



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

"EFECTO DE HIDROCORTISONA Y DE INSULINA EN LAS ACTIVIDADES
DE ALGUNAS ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN EL METABOLISMO
DEL AMONIO EN EL HIGADO DE RATA."

TESIS PROFESIONAL

LETICIA CARRIZALES YAÑEZ

03

SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

1984



T
QP 603
.A4
C3
C.1



1080075673



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

**“EFECTO DE HIDROCORTISONA Y DE INSULINA EN LAS ACTIVIDADES
DE ALGUNAS ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN EL METABOLISMO
DEL AMONIO EN EL HIGADO DE RATA.”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A :

LETICIA CARRIZALES YAÑEZ

SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

1984

T
9P603
A1
C3



ESTE TRABAJO FORMA PARTE DEL PROYECTO "REGULACION DEL METABOLISMO CELULAR EN EL TEJIDO NORMAL Y EN EL TEJIDO CANCEROSO" QUE SE ESTA DESARROLLANDO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI, BAJO EL ASESORAMIENTO DEL DR. JESUS MANUEL RODRIGUEZ MEDINA., GRACIAS A DONATIVOS PROPORCIONADOS POR LA DIRECCION DE FOMENTO ACADEMICO E INVESTIGACION DE LA SUBSECRETARIA DE EDUCACION SUPERIOR E INVESTIGACION CIENTIFICA. S.E.P. MEX.



Al Doctor Jesús Manuel Rodríguez Medina,
con agradecimiento, admiración y respeto
quien dirigió este trabajo.

A mis compañeros del Departamento de
Biología Celular.

A Lily muy especialmente por su valiosa
ayuda y compañerismo. Con cariño.

A mis maestros, compañeros y amigos.

A mis padres con el amor y reconocimiento que se merecen, quienes no me abandonan en ningún momento y hermanos.

ABREVIATURAS

AAT _c	Alanina aminotransferasa citosólica
AAT _m	Alanina aminotransferasa mitocondrial
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMP _c	Adenosina 5'-monofosfato cíclico
ASA	Arginasa
ASS	Arginino succínico sintetasa
AST _c	Aspartato aminotransferasa citosólica
AST _m	Aspartato aminotransferasa mitocondrial
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
CM-Sephadex	Carboxi-metil-sephadex
CPS 1	Carbamil fosfato sintetasa I
DAMO	Diacetilmonoxima
EDTA	Acido etilendiaminotetracético.
GDH	Glutamato deshidrogenasa.
GTP	Guanidina 5'-trifosfato
HEPES	N-2-hidroxietil piperazina-N ² -ácido etanosulfónico
K _m	Constante de Michaelis
NAD	Nicotina-adenina dinucleótido
NADH	Nicotina-adenina dinucleótido en forma reducida
NADP	Fosfato de nicotina-adenina dinucleótido
Pi	Fosfato inorgánico
PIPES	Piperazina-N,N'-bis(2 ácido etano sulfónico) sal dipotásica
TRIS	Tris (hidroximetil)-aminometano
TSC	Tiozemicarbazida

INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.** Curva patrón de gamma-monohidroxamato del ácido glutámico. 29
- Fig. 2.** Curva patrón de citrulina. 31
- Fig. 3.** Curva patrón de urea. 34
- Fig. 4.** Curva patrón de albúmina bovina para la determinación de proteínas. 35
- Fig. 5.** Efecto de hidrocortisona sobre las actividades de algunas enzimas del metabolismo del amonio en hígado de ratas machos. 40
- Fig. 6.** Efecto de insulina sobre las actividades de algunas enzimas del metabolismo del amonio en hígado de ratas machos. 45

INDICE DE TABLAS

- Tabla I. Efecto de la adrenalectomía, diabétes y la administración de hidrocortisona e insulina respectivamente sobre el peso de hígado y el contenido de proteína hepática. 37
- Tabla II. Efecto de hidrocortisona sobre la actividad de algunas enzimas del metabolismo del amonio en hígado de ratas machos. 39
- Tabla III. Efecto de insulina sobre la actividad de algunas enzimas del metabolismo del amonio en hígado de ratas machos. 44

