.

En el capítulo referente a los lípidos en general las muestras se extrajeron por el método de Folch; los resultados obtenidos permiten establecer que la riqueza lipídica alcanzada por los caparazones es notablemente más alta que la de los músculos.

Alícuotas de los extractos lipídicos fueron sometidas a fraccionamiento en columnas de ácido silícico/celita. La fracción eluida con cloroformo sometida a análisis cromatográfico en lámina fina reveló estar constituida por lípidos apolares, la eluida con acetona por glicolípidos y la eluida con metanol por fosfolípidos. La distribución en clases de la tasa lipídica global en ambas especies y los dos tejidos estudiados revela que el principal papel desempeñado en ellos por los lípidos es el estructural dada la elevada proporción de fosfolípidos y glicolípidos que, especialmente en *Heterocarpus dorsalis*, representan conjuntamente más de la mitad de los lípidos totales de ambos tejidos.

* Extracto de la tesis doctoral del mismo título.
An. Fac. Vet. León, 1980, 26, 191-194.

Las cromatografías en lámina fina del conjunto de los lípidos apolares permitieron identificar y cuantificar los siguientes componentes: acilglicéridos parciales, colesterol libre y esterificado, ácidos grasos libres, ubiquinona (Q₄), triacilglicéridos y gliceril éteres. Se observa un predominio claro de los triacilglicéridos, aunque cabe destacar los altos valores alcanzados por los ácidos grasos libres y el colesterol.

La cromatografía en lámina fina de sílica el G de la fracción fosfolípidos permitió, tanto en el músculo como en el caparazón de ambas especies, la identificación y cuantificación de los siguientes componentes: lisofosfatidilcolina, esfingomiélin, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina; plasmalógenos de todos los fosfolípidos aislados fueron también detectados y cuantificados.

Los ácidos grasos procedentes de todos y cada uno de los lípidos neutros y fosfolípidos aislados fueron analizados por cromatografía en fase gaseosa. Los resultados obtenidos tras el análisis efectuado en dicha cromatografía quedan recogidos en tablas que permitieron mostrar la evolución de los ácidos monoénicos, dienicos, trienicos, tetraenicos y penta y hexaenicos. En general, se observa una tendencia al predominio de los ácidos grasos insaturados (especialmente el C18:1). Dentro de los ácidos grasos saturados la tasa más alta suele ser la de C16:0.

Al intentar estudiar los pigmentos carotenoides el primer problema que se planteó fue elegir el método de extracción ya que existen muchos y muy variados dependiendo la eficacia de los mismos de diversos factores, entre los que cabe destacar: el material biológico, los carotenoides presentes en la muestra y los disolventes a utilizar, por lo cual se probaron los siguientes métodos: extracción con acetona de los tejidos previamente deshidratados con sulfato sódico anhidro, extracción con éter etílico deshidratado con sulfato sódico anhidro, extracción con metanol y extracción con acetona, siendo este último el que resultó ser el más eficaz.

El contenido en carotenoides totales se calculó utilizando un coeficiente de extinción de 2.500 como recomiendan DE NICOLA y GOODWIN para carotenoides desconocidos que concuerda bien por otra parte con los del α y β caroteno y con los de las xantofilas que pudiera esperarse encontrar tales como luteína, zeaxantina, cantaxantina, astaxantina, etc. El contenido medio en carotenoides totales en *Aristaeomorpha foliacea* es superior al encontrado en *Heterocarpus dorsalis*. En ambas especies el caparazón supera, con mucho las tasas musculares halladas.

El fraccionamiento de los carotenoides totales se efectuó en cromatografía en columnas de alúmina, obteniéndose 8 fracciones la primera de las cuales, eluida con éter de petróleo, se abandonó por carecer de carotenoides.

La identificación se llevó a cabo basándose en el comportamiento cromatográfico,

en el espectro visible, la polaridad relativa y la investigación de grupos funcionales.

