

Modificaciones a nivel celular hepático en ratas sometidas a malnutrición proteico-calórica

A. Marcos, E. Muñoz-Martínez, M. T. Unzaga, J. L. Rey de Viñas y G. Varela

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
Madrid-3

(Recibido el 27 de julio de 1983)

A. MARCOS, E. MUÑOZ-MARTÍNEZ, M. T. UNZAGA, J. L. REY DE VIÑAS and G. VARELA. *Changes in Liver Cells from Rats Suffering Protein-Calorie Malnutrition*. Rev. esp. Fisiol., **40**, 165-170, 1984.

The effect of a low protein-calorie diet (restricted diet) on cellular growth and on RNA metabolism in Wistar rat liver has been studied. Experimentation was carried out over 30 days and the comparisons were made against well-nourished group (10 % protein, controls). Liver weight and hepatic proteins dropped significantly in malnourished rats. Both rate of DNA and number of nuclei were unchanged. However, protein/DNA and liver weight/number of nuclei ratios decreased, which led to an atrophy phenomenon.

DNase specific activity however, was not modified. Liver RNA content together with RNase activity dropped in deficient rats. Protein synthesis capacity (RNA/protein) did not change. These results suggest that restricted diet leads to a lower hepatocyte size with a decreased rate of RNA turnover.

Key words: Protein, Calorie, Malnutrition, RNA, DNA, Liver.

En el proceso de adaptación al déficit proteico y/o calórico de la dieta, están implicados varios mecanismos metabólicos, entre los cuales destacan servomecanismos a nivel celular. El incremento en la degradación proteica es según MILLWARD *et al.* (13) la respuesta inicial del hígado de rata a la malnutrición proteica. En este fenómeno juegan un importante papel los enzimas hidrolíticos lisosómicos, tanto durante déficits proteicos como proteico-calóricos, según se ha comprobado en trabajos previos (15, 16).

A consecuencia de este aumento catabólico, la malnutrición proteica afecta a la síntesis de DNA (3) y a la proliferación celular hepáticas (23), las cuales disminuyen durante el proceso, especialmente en ratas en período de desarrollo primario. Estas alteraciones también aparecen durante el período de crecimiento hipertrófico por efecto de la dieta proteín-deficiente (16), comprometiéndose el desarrollo celular normal.

También el metabolismo del RNA está profundamente afectado durante malnutrición proteica, produciéndose

una pérdida de este ácido nucleico, lo que se relaciona con el aumento en la actividad degradativa de la ribonucleasa (16, 18).

No obstante, LEWIS y WINICK (10) indican que la ingestión de una dieta pobre en proteína determina cambios celulares que estimulan al núcleo a sintetizar y procesar RNA nucleolar y nucleoplásmico con mayor rapidez.

Ello podría relacionarse con la elevación de la síntesis proteica, indicada por GARLICK *et al.* (5) en hígado de ratas sometidas a una malnutrición prolongada y observada en trabajos previos (16).

Hay que señalar por otra parte, que la variabilidad en la concentración de proteínas y calorías en la dieta afecta de distinta forma a estos mecanismos. De acuerdo con ello, HILL *et al.* (6) sugieren que existen diferencias a nivel celular hepático, entre ratas alimentadas con dietas adecuadas en energía pero restringidas en proteína y ratas sometidas a restricción energética, pero con un contenido adecuado en proteína.

Teniendo en cuenta la mayor frecuencia de déficits combinados de proteínas y calorías dietarias y su incidencia en clínica humana, es de gran interés estudiar los efectos producidos por la ingesta restringida al 50 % de la control, sobre el crecimiento celular y el metabolismo del RNA hepáticos. Con este objeto se investigan los siguientes aspectos: 1) examen del crecimiento celular cuantificando el número (tasa de DNA) y el tamaño celular (proteína/DNA y peso hígado/número de núcleos), 2) comprobación de la actividad degradativa del enzima deoxirribonucleasa ácida (DNasa), 3) estudio de las variaciones de la tasa de RNA y su relación con la capacidad de síntesis proteica (RNA/proteína) y 4) determinación de la actividad del enzima ribonucleasa ácida (RNasa) en relación a la tasa de RNA.

Material y métodos

Diseño experimental. Se utilizan ratas macho Wistar de ocho semanas de vida y con un peso medio de 135 g aproximadamente, agrupadas como se indica: a) *Control*, alimentadas con una dieta basal (10 % caseína-metionina), y b) *Restringido* al 50 % de la cantidad que ingiere el grupo control, dando lugar a una malnutrición proteico-calórica. La composición de las dietas se ha descrito previamente (15).

