

Influencia nutricional y hormonal sobre los niveles de ornitina transcarbamilasa de hígado de cobaya

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

Departamento de Fisiología y Bioquímica
Facultad de Veterinaria
Madrid

(Recibido el 2 de marzo de 1974)

F. J. MATAIX, G. VARELA and M. RUIZ-AMIL. *Nutritional and Hormonal Influence on the Guinea Pig Liver Ornithine Transcarbamylase Levels*. Rev. esp. Fisiol., 30, 155-158. 1974.

The ornithine transcarbamylase levels in guinea pig liver after various nutritional or hormonal seven days treatments were determined. Fasting, rich protein (60 %) diet or low protein (6 %) diet did not modify the enzyme levels. Insuline (0.08-0.24 U.I./day) not either. Increases up to 20 % were only observed after glucagon (25-75 μ g/day) or cortisol (12 mg/day) treatment.

El papel clave de la ornitina transcarbamilasa (OTC) (EC 2.1.3.3) (Carbamil fosfato: L-ornitina carbamil transferasa) en la primera etapa enzimática específica de la ureogénesis, lo hace susceptible de regulación en respuesta a cambios nutricionales y hormonales a que pueden estar sometidos los animales.

SCHIMKE observó en ratas (18, 19) que los niveles enzimáticos de OTC aumentaron tres veces cuando los animales se sometían a ayuno o recibían una dieta de gran contenido proteico (60%) en comparación con las alimentadas con dieta de menor riqueza (15 %), o exenta de proteínas. También ha sido estudiado el efecto que sobre los niveles de OTC pueden tener determinados aminoácidos in-

corporados a la proteína de la dieta (14, 20), concluyéndose que las variaciones en los citados niveles se relacionan más bien con el contenido nitrogenado total que con los efectos específicos de los aminoácidos. Otros autores han encontrado igualmente variaciones en los niveles de enzima al modificar la riqueza nutritiva de la dieta en cabra (7) y mono (15).

Con respecto a la influencia de determinadas hormonas se mostró que la administración de la insulina o glucagón a ratas aumentaba la actividad de determinados enzimas del ciclo de la urea, pero no de OTC (13); sin embargo, la corticosterona produjo un aumento del 42 % (20).

En el presente trabajo se estudian los niveles de OTC en hígado de cobayas

sometidos a distintos tratamientos nutricionales y hormonales.

Material y métodos

Se utilizaron cobayas machos de un peso medio aproximado de 500 g, distribuidos en lotes de cuatro individuos, los cuales se sometieron a diversos tratamientos nutricionales y hormonales. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales, cuidándose factores como la temperatura y otros de orden secundario, a fin de evitar efectos de «stress» que pudieran interferir en las experiencias.

Los tratamientos nutricionales fueron ayuno, dieta rica y pobre en proteínas (60 y 6 %, respectivamente) durante siete días. Para la obtención de las dietas se partió de un pienso con 18 % de proteína (con el cual se alimentan los animales testigos) al cual se adicionó caseína para obtener la dieta del 60 % o glucosa y almidón a partes iguales para conseguir la del 6 %. Todos los animales ensayados, excepto los sometidos a ayuno, dispusieron del respectivo pienso y agua *ad libitum*.

Los tratamientos hormonales se llevaron a cabo por administración parenteral diaria durante siete días de insulina, glucagón y cortisol a animales alimentados con el pienso de riqueza proteica del 18 %. Asimismo, a animales sometidos a ayuno durante siete días, se les administró glucagón el sexto y séptimo día. Se utilizaron dos dosis, una triple que la otra. Para las dosis inferiores de insulina y glucagón se tomó como referencia las de aplicación clínica y fueron 0,08 U.I. y 25 μ g por animal y día, respectivamente. Para la dosis inferior de cortisol (4 mg/animal/día) nos basamos en la utilizada para los estudios de digestibilidad en nuestro laboratorio. Los animales del lote testigo se inyectaron con 1 ml de suero fisiológico diario, disolvente de las hormonas administradas. Todos los animales

sometidos a estos tratamientos dispusieron de agua *ad libitum*.

