



Vol. 1, N° 1. Año 1997

MECANISMOS DE GLUCOSURIA RENAL POR ACCION DE LA TIOACETAMIDA EN RATAS

Julio César González Martínez
Universidad de Carabobo-Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Bioanálisis-Valencia

Premio Anual Sociedad de Bioanalistas Especialistas 1994

RESUMEN

Se determinó el efecto que produce la tioacetamida (TAA) sobre el estado físico de las membranas, la composición lipídica y el transportador Na^+ -glucosa de la membrana de borde ciliado renal (MBCR) con la finalidad de establecer el mecanismo por el cual esta droga produce glucosuria sin hiperglicemia en ratas cuando se administra por vía subcutánea.

Se encontró disminución de la anisotropía del DPH (aumento de la fluidez) en MBCR tratadas, disminución en las concentraciones de colesterol, fosfolípidos y en la relación lípido/proteína (R L/P). Se detectó en MBCR controles, mayor concentración de esfingomielina y fosfatidiletanolamina, y en MBCR tratadas, mayor concentración de fosfatidilcolina. En cuanto a ácidos grasos se encontró en mayor proporción el C 16:0 y C 18:0 en MBCR controles y en tratadas el C 20:3. Indicando con estos resultados que la TAA produce aumento de la fluidez de las MBCR, debido a los cambios en su composición lipídica, y este cambio en la fluidez ha sido implicado en la disminución de la actividad de la proteína transportadora de Na^+ -glucosa.

No se observó efecto en la incubación "in vitro" de las MBCR con cantidades crecientes de TAA sobre la captación de [^{14}C]-glucosa.

En el ensayo de unión de [^3H] florizina a las MBCR, se hallaron los siguientes valores: para K_D 0,78 μM y 0,86 μM , y los números de sitios para [^3H] florizina de 69 y 33 pmoles/mg de proteína, en controles y tratados respectivamente.

En PAGE-SDS de los polipéptidos de MBCR tratados se observó una disminución de varios polipéptidos tales como 22,73 y 212 KDa. Se discuten las posibles implicaciones de estos resultados.

ABSTRACT

This study was done to determine the effect of thioacetamide (TAA) on the physical state of cell membrane, lipid composition and the Na^+ -glucose transport through the renal brush border membrane (BBM), in order to establish the mechanism through which TAA produce glycosuria without hyperglycemia in rats.

Findings include reduction of DPH anisotropy (fluidity increase) in treated BBM, reduction in cholesterol and phospholipid concentrations as well as in the lipid/protein relation (R L/P) Greater concentrations of sphingomyelin and phosphatidylethanolamine were detected on control BBM, while treated BBM showed greater concentrations of phosphatidylcoline. Fatty acids gave the following proportion C 16:0 and C 18:0 for control BBM and C 20:3 in treated BBM. These results indicate that TAA produces an increases of BBM fluidity due to changes in its lipid composition. This change of fluidity has been implied in the decrease of activity of the Na⁺-glucose transport protein.

In vitro incubation of BBM with increasing amounts of TAA showed no effect on [¹⁴C]-glucose.

The following values were found for the binding of [³H]Phlorizin to BBM: K_D 0,78 uM and place number for [³H] phlorizin of 69 pmoles/mg of protein in control BBM and K_D 0,86 uM and place number for [³H] phlorizin of 33 pmoles/mg of protein in treated BBM.

PAGE-SDS of the polypeptides of treated BBM showed a reduction of various polypeptides such as 22, 73 and 212 KDa.

The possible implications of these results are discussed on this paper.

KEY WORDS: Thioacetamide, renal brush border membrane (RBBM), glycosuria.

La tioacetamida es una droga utilizada en el pasado como fungicida, para controlar el daño producido a las naranjas (1). La actividad carcinogénica de la tioacetamida (TAA) en hígados de rata fue reportada por Fitzhugh y Nielson en 1948 (2), luego fue confirmada más tarde en diversos trabajos (3) (4) (5). El más notable efecto producido por la TAA fue descrito por Rather (6) observando el aumento del doble del tamaño del núcleo, volumen celular y nucleolar. Ha sido utilizada a fin de analizar el mecanismo involucrado en el daño celular y la transformación neoplásica por medio de inducción química al hígado. También la patología hepática inducida por TAA al administrarse por vía oral a dosis bajas se ha utilizado como un modelo para el estudio de cirrosis hepática debido a la muerte, proliferación celular y fibrosis (7), encontrándose alteraciones en las enzimas unidas a la membrana plasmática de los hepatocitos (8) y cambios en las izoenzimas hexoquinasas (9).

Afecta en varios aspectos el metabolismo nuclear del hígado (10, 11) induciendo un marcado aumento en la síntesis de ARN con aparición de modificaciones en las proteínas nucleares. La TAA se comporta como un fuerte promotor de carcinogénesis hepática, más bien que un carcinógeno total del hígado (12), Arni (13), concluye que la TAA induce un efecto genotóxico "in vitro" e "in vivo" y que la tioacetamida-s-óxido o un derivado de este metabolito es probablemente el causante de la mutagénesis.

La TAA es metabolizada totalmente antes de 24 horas, en la rata (14) a tioacetamida-s-óxido, acetamida y sulfato. Porter y Cols. (15), también describieron la metabolización de TAA a tioacetamida-s-óxido, el cual a la vez es metabolizada con la pérdida de sulfuro a reactivos intermediarios no identificados, los cuales pueden degradarse a acetamida u otros

productos más polares o combinados con macromoléculas en el hígado. Como sucede con otros químicos, esta biotransformación no es una verdadera reacción de detoxificación y algunos de sus metabolitos parecen ser muy activos. Encontrándose que la tioacetamida-s-óxido es un necrógeno más potente que la TAA y la acetamida, este último en altas dosis es capaz de producir lesiones hepáticas y hepatomas (16).

En las células del Tubo Contorneado Proximal se observan alteraciones similares a las encontradas en el hígado pero en menor extensión. La exposición del hígado a altas concentraciones de la droga es consistente con la absorción de TAA en el intestino y el paso a través del hígado antes de su distribución sistémica. La alta proporción de flujo sanguíneo a través del riñón expone necesariamente a las células renales a altas concentraciones de TAA temporalmente y de modo similar que en el hígado.

