

Evolución de la actividad de la Bilirrubina-UDP Glucuronosil-Transferasa (bUDP-GT) durante el desarrollo en rata

María Helena Cantarino¹, Rosa María Arahuetes¹, Elvira Arza¹, Francisco J. Cubero¹, María del Socorro García-Barrutia² & Agustín Ortiz¹

1 Departamento de Biología Animal II, Facultad de CC. Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (UCM), España.

2 Departamento de Biología Celular, Facultad de CC. Biológicas, UCM, España.

Resumen

Correspondencia

A. Ortiz

E-mail: agustino@bio.ucm.es

Tel.: 91.3.94.48.92

Fax: 91.3.94.49.35

Recibido: 4 Febrero 2002

Aceptado: 13 Abril 2002

La enzima microsomal bUDP-GT (bilirrubina uridindifosfo-glucuronosil transferasa) es responsable de la conjugación de la bilirrubina para ser eliminada por la bilis. Es un hecho establecido que durante la gestación la madre conjuga y elimina la bilirrubina producida por el feto, si bien hemos demostrado en nuestro laboratorio que el gen responsable de dicha enzima comienza a expresarse a partir del día 13 de gestación y por ello, nos planteamos: 1º) la puesta a punto de la técnica para determinar la actividad de la bUDP-GT en tejido hepático, y 2º) aportar nuevos datos sobre la variación de la actividad de la enzima durante el desarrollo perinatal. En cuanto al primer apartado, se han analizado el tiempo de activación de la fracción microsomal, que se estabiliza a los 30 minutos de incubación y la variación de la actividad enzimática cuyo máximo aparece a los 5 minutos de incubación de la mezcla de reacción. En cuanto a la evolución de la actividad de la bUDP-GT con la edad, hemos visto que sólo al final del periodo de gestación comienzan a aparecer valores detectables y durante el primer mes de vida ya alcanzan valores próximos al adulto.

Palabras clave: bUDP-GT, Actividad enzimática, Bilirrubina, Fracción microsomal, Perinatal.

Abstract

Evolution of bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase during development in the rat.

Conjugation of bilirubin and excretion by the liver is catalysed by the microsomal enzyme bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase (bUDP-GT). It is well known that during gestation, the fetal liver *in utero* is incapable for capture, conjugation and clearance of bilirubin. However, we have previously demonstrated that the gene responsible for the enzyme starts to express by day 13 of gestation. Therefore, the aims of the present work are first, to carry out a procedure so as to determine the activity of the bUDP-GT in the hepatic tissue, and, second, to obtain new data about the changes during the perinatal development in the activity levels of the mentioned enzyme. On the one hand, we have analyzed both, the activation time of the microsomal fraction, which stabilizes after 30 minutes of incubation, and the changes in the enzyme activity which reach a maximum peak after 5 minutes of incubation. On the other hand, we only detect activity of the bUDP-GT at the final period of gestation, reaching adult levels during the first month of extrauterine life.

Key words: bUDP-GT, Enzyme activity, Bilirubin, Microsome fraction, Perinatal.

Introducción

La bUDP-GT (bilirrubina uridin-difosfatoglucuronosiltransferasa) es una enzima unida a la membrana microsomal responsable de la conjugación de la bilirrubina para su posterior eliminación por bilis. Su regulación depende de la composición lipídica de la membrana, por lo que, durante el desarrollo fetal, los cambios en la actividad de las enzimas hepáticas implicadas en la síntesis de fosfolípidos provoca cambios en la composición lipídica microsomal, modulando la actividad catalítica de la bUDP-GT.

Por otra parte, ha quedado demostrado que la bilirrubina producida en el feto es transferida por la placenta al plasma materno, conjugada en el hígado materno, y excretada en bilis materna. Cuando esta ruta excretora se interrumpe en el nacimiento, la eliminación del pigmento llega a ser dependiente del hígado del recién nacido, cuya capacidad excretora está desarrollada de manera incompleta durante los primeros días de vida. Esta hiperbilirrubinemia fisiológica, también llamada ictericia del recién nacido, aparece no sólo en humanos sino también en otros muchos mamíferos (Thaler 1972, Odell 1976, Valaes 1976, Fevery et al. 1979, Lee et al. 1986).