CONTENIDO

GENERALIDADES.....	1
a) Alanina aminotransferasa.....	2
b) Aspartato aminotransferasa.....	3
c) Glutamato deshidrogenasa.....	5
d) Glutamina sintetasa.....	6
e) Carbamil fosfato sintetasa.i.....	7
f) Arginino succínico sintetasa.....	8
g) Arginasa.....	9
ANTECEDENTES.....	11
HIPOTESIS.....	19
OBJETIVO.....	21
MATERIALES.....	23
METODOS.....	24
a) Tratamiento hormonal de los animales.....	24
b) Preparación de fracciones celulares.....	25
c) Sonicación.....	26
d) Ensayos enzimáticos.....	26
RESULTADOS.....	36
a) Efecto de la adrenalectomía bilateral ó el estado dia bético del animal sobre el peso corporal, el peso he- pático y el contenido protéico del hígado.....	36
b) Efecto de hidrocortisona sobre las actividades de al- gunas enzimas del metabolismo del amonio.....	38
c) Efecto de insulina sobre la actividad de algunas de - las enzimas del metabolismo del amonio.....	43
DISCUSION.....	48
CONCLUSIONES.....	54
REFERENCIAS.....	56

GENERALIDADES

El metabolismo es un conjunto de reacciones químicas que se llevan a cabo en un organismo vivo, por medio de sistemas multienzimáticos (1). El papel principal de las enzimas, las cuales son catalizadoras, es disminuir la energía de activación de él ó los sustratos (reactivos) en el complejo enzima sustrato, ocasionando que la reacción entre ellos sea más adecuada y reflejándose por una parte un cambio en la velocidad de reacción, sin modificar la constante de equilibrio de la misma (2).

El metabolismo comprende el anabolismo y el catabolismo. El primero incluye las reacciones por medio de las cuales, los organismos sintetizan los componentes moleculares relativamente grandes: proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos, el proceso es termodinámicamente desfavorable, por lo que requiere energía (ATP) y poder reductor (NADPH).

El segundo (catabolismo) implica todas las reacciones por medio de las cuales, los organismos degradan las moléculas combustibles, para obtener energía y precursores de procesos biosintéticos, la mayoría de las reacciones son termodinámicamente favorables, generando energía (1).

El control del metabolismo es llevado a cabo por las enzimas las cuales, son moduladas alostérica y genéticamente (3). El control genético, es debido a cambios en la velocidad de síntesis de la enzima, reflejándose en la concentración de ésta, en la que también influirá el proceso degradativo (4). El control alostérico puede ocasionar inhibición ó una estimulación de la enzima marcando, por acción de efectores (2).

Todos los organismos vivos utilizan amonio ó productos derivados de éste para la formación de aminoácidos y de otros compuestos nitrogenados. La principal fuente de producción de amonio es el ca

metabolismo de los aminoácidos en la que intervienen reacciones de transaminación, desaminación no oxidativa y desaminación oxidativa.

El amonio formado es precursor de la biosíntesis de urea ó utilizado en la amidación del ácido glutámico ó sea la formación de glutamina, cuyo predominio depende de las necesidades de la célula.

Las variaciones en el recambio del amonio pueden estar mediadas por alteraciones en los niveles ó en las actividades de las enzimas relacionadas con el metabolismo del amonio. Enzimas que han mostrado cambios adaptativos; en respuesta a variaciones ambientales, como sería el ayuno ó cambios en el contenido de proteína en la dieta ó afecto hormonal, han sido alanina aminotransferasa (5) aspartato aminotransferasa (6), glutamina deshidrogenasa (7) glutamina sintetasa (8) y las involucradas en la síntesis de urea (9).