Barker y Smuckler (17) encontraron que la TAA no está ionizada al pH encontrado en la orina y tiene un coeficiente de partición $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ de 0,05. En estas circunstancias es demasiado soluble en agua, y puede ser filtrada en el glomérulo (la fracción no unida a albúmina) pasando a través del nefrón en el filtrado. En estas condiciones la TAA está progresivamente más concentrada y debería ocurrir una mayor difusión posterior dentro de las células tubulares a medida que progresa en el TCP, siendo la porción terminal del TCP la que sufre lesión, cuando se le administran grandes dosis por vía oral (40 mg/dL) a las ratas, aunque por evidencia de los cambios nucleolares en las células del inicio de TCP se puede inferir que hay reabsorción y daño a este nivel. Estos autores también encontraron que la TAA afecta del 70% al 95% de las células del TCP con la aparición de gránulos electrondensos en el borde apical, los cuales coinciden con la aparición de una diuresis marcada entre el segundo y quinto día del tratamiento. Recientemente se ha demostrado que la administración de TAA a ratas produce glucosuria sin alterar los niveles de glucosa sanguínea (18). Estos autores concluyen que la glucosuria inducida por TAA se debe a una disminución en la velocidad de reabsorción de glucosa en el TCP, no encontrando cambios en los patrones de excreción urinaria de potasio y aminoácidos, ni cambios en el pH urinario en los animales controles y los tratados. Se argumenta que el ambiente lipídico del transportador puede ser modificado por la droga, induciendo cambios en los parámetros cinéticos del transportador, ya que existe evidencia de que los ácidos grasos insaturados de cadena larga causan un incremento en la fluidez de la membrana, en vesículas de borde ciliado renal de rata, paralelamente a una disminución en la captación de D-glucosa (19). Los estudios realizados hasta el presente no han permitido establecer el mecanismo por el cual la TAA produce glucosuria renal, en consecuencia el objetivo principal de este trabajo es estudiar el efecto de la TAA sobre la cantidad y calidad del transportador Na^+ -glucosa, así como los posibles cambios que puede producir en la composición lipídica de la membrana de borde ciliado del TCP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales.

Se utilizaron ratas albinas macho de la cepa Sprague Dawley, con un peso corporal entre 230 y 280 g, los cuales se obtuvieron de la colonia endogámica del Instituto de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

Tratamiento de los animales.

Los experimentos se realizaron con 2 grupos de animales, el primero fue inyectado con TAA por vía subcutánea a razón de 75 mg/Kg disuelta en solución salina al 0,9 % (30 mg/ml) administrándose una dosis diariamente por 2 ó 3 días consecutivos. El otro grupo recibió solamente un volumen equivalente del diluyente y sirvió como control. Los animales disponían de agua y alimento comercial "ad libitum".

Preparación de Vesículas de Membrana de Borde Ciliado Renal.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, luego los riñones fueron perfundidos con solución salina isotónica fría a través de la aorta descendente, posteriormente extraídos y decorticados con un micrótopo manual en cortes de 0,4 mm de espesor. La corteza fue procesada inmediatamente de acuerdo a la técnica de precipitación diferencial con calcio (20).

Preparación de Membranas Reducidas.

Las membranas de borde ciliado renal resuspendidas en buffer Tris-Manitol, se incubaron con 7 volúmenes (v/v) de EDTA 0,1 M (pH 11,2) a 4 °C durante 15 minutos y se centrifugaron a 43000 g por 30 minutos. El sedimento se resuspendió en buffer I (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM ClNa, 5 mM EDTA) y se centrifugó como antes, este lavado se realizó dos veces. Luego se lavaron con buffer B-1 (Sacarosa 0,05 M, Cl₂Mg 2mM, Hepes-K⁺4 mM, pH 7,2) finalmente resuspendidas en buffer B (Sacarosa 0,25 M, 10 mM Cl₂Mg, Hepes-K⁺20 mM, PH 7,2) (21). Las membranas así obtenidas, se utilizaron para electrofóresis en geles de poliacrilamida.

Preparación de los cortes de riñón para Microscopía electrónica.

El procedimiento de las muestras para su observación al microscopio electrónico de transmisión se realizó según la técnica del corte fino, la cual comprende los siguientes pasos: fijación, lavado, coloración en bloque, deshidratación, infiltración, inclusión, corte, coloración y observación.

Microscopía Electrónica

La morfología e integridad de las vesículas de membrana obtenidas por el método de precipitación diferencial con calcio fue observada al microscopio electrónico. Para esto se fijaron en glutaraldehído al 2% en cacodilato 0,1 M pH 7,2, por una hora a 4 °C y se post-fijaron con tetróxido de osmio durante media hora. Luego las vesículas se deshidrataron y se lavaron 3 veces con óxido de propileno y se centrifugaron a 400 g por 10 minutos. El sedimento se infiltró en una mezcla de epón-óxido de propileno y luego se incluyó en epón. Los cortes finos se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, para ser examinados al microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-500.

Determinación de la Actividad Enzimas Marcadoras.

Las actividades de las siguientes enzimas, se usaron como marcadores para estimar el grado de pureza relativa de la preparación de membrana de borde ciliado renal del TCP: succinato-citocromo-c-reductasa, NADH-citocromo-c-reductasa y β -glucuronidasa para mitocondrias, microsomas y lisosomas, respectivamente (22). También se determinó la actividad de la Na^+ - K^+ -ATPasa para membranas basolaterales (23), maltasa como marcador de membrana de borde ciliado renal del TCP (24), y Fosfatasa alcalina (25).

Determinación de Proteínas y Lípidos

La concentración de proteínas se estimó por el método de Lowry y cols. (26), Foster y Yang (27). Para la extracción de los lípidos se utilizó el método de Folcn y cols. (28). La determinación de ácidos grasos se realizó por medio de cromatografía gas-líquido utilizando un cromatógrafo Hewlett Packard 4820 A, previa esterificación por el método de Kates (29). Para la separación de fosfolípidos se utilizó la técnica de Skipski y cols. (30) y se cuantificaron por el método de Onen y cols. (31). El colesterol se determinó enzimáticamente y los Lípidos Totales por Chabrol y Charonnat (32). Ensayo de fluorescencia de polarización se midió en un espectrofluorómetro instrument, inc. urbana IL (33) (34). Electroforesis en geles de poliacrilamida: se utilizaron geles en concentración al 7.5% (P/V) de acrilamida en el sistema tri-glicina-SDS (35) (36). Electroforesis en geles de poliacrilamida: se utilizaron geles en concentración al 7.5% (P/V) de acrilamida en el sistema tri-glicina-SDS (35) (36). Electroforesis en geles de poliacrilamida: se utilizaron geles en concentración al 7.5% (P/V) de acrilamida en el sistema tri-glicina-SDS (35) (36). Para el ensayo de unión de [^3H] florizina a membrana de borde ciliado de tubo contorneado proximal se utilizó el método descrito por Malathi y Cols (20).

Análisis Estadístico.

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado, promediando los resultados, y estos fueron sometidos al criterio estadístico habitual para números menores de 100 determinaciones. Se calcularon los promedios \pm las respectivas desviaciones y errores estándares. Se determinó la significación estadística de las diferencias entre las medias, mediante la prueba del "t" de Student cuyos valores se compararon en la respectiva tabla de distribución de FISHER y YATES para establecer las posibilidades "p", que representan los límites de la significación estadística.