Además de la rápida normalización en la conjugación de la bilirrubina en el hígado postnatal, la evidencia experimental sugiere que la defectuosa captura hepática inicial, el transporte intracelular y la excreción biliar del pigmento, también alcanzan, progresivamente, los valores del adulto durante el periodo neonatal acompañados por las modificaciones estructurales y ultraestructurales del hígado, lo que representa la adaptación del hígado fetal a la vida extrauterina.

Los objetivos de este estudio han sido: 1) la puesta a punto de la técnica para la determinación de la actividad de la bUDP-GT en tejido hepático ya que se requería un método de gran sensibilidad, dadas las características particulares de las muestras fetales y de neonatos, y 2) aportar nuevos datos sobre la variación de la actividad de la bUDP-GT durante el desarrollo perinatal, dado que son factores diferentes los que modulan dicha actividad.

Material y métodos

Productos químicos

KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Glicerol, UDPGA (ácido glucurónico), bilirrubina, Brij-56 (polyoxyethylene 10 cetyl ether), NO_2Na , sulfamato amónico, ácido ascórbico, butilacetato y reactivo de Bradford son productos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

DTT (1,4-Dithiothreitol) y EDTA son productos de Boehringer Mannheim GmbH (Alemania). Solución de tampón pH 2,8 según Soerensen (glicina/HCl), etil antranilato y 2-pentanona son productos de Fluka Chemie (Stenheim, Suiza).

Animales

Para este trabajo se han utilizado ratas adultas, tanto machos como hembras de la especie *Rattus norvegicus*, variedad albina, raza Wistar, con un peso entre 200 y 300g, así como fetos de la misma raza de rata de 21 días de gestación y neonatos de cuatro días y de un mes.

Los animales permanecieron en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas en módulos con T^a constante de 18 a 20°C y con fotoperiodo controlado (12 horas luz/oscuridad). En su momento, fueron anestesiados con éter dietílico con la finalidad de obtener una relajación completa y así evitar una vasoconstricción periférica. Una vez anestesiada la rata, se somete a una laparotomía media hasta el diafragma retirando la capa muscular y se aparta toda la masa visceral, con el fin de que el hígado y los vasos sanguíneos conectados a él queden bien visibles. A continuación se extrae el hígado, se pesa, se trocea y se coloca en un tubo de cristal al que previamente se le ha añadido el tampón I: KH_2PO_4 20mM, K_2HPO_4 80mM, DTT 1mM, EDTA 1mM y glicerol 20% con un pH de 7,4 y en una relación del 10-15% peso/volumen.

Preparación de la fracción microsomal

Se sometió a homogeneización (en un homogeneizador Heidolph) y a continuación a tres centrifugaciones sucesivas. La primera, en una centrifuga Eppendorf 5403, a 30 g a 4°C durante 15 min y las dos siguientes se llevan a cabo en una ultracentrifuga Beckman XL-90 ultracentrifuge. La primera, con el sobrenadante de la centrifugación anterior, es a 41.000 g a 4°C durante 15 minutos, mientras que la segunda es a 80.000 g a 4°C durante una hora. El sedimento, en el que se encuentra la fracción microsomal, se resuspende en un volumen conocido de tampón. A partir de esta muestra se determinó la concentración de proteínas microsomales por el método de Bradford y la determinación de la actividad de la enzima microsomal.

Determinación de la actividad de la bUDP-GT

Para la determinación de la actividad de la bUDP-GT se activaron alícuotas microsomales (4 mg/ml de proteína microsomal) con Brij-56 (0,08%) mediante incubación a 37°C durante 15, 30, 45 y 60 minutos. En la medida de la actividad, los componentes y sus concentraciones en el volumen o mezcla de reacción fueron: microsomas activados 1 mg/ml, tampón tris-maleato 0,1mM, UDP-GA 5mM, bilirrubina 0,125 mM. Con esta mezcla de reacción se procedió al ensayo «in vitro» a diferentes tiempos (5, 15 y 30 minutos) y siempre en baño metabólico a 37°C. A continuación, para analizar la actividad de la enzima recurrimos al procedimiento basado en la diazotización selectiva de los glucurónidos de bilirrubina en presencia de bilirrubina a pH 2,7. Esto se realizó deteniendo la reacción de incubación con tampón glicina/HCl en hielo, agi-

Tiempo de activación	15 minutos	30 minutos	45 minutos	60 minutos
Activación (nmol/mn/mg)	0,165 ± 0,011	0,188 ± 0,001	0,181 ± 0,003	0,189 ± 0,025

Tabla 1. Variación en el valor de la actividad de la bUDP-GT a diferentes tiempos de activación de la fracción microsomal con Brij-56. El número de muestras utilizadas en cada uno de los tiempos de incubación ha sido de 15.

