

ANALES DE BIOLOGIA, 10 (Biología General, 2), 1986: 3-19  
SECRETARIADO DE PUBLICACIONES - UNIVERSIDAD DE MURCIA

## ASIMILACIÓN METABÓLICA DE LOS ALCOHOLES EN *DROSOPHILA*: NUTRICIÓN Y DETOXIFICACIÓN\*

S. Atrian\*\* & R. González-Duarte\*\*

Recibido: marzo 1986

### SUMMARY

Alcohol metabolism in *Drosophila*: its relevance in nutrition and detoxification

Alcohol metabolism in *Drosophila* has recently attracted a lot of interest probably due to the essential role that the enzyme alcohol dehydrogenase plays in alcohol transformation. Species differ markedly in alcohol tolerance and this is attributed to ADH. While some species can cope with high ethanol concentrations (28%), others do not survive when reared in minimal amounts (0.9%). Most of the species belong to an intermediate group being able to tolerate and make use of alcohols produced in fermenting fruits which frequently constitute their natural habitats, at least during embryonic and larval development.

The analysis of ethanol metabolism and other primary alcohols, will help to establish not only the biochemical transformations, the enzymes involved and the relationships between other metabolic pathways but also to clarify the various factors relevant to the species adaptation towards alcohol-rich or moderately rich environments. Different types of evidence seem to indicate that one of these key factors is clearly ADH. In its absence, species become extremely sensitive to ethanol. Yet, it is still unclear which enzyme features account for higher ethanol tolerance. Available data suggest that the kinetic coefficient  $V_{max}$  and the quantity of enzyme synthesized could be the most relevant factors in alcohol adaptation. On the other hand, kinetic and structural studies of ADH reveal that ethanol utilization probably represents a recent evolutionary acquisition and was not associated initially with the enzyme.

Other enzymatic systems help *Drosophila* in the exploitation of alcohol-rich environments, although they only account for some 10% of alcohol utilization. Aldehydes produced are further oxidized to carboxylic acids and this seems to be produced by an aldehyde dehydrogenase (ALDH), recently characterized in *Drosophila*, which shares relevant biochemical properties with liver ALDH. Ethanol is then eventually transformed to acetic acid and acetylCoA which may serve as substrate for fatty acid synthesis or be oxidized in the Krebs cycle.

All appears to be different when ADH acts on secondary alcohols. Highly toxic, metabolically inert compounds are produced which at the same time inactivate the enzyme. Nevertheless, ADH shows lowest  $K_m$  values with these substrates, something that cannot be easily explained, at least in biological terms. It has been claimed that greater affinity could be due to the type of chemical interaction between the substrate and the active site of the enzyme.

Studies have also been carried out to know the effect of ethanol and / or sucrose in alcohol metabolism to approach the real situation that *Drosophila* encounters in natural habitats. It has been proved that ethanol and sucrose, together or individually, exert a positive regulation on ADH activity. It is not clear what produces this effect: increased levels of synthesis of the enzyme, lower turnover rate, re-activation of preexisting less active molecular forms or if it is directly produced by these compounds or its metabolic intermediates. The positive regulatory effect of ethanol and sucrose combined only appears if sucrose concentration does not reach a threshold level, when this is exceeded, a negative effect would be produced. When sucrose, at permissible amounts under the inhibitory effect, is supplemented to an ethanol diet, positive metabolic regulation is also observed in the activities of lipogenic enzymes together with an increase in the triacylglycerol content.

\* La publicación de este trabajo ha sido posible gracias al disfrute de las ayudas de la CAICYT n.º 0821181 y 3446/83.

\*\* Departament de Genètica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Av. Diagonal 645.08028-Barcelona.

Other type of data seem to strenghten the view that ADH role in alcohol transfontation is not necessarily related to its possible function in intermediary metabolism. Among these are the facts that in the absense of ethanol ADH-negative mutants differ from wild-type individuals in these metabolic pathways and that sucrose alone can modulate ADH activity.

In *Drosophila*, a clear picture of the relationships between catabolic and anabolic pathways has not yet emerged and this also applies to individual pathways. Alcohol metabolism is a clear example: it is not known how the activities of enzymes involved in this process are regulated and if this is achieved through a direct or indirect effect. Until this stage is reached much of the meaning of the experimental results will be difficult to grasp. Obviously, there is a long way to go before there will be an amount of data comparable to other organisms, as is the case of mammals, frequently investigated because they serve as model systems for humans.

**Keywords:** Alcohol dehydrogenase, *Drosophila*, Alcohol metabolism.

## RESUMEN

El metabolismo de los alcoholes en *Drosophila* es objeto de múltiple interés científico, originado por el protagonismo que en él ejerce el enzima alcoholdehidrogenasa (ADH). En los últimos años, el aporte de nuevos resultados ha sido considerablemente rico y relevante, llegando a poner en duda algunos de los dogmas que durante largo tiempo rigieron este esquema metabólico y proporcionar, por fin, datos sobre otros enzimas implicados. El presente trabajo pretende revisar de modo exhaustivo y crítico los datos acumulados hasta la fecha, así como proporcionar una visión integradora de todos ellos en unas vías metabólicas basales e interrelacionadas.

**Palabras clave:** Alcoholdehidrogenasa, *Drosophila*, Metabolismo del alcohol.

## 1. INTRODUCCIÓN

El estudio de las vías enzimáticas de **metabolización** de los alcoholes en *Drosophila* constituye hoy en día un tema enmarcado en las disciplinas de la **genética** de poblaciones y la evolución, más que un puro centro de interés bioquímico. La **razón** de ello se halla, sin duda, en el enorme interés que ha suscitado el primero de los enzimas implicados: la alcoholdehidrogenasa de *Drosophila* (ADH: E.C. 1.1.1.1).

JOHNSON & DENNISTON (1964) describieron un **polimorfismo** enzimático para este locus en la especie *Drosophila melanogaster*. Las poblaciones naturales presentaban 2 aloenzimas mayoritarias: las formas ADH-FAST y ADH-SLOW, **distinguibles** según sus velocidades de migración en electroforesis sobre **geles** de almidón. Este fue el origen de numerosos estudios genético-poblacionales sobre este sistema enzimático. Además de los dos aielos mayoritarios mencionados, se han aislado posteriormente otros de presencia minoritaria en distintas poblaciones naturales. Cabe destacar las formas ADH-ULTRA FAST aislada en Rusia por GROSSMAN *et al.* (1970), y ADH FASTER THAN FAST, aislada en los E.E.U.U. por SAMPSELL (1977). Otros **alelos** fueron inducidos por mutagénesis en el laboratorio, como el **alelo** ADH-D, derivado de ADH-F; o numerosas cepas defectivas en actividad ADH —**mutantes** ADH-negativos — que han sido extremadamente útiles en los estudios metabólicos (GRELL *et al.*, 1968). En poblaciones naturales

se han detectado también formas **ADH-negativas**, en proporciones que oscilan según los períodos y localización geográfica: 1.3% en 1983 y 0.7% en 1984 en Australia; 0.09% en E.E.U.U. (North Carolina) y Londres (FREETH & GIBSON, 1985). Además de la movilidad **electroforética**, existen otros parámetros susceptibles de variabilidad, como, por ejemplo, la **termosensibilidad** de las formas activas del enzima (THORIG *et al.*, 1975; MILKMAN, 1976). Los diversos **aloenzimas** ADH-S y ADH-F comprenden una amplia gama de variabilidad en lo que respecta a la resistencia a la degradación térmica, aunque, en general, los enzimas ADH-S son más termorresistentes que los ADH-F. La relación del enzima ADH con un parámetro ambiental estimuló la búsqueda de un mecanismo que explicara el mantenimiento del **polimorfismo** enzimático en poblaciones naturales: se sugirió un valor adaptativo de los distintos **alelos** en situaciones ambientales concretas. Una primera aproximación exigía estudiar las correlaciones entre las frecuencias génicas de cada **alelo** en distintas poblaciones y algunos de los parámetros ambientales. VIGUE & JOHNSON (1973) demostraron que las frecuencias de los aielos F y S seguían una clina N-S en los E.E.U.U. La clina concordaba con el gradiente térmico de modo que ADH-F predominaba en el N, para dar paso, progresivamente, a ADH-S, que resultaba mayoritaria en la frontera mejicana. Además, BIRLEY & BARNES (1973) describieron que las líneas portadoras del **alelo** F presentaban mayor actividad enzimática

respecto a las S: éstas, en contrapartida, poseían un enzima más termoestable. Dichas propiedades constituyeron un argumento básico de la teoría seleccionista del mantenimiento del **polimorfismo**: F presentaría una mayor eficacia biológica en poblaciones frías y S en poblaciones templadas. DAVID & BOCQUET (1975) establecieron una **clina** paralela en Europa. Sin embargo, a pesar del atractivo de la hipótesis seleccionista, ésta no ha podido explicar todas las variaciones de frecuencias alélicas observadas en muchas poblaciones naturales.

La complejidad intrínseca que comporta la asignación de una mayor eficacia biológica a uno u otro aloenzima, se vio profundamente incrementada por el desconocimiento casi absoluto de la(s) **función(es)** fisiológica(s) de la ADH en *Drosophila* y de su papel dentro de las vías metabólicas de los alcoholes en este organismo. Se postuló que la presencia de una ADH suficientemente activa sería esencial para la tolerancia y aprovechamiento de estos compuestos (GRELL *et al.*, 1968; GIBSON, 1970; BRISCOE *et al.*, 1975) y, por tanto, uno de los parámetros ambientales reguladores de las frecuencias alélicas en poblaciones naturales de *Drosophila*. Así se ha comprobado que todas las especies que de modo persistente o eventual se capturan en ambientes muy ricos en etanol —puntos de elaboración vinícola— presentan actividad ADH superior a las restantes (MON-

CLUS & PREVOSTI, 1979; GONZÁLEZ-DUARTE *et al.*, 1986). *D. lebanonensis* representa un caso extremo de tolerancia (DAVID *et al.*, 1979) con una dosis letal 50 (LC 50) de aproximadamente 28% de etanol. Por el contrario, los mutantes **ADH-negativos** sólo toleran concentraciones muy bajas de alcoholes, hecho que confirma que la **actividad** ADH determina la **capacidad** de metabolizar estos compuestos. Algunas especies habrían utilizado esta capacidad para la colonización de nuevos hábitats **ecológicos**: aquellos que presentan elevadas concentraciones de compuestos alcohólicos. Sin embargo, no existe una clara correlación entre niveles de actividad ADH y tolerancia al etanol, o alcoholes en general, para todas aquellas especies situadas en las posiciones intermedias de la tabla de tolerancias (tabla 1) (ATRIAN & GONZÁLEZ-DUARTE, 1982). Se observa asimismo una falta de correlación entre las tolerancias larvaria y adulta, probablemente debida a una insuficiente permanencia del adulto en los frutos en **fermentación** para requerir una adaptación metabólica especial (DAVID & VAN HERREWEGE, 1983). Las larvas de muchas especies con notable actividad ADH no muestran tampoco ninguna preferencia especial hacia medios suplementados con etanol (HOUGOUTO *et al.*, 1982), ni las hembras adultas los prefieren para la ovoposición (RICHMOND & GERKING, 1979).