RESULTADOS

Caracterización enzimática de la preparación de membranas de borde ciliado normal.

Como se muestra en la *Tabla I* en la fracción de membranas de borde ciliado renal del TCP se recupera aproximadamente 27% de la actividad de enzimas marcadoras de este organelo (maltasa y fosfatasa alcalina). Y la actividad específica de los mismos se incrementa 8 veces; por otro lado la recuperación de la actividad específica de enzimas marcadoras de otros organelos fue muy baja en estas preparaciones. Es importante destacar que la actividad de las enzimas antes mencionadas no fue afectada por el tratamiento con TAA.

En la *figura 1* se muestra una micrografía de las membranas de borde ciliado, donde se observan vesículas de forma y tamaño variable con muy poca o ninguna cantidad de material electrón denso en su interior. Estos resultados nos permiten asegurar que las membranas obtenidas por este método son altamente puras y adecuadas para los diferentes experimentos realizados.

Efecto de la Tioacetamida sobre la captación de Glucosa por las vesículas de membrana de Borde Ciliado Renal.

Los valores de captación de D-[U¹⁴C]-Glucosa (*Tabla 2*), obtenidos por las vesículas de membranas de BCR de ratas controles, incubadas con diferentes concentraciones de tioacetamida (1,0; 2,5 y 5,0 mg/dl), no variaron significativamente con relación a las no incubadas con TAA y fueron similares a los reportados previamente.

Anisotropía fluorescente de DPH en las membranas de borde ciliado renal.

En la *Tabla 3* se encuentran los valores de la anisotropía (r) fluorescente del DPH, se encontraron diferencias significativas [$p < 0,01$ (25 °C) y $p < 0,005$ (37 °C)] entre los grupos controles y tratados con TAA, a las dos temperaturas ensayadas. Los valores arrojados por el grupo tratado fueron más bajos que control, indicando membranas más fluidas en relación al segundo.

Composición lipídica de la membrana de Borde Ciliado Renal de ratas Controles y Tratados con Tioacetamida.

En la *Tabla 4* se muestra la composición de lípidos de la membrana de BCR, la relación lípido/proteína varió poco entre controles y tratados siendo significativo al nivel de $p < 0,05$. Con respecto a la relación colesterol/proteínas se encontró una disminución del 26,4% la cual es altamente significativa ($p < 0,005$), de igual manera se hallaron diferencias (disminución de 17,1%) significativas ($p < 0,005$) en los valores de la relación fosfolípidos/proteína entre controles y tratadas. En cuanto a la relación colesterol/fosfolípidos fue menor en éstas que en las primeras.

El fosfolípido encontrado en mayor proporción en las membranas controles fue la fosfatidiletanolamina, en cambio el fosfolípido más abundante en las tratadas fue la fosfatidilcolina; para ambos fosfolípidos hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 2 grupos de animales. La esfingomielina disminuyó en un 4% durante el tratamiento con TAA. Se encontraron valores similares de fosfatidilinositol y fosfatidilserina en ambos grupos (*Tabla 5*).

En cuanto al análisis de ácidos grasos realizado los fosfolípidos extraídos de las membranas de BCR de ratas controles y tratados, se muestra en la *Tabla 6*; se observaron disminuciones pequeñas, pero estadísticamente significativas en el contenido de ácido palmítico (2%) y ácido esteárico (2%), como consecuencia del tratamiento con TAA. Por el contrario se evidenció un incremento de mayor magnitud (5%) en el contenido de ácido eicosatrienoico en los fosfolípidos de membrana de animales tratados. En el resto de los ácidos grasos estudiados, no se observó con diferencias.

Efectos de la Tioacetamida sobre la unión de [³H] Florizina a membranas de Borde Ciliado Renal.

En la *Figura 2* se muestra la gráfica de Scatchard, a partir de la cual se calcularon las siguientes constantes: para K_D : 0,78 μ M para controles y para tratadas 0,85 μ M correspondiendo a un 9% de incremento; el número de receptores para controles fue de 69 pmol/mg de proteína y para tratadas 33 pmol/mg de proteína, este valor representa un 52,2 % de disminución del número de receptores con respecto al control. La K_A para el control fue de 1.29 μ M y para las tratadas de 1,18 μ M lo cual corresponde a una disminución del 8,5%.

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

En la *Figura 4* se representa el trazado densitométrico de los polipéptidos controles (C), tratados (T) y patrones (P). Se nota la disminución de varios polipéptidos, uno cuyo peso es cercano a 73 kDa, otros de 22 y 212 kDa (señalados con flechas en el control) en el trazado correspondiente a las membranas tratadas.

Las vesículas de membranas aisladas según lo indicado en métodos se incubaron durante 36 minutos con diferentes concentraciones (4.5, 9.0, 13.5, 18.0 y 22.5 pmol de [³H] Florizina a temperatura ambiente), la reacción se detuvo por filtración en filtros millipore, y se midió la radioactividad. Se emplearon cortezas renales de 3 animales por experimento (10 a 15 mg de prot./ml). Cada punto representa el promedio de 4 experimentos.

El estudio ultramicroscópico no mostró ningún cambio morfológico en el borde ciliado renal (fotos no mostradas), no se observó disrupción de las uniones estrechas entre las células, ni cambios en las mitocondrias, indicando que a la concentración utilizada, la TAA no produce alteraciones morfológicas apreciables por las técnicas aplicadas, a diferencia de concentraciones mayores que producen necrosis tubular renal (17), incluyendo hipertrofia nuclear, incremento del retículo endoplásmico liso y la presencia de cuerpos electrón denso en la porción apical de las células de evolución temprana en relación a la lesión. También las cifras halladas para la captación de D-[U¹⁴C]-Glucosa (Tabla 2) por las vesículas de membrana de BCR incubadas "in vitro" con TAA, a diferentes concentraciones, indican que no hay un efecto directo de la droga sobre el transportador de Na⁺-glucosa. De igual manera Rees y cols. (14) y Barker y Cols. (17), en estudios por microscopía electrónica, no encontraron daño en el epitelio intestinal (tejido que no es capaz de metabolizar la TAA) después de la administración crónica por vía oral de TAA a grandes dosis (20 mg/100 g de peso). Concordando de esta manera con que el efecto de la TAA sobre las células hepáticas y renales se realiza por medio de otros compuestos provenientes de su metabolismo, tal como la Tioacetamida-S-Oxido, la cual se ha comprobado que es 10 veces más activa que la TAA (17). Basado en lo antes expuesto, los hallazgos encontrados por Pradere (24) sobre la captación de D[U¹⁴C]-Glucosa (12,2% de disminución en relación a los controles) y la disminución de la reabsorción tubular de glucosa en animales tratados con TAA, indica evidentemente que la acción sobre el transportador de glucosa la realiza otra molécula diferente a la TAA. En vista de estos hallazgos se estudió de una manera diferencial, en forma directa, el estado físico y la composición lipídica de la MBCR de ratas controles y tratadas.