Table 1. Changes in the activity of the bUDP-GT at different times after activation of the microsomal fraction with Brij-56. (n=15 per time).

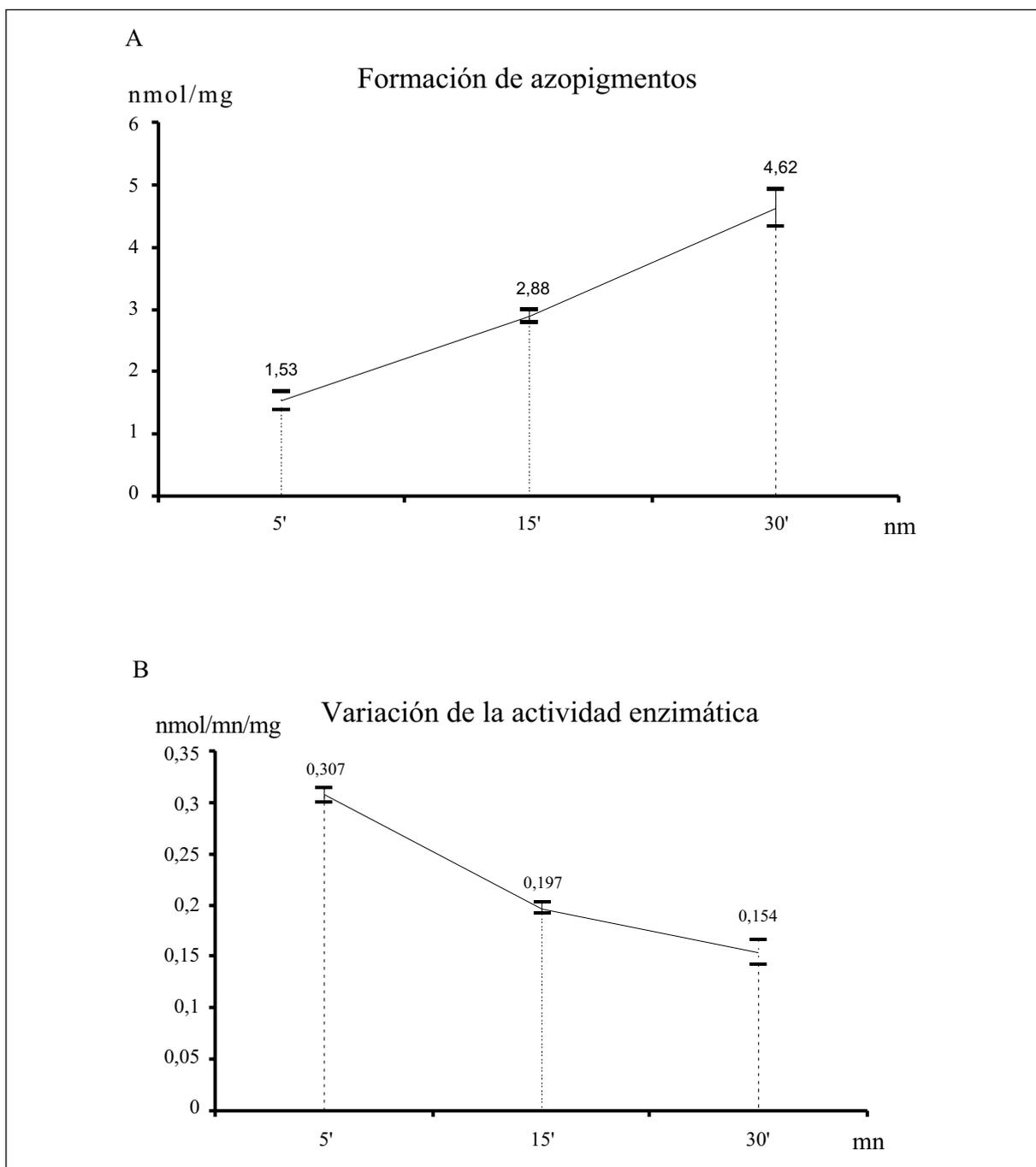


Figura 1. El gráfico A muestra la cantidad de azopigmentos (expresada en nmol/mg de proteína microsomal) que se han formado en función del tiempo de incubación. En el gráfico B se observa la actividad (expresada en nmol/mn/mg de proteína microsomal) de la bUDP-GT a diferentes tiempos de incubación con la mezcla de reacción. El número de muestras empleadas en cada uno de los tiempos ha sido de 10.

