

Influencia del ayuno y del cortisol sobre los niveles de arginosuccinato sintetasa, arginosuccinasa y arginasa de hígado de cobaya *

G. Soler, F. J. Mataix y M. Ruiz-Amil

Departamento de Bioquímica
Facultad de Veterinaria
Madrid

(Recibido el 4 de junio de 1979)

G. SOLER, F. J. MATAIX and M. RUIZ-AMIL. *The Influence of Fasting and Cortisol upon Arginosuccinate Synthetase, Arginosuccinase and Arginase Levels in Guinea Pig Liver*. Rev. esp. Fisiol., 36, 77-82. 1980.

The influence of fasting and cortisol treatment on the levels of arginosuccinate synthetase (E.C. 6.3.4.5.), arginosuccinase (E.C. 4.3.2.1.) and arginase (C.E. 3.5.3.1.) from guinea pig liver has been investigated. The results show a general increase in the levels of the mentioned enzymes, with specific enzyme synthesis for fasting, and unspecific for cortisol treatment.

En trabajos anteriores se ha estudiado la regulación nutricional y hormonal, y la caracterización de la ornitina transcarbamilasa de hígado de cobaya (7, 8), así como la regulación de la síntesis de arginosuccinato sintetasa (ASS) (E.C. 6.3.4.5.), arginosuccinasa (AS) (E.C. 4.3.2.1.) y arginasa (A) (E.C. 3.5.3.1.), por insulina, glucagon y testosterona (18).

El objeto del presente trabajo ha o-

decido a un intento de establecer en el cobaya condiciones metabólicas estrechamente correlacionadas con la movilización de aminoácidos y su repercusión en enzimas del ciclo de la urea desde dos situaciones experimentalmente distintas, como son tratamiento con cortisol y ayuno.

Una buena eficacia funcional del ciclo de la urea presupone una regulación de los enzimas que en él participan y así diversos autores han descrito efectos de regulación del citado ciclo en distintos animales (3, 9, 12).

La elección del cobaya se justifica por el hecho de que la regulación enzimática del ciclo de la urea en este animal presenta características diferenciales respecto de la rata y otros animales, como se ha encontrado en trabajos previos (7, 8, 18).

* Parte de este trabajo fue presentado al I Congreso de la FESBE, Madrid (1976), y realizado con ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica de la Presidencia de Gobierno y, en parte, con aparatos donados por la Fundación Alexander von Humboldt.

Material y métodos

Se utilizaron cobayas machos de peso entre 350 y 400 g, distribuidos en lotes de cuatro individuos sometidos a ayuno y tratamiento con cortisol. Dado que en jaulas individuales se observó que los animales disminuían la ingesta, se les agrupó en lotes de cuatro en pequeños habitáculos dispuestos al efecto, cuidándose factores como la temperatura y otros de orden secundario, a fin de evitar efectos de *stress* que pudieran interferir en las experiencias.

La dieta testigo estaba formada por alfalfa (11,25 % de proteína) y cereales (36,74 % de proteína) suministrada con agua *ad libitum*. Los cereales utilizados fueron: cebada, avena y salvado a partes iguales.

Los animales sometidos a ayuno se colocaron en jaulas individuales durante siete días, suministrándoles únicamente agua *ad libitum*.

En cuanto al tratamiento con cortisol, se realizó por administración parenteral diaria de 12 mg de cortisol (suspendidos en una solución estéril de carboximetil celulosa al 0,2 %) por animal, durante siete días.

Los extractos enzimáticos se prepararon por homogeneización de 2 g de hígado del animal recién sacrificado (por sección de las carótidas) con dos veces su volumen de agua destilada. Después de centrifugar durante 30 minutos a $16.000 \times g$ a $0-4^{\circ} C$, se determinó la actividad enzimática en el sobrenadante. La medida de la actividad enzimática de la ASS se realizó en extractos crudos utilizando la técnica descrita por SCHIMKE (13), pero midiendo la citrulina no consumida por el método de ARCHIBALD (1), en lugar de la urea formada, y añadiendo pirofosfatasa a la mezcla de reacción para evitar la inhibición por pirofosfato. La mezcla de reacción contenía L-citrulina, 2 μ moles; L-aspartato, 5 μ moles; ATP, 3 μ moles; PEP, 5 μ moles; piruvatocinasa, 4 U, y pirofosfa-

tasa, 2 U. La cantidad de extracto añadido fue de 0,05 ml, conteniendo aproximadamente 4 mg de proteína. El volumen final fue de 1 ml.