Todos los interrogantes reconducen a una cuestión principal: cuál o cuáles son las funciones básicas del enzima en el organismo, función que cabría esperar altamente relevante considerando que la proteína ADH supone por término medio un 1% de proteína soluble del individuo. Todo lo expuesto apunta a la metabolización de los alcoholes como función obvia de la ADH aunque quizás no la esencial. Los estudios cinéticos del enzima revelaron características de difícil interpretación: la afinidad hacia alcoholes primarios —a igual número de carbonos en su cadena— es mucho menor que frente a alcoholes secundarios, siendo estos últimos prácticamente ausentes de la naturaleza. Se desconocen las causas por las que el enzima ADH es más activo frente a un producto menos abundante, más tóxico y cuya catálisis conduce a su propia inhibición por intercambio de sus formas **isoméricas** más activas a menos activas (PAPEL *et al.*, 1979). Además *Drosophila* tolera niveles basales de **metanol** —comparables a los de los alcoholes primarios con cadena hidrocarbonada de 5 ó más carbonos— y sin embargo, la ADH se ha demostrado totalmente inactiva frente a aquel sustrato (DAVID *et al.*, 1976).

El etanol es, con gran diferencia, el alcohol menos tóxico de todos los probados y, a la vez,

TABLA 1. Tolerancias al etanol de adultos de diversas especies de *Drosophila* expresadas por sus LC50 desde el primer al cuarto día de tratamiento. (Datos de ATRIAN & GONZÁLEZ-DUARTE, 1982.)

Adult alcohol tolerance of some species of *Drosophila* expressed as the LC 50 after different periods (1 to 4 days) of treatment. (From ATRIAN & GONZÁLEZ-DUARTE, 1982.)

ESPECIES	LC 50/DÍAS			
	1	2	3	4
<i>D. hydei</i>	9.82	4.25	4.05	3.71
<i>D. willistoni</i>	6.25	4.71	4.06	3.18
<i>D. pavani</i>	6.13	4.11	3.20	0.58
<i>D. suboscuro</i>	6.11	4.03	2.39	0.89
<i>D. gaucha</i>	5.46	2.88	2.34	2.10
<i>D. bocqueti</i>	5.46	3.93	3.29	3.14
<i>D. teissieri</i>	5.34	3.35	2.88	2.56
<i>D. burlai</i>	5.00	3.68	2.78	2.14
<i>D. guanche</i>	4.86	3.97	3.00	2.19
<i>D. mauritiana</i>	4.60	3.32	3.24	2.70
<i>D. yakuba</i>	3.85	2.13	2.31	2.25
<i>D. kikkawai</i>	3.37	2.07	1.90	1.63
<i>D. erecta</i>	3.08	2.65	2.40	2.14
<i>D. littoralis</i>	2.88	2.77	2.36	2.25
<i>D. greeni</i>	2.72	1.68	1.37	1.24
<i>D. phalerata</i>	2.14	1.76	1.57	0.33

uno de los substratos frente al cual la ADH muestra un Km mayor. Persiste pues una aparente paradoja: la existencia de una relación inversa entre la afinidad del enzima y el grado de tolerancia hacia un determinado alcohol. Ahora bien, aproximar a un solo parámetro la tolerancia a los alcoholes no está de acuerdo con la realidad, ya que la metabolización de estos compuestos, sea con fines nutritivos o detoxificantes, supone inexorablemente la acción de distintos enzimas, siendo la ADH únicamente el primero de todos ellos. Es posible que la elevada tolerancia a los alcoholes de muchas especies de *Drosophila* radique en la adecuación y coordinación de todas las actividades enzimáticas implicadas en la vía metabólica completa, y no en uno sólo de sus eslabones. He aquí el marco de los temas objeto de la presente revisión.

Finalmente, el gran desarrollo alcanzado por los estudios de las estructuras proteicas y génicas de la ADH de *D. melanogaster* contrasta con los modestos conocimientos actuales en el campo bioquímico-funcional. El enzima ADH de *D. melanogaster* ha sido purificado y secuenciado por THATCHER (1977, 1980). La forma activa, de 54.000d de peso molecular, consta de dos subunidades idénticas de 255 aminoácidos. El enzima actúa sin átomos metálicos coordinados y no presenta homologías estructurales con sus homónimos de levadura ni de hígado de mamífero. Dado que no ha sido posible obtener formas cristalinas de la ADH, se desconocen las estructuras de orden superior, así como la de los sitios activos para el substrato y el coenzima. En consecuencia, los modelos sobre los mecanismos de catálisis se basan en estudios cinéticos (WINBERG *et al.*, 1982 a,b). El estudio de la estructura de la ADH se ha extendido a diversas especies del género: *D. simulans* y *D. virilis* (JUAN & GONZÁLEZ-DUARTE, 1980, 1981); *D. immigrans* y *D. funebris* (VILAGELIU & GONZÁLEZ-DUARTE, 1984) y *D. hydei* (ATRIAN & GON-

ZÁLEZ-DUARTE, 1985 b) con objeto de relacionar las propiedades bioquímicas, la actividad enzimática y la presencia de la especie en ambientes ricos en etanol.

En 1980, Goldberg inició los estudios estructurales del gen *Adh* de *D. melanogaster* para determinar las distintas regiones funcionales del gen: promotores, exones e intrones, tanto en la misma especie (BENYAJATI *et al.*, 1980, 1982, 1983) como en otras del mismo subgrupo (BODMER & ASHBURNER, 1984) o de otros subgrupos (*mulleri*, FISHER & MANIATIS, 1985). Con estos estudios se pretende establecer el mecanismo de expresión del gen y cómo se ejerce su regulación ontogénica y tisular, reflejadas respectivamente en las curvas de actividad durante el ciclo biológico y en la distribución histológica de la actividad ADH (URSPRUNG *et al.*, 1970). Se sabe además que el gen utiliza para su transcripción secuencias promotoras distintas en la larva y el adulto, y que se sintetiza un solo producto proteico (BENYAJATI *et al.*, 1983). Recientemente se han caracterizado factores transcripcionales específicos para ambos promotores, lo cual explicaría su expresión diferencial (HEBERLEIN *et al.*, 1985).

Sin embargo, difícilmente los datos estructurales aportarán luz sobre el metabolismo de los alcoholes en *Drosophila*. Para resolver los problemas pendientes respecto a la funcionalidad del enzima, los efectos metabólicos de la ingestión de alcoholes y las eficacias biológicas que en cada genotipo o especie podrían estar asociadas a la ADH, es necesario realizar estudios fisiológicos y metabólicos desde una óptica netamente bioquímica.

## 2. METABOLISMO DE LOS ALCOHOLES PRIMARIOS

*Drosophila* necesita realmente un sistema de asimilación metabólica de alcoholes a causa del

TABLA 2. Contenido (% v/v) de distintos alcoholes en seis hábitats larvales de *D. melanogaster*. (Datos de McKECHNIE & MORGAN, 1982.)

HÁBITAT	METANOL	ETANOL	PROPAN-1-OL	BUTAN-1-OL	PROPAN-2-OL
Pera	0.03-0.05	0.25-2.50	0.25-0.35	0.06-0.20	0.03-0.07
Banana	0.02-0.06	0.41-0.46	0.13-0.46	0.01-0.17	0.01-0.06
Tomate	0.01-0.04	0.09-0.80	0.02-0.07	<0.005	—
Manzana	0.005	0.02	0.10	—	0.006
Uva	0-0.02	1.00-4.00	0.36-1.00	0.03-0.20	0.03-0.80
Mosto decantado	0.03-0.04	0.50-2.50	0.24-0.43	0.04-0.05	0.04-0.06
Orujo	0.007	0.22	0.01	0.005	0.01

carácter fermentativo de los ambientes donde se alimentan la mayoría de sus especies (tabla 2). Estos pueden ser sistematizados en tres grandes grupos, según el porcentaje de contenido alcohólico (DAVID & VAN HERREWEGE, 1983):

I) Ambientes de alto contenido alcohólico: medios de fermentación alcohólica producidos artificialmente por el hombre en la elaboración vinícola: bodegas, cavas, factorías cerveceras. Se desarrollan algunas especies de *Drosophila* altamente adaptadas.

II) Ambientes de moderado contenido alcohólico: frutos dulces en descomposición, donde los polisacáridos sufren una rápida fermentación alcohólica por parte de la flora microbiana saprofítica. La mayoría de especies de *Drosophila* se desarrolla en estos ambientes.

III) Ambientes de escaso contenido alcohólico: hojas, flores y hongos cuya composición no da lugar a síntesis de alcoholes. Se desarrollan algunas especies de *Drosophila*, generalmente de nicho ecológico altamente especializado.

Dado que el etanol es sin lugar a dudas el componente preponderante de los ambientes I y II, el estudio de la asimilación metabólica de los alcoholes en *Drosophila* se centra, casi exclusivamente, en este compuesto.