Existen varias técnicas para ello, en este trabajo se utilizó la fluorescencia de polarización donde se midió la anisotropía del DPH. Los resultados (*Tabla 6*) indican que las MBCR tratadas son más fluidas que la MBCR controles. Es evidente que las modificaciones de los lípidos de la membrana y/o la viscosidad afectan la actividad de una amplia variedad de proteínas unidas a ella. Para definir los factores responsables de la disminución aparente de la fluidez de la MBCR tratadas se examinó su composición. Estudios previos realizados en su mayor parte en sistemas de modelos de membranas, han definido una serie de factores que determinan la fluidez, entre ellos está la relación lípido/proteína (R L/P). Dicha relación, se ha descrito como un factor muy importante para determinar la fluidez de las membranas (37); en estudios en MBCR y basolaterales renales (MBLR) se ha encontrado que la R L/P es mayor en MBLR (0,67) que en MBCR (0,61) (38) y por estudios de anisotropía, se halló que la primera es más fluida que la segunda; Brasitus y Schachter (39) encontraron resultados similares en membranas de enterocitos. En nuestro estudio la R L/P es mayor en MBCR controles que tratadas, estos resultados no concuerdan con los hallazgos reportados, sin embargo la R L/P no es el único factor determinante de la fluidez de las membranas, hay otros, entre ellos el colesterol (40) y los ácidos grasos (41).

También se ha demostrado que el contenido relativo de fosfolípidos y colesterol tiene una influencia importante sobre el estado físico de membranas naturales y artificiales (42) (43) (44) (45). Un incremento en el contenido de colesterol, restringe el movimiento molecular en las porciones más hidrofóbicas de las membranas. Los valores obtenidos de colesterol y fosfolípidos (FL) de las MBCR de controles son similares a los encontradas por Levi y cols. (46) cuyos valores fueron de $408 \pm 12,2$ nmol/mg de proteína para colesterol y 501 ± 12 nmol/mg de proteína para FL, y las cifras halladas por Levi y cols. (47) para Colesterol 422 ± 15 nmol/mg de proteína y FL 491 ± 12 nmol/mg de proteína. En este estudio encontramos una diferencia significativa entre los valores para colesterol, FL y la relación Colesterol/FL (R C/FL) de las membranas controles y tratadas (*Tabla 2*), las cifras para C/FL son de 0,96 para controles y 0,88 para tratadas, estos datos concuerdan con los encontrados para la anisotropía del DPH que indican que las MBCR tratadas son más fluidas que las controles y estos resultados están de acuerdo con los reportados por otros investigadores (48) (38) (46), en los cuales estudiando la fluidez de las membranas de BCR y BLR encontraron una correlación entre la disminución de la R C/FL y la fluidez de las mismas.

En estudios realizados utilizando sistemas artificiales, se ha demostrado que el incremento de ácidos grasos insaturados de cadena corta producen membranas más fluidas (49) (50). Las MBCR controles contienen cantidades porcentuales significativamente mayores de ácido palmítico y ácido esteárico y las tratadas mayores concentraciones de ácido eicosatrienoico, lo cual nos da otro factor a favor de la mayor fluidez de estas membranas. En cuanto a los diferentes tipos de fosfolípidos, llama la atención la disminución significativa de fosfatidiletanolamina (FE) en MBCR tratadas en relación a las controles, ya que la FE es capaz de regular la actividad de membranas y actualmente diversos grupos de investigadores están de acuerdo que la FE regula la proteína de la bomba de calcio (51), aunque no está claro el porqué la FE es capaz de regular esta proteína, se conoce que la superficie de bicapas formadas por FE es diferente a la de otros fosfolípidos. La superficie de FE está hidratada pobremente y tiende a interactuar con otras superficies si ellas se

encuentran sobre otras bicapas o proteínas, más bien que interactuar directamente sobre la fase acuosa (52).

La Esfingomielina (ES), en virtud de su estructura intrínseca, forma fuertes enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares (53). También se ha demostrado que la ES natural contiene ácidos grasos de cadena más larga y menos insaturados cuando se compara con la fosfatidilcolina (FC) (54). Hise y cols. (38) han encontrado resultados similares en membrana de riñón de rata. De este modo es importante el cociente existente entre FC/ES ya que es otro factor determinante en el estado físico de las membranas, de tal manera que valores aumentados están asociados a membranas más fluidas. Tanto los valores porcentuales (*Tabla 4*) de FC, como la relación FC/ES fueron significativamente mayores en MBCR tratadas que en controles, y las cifras de ES, fueron más altas en éstas que en las tratadas. Molitoris y Kinne (55) reportaron una R FC/ES alta correlacionada con aumento de la fluidez de MBCR isquémicas, de igual manera otros autores han encontrado valores similares con relación a cambios en R FC/ES y fluidez de las membranas (38) (45) (56).

Todos estos resultados indican que existe un aumento de la fluidez de la MBCR de ratas tratadas y éste es un factor, posiblemente entre otros, responsable de la disminución del transporte de la hexosa ya que, el transportador Na^+ -glucosa es extremadamente sensible al medio ambiente físico que lo rodea disminuyendo su eficiencia, al aumentar la fluidez (57) (19).

Por otra parte, los valores encontrados para el K_D para florizina en MBCR controles son similares a los hallados por Aronson (58) y Chesney y cols. (59), aunque las cifras del número de receptores fue inferior a los reportados por el primero (265 pmoles/mg de proteína de membrana), pero similares a los de Chesney y Cols. (59) (77 pmoles/mg de proteína). La diferencia no significativa de los valores de la K_A y K_D de las MBCR controles y las tratadas, indica que no existe una pérdida relativa de la afinidad del receptor de florizina en MBCR de ratas tratadas.

El número de sitios de unión a florizina está disminuido en MBCR tratadas, en un 52,2%, en relación a las controles. La TAA claramente reduce la unión de florizina y el análisis de los datos del gráfico de Scatchard revela que la reducción se debió a una alteración en el número de sitios de unión y no por su afinidad. Hay diversos mecanismos posibles por medio de los cuales un metabolito de la TAA puede reducir el número de sitios de unión de florizina. En primer lugar, la pérdida de unidades de proteínas transportadoras, presentes en los BCR o la destrucción de los sitios de unión dentro del BCR, lo que resultaría disminuida la unión de florizina. Por otra parte, existe evidencia que la unión del Na^+ al transportador induce un cambio conformacional en el sitio de adhesión para glucosa, también se ha descrito que éste puede estar en el mismo polipéptido, de esta manera podría alterarse drásticamente el sitio de unión de Na^+ , y así no exponerse el sitio de unión de glucosa, al no ocurrir el cambio conformacional o a la unión de glucosa a las unidades de proteínas transportadoras existentes; esta última posibilidad podría deberse a una alteración o a modificaciones en el equilibrio entre subunidades asociadas y no asociadas (60). Esta alteración en el número de sitios de unión, al relacionarla con los experimentos de electroforesis en PAGE nos indica la posibilidad de que la proteína transportadora esté reducida, ya que al efectuar la densitometría a estos geles (*Figura 3*), se encontró la

disminución de varios polipéptidos, entre ellos uno de Mr. aproximado de 73 KDa, peso similar al encontrado para el transportador de glucosa (61). La disminución de esta proteína, podría deberse a disminución en la síntesis de ARNm del transportador, ya que se ha reportado que la TAA es capaz de inhibir la formación de algunas proteínas a nivel de la transcripción (62).