Figure 1. A shows the azopigments quantified as nmol/mg of microsomal protein. B represents the activity of the bUDP-GT (expressed as nmol/mn/mg) at several times of incubation with the reaction mixture. (n=10 per time).

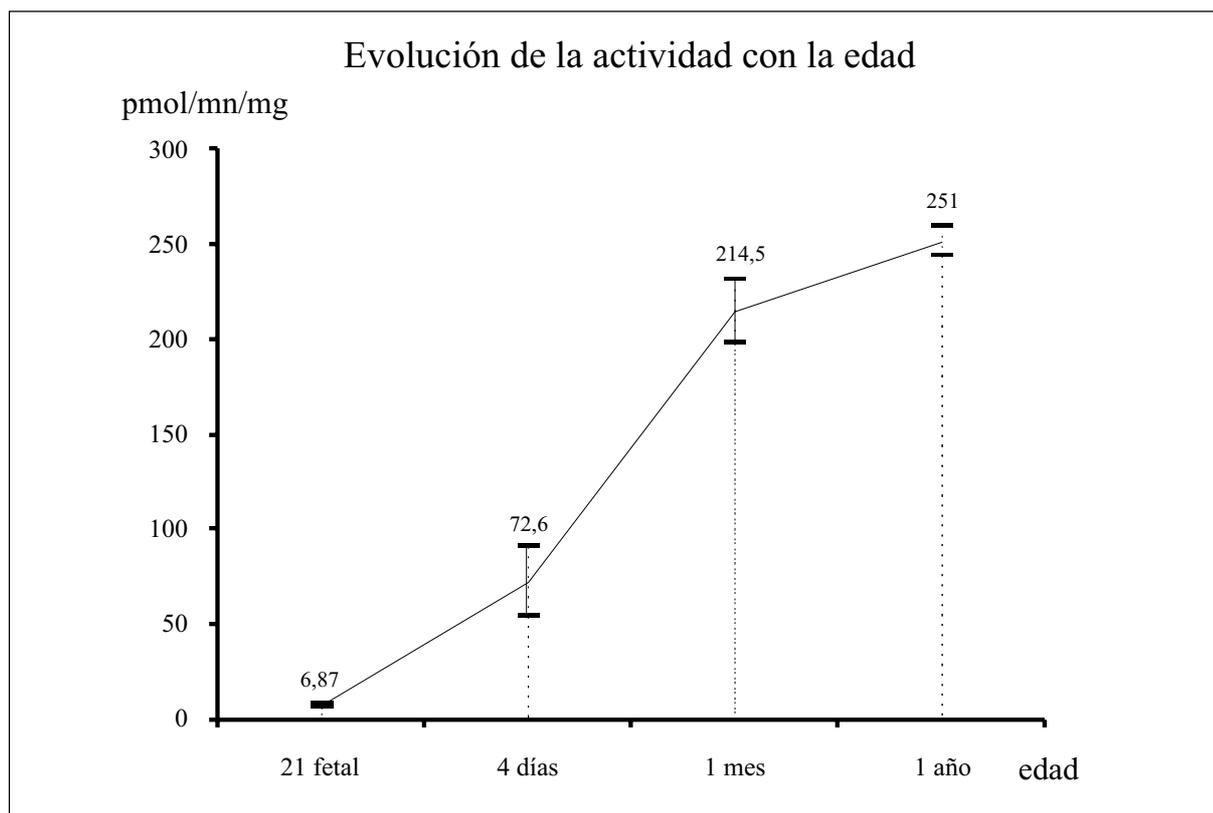


Figura 2. El gráfico representa los valores de actividad de la bUDP-GT y su evolución con la edad. El número de muestras empleadas en cada uno de los tiempos ha sido de 8.