Los animales son instalados en jaulas individuales en una habitación iluminada de 8 h a 20 h y mantenida a 23° C. El agua es suministrada *ad libitum* y el experimento se prolonga durante 30 días, a lo largo de los cuales se controla periódicamente la ingesta y el peso de los animales.

Al final del experimento, los animales son pesados y sacrificados en grupos de 10. El hígado es extraído y pesado; una parte alícuota del mismo es homogenizada en un homogenizador ultraturax con solución tampón (CINa 0,1 M y CO₂HNa 0,05 M) a pH 7,4 en una proporción del 20 % (P/V). Posteriormente, se centrifuga a 550 × g durante 10 minutos a 0-4° C. Alícuotas de los sobrenadantes se utilizan para análisis de proteínas y actividades enzimáticas.

La determinación de los ácidos nucleicos se lleva a cabo previa extracción de los mismos, mediante el tratamiento del hígado con ácido tricloroacético.

Ensayos analíticos. Las actividades de DNasa y RNasa ácidas se determinan por los métodos de KALNITSKY *et al.* modificado (9) y de McDONALD modificado (12) respectivamente. La actividad específica viene dada por mg de proteína, por órgano total y por célula. Las proteínas se determinan por el método de LOWRY *et al.* (11). La cuantificación de DNA y RNA se realiza mediante el método de SCHMIDT y THANN-

HAUSER (21) con modificación de MUNRO y FLECK (14).

La evaluación del número de núcleos y el tamaño celular se expresan de acuerdo con las fórmulas de ENESCO y LEBLOND (4) y son aplicadas al tejido hepático (20).

Los resultados son expresados como valores medios $\pm$ SEM. Las diferencias significativas entre los datos resultantes de comparar el lote control con el malnutrido, se determinan por el test de la t de Student (22). La probabilidad menor de 0,05 se considera significativa.

Resultados y discusión

El modelo de malnutrición utilizado conduce a la aparición de un déficit proteico-calórico que origina una disminución en el crecimiento corporal de un 38 % de los animales deficitarios en relación a los bien alimentados, permitiéndoles no obstante, un crecimiento positivo de un 17 % sobre su peso inicial, de acuerdo con trabajos anteriores (15).

El decrecimiento afecta asimismo al tamaño del hígado, cuya disminución en peso (38 %) es proporcional a la pérdida del peso corporal, lo que hace invariable

el índice hepato-somático (tabla I). Sin embargo, esta pérdida de peso no se debe a la caída en el número total de células hepáticas, puesto que no aparece modificación alguna en la tasa de DNA total ni en el número de núcleos del hígado, dando lugar así a un incremento en la cantidad del nucleótido por gramo de tejido. De acuerdo con esto, ANTHONY y EDOZIEN (1) señalan un alto contenido en DNA/g de hígado, sin modificaciones en el DNA total en ratas sometidas a una dieta restringida.

A pesar del mantenimiento del número de células, el crecimiento celular se afecta por la pérdida de substratos citoplasmáticos, como viene señalado por el descenso de la razón peso hepático/número de núcleos. La proteína se destaca como el factor más importante de esta depleción, puesto que su decrecimiento llega a ser de un 61 % de la control. Además, la profunda caída de la razón proteína/DNA (tabla I) indica, de acuerdo con ROZOVSKI *et al.* (19), una disminución en el tamaño celular, con la aparición de un fenómeno de atrofia hepática. Esta pérdida de substratos celulares coincide con el período de crecimiento hipertrófico en el que se encuentran los animales en estudio, lo

Tabla I. Efecto de la deficiencia proteico-calórica sobre el crecimiento celular en hígado de rata. Media $\pm$ SEM. 10 ratas por grupo. Se compara el grupo restringido frente al control.

	CONTROL	RESTRINGIDO	SIGNIFICACION
Peso hígado (g)	7,69 $\pm$ 0,36	4,72 $\pm$ 0,12	P < 0,001
Índice hepato-somático	30,63 $\pm$ 1,41	29,92 $\pm$ 0,73	NS
Proteínas (mg/órgano)	1260 $\pm$ 64	490 $\pm$ 17	P < 0,001
DNA (mg/órgano)	33,39 $\pm$ 1,00	32,84 $\pm$ 0,73	NS
DNA (mg/g órgano)	4,34 $\pm$ 0,21	6,96 $\pm$ 0,15	P < 0,001
Número núcleos (millones)*	5386 $\pm$ 161	5297 $\pm$ 117	NS
Proteína/DNA	38,01 $\pm$ 1,02	14,98 $\pm$ 0,33	P < 0,001
Tamaño celular (ng)**	1,44 $\pm$ 0,04	0,90 $\pm$ 0,02	P < 0,001
DNasa ¹ /órgano	161,33 $\pm$ 12,11	53,99 $\pm$ 3,91	P < 0,001
DNasa ¹ /mg proteína	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02	NS
DNasa ¹ /DNA	4,83 $\pm$ 0,36	1,65 $\pm$ 0,12	P < 0,001