## 2.1. ACTIVIDAD ADH

El hecho de que los mutantes ADH-negativos no sean capaces de tolerar más que mínimas cantidades de alcohol demuestra de modo inequívoco que la oxidación de estos compuestos vía ADH constituye el primer paso de su metabolización en condiciones naturales (DAVID *et al.*, 1976). Este proceso puede responder a dos finalidades: su asimilación como nutriente y/o su eliminación como tóxico ambiental. El alcohol etílico, en ausencia de otra fuente de energía, y siempre en concentraciones subletales, prolonga la esperanza de vida de las moscas, tanto ingerido por vía oral como respiratoria (VAN HERREWEGE & DAVID, 1974, 1978). La ADH transforma el etanol en acetaldehído y por tanto cabe suponer que la incorporación al metabolismo energético se realiza vía acetato—acetilCoA—ciclo de Krebs. Sin embargo, el etanol a elevadas concentraciones causa la intoxicación y la muerte de los individuos: sólo contadas especies soportan concentraciones superiores al 10% de etanol, propias de los ambientes tipo I (tabla 1). En este caso, la acción de la ADH sería primordialmente detoxificante, con una función análoga a la de ADH hepática de mamífero. Algunas especies

de *Drosophila* pueden soportar concentraciones de etanol mucho más elevadas que las máximas detectadas en la naturaleza: 15% frente a una LC 50 de 28% para *D. lebanonensis*. Es difícil encontrar una razón para esta actividad superflua, así como para: i) el singular carácter de los substratos preferenciales de la ADH que sitúa el etanol después de los alcoholes secundarios o cíclicos (tabla 3); ii) la falta de homología con la ADH hepática de mamífero (JORNVALL *et al.*, 1981). A la vista de estos resultados, diversos autores han emitido una hipótesis según la cual la función detoxificadora de alcoholes de la ADH no es más que una adquisición evolutiva relativamente reciente de un sistema enzimático preexistente, que realizaba funciones metabólicas desconocidas y que, al aumentar su presencia en el individuo, permitió la explotación de hábitats vírgenes.

TABLA 3. Especificidad de substrato de las aloenzimas ADH<sup>S</sup> y ADH<sup>UF</sup> de *D. melanogaster*. Los valores de actividad enzimática frente a diversos substratos se hallan referidas al determinado para el etanol (100). (Datos de WINBERG *et al.*, 1982B.)

Substrate specificity of ADH<sup>S</sup> and ADH<sup>UF</sup> allozymes from *D. melanogaster*. Activities for the oxidation of several alcohols are relative to ethanol (100). (From WINBERG *et al.*, 1982B.)

	ADH <sup>S</sup>	ADH <sup>UF</sup>
Metanol	0	0
Etanol	100	100
Propan-1-ol	235	259
Butan-1-ol	305	364
Pental-1-ol	115	131
Hexan-1-ol	91	86
Heptan-1-ol	36	43
Octan-1-ol	25	29
Propan-2-ol	756	1.212
R <sup>S</sup> butan-2-ol	921	1.712
R <sup>S</sup> pentan-2-ol	1.010	1.798
R <sup>S</sup> hexan-2-ol	1.226	1.943
R <sup>S</sup> heptan-2-ol	719	926
R/- octan-2-ol	886	1.300
Ciclohexanol	1.057	1.731
R/+ cis-verbenol	660	859
2 propen-1-ol	251	263
2 buten-1-ol	266	275
3 buten-1-ol	166	209
5 hexen-1-ol	112	109
R <sup>S</sup> 3-buten-2-ol	767	1.301
R <sup>S</sup> 3-penten-2-ol	934	1.446
R <sup>S</sup> 4-penten-2-ol	1.113	1.914
R <sup>S</sup> 1-penten-3-ol	967	1.671
R <sup>S</sup> 1-hexyn-3-ol	876	1.574
R <sup>S</sup> 1-hexen-3-ol	1.080	1.643
R <sup>S</sup> 1-feniletanol	203	193

Dicha adquisición parece constituir un claro ejemplo de convergencia adaptativa, ya que las especies en las que aparece no guardan ninguna relación filogenética especial dentro del género *Drosophila*.

En la conversión de una simple capacidad asimiladora de alcoholes a un mecanismo de detoxificación que permitiera la colonización de nuevos nichos ecológicos pueden haber resultado decisivos dos tipos de factores: por un lado los parámetros cinéticos del enzima — constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y velocidad máxima de reacción ( $V_{max}$ )—, y por otro la cantidad total de enzima activo con la que cuenta el organismo en un momento determinado. Está bien documentado en *D. melanogaster* que el alelo ADH-F se halla favorecido frente al ADH-S en los ambientes ricos en etanol (VAN DELDEN *et al.*, 1975; BRISCOE *et al.*, 1975; KAMPING & VAN DELDEN, 1978). De acuerdo con los estudios cinéticos realizados, la  $V_{max}$  de reacción sería el parámetro relevante en cuanto a capacidad detoxificadora del enzima (DAY *et al.*, 1974; McDONALD *et al.*, 1980). Esto significa que en condiciones de alto contenido alcohólico, la forma ADH-F resultaría más eficaz, al poseer mayor velocidad de reacción; por el contrario, en condiciones de discreto contenido alcohólico se favorecen ADH-S. Según este criterio, la práctica totalidad de especies de *Drosophila* serán capaces de metabolizar y aprovechar el alcohol-etanol (ambientes del tipo II), pero sólo aquellas cuyo enzima posea una  $V_{max}$  adecuada tolerarán concentraciones de alcohol tóxicas (ambientes tipo I).

La cantidad total de enzima activo por individuo también parece determinar las especies que explotarán ambientes ricos en etanol. A pesar de no contar hoy en día con ninguna técnica de cuantificación precisa de enzima activo por individuo, las aproximaciones realizadas revelan características de interés: primeramente, los individuos ADH-F de *D. melanogaster*, mayoritarios en ambientes tipo I, poseerían niveles de proteína ADH superiores que los ADH-S (GIBSON, 1972; DAY *et al.*, 1974). En segundo lugar, muchas de las especies localizadas en bodegas del Levante español (MONCLUS & PREVOSTI, 1979) presentan mayor cantidad de ADH cuantificada después de procesos paralelos de purificación que especies ajenas a estos ambientes, a la vez que su ADH posee también una  $V_{max}$  superior (GONZÁLEZ-DUARTE *et al.*, 1986). La averiguación de los mecanismos que permiten a un determinado genotipo o especie la acumulación de mayor cantidad de enzima activo —niveles de expresión génica (transcripcionales o traduccionales), tasa de de-

gradación, turnover de formas activas...— supone otra vía abierta de estudio que deberá abordarse forzosamente en un futuro próximo.

El papel nutritivo/detoxificante de la ADH puede hacerse extensivo a otros alcoholes primarios. En los frutos en descomposición se ha detectado, además de etanol, propan-1-01 y butan-1-01 (tabla 2), para los que se supone una vía de metabolización aldehído—ácido carboxílico homóloga a la del alcohol etílico.

Como conclusión, es obligado mencionar la posible función inversa del enzima, o sea, la reducción de aldehidos —o cetonas— a los correspondientes alcoholes. Contrariamente a la ADH hepática de mamífero, donde el equilibrio termodinámico de la reacción favorece su sentido reductor, la ADH de *Drosophila* presenta niveles bajos de actividad inversa (GONZÁLEZ-DUARTE & VILAGELIU, 1985). Algunos autores consideran que esta actividad enzimática constituiría un mecanismo de detoxificación en dietas suplementadas con acetaldehído o acetona (DAVID *et al.*, 1978, 1984). Esta interpretación es discutida en la sección 5, al tratar de los alcoholes secundarios.

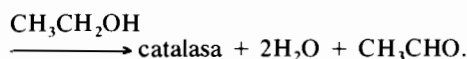
## 2.2. ACTIVIDAD ODH

COURTRIGHT *et al.* (1966) demostraron la independencia del sistema enzimático octanol-deshidrogenasa (ODH, E.C. 1.1.1.73) respecto a ADH, en *D. melanogaster*. El estudio de sus especificidades de sustrato reveló que podía oxidar un amplio espectro de alcoholes alifáticos de cadena lineal, con afinidad creciente al aumentar el número de carbonos de la molécula, así como también el farnesol y el fenol. No demuestra una actividad hacia los alcoholes secundarios, ni de cadena ramificada. Por tanto, la ODH no parece relacionada con los alcoholes ingeridos por *Drosophila*, sino con el catabolismo de la hormona juvenil. Esto vendría corroborado por el perfil ontogénico de su actividad (MADHAVAN *et al.*, 1973).

## 2.3. OTROS ENZIMAS OXIDATIVOS DE LOS ALCOHOLES

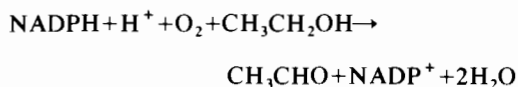
En el metabolismo de los mamíferos superiores, se hallan descritos dos sistemas enzimáticos distintos de la ADH, capaces de oxidar los alcoholes.

El primero de ellos es la catalasa (E.C. 1.11.1.16) (KEILIN, 1945). La reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno procedería según la siguiente vía:



La reacción se localiza en los peroxisomas, por ser éste el orgánulo que contiene el peróxido de hidrógeno celular.

El segundo sistema, denominado MAOS (Microsomal-Alcohol-Oxidizing-System) por ORME-JHONSON & ZIEGLER (1965), es dependiente de NADPH y  $\text{O}_2$ , localizado en la fracción microsomal celular:



Así pues, por simple analogía, se postuló la existencia de alguna de estas vías en *Drosophila*. Si así fuese, ello constituiría una explicación a las observaciones de DELTOMBE-LIETAERT *et al.* (1979) según las cuales las cepas con baja actividad ADH son capaces de utilizar etanol como fuente nutritiva, y que mutantes ADH-negativos toleran mínimas cantidades de alcohol. Estos mismos autores han argumentado que la elevada actividad catalásica de *Drosophila* podría, de acuerdo con su hipótesis, jugar un papel importante en el metabolismo alcohólico. Sin embargo, recientemente GEER *et al.* (1985) reparan, contrariamente, que «el tipo de regulación que el etanol ejerce sobre la catalasa, la piridoxal-oxidasa y la aldehído-oxidasa es desfavorable a una mayor intervención de estas enzimas en el metabolismo del etanol». Además en ningún momento se ha determinado la presencia de un sistema MAOS en *Drosophila*.

### 3. METABOLISMO DE LOS ALDEHÍDOS

La acción de la ADH sobre los alcoholes primarios supone la aparición de aldehídos en el medio celular. Evidentemente la atención ha sido centrada en el acetaldehído. HEINSTRÁ *et al.* (1983) han demostrado por cromatografía de gases que homogenados de *Drosophila* provocan un aumento de los niveles de acetato de un sistema artificial, en detrimento de los niveles de etanol, no observándose acumulación de acetaldehído alguna. La mayor incógnita en el sistema de metabolización de alcoholes en *Drosophila* es precisamente la determinación del enzima responsable de la oxidación del acetaldehído. Este es un compuesto altamente tóxico, mucho más que el propio etanol, y que en principio debería ser metabolizado inmediatamente en la célula, tal como realmente se deduce de los datos citados.