Alanina aminotransferasa (L-alanina-2-oxoglutarato aminotransferasa EC 2.6.1.2) cataliza la reacción:



En esta reacción se observó la transferencia de un grupo amino del aminoácido L-alanina quedando así el cetoácido piruvato y a su vez la aminación del alfa-cetoglutarato formandose glutamato, es completamente reversible con una constante de equilibrio de - 0,67 característica común a otras transaminasas (5, 10). La enzima requiere fosfato de piridoxal como coenzima, la que está unida íntimamente a la parte portéica (11)

Existen varias formas de la enzima en la misma célula, como en el hepatocito, ocupando sitios diferentes (mitocondria y citosol) pero muy relacionadas entre sí (isoenzimas). Y se ha reportado que su concentración y su respuesta a cambios ambientales es diferente (12,13).

En el hígado de rata, la isoenzima mitocondrial predomina, la cual, es la responsable de la conversión de L-alanina a piruvato y presenta una respuesta adaptativa a situaciones ambientales, con el fin de favorecer cambios metabólicos acordes (5). Se ha reportado que la actividad de la isoenzima es afectada por el tipo de dieta, así como la estimulación hormonal, cuya respuesta no es paralela a la que presenta la isoenzima citosólica (14).

Esta enzima además de responder a estímulos hormonales y dietéticos presenta un efecto aditivo entre ambos. Se postula que el aumento en la actividad de la enzima después de la administración de glucocorticoides se debe al aumento de la proteína (14). Igualmente la actividad de esta enzima se ve influenciada por el ayuno prolongado (14). La habilidad gluconeogénica del hígado a partir de la L-alanina al someter al animal de experimentación a 24 horas de ayuno, y el decremento de los niveles de L-alanina circulante después de dicho período permiten suponer que el paso en el que interviene la alanina aminotransferasa no es un paso limitante en la gluconeogénesis a partir de L-alanina en el hígado de la rata (5).

- Aspartato aminotransferasa (L-aspartato-2-oxoglutarato aminotransferasa EC 2.6.1.1) cataliza la reacción:



Esta es una reacción reversible entre el aspartato y el oxalacetato y entre el alfa-cetoglutarato y el glutamato.

Como en el caso de la alanina aminotransferasa, la aspartato aminotransferasa presenta dos formas de isoenzimas, una localizada en el citosol y la otra en la mitocondria (15). Un estudio electroforético de esta enzima en músculo cardíaco humano, de cerdo y perro, mostró la existencia de dos formas, una de las cuales migró

hacia el cátodo y la otra hacia el ánodo (14). Otros estudios -- demostraron en hígado de rata que la fracción catiónica correspon-- dia a la isoenzima mitocondrial, mientras que la aniónica a la iso- enzima citosólica (fracción soluble) (16).

La actividad de la enzima es regulada por la dieta y por trata- mientos hormonales, la isoenzima catiónica no cambia esencialmente cuando se encuentra en las mismas condiciones que la aniónica. La - regulación adaptativa de la isoenzima catiónica ocurre en un perio- do de días (14,16,17,18).

Los estudios cinéticos muestran que la isoenzima catiónica tie- ne una actividad constante en el rango de pH de 6.0 - 7.7, y una - mayor afinidad para el aspartato, mientras que la isoenzima anióni- ca, tiene mayor afinidad para el oxalacetato (17).

La aspartato aminotransferasa al igual que otras transaminasas requiere de su coenzima unida, para proteger de la degradación de - su molécula (6). La actividad de esta enzima representa la activi- dad de las dos isoenzimas, localizadas en compartimentos diferentes de las células hepáticas y miocárdicas (19).

En el citosol, la transaminasa del aspartato, el cual dona su grupo amonio para la biosíntesis de urea, y además genera oxalaceta- to, el cual, a través de la enzima fosfoenolpiruvato carboxícinasa da la formación de glucosa. La presencia de esta enzima en las dos fracciones mitocondrial y citosólica es necesaria para que el aspar- tato efectúe su función (10,16).

La isoenzima mitocondrial tiene un punto isoeléctrico de 9.6, mientras que la isoenzima citosólica tiene subformas con valores de punto isoeléctrico de 5.22, 5.42, 5.62 a 4°C (15).

La aspartato aminotransferasa está compuesta por dos subunida- des idénticas cada una de las cuales, tiene cinco residuos de ciste- ina; dos de esos residuos, la cis 45 y cis 82 son ampliamente acce- sibles a modificaciones químicas (20).