* U.I. $\frac{\text{DNA}}{0,2} \times 10^3$; ** $\frac{\text{Peso hígado}}{\text{Número de núcleos}} \times 10^3$

que para JASPER y BRASEL (8), constituye un determinante crítico de los efectos de la malnutrición sobre el crecimiento celular.

En contraste con estos resultados, la malnutrición proteica (1 %) determina una disminución muy significativa, tanto en el número como en el tamaño de los hepatocitos de rata, durante el mismo período experimental (16).

Por otra parte, la degradación del DNA hepático se mantiene constante en estas circunstancias, al no modificarse la actividad específica del enzima DNasa ácida, a pesar de la pérdida sufrida en valores absolutos, tanto por órgano como por célula (tabla I).

De todo ello se puede deducir que, durante la malnutrición proteico-calórica, el DNA parece poco susceptible a la acción de la DNasa ácida. En este sentido, CASTRO y SEVALL (2) utilizando dietas bajas en carbohidratos y sin proteínas, encuentran también una disminución en la cantidad de DNA capaz de degradarse por la nucleasa microcócica.

La modificación del metabolismo del RNA por la malnutrición proteico-calórica, viene determinada por la pérdida de este ácido nucleico tanto por gramo (40 %) como por órgano (63 %) en relación al grupo control (tabla II). Este resultado es similar al encontrado

previamente en hígado de ratas sometidas a deficiencia proteica (16).

También HIRSCH y HIATT (7) trabajando con ratas en ayuno, encuentran un decrecimiento de la tasa total de RNA hepático y lo relacionan tanto con un aumento de la velocidad de degradación, como con una disminución en la síntesis de este ácido nucleico.

Por el contrario, de nuestros resultados se puede deducir que el déficit proteico-calórico de la dieta utilizada parece determinar un decrecimiento en el catabolismo del RNA. Así, la actividad específica del enzima RNasa ácida disminuye un 21 % en relación a las ratas bien alimentadas. Por consiguiente, la disminución de la tasa de RNA no parece depender de un proceso degradativo incrementado, por lo que este efecto podría estar determinado por un decrecimiento en su síntesis. Además, se observa que la caída de RNA y de RNasa ácida es la misma magnitud, puesto que la razón RNA/RNasa no se modifica respecto a controles (tabla II).

A pesar de la deficiencia dietaria, la capacidad de síntesis proteica permanece constante en relación al grupo control, como señala la invariabilidad del cociente RNA/proteína. A estos mismos datos llega MILLWARD *et al.* (13) en hígado de ratas sometidas a ayuno. Sin embargo, la ingestión de una dieta

Tabla II. Efecto de la deficiencia proteico-calórica sobre el metabolismo del RNA en hígado de rata. Media $\pm$ SEM. 10 ratas por grupo. Se compara el grupo restringido frente al control.

	CONTROL	RESTRINGIDO	SIGNIFICACION
RNA (mg/órgano)	40,14 $\pm$ 1,73	14,98 $\pm$ 0,57	P < 0,001
RNA (mg/g órgano)	5,22 $\pm$ 0,28	3,15 $\pm$ 0,08	P < 0,001
RNA/proteína	31,86 $\pm$ 1,37	30,41 $\pm$ 1,17	NS
RNA/DNA	1,20 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,02	P < 0,001
RNasa ¹ /órgano	21,77 $\pm$ 0,97	6,63 $\pm$ 0,84	P < 0,001
RNasa ² /mg proteína	17,42 $\pm$ 0,86	13,78 $\pm$ 1,18	P < 0,05
RNasa ¹ /RNA	0,56 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,06	NS
RNasa ¹ /DNA	0,65 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,03	P < 0,001

¹ U.I.; ² mU.I.

proteín-deficiente origina un incremento en la formación de las proteínas hepáticas, mecanismo que parece corresponder a un proceso de adaptación más adecuado a este nivel dietario (17).