La capacidad de distintas especies de detoxificar el acetaldehído se halla bien documentada (LIETAERT *et al.*, 1981; MOXON *et al.*, 1982), así como también la posibilidad de nutrirse de él, siempre en concentraciones no letales (DAVID *et al.*, 1984). Se ha descrito en mamíferos una aldehíodeshidrogenasa (ALDH, E.C. 1.2.1.3.) dependiente de  $\text{NAD}^+$  e inhibible por disulfiram (disulfuro de bis-(dietiltiocarbamil)), responsable de esta misión (PARRILLA *et al.*, 1974; DEITRICH *et al.*, 1976; MARCHER & TOTTMAR, 1978). Sin embargo, los primeros datos obtenidos en *Drosophila* no revelaban la existencia de un sistema equivalente (COURTRIGHT, 1967; DICKINSON, 1971; DAVID, 1977), lo que condujo a considerar las tres vías hipotéticas siguientes:

—La metabolización de los aldehídos mediante una aldehído oxidasa.

—La capacidad de función de la propia ADH como aldehíodeshidrogenasa, actuando sobre aldehídos como sustratos.

—La existencia, a pesar de todo, de una aldehíodeshidrogenasa, que a causa de un planteamiento experimental erróneo, no habría podido ser detectada.

#### 3.1. HIPÓTESIS ALDEHÍDO-OXIDASA

El sistema aldehído oxidasa (locus Aldox de *D. melanogaster*) fue descrito por COURTRIGHT en 1967. La aldehído oxidasa (E.C. 1.2.3.1.) es una metaloflavoproteína que, como oxidasa, cataliza la oxidación de sus sustratos sin el concurso de coenzima, mediante  $\text{O}_2$  libre como aceptor de potencial reductor.

Hasta 1978 se alude invariablemente en la bibliografía a la «acción de un enzima abundante y bien descrito en *Drosophila*, la aldehído oxidasa, AO, como único agente transformante del acetaldehído producido en la metabolización del etanol» (DICKINSON, 1970; DAVID, 1977). Existen, sin embargo, discrepancias graves entre esta hipótesis y algunos datos experimentales. En primer lugar, si bien la aldehído oxidasa de *Drosophila* es capaz de actuar sobre una gran variedad de aldehídos y otros productos, presenta una afinidad baja hacia el acetaldehído — $K_m$  del orden de  $10^{-2}\text{M}$ —, particularmente en comparación de los aldehídos de estructura aromática (DICKINSON, 1978). Por otra parte, cepas de *D. melanogaster* deficientes en AO presentan una tolerancia al etanol y acetaldehído comparable en todo momento a la de las cepas salvajes (DAVID *et al.*, 1978), fenómeno confirmado posteriormente por otros autores (LIETAERT, 1981, 1982) y que reduce considerablemente la veracidad de la «hipótesis aldehído oxidasa». Se han descrito dos sistemas

Aldox independientes entre sí, Aldox-1 y Aldox-2, con distinta movilidad electroforética y con especificidades selectivas de sustrato (DAVID *et al.*, 1978) hipotetizándose que mientras Aldox-1, sistema mayoritario controlado por el locus Aldox, poseería funciones fisiológicas todavía no bien delimitadas, el sistema Aldox-2 sería un sistema minoritario independiente de Aldox. Sin embargo, la ausencia de una caracterización rigurosa desde el punto de vista genético y bioquímico del sistema Aldox-2 debilita considerablemente esta hipótesis.

En este punto, quedaban pendientes muchas cuestiones relativas al metabolismo del acetaldehído, que no concordaban con la función aldehído oxidasa, entre ellas:

i) El acetaldehído, a concentraciones no letales, incrementa la vida de los adultos de *D. melanogaster* privados de otra fuente de energía alternativa. Respecto a su asimilación, no existe diferencia alguna entre cepas ADH-negativas, ADH-AO-negativas y salvajes (DAVID *et al.*, 1984).

ii) No existe correlación entre la actividad AO específica de muchas cepas y la utilización de acetaldehído como fuente de energía (MOXON *et al.*, 1982). Los valores de actividad enzimática se mantienen dentro de márgenes muy estrechos y constantes entre diversas especies, independientemente de poseer, algunas de ellas, como hábitat principal, frutos en fermentación o ambientes vinícolas (MOXON *et al.*, 1982).

iii) Los estudios histoquímicos realizados por tinción específica de actividades ADH y AO muestran que, existiendo diversos tejidos que poseen una u otra actividad, no es común que se presenten ambas conjuntamente, lo cual hace difícil suponer una degradación coordinada de etanol a acetato (DICKINSON, 1970; GOLDBERG *et al.*, 1983).

iv) La comparación de los perfiles de actividad enzimática durante el ciclo biológico de *Drosophila* de ADH y AO ponen de manifiesto una regulación dispar de los dos enzimas: en el estadio pupal, precisamente cuando la actividad AO alcanza su máximo, la actividad ADH se halla muy deprimida. Así pues, atendiendo al patrón de actividad enzimática, el sistema AO parece directamente implicado en el metabolismo hormonal, regulador de los procesos de desarrollo y écdisis (DICKINSON, 1971).

v) Estudios cinéticos del enzima AO (KREINITSKY, 1978) pusieron de manifiesto una elevada afinidad hacia compuestos como pteridinas y pirimidinas, sugiriendo un papel en la asimilación de estos compuestos heterocíclicos, propios de vegetales donde crecen y se alimentan numerosas especies de *Drosophila*.

### 3.2. HIPÓTESIS ALCOHOLDESHIDROGENASA

Se ha sugerido la posibilidad de que en algunas especies de *Drosophila*, el enzima ADH catalizara la conversión acetaldehído—acetato, realizando una función aldehíodeshidrogenásica (HEINSTRA *et al.*, 1983). Estos autores han observado que cepas «maroon-like», deficientes para la aldehído oxidasa, piridoxal oxidasa y xantindeshidrogenasa, no acumulan niveles apreciables de acetaldehído tras la ingestión de etanol, mientras que sí se incrementan los niveles de acetato libre, corroborando por tanto el correcto planteamiento de la vía:



Se ha confirmado la capacidad «in vitro» de la ADH para catalizar la oxidación del acetaldehído mediante medidas espectrofotométricas de actividad, usando  $\text{NAD}^+$  como cofactor. Los resultados negativos obtenidos previamente por otros autores se deberían a que la forma molecular más activa de la ADH—la más anódica—no presenta actividad aldehíodeshidrogenásica, que corresponde a la forma intermedia. Las características cinéticas de la reacción no han sido descritas todavía. Sorprendentemente, la ADH de *D. simulans*, especie gemela de *D. melanogaster*, presenta una actividad aldehíodeshidrogenásica prácticamente despreciable. *D. simulans* muestra una baja presencia en hábitats relacionados con los procesos de fermentación vinícola (MCKENZIE & PARSONS, 1972), lo cual sugeriría que la capacidad de tolerar elevadas concentraciones de alcohol no provendría tanto de niveles elevados de actividad ADH como de la posibilidad de que este enzima oxidara también el acetaldehído a acetato. La extrapolación de unos resultados «in vitro» a una funcionalidad «in vivo» es siempre cuestionable. Además, la teoría mencionada es difícil de conciliar con algunos resultados experimentales, a saber:

i) No se encuentran diferencias significativas en la asimilación metabólica y detoxificación «in vivo» del acetaldehído en cepas ADH-negativas y salvajes (DAVID *et al.*, 1984).

ii) Las cepas ADH-negativas pueden metabolizar el acetaldehído «in vitro» (GARCIN *et al.*, 1985).

Un argumento sólido en contra de la «hipótesis ADH» sería además su limitación a determinadas especies. Cabe suponer una vía de metabolización de aldehídos de distribución universal dentro del género *Drosophila* y no un mecanismo válido para algunas especies, ya que la práctica totalidad pueden nutrirse de etanol.



### 3.3. HIPÓTESIS ALDEHIDODESHIDROGENASA

Algunos autores han supuesto la existencia de un enzima en *Drosophila* próximo a la aldehidodeshidrogenasa de mamífero, a pesar de los resultados adversos obtenidos al tratar de determinar y caracterizar dicha actividad enzimática. Se ha establecido mediante cromatografía de gases que un homogenado de *Drosophila* provoca la desaparición de acetaldehído de un sistema cerrado de modo paralelo a una preparación de aldehidodeshidrogenasa (ALDH) hepática de mamífero (LIETAERT *et al.*, 1982). Finalmente, se ha conseguido la caracterización de una ALDH, dependiente de la  $NAD^+$  e inhibible por disulfiram, en *D. melanogaster* y *D. simulans* (GARCIN *et al.*, 1983). La detección espectrofotométrica de la actividad enzimática se ha realizado según protocolos adaptados de las ALDH hepáticas de mamífero. Según Garcin, el error que durante largo tiempo mantuvo oculta esta actividad se debió al hecho de haber realizado las pruebas correspondientes en condiciones propias de las ALDH de levadura, muy alejadas de las citadas anteriormente.

La ALDH de *D. melanogaster* ha sido caracterizada parcialmente: presenta un pH óp-

timo claramente alcalino (10-11) y una afinidad hacia el acetaldehído situada en el rango micromolar, mientras que hacia el coenzima, la afinidad se sitúa en una  $K_m$  de dos órdenes de magnitud superior. Se detectan cifras comparables de actividad ALDH tanto en cepas AO-negativas (GARCIN *et al.*, 1983, B) como ADH-negativas (GARCIN *et al.*, 1985) respecto a cepas salvajes. La ALDH de *D. melanogaster* presenta valores de  $V_{max}$  dobles de los de la ALDH de *D. simulans*, lo cual confirmaría que la especial adaptación de la primera a ambientes ricos en etanol no es debida solamente a su ADH sino también a una ALDH capaz de detoxificar a mayor velocidad el acetaldehído producido.

La localización citológica de la ALDH realizada por fraccionamiento celular (LIETAERT *et al.*, 1985) ubica dicho enzima en la fracción mitocondrial —70% de actividad recuperada— y en el sobrenadante total —30% de actividad—. No está claro si esta ubicuidad refleja la existencia de dos sistemas distintos o es puramente un artefacto de las técnicas utilizadas. De todos modos, con la caracterización de este sistema, sea o no homogéneo, se ha logrado un gran avance en el tema de la metabolización de los aldehídos en *Drosophila*.