Sobre esta base se identificaron 38 carotenoides y 16 más fueron parcialmente caracterizados. Algunos de ellos como el 6'ceto (?) hidroxil 5'hidro $\psi\beta$ caroteno, hidroxil 6'ceto 5'6'dihidro $\epsilon\psi$ caroteno, foenicopterona y celaxantina no han sido previamente descritos en los decápodos. La astaxantina, el 6'ceto (?) hidroxil 5'hidro $\psi\beta$ caroteno y el hidroxil 6'ceto 5'6'dihidro $\epsilon\psi$ caroteno son los más abundantes entre los pigmentos encontrados: tanto en el caparazón como en el músculo de *Aristaeomorpha foliacea* el pigmento más abundante es la astaxantina, seguido en el caparazón de *Aristaeomorpha foliacea* por el éster del 6'ceto monohidroxil $\psi\beta$ caroteno y el astaceno y en el músculo por el éster del 6'ceto monohidroxil $\psi\beta$ caroteno, el éster del 6'ceto 5'6'dihidro $\epsilon\psi$ caroteno y la cantaxantina. En *Heterocarpus dorsalis* un sólo pigmento, el éster del 6'ceto 5'6'dihidro $\epsilon\psi$ caroteno, da cuenta de alrededor del 50 % del total de los carotenoides, siguiéndole en importancia cuantitativa la astaxantina que alcanza tasas del orden del 20 % en el caparazón y el 15 % en el músculo.

Aplicando los principios generales que parecen regir las transformaciones de los carotenoides en los animales se sugieren 2 rutas metabólicas principales en cada uno de estos crustáceos decápodos conducentes a la formación de astaxantina y otras dos accesorias, una para cada especie, debidas a las tasas anormalmente altas de ψ carotenos.

STUDY OF CAROTENOID PIGMENTS AND OTHER LIPIDS FROM *Aristaeomorpha foliacea* AND *Heterocarpus dorsalis*

SUMMARY

Thirty eight carotenoids have been identified and sixteen partially characterized on carapace and flesh of *Aristaeomorpha foliacea* and *Heterocarpus dorsalis* caught in the Indian Ocean. Some of them (6'keto (?) hydroxy 5'hydro $\psi\beta$ carotene, hydroxy 6'keto 5'6'dihydro $\epsilon\psi$ carotene, phoenicopterone and celaxanthin) have not been previously described in decapoda. Astaxanthin, 6'keto (?) hydroxy 5'hydro $\psi\beta$ carotene and hydroxy 6'keto 5'6'dihydro $\epsilon\psi$ carotene are the more abundant among the pigments found.

On the bases of a) this identification and b) the general principles of carotenoids transformations in animals, two different metabolic routes leading to astaxanthin are proposed in each of the above named decapoda. It is proposed as well a pathway, operative in *Aristaeomorpha foliacea* which starts from 5'hydro γ carotene and leads to 6'keto (?) hydroxy 5'hydro $\psi\beta$ carotene and another one, operating in *Heterocarpus dorsalis*, leading from 5'6'dihydro δ carotene to 6'keto (?) hydroxy 5'6'dihydro $\epsilon\psi$ carotene.

Partial acylglicerides, free and sterified cholesterol, free fatty acids, ubi-

quinone (Q₄), triacylglycerides and glyceryl ethers have been identified and quantitatively estimated among nonpolar lipids. Free fatty acids are highly abundant, specially in carapace, and triacylglycerides represent not more than 30 % of total lipids.

Lisophosphatidylcholine, sphingomyelin, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and cardiolipin have been characterized among phospholipids and its contribution to total lipid estimated. Plasmalogens and diether forms of all of the isolated phospholipids have been as well identified.

Each one of the identified components have been purified and its fatty acids composition studied. Phospholipids from carapace are in general more unsaturated than those from flesh.

**«ESTUDIOS CINETICOS DE LA L. GLICOL
DESHIDROGENASA DE MUSCULO DE GALLINA»**

Por Josefa González Prieto

La L. glicol deshidrogenasa, enzima purificado y clasificado recientemente en el laboratorio en que se llevó a cabo esta tesis, cataliza la reducción reversible, aunque el equilibrio de la reacción se encuentra fuertemente desplazado en el sentido reductasa, de los α -dicarbonilos a α -hidroxicarbonilos y de estos a L(+) glicoles. Los primeros compuestos son sustancias de fuerte aroma y contribuyen de forma muy acusada al «bouquet» de ciertos productos alimenticios, de ahí la importancia que este enzima tiene para el tecnólogo de los alimentos. Podría actuar manteniendo la relación piridín nucleótidos reducidos/oxidados en condiciones de anaerobiosis parcial, cuando fallen los mecanismos ordinarios de reoxidación de estos compuestos, en favor de esta teoría puede aducirse que la L. glicol deshidrogenasa es un enzima muy apropiado para cumplir este papel por catalizar dos reacciones consecutivas acopladas a la oxidación de dos moléculas de NADPH, de forma que el equilibrio del conjunto de las dos reacciones es función del cuadrado de la concentración de NADPH en vez de ser función lineal, lo que hace a estas reacciones muy sensibles a los cambios en el nivel fisiológico de NADPH.