En este trabajo se ha demostrado que la acción de la TAA sobre el transporte Na^+ -glucosa, por las vesículas de MBCR, se debe por lo menos en parte, a alteraciones en su composición lipídica. Esto resulta a la vez en un incremento en la fluidez de la membrana y disminución de la captación Na^+ -glucosa. La capacidad disminuida del transportador para unirse a florizina; puede ser consecuencia de los cambios en la fluidez de las membranas; o pudiera ser explicado por una disminución de la proteína transportadora, lo cual está de acuerdo con las modificaciones observadas en el perfil polipéptidico de las MBCR; esto último necesita ulterior estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Childs, J.F. and Siegler, E.A. (1946). Controlling Orange Decay. *Ind. & Eng. Chem.* 38: 82-86.
2. Fitzhugh, O.G. and Nielson, A.A. (1948). Liver tumors in rat fed thiourea or thioacetamide. *Science.* 108: 626-628.
3. Gupta, D.N. (1955). Production of cancer of the bile ducts with thioacetamide. *Nature.* 175: 257-259.
4. Dasgupta, F.F., Chatterjee, R. and Chowdhury, J.R. (1981). Thioacetamide induced carcinoma in rat. *Oncology.* 38: 249-255.
5. Becker, F.F. (1983). Thioacetamide hepatocarcinogenesis. *J. Natl. Cancer. Inst.* 71: 553-557.
6. Rather, L.J. (1951). Experimental alteration of nuclear and cytoplasmic components of the liver cell with thioacetamide. *Bull. Johns. Hopkins. Hosp.* 88: 38-58.
7. Zimmermann, T., Franke, H. and Dargel, R. (1986). Studies on lipid and lipoprotein metabolism in rat liver cirrhosis induced by different regimens of thioacetamide administration. *Exp. Pathol.* 30: 109-117.
8. Nikolaev, V., Kerimova, M., Naydenova, E. Ivanov, E. and Adjarov, D. (1988). Biochemical changes in the rat after chronic thioacetamide intoxication. *Toxicology.* 48: 81-85.
9. Lawrence, G.M., Beesley, C.H., Jepson, M.A. and Walker, D.G. (1989). Thioacetamide-induced changes in hepatic hexokinase isoenzymes. *Toxicology.* 58: 21-31.
10. González-Mujica, F. and Mathias, A.P. (1973a). Studies of nuclei separated by zonal centrifugation from liver rats treated with thioacetamide. *Biochem. J.* 132: 163-183.
11. González-Mujica, F. and Mathias, A.P. (1973b). Non-histone chromosomal proteins from different class of liver nuclei prepared from normal and thioacetamide treated rats. *Biochem. J.* 133: 441-455.

12. Malvaldi, G., Saviozzi, M., Longo, V. and Gervasi, P.G. (1988). Studies on the Mechanism of the Carcinogenetic Activity of Thioacetamide on rat liver. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 102: 299-304.
13. Arni, P. (1989). Review on the genotoxic activity of thioacetamide. *Mutation. Res.* 221: 153-162.
14. Rees, K.R., Rowland, G.F. and Varcoe, J.S. (1966). The metabolism of tritiated thioacetamide in the rat. *Int. J. Cancer.* 1: 197-206.
15. Porter, W.R., Gudzinovicz, M.J. and Neal, R.A. (1979). Thioacetamide-induced hepatic necrosis. II. Pharmacokinetics of thioacetamide and thioacetamide-S-oxide in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208: 386-400.
16. Vadi, H.V. and Neal, R.A. (1981). Microsomal activation of Thioacetamide-s-oxide to a metabolite (s) that covalently binds to calf thymus DNA and other polynucleotides. *Chem. Biol. Inter.* 35: 25-38.
17. Barker, E. and Smuckler, E. (1974). Nonhepatic Thioacetamide injury. II. The morphologic features of proximal renal tubular injury. *Am. J. Pathol.* 74: 575-590.
18. De Sa Moita, R., Pradere, J.D. y González-Mujica, F. (1989). Metabolismo de la Glucosa durante la intoxicación con Tioacetamida. *Rev. Fac. Med.* XXII. 39-47.
19. Wagner, S., Sorgenfrei, D., Christowa, M., Senkel, M. and Ebel, H. (1986). Effects of fatty acids on membrane fluidity and D-glucose transport in renal brush border membranes of the rat. *Pflugers. Arch.* 406: R51.
20. Malathi, P., Preiser, H., Fairclough, P., Mallet, P. and Crane, R. (1979). A rapid method for the isolation of kidney brush border membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 554: 259-273. *Biochim. Biophys. Acta.* 554: 259-273.
21. Wu, J.S.R. and Lever, J.E. (1987). Monoclonal Antibodies That bind the Renal Na⁺/Glucose Symport System. 1. Identification. *Biochemistry.* 26: 5783-5790.
22. Bergmeyer, H. (1965). *Methods of enzymatic analysis.* 2nd. Edition. p. 344-869, New York, Academic Press.
23. Cohen, M., Klepser, H. and Shapiro, E. (1986). Insulin stimulates renal glomerular sodium-potassium triphosphatase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 856: 182-184.
24. Pradere, J.D. y González-Mujica, F. (1986). Efecto de la tioacetamida sobre el transporte renal de glucosa. *Resúmenes de la XXXVI Convención Anual de ASOVAC.* p. 61.
25. Andersch, M.A. and Szcypinski, A.J. (1947). Determination in serum of alkaline phosphatase with p-Nitrophenylphosphate. *Am. J. Clin. Pathol.* 17: 571-574.
26. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
27. Foster, J.F. and Yang, J.T. (1954). Competitive interactions between proteins and surface-active anions with ovalbumine and bovine plasma albumine. *J. Am. Chem. Soc.* 76: 1015-1019.
28. Folch, C.H., Lees, W. and Sloane, G. (1975). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
29. Kates, P. (1965). Simplified procedures for hydrolysis or methanolysis of lipids. *J. Lipid. Res.* 5: 132.
30. Skipski, V.P., Peterson, F.R., Sanders, J. and Barclay, M. (1963) Thin Layer Chromatography of fosfolipids using silica gel without calcium sulfate binder. *J. Lipid. Res.* 4: 227-228.