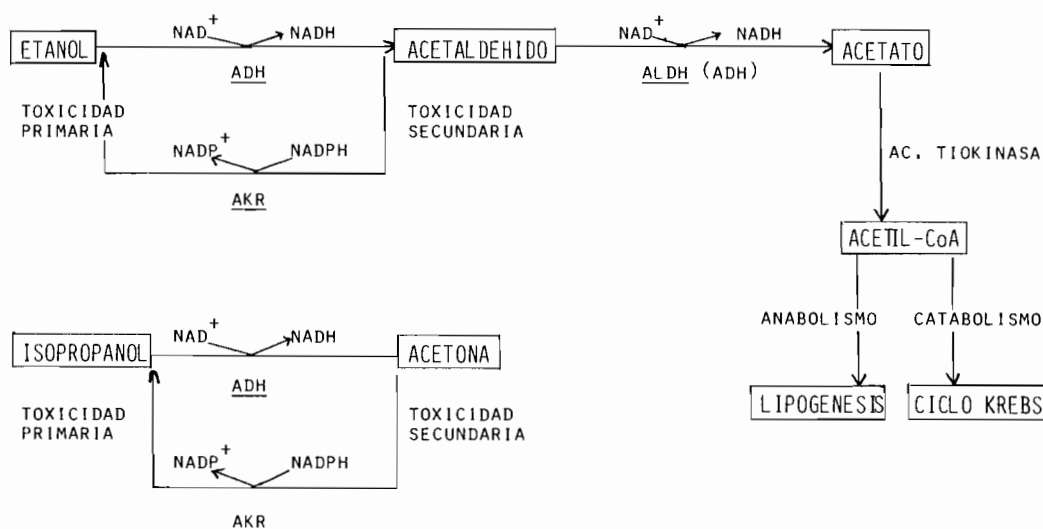
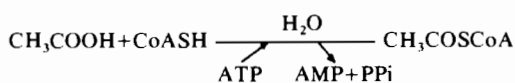


FIGURA 1. Esquema del metabolismo de los alcoholes primarios —etanol— y alcoholes secundarios —isopropanol— en *Drosophila*. Mientras en el primer caso la vía de asimilación es completa de modo que el enzima puede ejercer una función de nutrición y detoxificación, en el segundo caso, la acción de la ADH supone la última transformación posible del sustrato.

Metabolic pathways of primary (ethanol) and secondary (propan-2-ol) alcohols in *Drosophila*. In the first case there is a complete metabolic utilization of the substrate and ADH plays a role relevant to nutrition and detoxification. In the second pathway ADH catalyses the only possible transformation of the substrate.

#### 4. METABOLISMO DEL ACETATO

La incorporación final del acetato, proporcionado por la degradación del etanol, al metabolismo intermediario necesita el enzima acetato-quinasa, que lo activa a acetilCoA mediante el concurso energético de ATP:



Asumiendo que el etanol pasa a incrementar el pool de acetil-CoA del organismo, este compuesto podrá más tarde ser desviado a metabolismo catabólico por entrada en el ciclo de Krebs, o anabólico, por ser sustrato de lipogénesis.

#### 4.1. CICLO DE KREBS

El valor del etanol como nutriente depende de la disponibilidad del acetilCoA derivado como sustrato del ciclo de Krebs. MIDDLETON & KACSER (1983) recuperan CO<sub>2</sub> marcado radiativamente tras la ingestión por las moscas de <sup>14</sup>C-etanol, utilizando su cuantificación como estimación de la tasa de oxidación «in vivo» de etanol en distintos genotipos de *D. melanogaster*.

#### 4.2. LIPOGENESIS

Los organismos pueden desviar el exceso de acetilCoA que no se integra en el ciclo de Krebs a una de sus vías anabólicas: la lipogénesis. GEER *et al.* (1985) han verificado que, en *Drosophila*, el etanol es un buen sustrato lipogénico. A partir de un planteamiento experimental semejante al de MIDDLETON & KACSER (1983), han determinado el marcado radiativo recuperado en los lípidos. Según ello, la metabolización del etanol se realiza vía ADH en un 91-93%, ya que en cepas ADH-negativas la recuperación desciende a un 7-9%. Este porcentaje reflejaría precisamente la importancia en *Drosophila* de las vías de oxidación del etanol ajenas a la ADH. En el mismo estudio, los autores han detectado que tras una dieta de etanol, se incrementan una serie de actividades enzimáticas: la propia ADH, que permite la asimilación del etanol, la «ácido graso sintetasa», complejo formado por 7 enzimas que actúan de modo coordinado, y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, que proporciona glicerol-3-fosfato a partir de la hidroxiacetona-fosfato producida en la vía glucolítica. El glicerol-3-fosfato constituye el sustrato activado necesario para la formación de los triacilglicéridos (TG), que son a su vez lípidos de almacenamiento y reserva de los ácidos grasos acumulados y cuyos niveles aumentan ostensiblemente tras la dieta alcohólica (fig. 2).

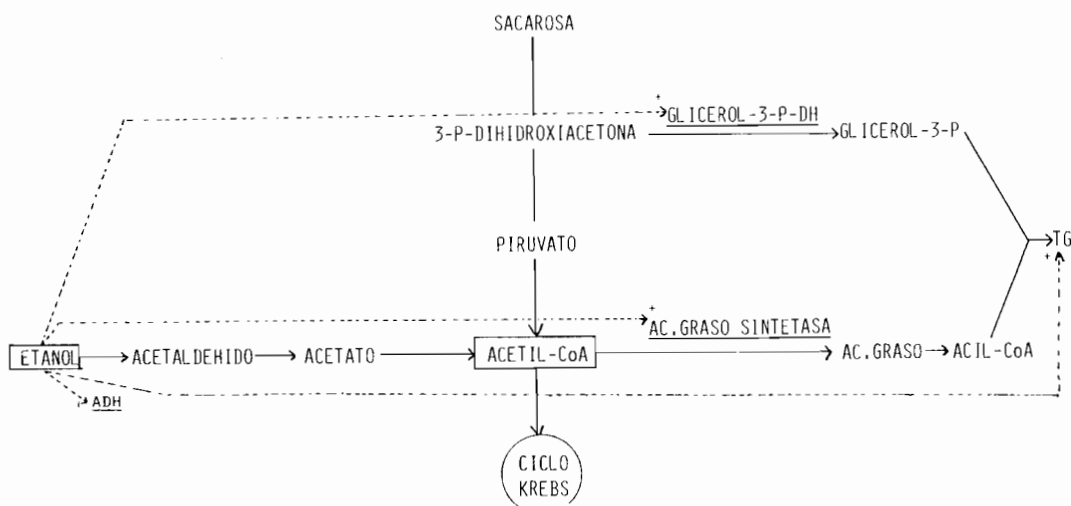


FIGURA 2. Conexiones observadas entre el metabolismo del etanol, la sacarosa y los lípidos en *Drosophila*. Se indican las actividades enzimáticas que resultan moduladas por una dieta de alcohol y/o sacarosa. (TG = triacilglicéridos.) (Datos de GEER *et al.*, 1985).

Relationships between different metabolic pathways —ethanol, sucrose and lipids— in *Drosophila*. Enzyme activities subject to variation in an alcohol and/or sucrose diet are underlined. (TG = triacylglycerol.) (From Geer *et al.*, 1985.)

TABLA 4. Parámetros cinéticos de la ADH de distintas especies de *Drosophila*. (Datos de GONZÁLEZ-DUARTE *et al.*, 1986.)

Kinetic coefficients of ADH from different species of *Drosophila*. (From GONZÁLEZ-DUARTE *et al.*, 1986.)

	CONSTANTE DE MICHAELIS (MILIMOLAR)					
	D. melanogaster Adh <sup>S</sup>	D. simulans	D. virilis	D. funebris	D. immigrans	D. hydei
NAD <sup>+</sup>	0.26	0.19	0.20	0.15	0.16	0.16
Propan-2-ol	1.87	0.93	1.99	2.90	1.53	0.81
Butan-2-ol	0.86	0.41	1.60	2.08	1.49	0.43
Etanol	8.92	5.22	6.44	13.11	12.42	5.62
Propan-1-ol	3.42	3.33	4.16	8.21	5.06	1.95
Butan-1-ol	3.31	—	3.01	9.39	6.02	2.64
	VELOCIDAD MÁXIMA (x10 <sup>-1</sup> ) (MILIMOLES POR MINUTO POR MOL DE SUBUNIDAD)					
	D. melanogaster	D. simulans	D. virilis	D. hydei		
Propan-2-ol	9.78	6.67	8.15	7.36		
Butan-2-ol	9.34	6.02	7.75	5.93		
Etanol	4.78	2.08	4.01	2.77		
Propan-1-ol	4.60	2.15	4.99	2.70		
Butan-1-ol	5.75	—	6.13	4.18		

## 5. METABOLISMO DE LOS ALCOHOLES SECUNDARIOS

La acción de la ADH sobre los alcoholes secundarios da lugar a la síntesis de cetonas, compuestos no susceptibles de incorporación al metabolismo y que presentan graves problemas de toxicidad para el organismo. Sin embargo, la ADH de *Drosophila* es un enzima mucho más afín hacia los alcoholes secundarios que primarios (VIGUE & JOHNSON, 1973) (tabla 4).

VAN HERREWEGE *et al.* (1980) han comprobado que la asimilación de estos compuestos no representa una fuente de energía y PAPEL *et al.* (1979) han demostrado que tanto el propan-2-ol como la acetona, suministrados por vía oral, inhiben la actividad ADH hasta un 5% de su valor inicial, en 24h (fig. 1). Esta inhibición se debe a la interconversión de las formas isoméricas más activas a menos activas. La toxicidad de las cetonas no saturadas que proceden de determinados alcoholes es la base de un método clásico de selección de mutantes ADH-negativos, ya que al adicionar en la dieta 1-penten-3-ol sólo logran sobrevivir los individuos que no presentan una ADH funcional por no ser capaces de producir la cetona correspondiente (SOFER & HATKOFF, 1972; O'DONELL *et al.*, 1975).