Figure 2. Activity of the bUDP-GT versus evolution during development (n=8 per time).

tando bien y dejando la muestra a temperatura ambiente. La bilirrubina conjugada se convierte en azopigmentos coloreados que son extraíbles en solventes orgánicos y medidos espectrofotométricamente. Por lo tanto, a la bilirrubina conjugada se le añadió el reactivo de diazotización (HCl 0,15M, NO_2Na al 5%, sulfamato amónico 17g/l y etil antranilato), se agitó y se incubaron las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se detuvo la reacción con ácido ascórbico y se extrajo el azopigmento al añadir 1,5 ml de 2-pentanona/butilacetato (17/3 v:v), agitando intensamente y congelando las muestras a -20°C durante dos horas. Se descongelaron y centrifugaron a 2500 rpm durante 10 mn a temperatura ambiente. Se recogió la fase superior y se leyó la densidad óptica a 530 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 contra un blanco de 2-pentanona/butilacetato (17:3 v/v).

Las modificaciones llevadas a cabo en esta metodología están basadas en el método descrito por Roy & Heirwegh (1968), modificado «a posteriori» por Heirwegh et al. (1972), Viollon-Abadie et al. (1999).

Resultados y Discusión

La valoración de la actividad de la enzima microsomal bUDP-GT requiere atención especial cuando se parte de muestras

hepáticas que por su grado de maduración no presentan valores relevantes de la misma, como es el caso del hígado en el periodo perinatal. Por esta razón, uno de los objetivos de este trabajo ha sido el desarrollo de una técnica, con las modificaciones más apropiadas, que permita valorar con gran fiabilidad dicha actividad enzimática durante el desarrollo.

Variación de los tiempos de activación de la fracción microsomal

Se ha valorado el tiempo de activación de la fracción microsomal con Brij-56 en función del tiempo de incubación. Los resultados aparecen en la Tabla 1. A partir de los 30 minutos de activación, los valores obtenidos fueron prácticamente iguales por lo que se fijó ese tiempo como preestablecido para la metodología.

Formación de azopigmentos

El color de los extractos de azopigmentos obtenidos en la mezcla de reacción, se debe a los parámetros siguientes:

- a) bilirrubina conjugada sintetizada durante la incubación de la mezcla de reacción.

- b) material diazopositivo presente en la muestra.
- c) compuestos diazonegativos que absorben a la longitud de onda utilizada.
- d) turbidez de la mezcla (Heirwegh et al. 1972).

En la Figura 1: A, se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de la formación de azopigmentos durante el tiempo comprendido entre 5 y 30 minutos de incubación de la mezcla de reacción. Éstos están expresados en nmol/mg de proteína microsomal y se han obtenido restanto de los valores finales los correspondientes a los cuatro factores expresados anteriormente.

Estos datos coinciden con los señalados por Bruni & Chang (1999) donde trabajaban con concentraciones de bilirrubina/albumina de 0,85 mM y UDPGA de 83,5 mM mientras que en nuestro caso se ha trabajado con bilirrubina/albumina de 0,125 mM y UDPGA de 5 mM (Viollon-Abadie et al. 1999).

Variación de la actividad enzimática de la bUDP-GT

En la Figura 1: B, se señala los resultados obtenidos. Según éstos, el pico de actividad aparece a los 5 minutos de incubación (0,307 nmol/ mn/mg) disminuyendo, de forma no lineal, hasta 0,154 nmol/mn/mg a los 30 minutos de incubación. Este hecho podría explicarse por la falta de sustrato. Nosotros hemos trabajado con concentraciones de albumina y de UDPGA mucho más bajas que Bruni & Chang (1999) que han señalado un aumento continuo de actividad en función del tiempo. Sin embargo, Heirwegh et al. (1972), trabajando con concentraciones muy superiores a las nuestras, manifestaron una caída de la actividad enzimática en función del tiempo muy similar a la nuestra.

Entre nuestros objetivos destacaba la puesta a punto de una técnica eficaz, sensible y fiable, minimizando costes para poder llevarla a cabo, y por tanto, creemos que los parámetros a utilizar serían de 30 minutos de incubación para la activación de la fracción microsomal seguida de 5 minutos de incubación para la mezcla de reacción con las concentraciones señaladas con anterioridad en el apartado de material y métodos.

Evolución de la actividad de la bUDP-GT con la edad

Se ha analizado la actividad de la bUDP-GT en función de los parámetros ya establecidos, excepto del tiempo de activación que en este caso fue de 30 minutos para poder comparar con otros trabajos. Los resultados que hemos obtenido se muestran en la Figura 2. En ellos se pone de manifiesto que sólo a partir del día 21 hay trazas de actividad que aumenta significativamente en el 4º día postnatal y a partir del primer mes de vida se alcanzan valores próximos al adulto.