De todo ello se deduce que la dieta restringida al 50 % de la control altera la función de crecimiento celular del hígado de rata, mediante la disminución del tamaño de los hepatocitos, con mantenimiento del número total de células. Además, esta dieta origina un menor catabolismo del RNA, posiblemente acompañado de un decrecimiento de la síntesis, lo que explicaría el descenso encontrado en los valores del nucleótido.

Resumen

Se estudia el efecto de una dieta deficiente en proteína y calorías (restringida al 50 % de una dieta control) durante 30 días, sobre el crecimiento celular y el metabolismo del RNA en hígado de ratas Wistar. El peso del hígado y las proteínas hepáticas de las ratas alimentadas con dietas restringidas, disminuyen significativamente, aun cuando la tasa de DNA y el número de núcleos permanecen invariables. Sin embargo, las fracciones proteína/DNA y peso hígado/número núcleos decrecen, dando lugar a un fenómeno de atrofia hepática. La actividad específica del enzima DNasa no se modifica. La aparición de una menor tasa de RNA en los animales deficientes está acompañada de una disminución de la actividad específica de RNasa, paralela a la caída del nucleótido. La capacidad de síntesis proteica hepática (RNA/proteína) no se modifica. Se concluye que durante la adaptación a una dieta deficiente en proteínas y calorías se afecta el tamaño celular y se produce un posible decrecimiento del turnover del RNA hepático.

Bibliografía

1. ANTHONY, L. E. y EDOZIEN, J. C.: *J. Nutr.*, **105**, 631-648, 1975.
2. CASTRO, C. E. y SEVALL, J. S.: *J. Nutr.*, **110**, 105-116, 1980.
3. DALLMAN, P. R.: *J. Cell. Biol.*, **51**, 549-553, 1971.
4. ENESCO, M. y LEBLOND, C. P.: *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **10**, 530, 1962.
5. GARLICK, P. J., MILLWARD, D. J., JAMES, W. P. T. y WATERLOW, J. C.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **414**, 71-84, 1975.
6. HILL, D. E., HOLT, A. B., PARRA, A. y CHEEK, D. B.: *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, **127**, 146-163, 1970.
7. HIRSCH, G. A. y HIATT, H. H.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 5936-5940, 1966.
8. JASPER, H. L. y BRASEL, J. A.: *J. Nutr.*, **104**, 405-414, 1974.
9. KALNITSKY, G., HUMMEL, J. P., KESNICK, H., CARTER, J. R., BARNETT, L. B. y DIERKS, C.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **81**, 542-566, 1959.
10. LEWIS, CH. G. y WINICK, M.: *J. Nutr.*, **108**, 329-340, 1978.
11. LOWRY, O. A., ROSEBROUGH, N. J., FAIR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
12. McDONALD, M. R.: En «Methods in Enzymology» (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.). Vol. II. Acad. Press, Nueva York, 1955, pp. 437-447.
13. MILLWARD, D. J., GARLICK, P. J., STEWART, R. J. C., NNANYELUGO, D. O. y WATERLOW, J. C.: *Biochem. J.*, **150**, 235-243, 1975.
14. MUNRO, H. N. y FLECK, A.: *Analyst*, **91**, 78-88, 1966.
15. MUÑOZ-MARTÍNEZ, E., MARCOS, A., UNZAGA, M. T. y VARELA, G.: *Rev. esp. Fisiol.*, **38**, Supl. 327-334, 1982.
16. MUÑOZ-MARTÍNEZ, E., MARCOS, A., UNZAGA, M. T. y VARELA, G.: *Ann. Real Acad. Farm.*, **4**, 741-752, 1983.
17. ONISHI, T.: *J. Biochem.*, **67**, 577-585, 1970.
18. ROSSO, P. y WINICK, M.: *J. Nutr.*, **105**, 1104-1110, 1975.
19. ROZOVSKI, S. J., ROSSO, P. y WINICK, M.: *J. Nutr.*, **108**, 1680-1690, 1978.
20. ROZOVSKI, S. J. y WINICK, M.: En «Human Nutrition. A Comprehensive Treatise» (Winick, M. ed.). Plenum Press, Nueva York, 1979, pp. 61-102.
21. SCHMIDT, G. y THANNHAUSER, S. J.: *J. Biol. Chem.*, **161**, 83-89, 1945.
22. SOKAL, R. R. y ROHEF, F. J.: En «Biometría: Los principios y la práctica de la estadística en la investigación biológica» H. Blume. Madrid, 1979, pp. 145-194.
23. WINICK, M. y NOBLE, A.: *J. Nutr.*, **89**, 300-306, 1966.