A pesar de todo lo expuesto, la actividad ADH de diversas especies y las tolerancias respectivas al propan-2-ol y butan-2-ol parecen correlacionarse directamente (MCDONALD & AVISE, 1976), al tiempo que se observa que las

cepas con una ADH funcional toleran mejor estos alcoholes que las defectivas (DAVID *et al.*, 1976). Trabajos posteriores del mismo autor (1981, 1984) atribuyen a la ADH un papel detoxificante frente a la acetona e incluso frente al acetaldehído, apuntando a una activación del sentido reductor de su actividad. En efecto, puesto que las LC 50 de los productos de segundo grado de oxidación es mucho mayor que la correspondiente a los alcoholes respectivos, una posible vía de urgencia consistiría en la reducción de cetonas o aldehídos. Este mecanismo sería operativo frente a una rápida acumulación de acetaldehído que no pudiera ser transformado por la deshidrogenasa correspondiente y, en todo caso, frente a la acetona, que sólo es posible eliminar por difusión directa al exterior —respiración— o por excreción. Los datos «in vivo» de VILAGELIU & GONZÁLEZ-DUARTE (1980) confirmarían la hipótesis de la «vía reductora», ya que al suministrar propan-2-ol a *Drosophila*, se observa primero una disminución de este compuesto en el medio, acompañada de un aumento de la acetona —consecuencia presumible de la actividad de ADH— seguido de un efecto rebote consistente en la disminución de esta acetona y el aumento del propan-2-ol. Sin embargo no es posible atribuir sólo a la actividad de «ADH inversa» estos hechos, ya que tras una dieta de propan-2-ol o acetona:

- i) No se observa incremento alguno de los

valores, ya modestos en condiciones normales, de la actividad reductora de la ADH.

ii) Dichos niveles son aún mucho más insignificantes al tener en cuenta la inactivación de la actividad ADH en presencia de los alcoholes secundarios (PAPEL *et al.*, 1979; GONZÁLEZ-DUARTE & VILAGELIU, 1985).

Las aldo-ceto reductasas (AKR, E.C. 1.1.1.2) caracterizadas en *Drosophila* (ATRIAN & GONZÁLEZ-DUARTE, 1985) podrían ser los responsables de esta reacción. Estas enzimas fueron primeramente caracterizados en mamíferos (BOSRON & PRAIRIE, 1972; TURNER & TIP-TON, 1972) y más tarde en *D. melanogaster* en un estudio comparativo realizado por DAVIDSON *et al.* (1978) en todo el filum animal. Se trata de una actividad enzimática dependiente de NADPH e inhibible por fenobarbital que opera a niveles micromolares de coenzima. Entre una amplia variedad de substratos incluye el acetaldehído y la acetona y su presencia ha sido confirmada en *D. melanogaster* y *D. hydei* (ATRIAN & GONZÁLEZ-DUARTE, 1985A) y *D. immigrans* y *D. funebris* (GONZÁLEZ-DUARTE & VILAGELIU, 1985). Se ha demostrado además que los niveles de actividad enzimática varían en función del etanol y/o propan-2-ol, lo que consolida la hipótesis de su papel relevante en el metabolismo alcohólico (GONZÁLEZ-DUARTE & ATRIAN, 1986).

## 6. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ADH EN EL METABOLISMO ALCOHÓLICO

La regulación de la actividad ADH es un tema sumergido hoy en día en una gran controversia en el metabolismo de los mamíferos, incluido el hombre, a pesar de que existen muchos datos al respecto. No es de extrañar pues que, en *Drosophila*, sean escasas las publicaciones sobre el tema. Dos son los factores que se han considerado hasta el momento como posibles moduladores de esta actividad y, en consecuencia, de la asimilación de los alcoholes: los niveles  $NAD^+/NADH$  y la propia ingestión del alcohol (etanol) y un disacárido como la sacarosa.

### 6.1. NIVELES DE $NAD^+/NADH$

En una dieta rica en etanol, tanto su oxidación como la del acetaldehído correspondiente, implican dos actividades deshidrogenásicas dependientes de  $NAD^+$ : ADH y ALDH, respectivamente. La regeneración del coenzima reducido a su forma oxidada es considerada por algunos autores vital para el continuo funcionamiento de ambas oxidaciones. Otros aseguran

que el aporte de  $NAD^+$  de la cadena respiratoria cubre con creces estas necesidades. En los mamíferos se ha descrito como vía de emergencia independiente de la cadena respiratoria el equilibrio piruvato-lactato, es decir, la acción de la lactatodeshidrogenasa. En los insectos cabe atribuir esta función a los equilibrios glicerol-3-fostato-dihidroxiacetona-fostato (SACKTOR, 1965) y malato-aspartato (CAVERNER & CLEGG, 1978), mediados respectivamente por la glicerol-3-fostato y malato deshidrogenasas.

### 6.2. DIETA DE ETANOL Y SACAROSA

McKECHNIE & GEER (1984) han estudiado la influencia del etanol y la sacarosa sobre la actividad ADH cuando ambos compuestos forman la dieta habitual de *Drosophila*. Si el contenido de sacarosa y etanol es del 0'5% y 2'5% respectivamente se observa un incremento de la actividad ADH, paralelo al incremento de la cantidad de enzima presente en los individuos, detectada por métodos inmunológicos. Sorprendentemente, una concentración equivalente de sacarosa puede provocar por sí sola el mismo tipo de efectos, aunque en menor grado. Si bien no existe una explicación obvia para esta observación, los autores argumentan que ello podría ser considerado como una consecuencia accidental de una cascada de interacciones metabólicas, producidas por la ingestión de sacarosa, y que no guardarían relación alguna con el metabolismo alcohólico.

A las concentraciones citadas de etanol y sacarosa, el tipo de regulación supondría una interacción metabólica positiva, que aseguraría la función nutritiva de ambos. Sin embargo, al elevarse los niveles de sacarosa hasta un 5%, los efectos de modulación se invierten a negativos, lo cual podría ser interpretado como un mecanismo paralelo al de la «represión por catabolito» microbiana, ejercida en este caso por el acetilCoA, intermediario común. Es de señalar así mismo que a concentraciones de 0'5% de sacarosa + 1'5% etanol, ambos compuestos son substratos intercambiables para la lipogénesis, y actúan de modo sinérgico en la inducción del aumento de triacilglicéridos acumulados y de las actividades enzimáticas ácido graso sintetasa y glicerol-3-fostato-deshidrogenasa. Ahora bien, el incremento de la concentración de sacarosa inhibe la vía etanol-TG, lo que estaría relacionado con la disminución de la actividad ADH mencionada anteriormente para las dietas de etanol suplementadas con un 5% del disacárido. Sorprendentemente, existen indicios de que la presencia de ADH en *Drosophila* estimula la integración de sacarosa a TG, ya que

ésta resulta mucho más eficiente en cepas salvajes que defectivas para la ADH, aún cuando no exista alcohol en la dieta. Ello corroboraría también un papel fisiológico de la ADH desligado del metabolismo alcohólico, coincidiendo quizás con la modulación positiva que la sacarosa ejerce sobre la actividad ADH.

En cepas negativas, la ingestión de un etanol no metabolizable provoca la inhibición de la ácido graso sintetasa, y por tanto, anula el efecto de acumulación de TG (GEER *et al.*, 1985). Parece que el etanol reprimiría directamente los enzimas de la lipogénesis según muestran algunas pruebas «in vitro» realizadas en presencia de etanol.

Cabe recordar, por último, que el enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa es precisamente uno de los candidatos a modulador de los niveles de coenzima oxidado y reducido. La sacarosa suministra, vía glucolisis, su substrato —la dihidroxiacetona-3-fosfato—, por lo que así podría producirse el efecto beneficioso de este disacárido en las dietas alcohólicas.

## 7. DISCUSIÓN

Mientras algunas especies de *Drosophila* son capaces de tolerar y aprovechar energéticamente elevadas concentraciones de etanol (aprox. 28%), otras no resisten mínimos contenidos en el medio nutritivo (aprox. 0'9%). Entre estos márgenes se sitúan, en una posición intermedia, la mayoría de las especies con un sistema de metabolización que les permite tolerar y asimilar los alcoholes que se forman por fermentación microbiana a partir de los azúcares de los frutos en descomposición que constituyen su hábitat natural, cuanto menos durante el desarrollo embrionario y larvario.

El análisis de la vía de metabolización del etanol y otros alcoholes primarios abrirá las puertas no sólo al conocimiento de los mecanismos bioquímicos implicados y de las influencias mutuas entre cadenas metabólicas distintas, sino que también permitirá establecer los parámetros que condicionan la tolerancia diferencial entre especies y que en definitiva determinan la eficacia biológica frente a unas condiciones concretas de «stress» alcohólico.

Diversos tipos de evidencias parecen indicar que uno de estos parámetros lo constituye indiscutiblemente el enzima ADH, ya que su ausencia limita de modo drástico la capacidad de asimilación de los alcoholes primarios. Pero será necesario concretar cuáles de sus características son responsables en último término del incremento de capacidad de degradación alcohólica. Las observaciones con que contamos

hoy revelan la importancia de la velocidad máxima de catalisis enzimática y de la cantidad de ADH activa que el organismo acumula. Por otra parte, si bien es cierto que la ADH es imprescindible para la adaptación a la presencia de alcoholes en el medio, estudios cinéticos y estructurales niegan que la afirmación recíproca también sea cierta; no parece que la función intrínseca o primitiva de la ADH de *Drosophila* sea la de asimilación metabólica ni detoxificación de los alcoholes ingeridos, sino que ésta representaría una adquisición reciente en la historia evolutiva, y posiblemente la más espectacular.

Así pues, una determinada especie de *Drosophila* asimila el etanol como producto metabólico explotable, mientras éste no sobrepase las concentraciones letales en el medio. Un 90% de esta asimilación se produce vía ADH, mientras que los restantes sistemas enzimáticos alternativos no sobrepasarían el 10% en importancia. Los aldehídos producidos deben ser oxidados a su ácido carboxílico correspondiente, con toda probabilidad por una ALDH de reciente caracterización que comparte peculiaridades bioquímicas con las ALDH hepáticas. El etanol se integrará así vía ácido acético—acetilCoA, y este último puede derivar en degradación catabólica —ciclo de Krebs, cadena respiratoria— para producir energía inmediata, o en asimilación anabólica —vía lipogénica— que supone una reserva para el futuro.

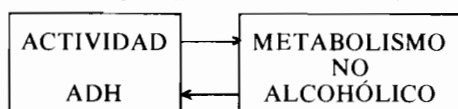
El panorama cambia radicalmente si la ADH actúa sobre alcoholes secundarios: su catalisis proporciona compuestos metabólicamente inertes, no asimilables y muy tóxicos —las cetonas—, pero además provoca la inactivación del propio enzima. Sin embargo, la ADH presenta sus Km menores precisamente frente a estos substratos en todas las especies estudiadas. Se desconoce el significado biológico de esta contradicción. Por otra parte, estudios cinéticos más minuciosos señalan que quizás esta mayor afinidad sea debida al tipo de enlace del substrato con el sitio activo del enzima.