La medida de la actividad enzimática de la AS se basó en el método de RATNER (10). La mezcla de reacción contenía 50 μ moles de tampón fosfato pH 7,5; 5 μ moles de L-arginosuccinato potásico y 10 unidades de arginasa. La cantidad de extracto enzimático añadido fue de 0,1 ml, conteniendo aproximadamente 3 mg de proteína. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 1 ml.

La medida de la actividad enzimática de la arginasa se realizó según la técnica empleada por SCHIMKE (16). La mezcla de reacción contenía 450 μ moles de L-arginina pH 9,7 y 1 μ mol de Cl_2Mn , a esta mezcla se le añade 0,1 ml de extracto enzimático activado. La activación del extracto se realiza adicionando a 0,9 ml de extracto (diluido a 1/40) 0,1 ml de Cl_2Mn 0,1 M y calentando en baño maría 5 minutos a $45^{\circ} C$. A continuación se centriuga durante 10 minutos a 8.000 rpm, entre $0^{\circ} C$ y $4^{\circ} C$. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 1,1 ml.

La determinación de proteína se realizó según el método de LOWRY *et al.* (6).

La unidad de actividad enzimática (U) corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μ mol de sustrato o la producción de 1 μ mol de producto por minuto.

Resultados y discusión

Las actividades de la ASS, AS y A en cobayas sometidos a los tratamientos anteriormente descritos, muestran variaciones de distinta significación, lo cual está de acuerdo en líneas generales con los resultados descritos para la rata por otros autores (14, 15).

En las tablas II, III y VI se muestran los valores de actividades enzimáticas de hígados de cobayas sometidos a ayuno. Estos resultados siguen el modelo de res-

Tabla I. *Variación de peso del animal entero y del hígado de cobayas sometidas a ayuno y tratamiento con cortisol (12 mg/día) durante 7 días.*

Peso (g)	Testigo	Ayuno	Cortisol
Inicial	380,00 ± 11,54	395,00 ± 10,80	338,75 ± 17,50
Final	376,25 ± 11,80	257,75 ± 18,60***	355,00 ± 26,05
De hígado	14,12 ± 1,37	6,12 ± 0,85***	19,87 ± 2,09**

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

puesta de ratas sometidas al mismo tratamiento (14), aunque nuestros valores son en general menos acusados.

Las actividades de los enzimas se han expresado en unidades por gramo de hígado, unidades por miligramo de proteína y unidades por hígado total. Esta expresión viene obligada porque en situaciones tales como el ayuno, donde el catabolismo es muy acusado y se presenta prácticamente a todos los niveles orgánicos, la consideración de la actividad expresada de una sola forma impide la mejor interpretación de estos hechos. Y así, al considerar que las actividades por hígado de cobayas en ayuno disminuyen ligeramente, siendo sólo significativo en el caso de la ASS, se podría pensar que apenas ha habido regulación. Sin embargo, si se tiene en cuenta que tanto el peso del hígado (tabla I) como los valores de proteína por hígado total (tablas II, III y IV) disminuyen un 50 % al referir la actividad enzimática a gramo de hígado y miligramo de proteína (actividad específica), estas actividades aumentan de manera muy significativa. Por ello, se puede deducir, que ante una depleción hepática, este órgano reacciona con el efecto compensador de síntesis de proteínas enzimáticas específicas, y/o no movilización de éstas, para satisfacer las necesidades metabólicas en general y en este caso concreto la de detoxicación de amoníaco.

A pesar del efecto compensador citado previamente, hay una clara diferencia cuantitativa, puesto que a igual actividad

enzimática total o ligera disminución de ASS, el hígado del animal en ayuno tiene que llevar a cabo una función detoxicante mucho mayor que la del animal normal, como se comprueba si tenemos en cuenta que mientras el peso de estos animales se mantiene prácticamente constante el de los animales ayunados ha disminuido al final del período experimental aproximadamente en un 30 %.