Los extractos enzimáticos se prepararon por homogenización de 2 g de hígado del animal recién sacrificado (por sección completa de las carótidas) con dos veces su volumen de EDTA 50 μ M, en homogenizador tipo Potter, en cámara fría a 0-4° C. Después de centrifugar a 20 000 g durante veinte minutos a 0-4° C, el sobrenadante se empleó para la determinación de la actividad enzimática. La medida de la actividad ornitina transcarbamilasa se realizó según el método de JONES (9), por valoración de la citrulina por la técnica colorimétrica de ARCHIBALD (1), y se expresan en $m\mu$ moles de citrulina formada por minuto, en las condiciones de ensayo. La mezcla de reacción contenía 15 μ moles de carbamil fosfato, 5 μ moles de ornitina y 200 μ moles de tampón tris maleato pH 7,8 en un volumen final de 0,5 ml. La cantidad de extracto enzimático que se agregaba a la mezcla de reacción contenía aproximadamente 0,8 mg de proteínas. La determinación de proteína se realizó según LOWRY *et al.* (10).

Resultados y discusión

La actividad específica de OTC en cobayas sometidos a distintos tratamientos nutricionales no muestra variaciones con respecto al lote testigo (tabla I), lo cual difiere de los resultados descritos por otros autores en ratas, monos y otros animales (7, 15, 18, 19).

En el caso de ayuno, la movilización de aminoácidos y grasas parece evidente, puesto que el peso medio de los animales del lote descende unos 200 g (550 a 350 gramos). La ausencia de aumento en los niveles de OTC podría deberse a que en estos animales el amoníaco liberado se neutraliza a causa de la acidosis metabólica que es propia en estado de gluconeogénesis, o también a un aumento de las desaminaciones directas renales a partir de glutamina y otros aminoácidos (6).

Tabla I. Niveles hepáticos de actividad ornitina transcarbamilasa en cobayas.

Los animales (lotes de cuatro animales) se sometieron durante siete días a ayuno, a dieta rica o pobre en proteína (60 ó 6%, respectivamente), a tratamiento con insulina 0,08 ó 0,24 U.I./día), con glucagón (25 ó 75 µg/día) o con cortisol (4 ó 12 mg/día). Actividad enzimática en mµmoles de citrulina/min/mg de proteína ($\pm$ SEM).

Tratamiento	Actividad específica
Testigos	240 $\pm$ 4
Ayuno	243 $\pm$ 4
Dieta rica en proteína	240 $\pm$ 5
Dieta pobre en proteína	245 $\pm$ 5
Insulina, 0,08 U.I.	230 $\pm$ 5
Insulina, 0,24 U.I.	233 $\pm$ 2
Glucagón, 25 µg	280 $\pm$ 6 *
Glucagón, 75 µg	295 $\pm$ 3 *
Ayuno-glucagón, 25 µg	245 $\pm$ 3
Ayuno-glucagón, 75 µg	252 $\pm$ 3
Cortisol, 4 mg	245 $\pm$ 3
Cortisol, 12 mg	306 $\pm$ 6 *

* Significativamente diferente del lote testigo ($P < 0,01$).

Análogo razonamiento podría explicar la falta de efecto positivo de la dieta rica en proteínas, máxime si se tiene en cuenta que la caseína, con la que se enriquece la dieta, contiene un 36-40 % de aminoácidos cetogénicos (18).

Finalmente, la no variación de la actividad específica en animales alimentados con dieta pobre en proteínas podría atribuirse a una escasa diferencia entre el amoníaco producido por los animales mantenidos con dieta normal (18 % de proteínas) y por los sometidos a dieta pobre en proteínas (6 % de proteínas). Los ensayos de tratamientos hormonales han mostrado variaciones en los niveles de OTC sólo cuando se administraba a los cobayas glucagón o cortisol. Puesto que la acción de la insulina sobre el metabolismo proteico es de naturaleza anabólica, los niveles de amoníaco han de ser menores en animales tratados con esta hormona que en los no tratados (lote

testigo), lo que debiera reflejarse en una disminución de los niveles de OTC. La falta de efecto de la insulina puede deberse a una menor sensibilidad del cobaya a esta hormona.

El aumento apreciable de la actividad específica de OTC por tratamiento de los cobayas con glucagón podría explicar el efecto estimulador de la gluconeogénesis característico de esta hormona. Puesto que el glucagón estimula también la cetogénesis (4) este aumento de la OTC puede explicarse por un incremento de la captación de aminoácidos por el hígado (11), con destino gluconeogénico, que se refleja en aumento de la formación de urea (12). Probablemente en estas condiciones el amoníaco liberado supera a la acidosis, provocando así una inducción de OTC.