Podría también desempeñar una función detoxicante, al transformar compuestos como los α -dicarbonilos, cuya estructura hace preveer una alta toxicidad, en glicoles muy poco tóxicos.

Esta tesis doctoral forma parte de un conjunto de investigaciones destinadas al conocimiento del metabolismo de los α -dicarbonilos y tiene por objeto, aclarar los mecanismos de las reacciones catalizadas por la L. glicol deshidrogenasa y determinar la afinidad de ésta por el coenzima y los sustratos. Para obtener datos que puedan contribuir a aclarar su papel biológico.

Para la realización de estos estudios se utilizó la forma enzimática de pI

quinone (Q₄), triacylglycerides and glyceryl ethers have been identified and quantitatively estimated among nonpolar lipids. Free fatty acids are highly abundant, specially in carapace, and triacylglycerides represent not more than 30 % of total lipids.

Lisophosphatidylcholine, sphingomyelin, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and cardiolipin have been characterized among phospholipids and its contribution to total lipid estimated. Plasmalogens and diether forms of all of the isolated phospholipids have been as well identified.

Each one of the identified components have been purified and its fatty acids composition studied. Phospholipids from carapace are in general more unsaturated than those from flesh.

**«ESTUDIOS CINETICOS DE LA L. GLICOL
DESHIDROGENASA DE MUSCULO DE GALLINA»**

Por Josefa González Prieto

La L. glicol deshidrogenasa, enzima purificado y clasificado recientemente en el laboratorio en que se llevó a cabo esta tesis, cataliza la reducción reversible, aunque el equilibrio de la reacción se encuentra fuertemente desplazado en el sentido reductasa, de los α -dicarbonilos a α -hidroxicarbonilos y de estos a L(+) glicoles. Los primeros compuestos son sustancias de fuerte aroma y contribuyen de forma muy acusada al «bouquet» de ciertos productos alimenticios, de ahí la importancia que este enzima tiene para el tecnólogo de los alimentos. Podría actuar manteniendo la relación piridín nucleótidos reducidos/oxidados en condiciones de anaerobiosis parcial, cuando fallen los mecanismos ordinarios de reoxidación de estos compuestos, en favor de esta teoría puede aducirse que la L. glicol deshidrogenasa es un enzima muy apropiado para cumplir este papel por catalizar dos reacciones consecutivas acopladas a la oxidación de dos moléculas de NADPH, de forma que el equilibrio del conjunto de las dos reacciones es función del cuadrado de la concentración de NADPH en vez de ser función lineal, lo que hace a estas reacciones muy sensibles a los cambios en el nivel fisiológico de NADPH.

Podría también desempeñar una función detoxicante, al transformar compuestos como los α -dicarbonilos, cuya estructura hace preveer una alta toxicidad, en glicoles muy poco tóxicos.

Esta tesis doctoral forma parte de un conjunto de investigaciones destinadas al conocimiento del metabolismo de los α -dicarbonilos y tiene por objeto, aclarar los mecanismos de las reacciones catalizadas por la L. glicol deshidrogenasa y determinar la afinidad de ésta por el coenzima y los sustratos. Para obtener datos que puedan contribuir a aclarar su papel biológico.