Por lo indicado anteriormente, parece claro que existe una regulación, aunque no del todo perfecta. En este sentido, los estudios llevados a cabo en rata (14) muestran variaciones más acusadas en los niveles enzimáticos, en situaciones experimentales idénticas, mostrando prácticamente iguales variaciones de peso total y hepático. Este hecho vuelve a confirmar que las características reguladoras de cobayas respecto a la rata y otros animales son distintas.

No obstante, no se puede descartar la acidosis que comporta la situación de ayuno, y que, como es conocido, se combate a nivel renal por la formación de sales amónicas merced a las desaminaciones directas a partir de la glutamina. En el caso de ayuno, la detoxicación amónica se regularía no sólo a nivel enzimático hepático, sino también a nivel renal, lo que justifica una respuesta de inducción menos acusada.

En lo que respecta al cortisol, los resultados encontrados en cobayas (tablas II, III y IV) ponen de manifiesto un aumento significativo, frente a los testigos,

Tabla II. Variaciones de actividad de la arginosuccinato sintetasa en cobayas sometidos a ayuno y tratamiento con cortisol (12 mg/día) durante 7 días.

Actividad	Testigo	Ayuno	Cortisol
U/ml ó g de hígado (peso fresco)	5,63 ± 0,33	8,26 ± 0,69***	7,30 ± 0,53**
mU/mg de proteína	53,25 ± 4,19	61,62 ± 4,17*	61,00 ± 2,16*
U/hígado total	79,63 ± 5,96	50,77 ± 4,17***	144,25 ± 5,54***
mg proteína/ml	105,37 ± 2,86	138,62 ± 4,64***	119,30 ± 9,45*
mg de proteína por hígado total	1490,06 ± 170,35	848,62 ± 119,90***	2357,10 ± 102,30***

Se considera que 1 g de hígado equivale a un volumen de 1 ml. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Tabla III. Variaciones de actividad de la arginosuccinasa en cobayas sometidos a ayuno y tratamiento con cortisol (12 mg/día) durante 7 días.

Actividad	Testigo	Ayuno	Cortisol
U/ml ó g de hígado (peso fresco)	3,90 ± 0,46	8,56 ± 0,60***	4,14 ± 0,93
mU/mg de proteína	33,00 ± 3,53	58,07 ± 3,55***	33,30 ± 4,50
U/hígado total	57,68 ± 5,64	52,21 ± 7,91	80,80 ± 8,97**
mg de proteína/ml	119,00 ± 7,84	146,50 ± 4,43**	119,30 ± 9,44
mg de proteína por hígado total	1675,57 ± 118,80	894,62 ± 101,00***	2537,10 ± 102,30***

Se considera que 1 g de hígado equivale a un volumen de 1 ml. ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Tabla IV. Variaciones de actividad de la arginasa en cobayas sometidos a ayuno y tratamiento con cortisol (12 mg/día) durante 7 días.

Actividad	Testigo	Ayuno	Cortisol
U/ml ó g de hígado (peso fresco)	835,15 ± 97,48	1727,65 ± 36,66***	945,87 ± 95,02
U/mg de proteína	7,05 ± 0,57	11,89 ± 0,25***	7,91 ± 0,35°
U/hígado total	11783,50 ± 1563,14	10565,50 ± 1346,93	18691,00 ± 1461,71***
mg de proteína/ml	119,00 ± 7,87	146,50 ± 4,43**	119,30 ± 9,45
mg de proteína por hígado total	1675,37 ± 118,80	849,62 ± 101,00***	2357,10 ± 102,30***

Se considera que 1 g de hígado equivale a un volumen de 1 ml. ° p < 0,1; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

de las actividades enzimáticas por hígado total, tanto para la ASS como para la AS y A; cuando estas actividades se expresan en unidades por gramo de hígado, la ASS muestra aumento significativo, mientras que la de la AS y A son similares a la de los testigos. Las variaciones de la actividad específica son similares a las indicadas en el párrafo anterior, destacándose la ASS que presenta aumento significativo.

Hay que mencionar también que, aunque la cantidad de proteína por gramo de hígado es prácticamente igual en el lote tratado y en el testigo, la proteína total por hígado ha aumentado 1,5 veces como consecuencia de que el peso total del hígado (tabla I) es 1,4 veces mayor en los animales tratados con cortisol.