31. Chen, P.S., Toribara, T. and Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Annal. Chem.* 28: 1756-1758.
32. Chabrol, E. y Charonnat, P. (1973). Métodos Químicos. En *Los Lípidos Laboratorio y Clínica*. Ed. Toray. Barcelona.
33. Van Blitterswijk, W.J., Van Hoeveven, R.P. and Van Deer Meer, B.W. (1981). Lipid Structural order Parameters (reciprocal of fluidity) in biomenbranes derived from stedy-state fluorecence depolarization measurements. *Biochim. Biophys. Acta.* 644: 323-332.
34. Chong, P.L., Fortes, P.A. and Jameson, D.M. (1985). Mechanisms of inhibition of (Na,K)-ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes. *J. Biol. Chem.* 260: 14484-14490.
35. Laemml, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
36. Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability molecular weight determinations by dobecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 3786-3792.
37. Schachter, D. and Shinitzky, M. (1977). Fluorescence polarization studies of rat intestinal microvillus membranes. *J. Clin. Invest.* 59: 536-548.
38. Hise, M.K, Mantulin, W.W. and Weinman, E.J. (1984). Fluidity and composition of brush border and basolateral membranes from rat kidney. *Am. Physiol.* 247: F434-F439.
39. Brasitus, T.A. and Schachter, D. (1980). Lipid dynamics and lipid-protein interactions in rat enterocytes basolateral and microvillus membranes. *Biochemistry.* 19: 2763-2769.
40. Le Grimellec, C., Giocondi, M.C., Carrière, B., Carrière, S. and Cardinal, J. (1982). Membrane fluidity and enzyme activities in brush border and basolateral membranes of the dog kidney. *Am. J. Physiol.* 242: F246-F253.
41. Hise, M.K., Mantulin, W.W. and Weinman, E.J. (1986). Fatty acyl chain composition in the determination of renal membrane order. *J. Clin. Invest.* 77: 768-773.
42. Cogan, U., Shinitzky, G., Weber, G. and Nishida, T. (1973). Microviscosity and order in the hydrocarbon region of phospholipid and phospholipid-cholesterol dispersions determined with fluorescents probes. *Biochemistry.* 12: 521-528.
43. Vanderkoi, J., Fischkoff, S., Chance, B. and Cooper, R.A. (1974). Fluorescent probe analysis of the lipid architecture of natural and experimental cholesterol-rich membranes. *Biochemistry.* 13: 1589-1595.
44. Yeagle, P.L. (1985). Cholesterol and the cell Wu, J.S.R. and Lever, J.E. (1987). Monoclonal Antibodies That bind the Renal Na⁺/Glucose Symport System. 1. Identification. *Biochemistry.* 26: 5783-5790.
45. Bergmeyer, H. (1965). *Methods of enzymatic analysis*. 2nd. Edition. p. 344-869, New York, Academic Press.
46. Cohen, M., Klepser, H. and Shapiro, E. (1986). Insulin stimulates renal glomerular sodium-potassium triphosphatase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 856: 182-184.
47. Pradere, J.D. y González-Mujica, F. (1986). Efecto de la tioacetamida sobre el transporte renal de glucosa. *Resúmenes de la XXXVI Convención Anual de ASOVAC.* p. 61.

48. Andersch, M.A. and Szczypinski, A.J. (1947). Determination in serum of alkaline phosphatase with p-Nitrophenylphosphate. *Am. J. Clin. Pathol.* 17: 571-574.
49. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
50. Foster, J.F. and Yang, J.T. (1954). Competitive interactions between proteins and surface-active anions with ovalbumine and bovine plasma albumine. *J. Am. Chem. Soc.* 76: 1015-1019.
51. Folch, C.H., Lees, W. and Sloane, G. (1975). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
52. Kates, P. (1965). Simplified procedures for hydrolysis or methenolysis of lipids. *J. Lipid. Res.* 5: 132.
53. Skipski, V.P., Peterson, F.R., Sanders, J. and Barclay, M. (1963) Thin Layer Chromatography of fosfolipids using silica gel without calcium sulfate binder. *J. Lipid. Res.* 4: 227-228.
54. Chen, P.S., Toribara, T. and Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Annal. Chem.* 28: 1756-1758.
55. Chabrol, E. y Charonnat, P. (1973). Métodos Químicos. En Los Lípidos Laboratorio y Clínica. Ed. Toray. Barcelona.
56. Van Blitterswijk, W.J., Van Hoeveven, R.P. and Van Deer Meer, B.W. (1981). Lipid Structural order Parameters (reciprocal of fluidity) in biomenbranes derived from stedy-state fluorescence depolarization measurements. *Biochim. Biophys. Acta.* 644: 323-332.
57. Chong, P.L., Fortes. P.A. and Jameson, D.M. (1985). Mechanisms of inhibition of (Na,K)-ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes. *J. Biol. Chem.* 260: 14484-14490.
58. Laemmlli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
59. Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability molecular weight determinations by dobecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 3786-3792.
60. Schachter, D. and Shinitzky, M. (1977). Fluorescence polarization studies of rat intestinal microvillus membranes. *J. Clin. Invest.* 59: 536-548.
61. Hise, M.K, Mantulin, W.W. and Weinman, E.J. (1984). Fluidity and composition of brush border and basolateral membranes from rat kidney. *Am. Physiol.* 247: F434-F439.
62. Brasitus, T.A. and Schachter, D. (1980). Lipid dynamics and lipid-protein interactions in rat enterocytes basolateral and microvillus membranes. *Biochemistry.* 19: 2763-2769.
63. Le Grimellec, C., Giocondi, M.C., Carrière, B., Carrière, S. and Cardinal, J. (1982). Membrane fluidity and enzyme activities in brush border and basolateral membranes of the dog kidney. *Am. J. Physiol.* 242: F246-F253.
64. Hise, M.K., Mantulin, W.W. and Weinman, E.J. (1986). Fatty acyl chain composition in the determination of renal membrane order. *J. Clin. Invest.* 77: 768-773.
65. Cogan, U., Shinitzky, G., Weber, G. and Nishida, T. (1973). Microviscosity and order in the hydrocarbon region of phospholipid and phospholipid-cholesterol dispersions determined with fluorescents probes. *Biochemistry.* 12: 521-528.