Cuando el glucagón se inyecta solo durante los dos últimos días a animales ayunados, no se modifica el nivel de enzima, lo que podría atribuirse fundamentalmente a la demostrada corta «vida media» del glucagón (3, 5), como ocurre en las investigaciones de McLEAN *et al.* (13).

Resulta sumamente interesante el notable aumento de los niveles de OTC de cobaya, cuando se aplica la dosis más alta (12 mg por animal y día) de cortisol, lo que corrobora la acción de esta hormona movilizandolos aminoácidos de las proteínas y provocando alta liberación de amoníaco. Es de hacer notar que la dosis máxima de cortisol de nuestros experimentos es sensiblemente inferior a la de corticosterona empleada por SCHIMKE (20) en sus ensayos con ratas.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la OTC de cobaya está regulada en su síntesis por las hormonas glucagón y cortisol, lo que relaciona este enzima con el estado gluconeogénico que estas hormonas determinan. Sin embargo, la falta de efecto que se observa en las condiciones de ayuno, en que sin duda es operativa la gluconeogénesis, sugiere que el factor determinante de la inducción de

OTC sea la acumulación de amoníaco libre sin neutralizar y que la acción del glucagón y el cortisol aumentando la síntesis de OTC probablemente se ejerce influyendo en este último factor.

Resumen

Se estudian los niveles de actividad ornitina transcarbamilasa de hígado de cobaya, después de tratamientos nutricionales y hormonales de siete días de duración. Ni el ayuno, ni la dieta rica en proteína (60 %), ni la pobre en proteína (6 %), indujeron modificaciones. Tampoco la insulínemia (0,08-0,24 U.I./día).

Sólo se observaron aumentos del nivel enzimático de hasta un 20 % con glucagón (25-75 µg/día) y con cortisol (12 mg/día).

Bibliografía

1. ARCHIBALD, R. M.: *J. Biol. Chem.*, **156**, 121, 1944.
2. ASHIDA, K. y HARPER, A. E.: *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, **107**, 151, 1961.
3. BERSON, S. A., YALOW, R. S. y BOLK, B. W.: *J. Lab. Clin. Med.*, **49**, 331, 1957.
4. BERTHET, J.: *Amer. J. Med.*, **26**, 703, 1959.
5. COX, R. W., HENLEY, E. D., NARAHARA, N. T., VAN ARSDEL, P. P. y WILLIAM, R. H.: *Endocrinology*, **60**, 277, 1957.
6. GUYTON, A. C.: En «Fisiología Médica» (4.ª edic.). Nueva Editorial Interamericana. Méjico, 1971, p. 468.
7. IDE, Y. y SHIMBAGASI, H.: *Nippon Inipoku Zasshi*, **30**, 125, 1968.
8. JOLLES, P.: En «Glycoproteins; their composition, structure and function» (Cottschalk, D., ed.). Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1966, p. 339.
9. JONES, M. E.: En «Carbamyl phosphate synthesis and utilization». *Methods in Enzymology* (Collowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.). Academic Press, New York, 1962, p. 910.
10. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FRARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
11. MALLETTE, L. E., EXTON, J. H. y PARK, C. R.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 5724, 1969.
12. MALLETTE, L. E., EXTON, J. H. y PARK, C. R.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 5713, 1969.
13. McLEAN, P. y NOVELLO, F.: *Biochem. J.*, **94**, 410, 1965.
14. MURAMATSU, K., HIRATA, R., KAWAKISHI, S. y ASHIDA, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 466, 1966.
15. NUZUM, C. T. y SNODGRASS, P. J.: *Science*, **172**, 1042, 1971.
16. RUSSELL, D., LEVIN, B., OBERHOLZER, V. G. y SINCLAIR, L.: *Lancet*, **1**, 699, 1959.
17. SCHIMKE, R. T.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **26**, 363, 1961.
18. SCHIMKE, R. T.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 459, 1962.
19. SCHIMKE, R. T.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1921, 1962.
20. SCHIMKE, R. T.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 1012, 1963.