La aspartato aminotransferasa es importante en el metabolismo del nitrógeno y carbono. Estudios estructurales han demostrado que son isoenzimas codificadas por genes distintos (21).

- La glutamato deshidrogenasa (L-glutamato-NAD-oxidoreductasa EC 1.4.1.3) cataliza la reacción :



Esta reacción consiste en la aminación reductiva del alfa-ceto glutarato y en la oxidación del NADH (22).

La glutamato deshidrogenasa actúa sobre el glutamato, el cual, sufre una rápida desaminación oxidativa y cede los grupos amino recogidos de otros aminoácidos en forma de iones amonio (23), y puede utilizar NAD^+ o NADP^+ , como coenzima con la misma eficiencia -- (24).

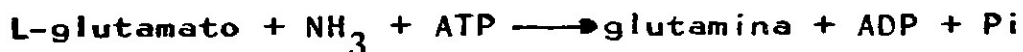
La glutamato deshidrogenasa se utiliza como marcadora mitocondrial (16,25). Esta enzima obedece a efectos alostéricos, los -- cuales dependen de la concentración de NAD^+ o NADH , así como del glu-- tamato (1). El amonio actúa como producto inhibitor y como sus-- trato (26).

La actividad de la glutamato deshidrogenasa está orientada --- principalmente hacia la síntesis de glutamato, más que la desamina-- ción oxidativa (16, 27,28). El glutamato que no únicamente sir-- ve como precursor de los grupos amonio incorporados a la urea, sino que también facilita su disposición para la actividad de la enzima carbamil fosfato sintetasa I (29).

Con respecto al diferente contenido de proteínas (15 - 60%), esta enzima en el hígado de la rata no sufre cambios significativos (29). La actividad de la glutamato deshidrogenasa, tampoco se ve modificada por el ayuno de 24 horas, pero sí, en ayunos más prolon--

gados (30). Algunos autores han reportado que es inducida por -- glucocorticoides (7).

- Glutamina sintetasa (L-glutamato-amino ligasa (ADP), EC 6.3.1.2) cataliza la reacción:



La formación de la glutamina a partir de glutamato y amonio en presencia de ATP es catalizada por esta enzima.

El grupo amida es la principal fuente de nitrógeno para la síntesis de nucleótidos de purinas y pirimidinas, aminoácidos y glucosaminas. La glutamina sintetasa juega un papel central en el metabolismo del nitrógeno.

La glutamina sintetasa está constituida por ocho subunidades, predominando en la fracción microsomal-citosólica, ésta enzima actúa sobre el L-glutamato (31). La enzima es inhibida en forma no aditiva por la glicina y la alanina (en presencia de Mg^{++}), también es inhibida por un incremento en la concentración de glutamato (31,32). Dependiendo de la concentración del catión divalente -- presente, el alfa-cetoglutarato y el citrato activan o inhiben la actividad catalítica de la enzima (33).

La interacción directa o indirecta del catión divalente en el complejo enzima-sustrato, puede ser de mayor significado en la regulación celular de la glutamina del hígado de la rata (32).

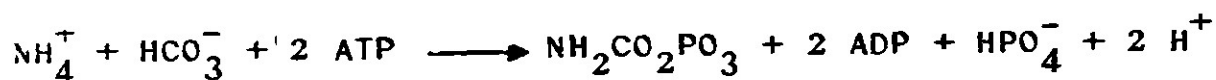
La actividad de la enzima dependerá de cambios en la velocidad de síntesis o cambios en su velocidad de degradación, o bien, por modificaciones covalentes de la enzima por un cambio catalítico - asociado con su eficiencia (33).

La glutamina sintetasa es inducida por glucocorticoides e insulina, pero su actividad disminuye por dibutiril AMPc y glucagón (3, 34).

La glutamina sirve como sillar para las proteínas y, como donador de nitrógeno en varias vías biosintéticas (31). Los iones amonio tienen un efecto modulador en la disposición de la glutamina, por lo tanto, estimula la liberación de nitrógeno derivado de la misma (35).

El papel del hígado en el metabolismo de la glutamina, es regular la síntesis y su degradación, dependiendo del estado metabólico de la célula (8).