66. Vanderkoi, J., Fischkoff, S., Chance, B. and Cooper, R.A. (1974). Fluorescent probe analysis of the lipid architecture of natural and experimental cholesterol-rich membranes. *Biochemistry*. 13: 1589-1595.
67. Yeagle, P.L. (1985). Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta*. 822: 267-287.
68. Molitoris, B.A. and Hoilien, C. (1987). Static and Dynamic Components of Renal Cortical Brush Border and Basolateral Membrane Fluidity: Role of Cholesterol. *J. Membrane Biol.* 99: 165-172.
69. Levi, M., Baird, B.M. and Wilson, P.V. (1990). Cholesterol Modulates Rat Renal Brush Border Membrane Phosphate Transport. *J. Clin. Invest.* 85: 231-237.
70. Levi, M., Jameson, D.M. and Van der Meer, B.W. (1989). Role of BBM lipid composition and fluidity in impaired renal Pi transport in aged rat. *Am. J. Physiol.* 256: F85-F94.
71. Bode, F., Baumann, K. and Kinne, R. (1976). Analyses of the pinocytic process in rat kidney. II. Biochemical composition of pinocytic vesicles compared to brush border microvilli, lysosomes and basolateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 433: 294-310.
72. Stubbs, C.D. and Smith, A. (1984). The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta*. 779: 89-137.
73. Lentz, B., Barenholz, Y. and Thompson, T. (1976). Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. I. Single component phosphatidylcholine liposomes. *Biochemistry*. 15: 4521-4528.
74. Yeagle, P.L. (1989). Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB. J.* 3: 1833-1842.
75. Yeagle, P.L. and Sen, A. (1986). Hydration and the lamellar to hexagonal II phase transition of phosphatidylethanolamine. *Biochemistry*. 25: 7518-7522.
76. Shinitzky, M. and Henkart, P. (1979). Fluidity of cell membranes corrent concepts and trends. *Int. Rev. Cytol.* 60: 121-145.
77. Schmidt, C.F., Barenholz, Y. and Thompson, T.E. (1977). A nuclear magnetic resonance study of sphingomyelin in bilayer systems. *Biochemistry*. 16: 2649-2652.
78. Molitoris, B.A. and Kinne, R. (1987). Ischemia Induces Surface Membrane Dysfunction. *J. Clin. Invest.* 80: 647-654.
79. Carmel, G., Rodríguez, F., Carrière, S. and Le Grimellec, C. (1985). Composition and physical properties of lipids from plasma membranes of dog kidney. *Biochim. Biophys. Acta*. 818: 149-157.
80. Fernández, Y.J., Biogegrain, R.M., Cambon-Gross, C.D. and Mitjavila, S.E. (1984). Sensitivity of Na⁺-coupled d-glucose uptake, Mg²⁺ATPase and sucrase to pertubation of the fluidity of brush border membrane vesicles induced by n-aliphatic alcohols. *Biochim. Biophys. Acta*: 770: 171-177.
81. Arosón, P.S. (1978). Energy-dependence of phlorizin binding to isolated renal microvillus membranes. *J. memb. Biol.* 42: 81-98.
82. Chesney, R., Sacktor, B. and Kleinzeller, A. (1974). The binding of phlorizin to the isolated luminal membrane of the renal proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta*. 332: 263-273.

83. Peerce, B.E. and Wright, E.M. (1984b). Sodium-induced conformational changes in the glucose transporter of intestinal brush borders. *J. Biol. Chem.* 259: 14105-14112.
84. Hediger, M., Coady, M.J., Ikeda, T.S. and Wright, E.M. (1987). Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature.* 330: 379-381.

Tabla 1

PERFIL ENZIMATICO DE LAS MEMBRANAS DE BORDE CILIADO RENAL

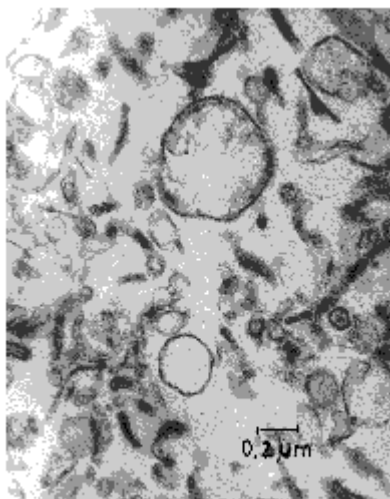
Enzima	Homogenado (H)	Membrana (Borde Ciliado)	Actividad Relativa (M/H)	Recuperación (%)
Maltasa	126.4±0.2	1180.5±0.3	9.4±0.2	27.4±1.2
Fosfatasa A.	9.1±2.1	63.8±8.02	7.0±1.8	26.0±1.4
NADH-cit-c-reductasa	47.5±0.3	4.5±0.6	0.09±0.3	0.25±0.03
b-Glucoronidasa	29.5±0.1	10.6±0.5	0.35±0.1	1.2±0.1
Na+K+ATPasa	101.9±0.4	42.7±0.5	0.41±0.1	0.90±0.1
Succinato-cit-c-reductasa	37.4±0.2	1.6±0.2	0.04±0.2	0.10±0.09

Los datos representan el promedio ± desviación estándar de 3 a 5 determinaciones independientes. Las actividades de las enzimas se expresaron de acuerdo a lo siguientes criterios:

- Maltasa: nmoles de glucosa producida/mg de proteína x minuto.
- Fosfatasa Alcalina: nmoles de p-nitrofenil fosfato/mg de proteína x minuto.
- NADH-cit-c-reductasa: nmoles de citocromo reducido/mg de proteína x minuto.
- B-glucoronidasa: wg de fenoltaleina liberados/mg de proteína x hora.
- Na+K+ATPasa nmoles de Pi liberados/mg de proteína x minuto.
- Succinato-cit-c-reductasa: nmoles de citocromo reducido/mg de proteína x minuto.

FIGURA 1

Micrografía Electrónica de Membranas de borde Ciliado Renal aisladas por el método de precipitación diferencial con calcio



Se observa las membranas de tamaño variable, poseen poca cantidad de material electrón denso en su interior y tiene una forma vesicular adecuada para los estudios de transporte y de unión de florizina.

Tabla 2

EFECTO "IN VITRO" DE LA TIOACETAMIDA SOBRE LA CAPTACION DE GLUCOSA POR LAS VESICULAS DE MEMBRANA DE BORDE CILIADO RENAL

Concentración Tioacetamida mg%	Captación Glucosa pmol/mg de proteína	Porcentaje "p"	"p"
0	983 ± 45	100	NS
1,0	910 ± 52	93	NS
2,5	1050 ± 62	107	NS
5,0	945 ± 55	96	

Los valores representan el promedio ± desviación estándar de dos experimentos independientes. NS = diferencia no significativa con respecto al experimento control.

TABLA 3

**ANISOTROPIA FLUORESCENTE DEL DEFENILHEXATRIENO EN
MEMBRANAS DEL BORDE CILIADO RENAL DE RATAS
CONTROLES Y TRATADOS CON TIOACETAMIDA**

TEMPERATURA	ANISOTROPIA		"p"
	Control	Tratadas	
25°C	0,242±0,0003	0,221±0,002	0,01
37°C	0,225±0,002	0,200±0,004	0,005

Los datos representan el promedio ± error estándar de 5 determinaciones independientes, en cada una se utilizaron las membranas de 3 animales, "p" indica la diferencia estadística entre los grupos.