Estudios realizados en nuestro laboratorio (Cubero et al. 2001) han puesto de manifiesto que el día 13 de gestación ya

existe expresión del gen de la bUDP-GT, cuatro días antes de lo detectado por Huang et al. (1992) utilizando la misma sonda. Por otra parte, la bibliografía existente sobre la actividad de dicha enzima en el periodo perinatal es escasa, y en contraposición a nuestros resultados, Fevery et al. (1977), detectó algo de actividad a partir del día 19 de gestación.

Finalmente, los resultados están en concordancia con la hipótesis de que la actividad de esta enzima hepática permanece suprimida por, al menos dos factores: las hormonas gestacionales circulantes y las bajas concentraciones de bilirrubina circulante ya que la placenta la elimina rápidamente (Lee et al. 1986). Al nacer, los neonatos excretan hormonas gestacionales una vez que son separados de la circulación placentaria, y, la bilirrubina endógena sirve para inducir la actividad de bUDP-GT. Esto nos hace pensar que cuando la ruta placentaria se pierde, se induce rápidamente la traducción del mRNA de la bUDP-GT ya que la expresión del gen es anterior al nacimiento.

Agradecimientos

Queremos agradecer a la Comunidad Autónoma de Madrid y a la Universidad Complutense la ayuda prestada para la realización de este trabajo con la concesión de los proyectos: C.A.M. 08.6/0027.1/98 y U.C.M. PR/52/008901.

Referencias

- Bruni S & Chang TMS. 1999. Kinetic studies of Hepatocyte UDP-glucuronosyltransferase: evidence of an allosteric enzyme. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology* 27: 343-356.
- Cubero FJ, Arza E, Maganto P, García-Barrutia MS, Mula N, Ortiz A & Arahetes RM. 2001. Expression of bilirubin UDP-Glucuronosyl-transferase (bUGT) throughout fetal development: intrasplenic transplantation into Gunn rats to correct enzymatic deficiency. *Digestive Diseases and Sciences* 46: 2762-2767.
- Fevery J, Wolf-Peters R de, Vos R de, Desmet V & Heirwegh KPM. 1977. Perinatal development of bilirubin UDP-glycosyltransferase activities in rat liver. *Biol. Neonate* 32: 336-342.
- Fevery J, Blanckaert N, Berthelot P, Heirwegh KPM. 1979. Bilirubin metabolism in neonatal life. In *Neonatal hepatitis and biliary atresia* (Javitt BN, ed.). Washington DC: US Government Printing Office, pp. 251-266.
- Heirwegh KPM, Vijver M van de & Fevery J. 1972. Assay and properties of digitonin-activated bilirubin uridine diphosphate glucuronyltransferase from rat liver. *Biochememical Journal* 129: 605-618.
- Huang TJ, Chowdhury JR, Lahiri P, Yerneni PC, Bommineni VR, Arias IM & Chowdhury NR. 1992. Prenatal diagnosis of bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase

- se deficiency in rats by genomic DNA análisis. *Hepatology* 16: 756-762.
- Lee K & Gartner LM. 1986. Fetal bilirubin metabolism and neonatal jaundice. In *bile pigments and jaundice* (Ostrow JD, ed.). New York: Marcel Dekker, p. 373.
- Odell GB. 1976. Neonatal jaundice. In *Progress in liver diseases* (Popper H & Schaffner F, eds.). New York: Grune and Stratton, p. 457.
- Roy FP van & Heirwegh KPM. 1968. Determination of bilirubin glucuronide and assay of glucuronyltransferase with bilirubin as acceptor. *Biochemical Journal* 107: 507-518.
- Thaler MM. 1972. Perinatal bilirubin metabolism. *Advances in Pediatrics* 6: 197-201.
- Valaes T. 1976. Bilirubin metabolism. Review and discussion of inborn errors. *Clinics Perinatology* 3: 177-209.
- Viollon-Abadie C, Lasserre D, Debruyne E, Nicod L, Carmichael N & Richert L. 1999. Phenobarbital, *_*-naphthoflavone, clofibrate, and pregnenolone-16 α -carbonitrile do not affect hepatic thyroid hormone UDP-glucuronosyltransferase activity, and thyroid gland function in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 155: 1-12.