Para la realización de estos estudios se utilizó la forma enzimática de pI

7,2 (responsable de casi el 90 % de la actividad L. glicol deshidrogenasa en el tejido muscular de gallina) purificada siguiendo el método de Bernardo y colaboradores. Como coenzima se utilizó el NADPH, ya que «in vivo» opera fundamentalmente con él. Como sustratos a reducir se utilizaron los que se consideró podrían tener interés fisiológico de entre los aceptados por el enzima: L. acetoína, L. gliceraldehído, diacetilo, glicolaldehído, 2-3 pentanodiona, glioxal y metil glioxal. Todos estos compuestos pudieron ser conseguidos en el comercio, excepto la L. acetoína, por lo que fue necesario la puesta a punto de un método para su obtención, que consta en síntesis de las siguientes etapas:

- 1) Incubación a temperatura ambiente de una mezcla de reacción compuesta por diacetilo, NADH y diacetilo reductasa de hígado de bóvido.
- 2) Purificación de la acetoína así obtenida por cromatografía en Sephadex G-10.
- 3) Posterior extracción con éter y concentración por evaporación del disolvente.

Los estudios de afinidad planteados como uno de los objetivos, se realizaron determinando las velocidades iniciales de reacción a diversas concentraciones de sustrato y coenzima. Los valores de las K_s fueron obtenidos de representaciones primarias de los datos por el método de Hanes («S/v» en función de «S»); tales representaciones dieron, en todos los casos, una familia de rectas, una para cada concentración de sustrato fijo/variable que se cortaron a la izquierda del eje de inordenadas. Las K_m se determinaron por representaciones secundarias de las pendientes de las rectas primarias en función de la inversa de las concentraciones del sustrato correspondiente. Los valores calculados fueron los siguientes:

| Reac. reducción | Carbonilo K_s (mM) | Carbonilo K_m (mM) | NADPH K_s (μ M) | NADPH K_m (μ M) |
|------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| L-acetoína | 1,6 | 2,6 | 1,9 | 3,5 |
| L-gliceraldehído | 0,024 | 0,026 | 2,0 | 3,1 |
| Glicolaldehído | 0,350 | 0,60 | 2,8 | 3,8 |
| Diacetilo | 0,055 | 0,11 | 1,2 | 3,1 |
| 2,3-pentanodiona | 0,09 | 0,061 | 1,8 | 5,7 |
| Glioxal | 0,5 | 0,52 | 1,9 | 2,4 |
| Metilglioxal | 0,05 | 0,102 | 1,8 | 2,85 |

Estos resultados concuerdan bien con los datos preliminares publicados por BURGOS y colaboradores en 1979. En el caso de la 2-3 pentanodiona se ha calculado una constante de Michaelis más baja que los citados autores, pero en nuestra opinión esta discrepancia no es significativa, teniendo en cuenta que pequeñas diferencias en el pH o la temperatura pueden justificarlo. En cuanto a la afinidad para el NADPH, las cifras obtenidas para la constante de

Michaelis oscilan entre 2,4 - 5,7 y para la de disociación entre 1,2 - 2,8, en todos los casos muy bajas en relación con la concentración de ese coenzima esperable en los tejidos, lo que confirma las conclusiones de Bernardo de que la glicol deshidrogenasa opera «in vivo» prácticamente en condiciones de saturación con el NADPH.

Estas observaciones tienden a apoyar la hipótesis de que el enzima cumple una función detoxicante, reduciendo los carbonilos a compuestos tan poco tóxicos como son los glicoles, puesto que si el enzima trabaja en los tejidos saturado con el coenzima, su actividad se ve regulada por la concentración de carbonilos, situación mucho más favorable para cumplir un papel de eliminación del exceso de ellos que si ha de depender también del nivel alcanzado por el coenzima. Por el contrario, prácticamente descartan que su papel sea controlar la concentración de NADPH porque, en principio, un enzima que opera saturado de un sustrato (como ocurre con el NADPH) no puede tener por función regular la concentración de éste.

Los mecanismos de la reacción catalizada por este enzima se han investigado a partir de los siguientes datos:

- a) La forma de las representaciones primarias.
- b) Del patrón de inhibición por los productos.
- c) De los efectos de inhibidores de vía muerta.

Como se ha indicado ya, las representaciones primarias de «S/v» en función de «S» dieron rectas convergentes a la izquierda del eje de ordenadas, lo que demuestra que el mecanismo seguido por la L. glicol deshidrogenasa es secuencial.