- Carbamil fosfato sintetasa I (Dióxido de carbono amonio-ligasa EC 6.3.4.16) cataliza la siguiente reacción:



La enzima requiere para su máxima actividad dos moles de ATP, iones magnesio, potasio y de N-acetil glutamato, como activador (36). El producto carbamil fosfato es esencial para la biosíntesis de la urea (37).

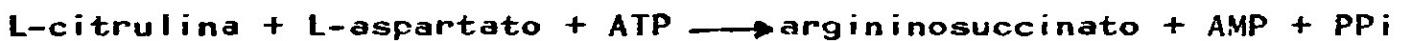
La carbamil fosfato sintetasa I es una enzima mitocondrial y, está acoplada a la glutamato deshidrogenasa (38). La activación de la carbamil fosfato sintetasa I, por el N-acetil glutamato es una etapa potencial para la rápida activación de las enzimas del ciclo de la urea (16, 29, 39). El N-acetil glutamato es requisito para que la carbamil fosfato sintetasa I actue, siendo el N-acetil glutamato un cofactor para su actividad, actuado como cofactor alosterico positivo (39).

En los polisomas libres del hígado de la rata, es sintetizada la carbamil fosfato sintetasa mitocondrial, en forma de un precursor (pCPS I), éste es más grande que la enzima madura (39). Se postula que los péptidos hidrolizados a partir de los precursores de la carbamil fosfato sintetasa I y de la ornitina transcarbamil-

sa, pueden servir como señales de retroalimentación en la transcripción de los genes involucrados, o bien, que tengan un efecto sobre algún gen regulador aún no demostrado, el cual controla la transcripción de las cinco enzimas que intervienen en el ciclo de la urea -- (39).

Es posible que la carbamil fosfato sintetasa I esté en el sitio de control regulatorio, ya que la carbamil fosfato sintetasa I es el paso inicial de la ureogénesis (29).

- Arginino succínico sintetasa (L-citrulina-L-aspartato ligasa EC 6.3.4.5) cataliza la reacción:



La enzima es poco estable tanto en extractos crudos como en purificados, la estabilidad de la proteína pura, es la misma congelada o precipitada con sulfato de amonio (40). El magnesio ejerce un efecto protector sobre la enzima y se ha observado que presenta inhibición por iones calcio y magnesio a una concentración de 0.001 M - (41), así como AMP y PPi (39).

Tres formas moleculares de arginino succínico sintetasa, denominadas I, II y III, según el orden de elución, han sido separadas por cromatografía de DEAE-Sephadex A-50, presentando pesos moleculares similares (41).

Hay evidencias de que la arginino succínico sintetasa sea la enzima limitante de la síntesis de urea, ya que en la mitocondria la producción de citrulina es más rápida que su utilización en la síntesis de urea; sin embargo, hay que considerar también que la tasa de transporte de la citrulina y la síntesis y transporte del aspartato al citosol, puede influir, en la producción de urea (39). Además el ritmo circadiano de la arginino succínico sintetasa en el hígado

de la rata, es la directamente responsable de los cambios del ritmo, en la concentración de la urea hepática, sanguínea y urinaria (40).

Por otro lado, la argininó succínico sintetasa se ve fuertemente afectada en su actividad por los cambios en el contenido protéico en la dieta, una concentración alta de proteínas en ésta, aumenta la actividad de la enzima. El cortisol y el glucagón aumentan también su actividad; la cual, es debida a incrementos en los niveles de la enzima (40).

- Arginasa (L-arginino amino hidrolasa, EC 3.5.3.10) cataliza la reacción:



Esta enzima cataliza la reacción a partir de arginina para la formación de urea (42).

La arginasa es activada por iones magnesio en una relación de cuatro moléculas de catión por una molécula de enzima (43), así, como por cobalto y níquel (44). Es muy estable a 4°C, conservandose aproximadamente durante dos meses y puede mantenerse liofilizado durante algunos años a 4°C (42). Esta enzima es altamente específica para la arginina (16).