La regulación que distintos compuestos, implicados directamente en la vía de degradación alcohólica —el mismo etanol— o sin ninguna conexión con ella —la sacarosa—, ejercen en el metabolismo de los alcoholes está empezando a ser estudiada, en un intento de aproximación a las condiciones que realmente *Drosophila* halla en sus puntos de nutrición, y a las cuales deberá adaptarse para sobrevivir. Se ha corroborado que la presencia de etanol y sacarosa, por separado o conjuntamente, modulan positivamente la actividad ADH. No se conoce cuál es el mecanismo de este efecto: mayor síntesis de producto génico, tasa de degradación menor,

activación de formas preexistentes menos activas..., ni si es ejercido directamente por aquellos compuestos o por intermediarios metabólicos.

El efecto de modulación positiva de la dieta conjunta de etanol y sacarosa se mantiene tan sólo mientras la concentración de ésta última no sobrepase unos determinados límites, momento en el cual se inicia una interferencia negativa para la actividad ADH. La dieta de etanol suplementada con sacarosa tiene también efectos metabólicos positivos sobre las actividades enzimáticas lipogénicas se incrementa el nivel de triacilglicéridos acumulados. El efecto umbral de la concentración del disacárido se mantiene para estos propósitos.

Muchos factores señalan que algunos de los efectos de la ADH en las vías del metabolismo intermediario podrían no guardar relación con su función de degradación alcohólica. Los principales indicios son que los mutantes ADH-negativos presentan comportamientos distintos respecto las cepas salvajes en vías ajenas al metabolismo alcohólico, aún en ausencia completa de estos compuestos, y además que sustancias tales como la sacarosa son capaces por sí solas de modular la actividad ADH:



En *Drosophila*, el desconocimiento de las interacciones entre distintas vías metabólicas es muy patente de acuerdo con los escasos datos sobre las propias vías. La metabolización de los alcoholes constituye un buen ejemplo de ello: no se conoce como se regula la actividad de cada uno de los enzimas que interviene, ni si esta regulación es directa o indirecta. Ante tal panorama no es extraño que el significado y la causa de muchas observaciones experimentales escape a nuestra interpretación ya que, el estudio de las primeras interacciones metabólicas acaba de empezar. Además el grado de conocimiento de esta problemática en *Drosophila* es muy inferior al de otros organismos, como pueden ser los mamíferos, ya que estos se han estudiado exhaustivamente como modelos del sistema humano.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

ATRIAN, S. & GONZÁLEZ-DUARTE, R. 1982. Comparison of some biochemical features of the enzyme alcohol dehydrogenase in sixteen species of *Drosophila*. En LAKOVAARA, S. (Ed). *Advances in Genetics, Development and Evolution of Drosophila*: 251-261. Plenum Press. New York.

- 1985 a). An aldo-keto reductase activity in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila hydei*: a possible function in alcohol metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 949-952.
- 1985 b). Purification and molecular characterization of alcohol dehydrogenase from *Drosophila hydei*: conservation in the biochemical features of the enzyme in several species of *Drosophila*. *Biochem. Genet.*, 23: 891-913.
- BENYAJATI, C.; WANG, N.; REDDY, A.; WEINBERG, E. & SOFER, W. 1980. Alcohol dehydrogenase in *Drosophila*: isolation and characterization of messenger RNA and cDNA clone. *Nucleic Acids Res.*, 8(23): 5.649-5.667.
- BENYAJATI, C.; PLACE, A. R.; WANG, N.; PENTZ, E. & SOFER, W. 1982. Deletions at intervening sequence splice sites in the alcohol dehydrogenase gene of *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.*, 10(22): 7.261-7.272.
- BENYAJATI, C.; SPOEREL, N.; HAYMERLE, H. & ASHBURNER, M. 1983. The messengers RNA for alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* differ in its 5' and in different developmental stages. *Cell*, 33: 125-133.
- BIRLEY, A. J. & BARNES, B. W. 1973. Genetic variation for enzyme activity in a population of *Drosophila melanogaster*. I. Extent of the variation for alcohol dehydrogenase activity. *Heredity*, 31: 413-416.
- BODMER, M. & ASHBURNER, M. 1984. Conservation and change in the DNA sequences coding for alcohol dehydrogenase in sibling species of *Drosophila*. *Nature*, 309: 425-430.
- BOSRON, W. F. & PRAIRIE, R. L. 1972. Triphosphopyridine nucleotide-linked aldehyde reductase. I. Purification and properties of the enzyme from the pig kidney cortex. *J. Biol. Chem.*, 247: 4.480-4.485.
- BRISCOE, D. A.; ROBERTSON, A. & MALPICA, J. M. 1975. Dominance at ADH locus in response of adult *Drosophila melanogaster* to environmental alcohol. *Nature*, 255: 148-149.
- CAVERNER, D. R. & CLEGG, M. T. 1978. Dynamics of correlated genetic systems. IV. Multilocus effects of ethanol stress environments. *Genetics*, 90: 629-644.
- COURTRIGHT, J. B.; IMBERSKY, R. B. & URSPRUNG, H. 1966. The genetic control of alcohol dehydrogenase and octanol dehydrogenase isozymes in *Drosophila*. *Genetics*, 54: 1.251-1.260.
- COURTRIGHT, J. B. 1967. Polygenic control of aldehyde oxidase in *Drosophila*. *Genetics*, 57: 25-39.
- DAVID, J. R. & BOCQUET, C. 1975. Similarities and differences in latitudinal adaptation of two *Drosophila* sibling species. *Nature*, 257: 588-590.
- DAVID, J.; BOCQUET, Ch.; ARENS, M. & FOUILLET, P. 1976. Biological role of alcohol dehydrogenase in the tolerance of *D. melanogaster* to aliphatic alcohols: utilization of Adh-null mutant. *Biochem. Genet.* 14: 989-997.
- DAVID, J. 1977. Signification d'un polymorphisme enzymatique: la déshydrogenase alcoolique chez *Drosophila melanogaster*. *Ann. Biol.*, 16: 451-472.
- DAVID, J.; BOCQUET, C.; V. HERREWEGE, J.; FOUILLET, P. & ARENS, M. 1978. Alcohol metabolism

- in *Drosophila melanogaster*: Uselessness of the most active aldehyde oxidase produced by the Aldox locus. *Biochem. Genet.*, 16: 203-211.
- DAVID, J.; V. HERREWEGE, J.; MONCLÚS, M. & PREVOSTI, A. 1979. High ethanol tolerance in two distantly related *Drosophila* species. A probable case of recent convergent adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63C: 53-56.
- DAVID, J.; V. HERREWEGE, J.; SCHEEMAERKER-LOUIS, M. & PLA, E. 1981. *Drosophila* alcohol dehydrogenase: detoxification of isopropanol and acetone, substances not used in energy metabolism. *Heredity*, 47: 263-268.
- DAVID, J. & V. HERREWEGE, J. 1983. Adaptation to alcoholic fermentation in *Drosophila* species: relationship between alcohol tolerance and larval habitat. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74 A: 283-288.
- DAVID, J.; KAY, K. & V. HERREWEGE, J. 1984. Acetaldehyde utilization and toxicity in *Drosophila* adults lacking alcohol dehydrogenase or aldehyde oxidase. *Biochem. Genet.*, 22: 1.015-1.029.
- DAVIDSON, W. S.; WALTON, D. J. & FLYNN, T. G. 1978. A comparative study of the tissue and species distribution of NADPH-dependent aldehyde reductase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 60B: 309-315.
- DAY, T. H.; HILLIER, P. C. & CLARKE, B. 1974. The relative quantities and catalytic activities of enzymes produced by alleles at the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 11: 155-166.
- DEITRICH, R. A.; TROXELL, P. A.; WORTH, W. S. & ERWIN, V. G. 1976. Inhibition of aldehyde dehydrogenase in brain and liver by cyanide. *Biochem. Pharmacol.*, 25: 2.733-2.738.
- DELTOMBE-LIETAERT, M. C.; DELCOUR, J.; LENELLE-MONTFORT, N. & ELENS, A. 1979. Ethanol metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, 35: 579-581.
- DICKINSON, W. J. 1970. The genetics of aldehyde oxidase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 66: 487-496.
- 1971. Aldehyde oxidase in *Drosophila melanogaster*: a system for genetic studies of developmental regulation. *Develop. Biol.*, 26: 77-86.
- 1978. Genetic control of enzyme expression in *Drosophila*: a locus influencing tissue specificity of aldehyde oxidase. *J. Exp. Zool.*, 206: 333-342.
- FISHER, J. A. & MANIATIS, T. 1985. Structure and transcription of the *Drosophila mulleri* alcohol dehydrogenase gene. *Nucleic Acids Res.*, 13: 6.899-6.917.
- FREETH, A. L. & GIBSON, J. B. 1985. Alcohol dehydrogenase and sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase null activity alleles in natural populations of *D. melanogaster*. *Heredity*, 55: 369-374.
- GARCIN, F.; CÔTE, J.; RADOUCO-THOMAS, S.; KASIECZUK, D.; CHAWLA, S. & RADOUCO-THOMAS, C. 1983(A). Acetaldehyde oxidation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*: evidence for the presence of an NAD<sup>+</sup> dependent dehydrogenase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75B: 205-210.
- GARCIN, F.; CÔTE, J.; RADOUCO-THOMAS, S.; CHAWLA, S.; RADOUCO-THOMAS, C. 1983(B). *Drosophila* ethanol metabolizing system. Acetaldehyde oxidation in ALDOX-null mutants. *Experientia*, 39: 1.122-1.123.
- GARCIN, F.; LAROCHELLE, C.; LAU-YOU, G. & CÔTE, J. 1985. Acetaldehyde oxidation in *Drosophila* null-mutants for alcohol dehydrogenase. *Experientia*, 41: 946-948.
- GEER, B. W.; LANGEVIN, M. L.; MCKECHNIE, S. W. 1985. Dietary ethanol and lipid synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, 23: 607-622.
- GIBSON, J. B. 1970. Enzyme flexibility in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 227: 959-960.
- 1972. Differences in the number of molecules produced by two allelic electrophoretic enzyme variants in *D. melanogaster*. *Experientia*, 28: 975-976.
- GOLDBERG, D. A. 1980. Isolation and partial characterization of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5.794-5.798.
- GOLDBERG, D. A.; POSAKONY, J. W. & MANIATIS, T. 1983. Correct developmental expression of a cloned alcohol dehydrogenase gene transduced into the *Drosophila* germ line. *Cell*, 34: 59-73.
- GONZÁLEZ-DUARTE, R. & ATRIAN, S. 1986. Metabolic response to alcohol ingestion in *Drosophila hydei*. *Heredity*, 56: 123-129.
- GONZÁLEZ-DUARTE, R. & VILAGELIU, L. I. 1985. Metabolic response to ethanol and isopropanol in *D. funebris* and *D. immigrans*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80 C: 189-193.
- GONZÁLEZ-DUARTE, R.; JUAN, E.; VILAGELIU, L. I. & ATRIAN, S. 1986. El sistema alcoholdehidrogenasa. *Investigación y Ciencia*, 113: 56-69.
- GRELL, E. H.; JACOBSON, K. B. & MURPHY, J. B. 1968. Alterations of genetic material for analysis of alcohol dehydrogenase isozymes of *Drosophila melanogaster*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 151: 441-455.
- GROSSMAN, A.; KORENOVA, L. G. & ULITSKAYA, L. E. 1970. Variation of the alcohol dehydrogenase locus in natural populations of *Drosophila melanogaster* (in Russia). *Genetika*, 6: 91-96.
- HEBERLEIN, V.; ENGLAND, B. & TJIAN, R. 1985. Characterization of *Drosophila* transcription factors that activate the tandem promoters of the alcohol dehydrogenase gene. *Cell*, 41: 965-977.
- HEINSTRAS, P. W. H.; EISSES, K. Th.; SCHOONEN, G. E. J.; ABEN, W.; DE WINTER, A. J.; VAN DER HORST, D. J.; VAN MARREWIJK, W. J. A.; BEENAKKERS, A. M. Th.; SCHARLOO, W. & THÖRIG, G. E. W. 1983. A dual function of alcohol dehydrogenase in *Drosophila*. *Genetica*, 60: 129-137.
- HOUGOUTO, N.; LIETAERT, M. C.; LIBION-MANNAERT, M.; FEYTMANS, E. & ELENS, A. 1982. Ovoposition-site preference and ADH activity in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 58: 121-128.
- JOHNSON, F. M. & DENNISTON, C. 1964. Genetic variation of alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 204: 906-907.
- JÖRVALL, H.; PERSSON, M. & JEFFERY, J. 1981. Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 4.226-4.230.