Para distinguir entre los diversos sistemas secuenciales posibles hemos hecho uso de los patrones de inhibición por los productos, comparando nuestros resultados con los patrones que determinan las normas de Cleland para estos tipos de inhibición. La inhibición por el NADP, competitiva para el NADPH y no-competitiva para el carbonilo utilizado como sustrato, elimina los sistemas al azar de entre los secuenciales y deja como únicos posibles los que, siendo secuenciales, siguen un orden obligatorio. La inhibición por los productos de los carbonilos resultantes de la reacción de reducción es, a concentración saturante del sustrato fijo, acompetitiva para el NADPH y no-competitiva para el carbonilo correspondiente, lo cual concuerda solo con un mecanismo ordenado clásico o con uno de Iso Theorell-Chance, siendo el primer sustrato en fijarse al enzima el NADPH en el primer caso, o el carbonilo en el segundo.

Para aclarar este punto se estudió la inhibición mediante un análogo estructural de los carbonilos, la acetona, que produce una inhibición reversible como demuestra la constancia a lo largo del tiempo del porcentaje de inhibición, la pérdida de linealidad en las representaciones de velocidad en función de la concentración de enzima al añadir inhibidor, y la recuperación de la actividad enzimática al eliminar el inhibidor por diálisis.

La inhibición de la reacción por la acetona, resultó ser competitiva para los carbonilos, lo cual demuestra que reacciona específicamente con la misma forma del enzima con que lo hacen éstos, y acompetitiva para el coenzima. Según predicen las normas de Cleland para inhibidores de vía muerta, este tipo de inhibición sólo es posible si la acetona se fija al enzima después de haberlo hecho el NADPH, de lo que se deduce es éste el primer sustrato en fijarse al enzima, haciéndolo a continuación el carbonilo al complejo enzima-coenzima; ello descarta que la reacción siga un mecanismo de Theorell-Chance y deja como único posible uno ordenado clásico.

Las constantes de inhibición para cada uno de los productos se calcularon mediante la representación secundaria de las pendientes de las gráficas anteriormente expuestas, en función de las correspondientes concentraciones de inhibidor. Los valores obtenidos fueron los siguientes:

$$K_i^{\text{Butilenglicol}} = 350 \text{ mM}, \quad K_i^{\text{Glicerol}} = 136 \text{ mM}, \quad K_i^{\text{Etilenglicol}} = 1,42 \text{ M},$$

$$K_i^{\text{Acetoína}} = 390 \text{ mM}, \quad K_i^{\text{Glicolaldehído}} = 22 \text{ mM}.$$

Las constantes de inhibición para NADP fueron en todos los casos en torno a 10 μM .

Como puede observarse, las K_i^{NADP} se aproximan en todas las reacciones estudiadas a las constantes de afinidad para el NADPH. En cambio, las de los hidroxycarbonilos producidos demuestran que su afinidad por el enzima es mucho más baja que la de los sustratos de procedencia, lo cual explica, al menos en parte, la difícil reversibilidad de la reacción.

Dado el mecanismo que sigue la reducción de los carbonilos por la L. glicol deshidrogenasa, los valores de K_i^{NADP} y de K_i^{acetona} deberían ser idénticos en todas las reacciones estudiadas, lo que se cumple con un grado de aproximación razonable.

KINETIC STUDIES OF HEN'S MUSCLE L. GLYCOL DEHYDROGENASE

SUMMARY

A kinetic studies of the 7.2 pI isoenzyme of L. glycol dehydrogenase have been performed. NADPH was used as coenzyme and acetoin, diacetyl, L. glyceraldehyde, glycolaldehyde, 2-3, pentanedione, glyoxal and methylglyoxal, as substrates.

The affinity studies were performed by determining initial rates at variable concentrations of coenzyme and substrates. The K_m values for carbonyls were found to be in the range 0,026 mM (diacetyl)-2.6 mM (acetoin); the corresponding parameter for NADPH was calculated around 3 μM .

The reaction mechanism has been shown to be an ordered Bi-Bi as proved by:

- The shape of the primary plots according to the method of Hanes.
- Product's inhibition pattern.
- The effect of dead end inhibitors.

The inhibition constants for each one of the reactions products obtained with the assayed substrates have been estimated: Those for NADP are extremely close to the affinity constant for NADPH. The affinity constants for carbonyls resulted to be on the contrary much lower (several orders) than the K_i for the products of their reduction by the L. glycol dehydrogenase reaction.