TABLA 4

**COMPOSICION LIPIDICA DE LAS MEMBRANAS DE BORDE CILIADO RENAL
DEL TUBO CONTORNEADO PROXIMAL DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS
CON TIOACETAMIDA**

	Controles	Tratadas (TAA)	«p»
Relación Lípido/Proteína (mg/mg)	0.67±0.08	0.61±0.08	0.05
Colesterol nmol/mg de Proteína	440±7.1	324±5.3	0.005
Fosfolípidos nmol/mg de proteína	456±14.0	378±10.5	0.005
Relación Colesterol/Fosfolípidos	0.96±0.01	0.88±0.01	0.05

Los datos representan el promedio ± error estándar de 12 determinaciones independientes, en cada determinación se utilizó las membranas de 3 animales.

TABLA 5

**RELACION PORCENTUAL DE FOSFOLIPIDOS EN MEMBRANAS DE
BORDE CILIADO RENAL DE RATAS CONTROLES Y TRATADOS
CON TIOACETAMIDA**

Fosfolípidos	Controles	Tratados	«p»
Fosfatidilinositol	1.4±0.1	1.7±0.1	NS
Fosfatidiletanolamina	32.5±1.2	27.2±1.3	0.005
Fosfatidilserina	13.0±0.6	13.3±0.3	NS
Fosfatidilcolina	31.2±1.0	39.8±1.4	0.05
Esfingomielina	21.4±0.6	17.5±0.7	0.05

Los datos representan el promedio ± error estándar de 8 experimentos independientes, en cada ensayo se utilizó membranas de 3 animales. Ns = diferencia no significativa.

TABLA 6

COMPARACION DE LOS ACIDOS GRASOS DE LOS FOSFOLIPIDOS MEMBRANAS DE BORDE CILIADO RENAL DE RATAS CONTROLES Y TRATADOS CON TIOACETAMIDA

Acido Graso	Controles	Tratados	«p»
C 16:0	22.2± 0.7	19.9± 0.6	0.02
C 17:0	0.6± 0.05	0.7± 0.06	NS
C 18:0	20.0±0.4	18.0±1.0	0.01
C 18:1	10.6±0.2	10.1±0.2	NS
C 18:2	9.5±0.6	9.6±0.5	NS
C 20:3	10.8±1.0	15.4±1.5	0.01
C20:4	22.2±0.9	21.7±0.5	NS
C 20:5	1.2±0.06	0.6±0.6	0.05
C 22:6	2.1±0.09	2.0±0.08	NS

Los datos representan el promedio ± error estándar de 12 determinaciones independientes.

Los valores se expresan en porcentaje del total de ácidos grasos.

En cada determinación se utilizaron 3 animales. Ns = diferencia no significativa.

Figura 2

UNION DE FLORIZINA A LA MEMBRANA DEL BORDE CILIADO DEL TUBO CONTORNEADO PROXIMAL DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON TAA

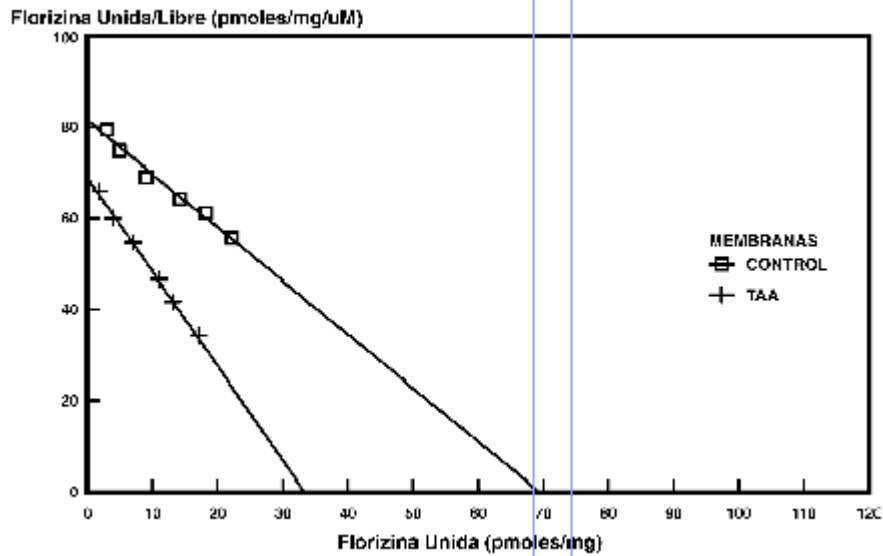
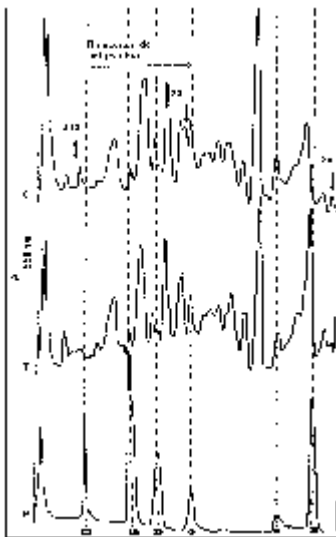


Gráfico de Scatchard

Registro densitométrico de los polipéptidos de membrana de borde Tioacetamida. El trazado P corresponde a los polipéptidos usados como patrones. Los números bajo las líneas discontinuas (de izquierda a derecha) representan la Mr x 103 de Miosina, b-Galactosidasa, Fosforilasa B, Albúmina Bovina, Ovolabumina y Anhidrasa Carbónica. Registro densitométrico de los polipéptidos de membrana de borde Tioacetamida. El trazado P corresponde a los polipéptidos usados como patrones. Los números bajo las líneas discontinuas (de izquierda a derecha) representan la Mr x 103 de Miosina, b-Galactosidasa, Fosforilasa B, Albúmina Bovina, Ovolabumina y Anhidrasa Carbónica.

Figura 3



Registro densitométrico de los polipéptidos de membrana de borde Tioacetamida. El trazado P corresponde a los polipéptidos usados como patrones. Los números bajo las líneas discontinuas (de izquierda a derecha) representan la Mr x 103 de Miosina, b-Galactosidasa, Fosforilasa B, Albúmina Bovina, Ovolabumina y Anhidrasa Carbónica. Registro densitométrico de los polipéptidos de membrana de borde Tioacetamida. El trazado P corresponde a los polipéptidos usados como patrones. Los números bajo las líneas discontinuas (de izquierda a derecha) representan la Mr x 103 de Miosina, b-Galactosidasa, Fosforilasa B, Albúmina Bovina, Ovolabumina y Anhidrasa Carbónica.