Resumiendo, de los datos que se acaban de exponer, es evidente que las actividades enzimáticas por gramo de hígado y las específicas, en animales tratados con cortisol, o no muestran variación o no experimentan aumentos acusados, mientras que la actividad por hígado total se ve incrementada en los tres enzimas estudiados.

Estos resultados en cobayas son similares a los obtenidos por SCHIMKE en ratas (15) para la cortisona. El aumento en el rendimiento del ciclo viene acompañado por un aumento de 1,5 veces la cifra de excreción de urea (15), circunstancia que está de acuerdo con los trabajos de KRAMER y FREEDLAND (4), que observaron también un aumento en la producción de urea en ratas sometidas a tratamiento de perfusión hepática con cortisona.

La diferente respuesta en estos animales tratados con cortisol respecto a ayuno, situaciones ambas en las que se presenta movilización de aminoácidos, se justifica por la diferente situación fisiológica de los animales. En este sentido, los animales tratados con cortisol tienen cubiertos sus requerimientos nutricionales, por lo que la movilización de aminoácidos (17, 19) sólo se debería, aparte del recambio

proteico normal del animal, al efecto específico gluconeogénico del cortisol, y así el aumento del peso del hígado en estos animales, que apenas modifican su peso corporal, se debe en parte, además de la síntesis inespecífica de proteína, a los depósitos de glucógeno (5).

Por lo indicado, la cantidad de grupos amonio que deben ser metabolizados en animales tratados con cortisol es necesariamente menor que en el caso de ayuno, lo que se refleja en menores aumentos de los niveles de los enzimas estudiados: sin embargo, es evidente la necesidad de detoxicación que el animal lleva a cabo a nivel de hígado total.

En cualquier caso, el elemento común de la regulación mostrada en este trabajo es la variación, en todos los casos, de los niveles de la ASS, lo cual se explica por ser el enzima limitante del ciclo de la urea (2, 11, 13).

Resumen

Se investiga la influencia del ayuno y del cortisol sobre los niveles de arginosuccinato-sintetasa (E.C. 6.3.4.5.), arginosuccinasa (E.C. 4.3.2.1.) y arginasa (E.C. 3.5.3.1.) en hígado de cobaya. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto, en general, un aumento de los niveles de actividad de los mencionados enzimas, observándose síntesis específica en el caso de ayuno e inespecífica para el tratamiento con cortisol.

Bibliografía

1. ARCHIBALD, R. M.: *J. Biol. Chem.*, 156, 121-142, 1944.
2. BROWN, G. W.: *Nature*, 210, 1367, 1966.
3. IDE, Y. y SHIMBAGASHI, K.: *Nippon, Jui-gaku Zasshi*, 30, 125-130, 1968.
4. KRAMER, J. N. y FREEDLAND, R. A.: *Proc. Soc. Ex. Biol. Med.*, 141, 822-824, 1972.
5. LEHNINGER, A. L.: En «Bioquímica», 2.^a edición, Omega, Barcelona, 1978.
6. LOWRY, O. H., ROSEBOROUGH, N. T., FARR, A. L. y RANDAL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.

7. MATAIX, F. J., VARELA, G. y RUIZ AMIL, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, **30**, 155-158, 1974.
8. MATAIX, F. J. y RUIZ AMIL, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 41-46, 1971.
9. NUZUM, C. T. y SNODGRASS, J.: *Science*, **172**, 1042-1043, 1971.
10. RATNER, S.: *Methods. Enzimol.*, **2**, 356-367, 1955.
11. RATNER, S.: *Advances Enzimol.*, **39**, 1-90, 1973.
12. ROBERGE, A. y CHARBONEAU, R.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **38**, 295-298, 1971.
13. SCHIMKE, R. T.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 459-468, 1962.
14. SCHIMKE, R. T.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1921-1924, 1962.
15. SCHIMKE, R. T.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 1012-1018, 1963.
16. SCHIMKE, R. T.: *Methods. Enzimol.*, **17/A**, 313-317, 1970.
17. SILVER, R. H. y PORTER, C. C.: *Endocrinology*, **52**, 518-525, 1953.
18. SOLER, G., MATAIX, F. J. y RUIZ AMIL, M.: *Anal. Inst. Inv. Vet.*, **25**, 247-258, 1978-1979.
19. SPRAGUE, R. G., MASON, H. L. y POWER, M. H.: *Rec. Prog. Horm. Res.*, **6**, 315-321, 1951.