- JUAN, E. & GONZÁLEZ-DUARTE, R. 1980. Purification and enzyme stability of alcohol dehydrogenase from *Drosophila simulans*, *Drosophila virilis* and *Drosophila melanogaster* Adh<sup>S</sup>. *Biochem. J.*, 189: 105-110.
- 1981. Determination of some biochemical and structural features of alcohol dehydrogenases from *Drosophila simulans* and *Drosophila virilis*. *Biochem. J.* 195: 61-69.
- KAMPING, A. & VAN DELDEN, W. 1978. The alcohol dehydrogenase polymorphism in populations of *Drosophila melanogaster*. II. Relation between ADH activity and adult mortality. *Biochem. Genet.*, 16: 541-551.
- KEILIN, D. & HARTREE, E. F. 1945. Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. *Biochem. J.*, 39: 293-296.
- KRENITSKY, T. A. 1978. Aldehyde oxidase and xanthine oxidase functional and evolutionary relationships. *Biochem. Pharmacol.*, 27: 2.763-2.764.
- LIETAERT, M. C.; LIBION-MANAERT, M.; ELENS, A. 1981. Acetaldehyde metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, 37: 689-690.
- LIETAERT, M. C.; LIBION-MANAERT, M.; HOUGOUTO, N. & ELENS, A. 1982. How can *Drosophila* flies without aldehyde oxidase detoxify acetaldehyde? *Experientia*, 38: 651-652.
- LIETAERT, M. C.; LIBION-MANAERT, M.; WATTIAUX-DE CONINCK, S. & ELENS, A. 1985. *Drosophila melanogaster* aldehyde dehydrogenase. *Experientia*, 41: 57-58.
- MADHAVAN, K.; CONSCIENCE-EGLI, M. SIEBER, F. & URSPRUNG, H. 1973. Farnesol metabolism in *Drosophila melanogaster*. Ontogeny and tissue distribution of octanol dehydrogenase and aldehyde oxidase. *J. Insect Physiol.*, 19: 235-241.
- MARCHER, H. & TOTTMAR, O. 1978. A comparative study of the effects of disulfiram cyanamide and 1-aminocyclopropanol on the acetaldehyde metabolism in rats. *Acta Pharmac. Tox.*, 43: 219-226.
- MCDONALD, J. F. & AVISE, J. C. 1976. Evidence for the adaptive significance of enzyme activity levels: Interspecific variation in  $\alpha$ -GDPH and ADH in *Drosophila*. *Biochem. Genet.*, 14: 347-355.
- MCDONALD, J. F.; ANDERSON, S. M. & SANTOS, M. 1980. Biochemical differences between products of the Adh locus in *Drosophila*. *Genetics*, 95: 1.013-1.022.
- MCKECHNIE, S. W. & GEER, B. W. 1984. Regulation of alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* by dietary alcohol and carbohydrate. *Insect Biochem.*, 14: 231-242.
- MCKECHNIE, S. W. & MORGAN, P. 1982. Alcohol dehydrogenase polymorphism of *D. melanogaster*: aspects of alcohol and temperature variation in the larval environment. *Austr. J. Biol. Sci.*, 35: 85-93.
- MCKENZIE, J. A.; PARSONS, P. A. 1972. Alcohol tolerance: an ecological parameter in the relative success of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Oecologia*, 10: 373-388.
- MIDDLETON, R. J. & KACSER, H. 1983. Enzyme variation, metabolic flux and fitness: Alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 105: 633-650.
- MILKMAN, R. 1976. Further evidence of thermostability variation within electrophoretic mobility classes of enzymes. *Biochem. Genet.*, 14: 383-387.
- MONCLÚS, M. & PREVOSTI, A. 1979. Cellars habitat and *Drosophila* populations. *Genética Ibérica*, 30-31: 189-201.
- MOXON, L. N.; HOLMES, R. S. & PARSONS, P. A. 1982. Comparative studies of aldehyde oxidase, alcohol dehydrogenase and aldehyde resource utilization among Australian *Drosophila* species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 71B: 387-395.
- O'DONELL, J.; GERACE, L.; LEISTER, F. & SOFER, W. 1975. Chemical selection of mutants that affect alcohol dehydrogenase in *Drosophila*: II. Use of 1-pentyne-3-ol. *Genetics*, 79: 73-83.
- ORME-JOHNSON, W. H. & ZIEBLER, D. M. 1965. Alcohol mixed function oxidase activity of mammalian liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 21: 78-83.
- PAPEL, J.; HENDERSON, M.; VAN HERREWEGE, J.; DAVID, J. & SOFER, W. 1979. *Drosophila* alcohol dehydrogenase activity *in vitro* and *in vivo*: effects of acetone feeding. *Biochem. Genet.*, 17: 553-563.
- PARRILLA, R.; OHKAWA, K.; LINDROS, K. O.; ZIMMERMAN, V.-J.P.; KOBAYASHI, J. & WILLIAMSON, J. R. 1974. Functional compartmentation of acetaldehyde oxidation in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 249: 4.926-4.933.
- RICHMOND, R. C. & GERKING, J. L. 1979. Oviposition site preference in *Drosophila*. *Behav. Genet.*, 9: 233-241.
- SACKTOR, B. 1965. Energetics and respiratory metabolism of muscular contraction. En: ROCKSTEIN, M. (Ed): *Physiology of insecta*, II: 483-580. Academic Press. New York.
- SAMPEL, B. 1977. Isolation and genetic characterization of alcohol dehydrogenase thermostability variants occurring in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, 15: 971-988.
- SOFER, W. H. & HATKOFF, M. A. 1972. Chemical selection of alcohol dehydrogenase negative mutants in *Drosophila*. *Genetics*, 72: 545-549.
- THATCHER, D. R. 1977. Enzyme instability and proteolysis during purification of alcohol dehydrogenase from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.*, 163: 317-323.
- 1980. The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase alleloenzymes (Adh<sup>a-11</sup>, Adh<sup>S</sup>, Adh<sup>UF</sup>) from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.*, 187: 875-886.
- THÖRIG, G. E. W.; SCHOONE, A. A. & SCHARLOO, W. 1975. Variation between electrophoretically identical alleles at the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, 13: 721-731.
- TURNER, A. J. & TIPTON, K. F. 1972. The characterization of two reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-linked aldehyde reductases from pig brain. *Biochem. J.*, 130: 765-772.
- URSPRUNG, H.; SOFER, W. H. & BURROUGHS, N. 1970. Ontogeny and tissue distribution of alcohol dehydrogenase in *D. melanogaster*. *Wilhelm Roux Arch.* 164: 201-208.
- VAN DELDEN, W.; KAMPING, A. & VAN DIJK, H. 1975. Selection at the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, 31: 418-419.



- VAN HERREWEGE, J. & DAVID, J. 1974. Utilisation de l'alcool étilique dans le métabolisme énergétique d'un insecte: influence sur la durée de survie dans les adultes de *Drosophila melanogaster*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 279: 335-338.
- 1978. Feeding and insect through its respiration: assimilation of alcohol vapors by *Drosophila melanogaster* adults. *Experientia*, 34: 163-164.
- 1980. Alcohol tolerance and alcohol utilization in *Drosophila*: partial independence of two adaptive traits. *Heredity*, 44: 229-235.
- VIGUE, C. L. & JOHNSON, F. M. 1973. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. VI. Frequency-property-environment relationships of allelic alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, 9: 213-227.
- VILAGELIU, Ll. & GONZÁLEZ-DUARTE, R. 1980. Effect of ethanol and isopropanol on the activity of alcohol dehydrogenase, viability and life-span in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila funebris*. *Experientia*, 36: 828-829.
- 1984. Alcohol dehydrogenase from *Drosophila funebris* and *Drosophila immigrans*: molecular and evolutionary aspects. *Biochem. Genet.*, 22: 797-815.
- WINBERG, J. O.; THATCHER, D. R. & MCKINLEY-MCKEE, J. S. 1982 a). Alcohol dehydrogenase from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. Inhibition studies of the alleloenzymes Adh<sup>UF</sup>. *Biochim. Biophys. Acta*, 704: 17-25.
- 1982 b). Alcohol dehydrogenase from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. Substrate specificity of the alleloenzymes Adh<sup>S</sup> and Adh<sup>UF</sup>. *Biochim. Biophys. Acta*, 704: 7-16.