El curso de la reacción no parece ser lineal a la concentración de la enzima, debido probablemente a la inhibición que presenta por la ornitina formada, en tanto que, la reacción es lineal a la urea formada durante un tiempo prolongado (43).

Hay evidencias de que las proteínas de la fase soluble del núcleo y del citoplasma pueden estar en equilibrio de difusión; las membranas de los núcleos de las células de los mamíferos, contienen poros suficientemente largos que permiten el paso de moléculas protéicas, lo que explica que la arginasa se haya encontrado en el núcleo y en el ci

tosol del hígado de la rata, y que después de la separación de las -- fracciones celulares se hayan encontrado concentraciones semejantes -- de la enzima en dichas fracciones (45).

Se ha observado un aumento en los niveles de la arginasa, como -- consecuencia de un aumento en su velocidad de síntesis, en los casos -- en los que la dieta la concentración de proteína es de 60%; cuando -- es una dieta pobre en proteínas, disminuyen los niveles de la enzima, -- debido a un aumento en su velocidad de degradación (45). Por lo -- tanto, se postula, que un aumento en la actividad de arginasa, puede -- ser un factor de adaptación de la variación de la dieta ingerida (29, -- 46).

Existen tres formas de arginasa hepática, denominadas I, II y III -- según su orden de elución en cromatografía de CM-celulosa (47).

La actividad de las tres formas moleculares de la enzima en caso -- de dieta con proteínas con 8.8%, fué baja con ausencia de la forma -- III, y alta cuando la dieta contenía 64% de proteína con mayor activi -- dad de la forma III; lo que indica, que en condiciones de mayor dispo -- nibilidad de sustrato (aumento de proteína de la dieta), la enzima -- podrá sufrir cambios que le permitan ser más estable (paso de la for -- ma II a la III) (46).

ANTECEDENTES

La regulación del metabolismo en un organismo multicelular es llevado a cabo fundamentalmente por acción hormonal, por controlar actividades de enzimas marcapaso, tanto a nivel genético como por modificaciones en su molécula, como fosforilación-desfosforilación (48), igualmente la dieta tiene una participación en este control. En el metabolismo del amonio, sin embargo los controles hormonales y dietéticos son distintos, aunque la magnitud de la respuesta del control hormonal es frecuentemente dependiente del contenido de proteínas, que es más pronunciado cuando ésta es baja (9).

Las enzimas que intervienen en la biosíntesis de la urea, están sujetas tanto a control dietético como hormonal (49). La producción de urea aumenta cuando el catabolismo de los aminoácidos es mayor (50).

Los requisitos de energía de una célula se obtienen a partir de los carbohidratos de la dieta. Durante el ayuno prolongado la energía deriva de las proteínas propias del organismo, las cuales se degradan a aminoácidos que a su vez, son utilizadas como fuente de energía al catabolizarse; presentándose por lo tanto, un aumento en la excreción de urea (51). Una dieta rica en proteínas también lleva a un aumento en la degradación de aminoácidos (52) como mecanismo compensatorio, con el fin de obtener el balance adecuado.

Schimke en 1963 (52) demostró, que la administración de dosis farmacológicas (25 mg/Kg de peso) de cortisona a ratas intactas y adrenalectomizadas causó un aumento en las actividades de las cinco enzimas del ciclo de la urea, junto con un aumento en la producción de ésta (52). Los glucocorticoides y una relación baja de insulina/glucagón, estimula la formación de las enzimas carbamil fosfato sintetasa y arginasa únicamente antes del naci

miento, también estimula la formación de glutamato deshidrogenasa antes y después del nacimiento (53).

La adrenalectomía bilateral en ratas, disminuye la actividad de carbamil fosfato sintetasa I, pero solamente en la cuarta semana de vida posnatal (53). La prednisona y el glucagón estimulan la actividad de esta enzima en todas las edades investigadas (53). La hormona del tiroides, aumento la actividad de esta enzima antes del nacimiento. Únicamente, insulina no afectó la actividad de la misma antes y después del nacimiento (53).

Por otro lado, se ha observado un incremento en la actividad de carbamil fosfato sintetasa I en hígado de fetos de rata, por efecto de glucocorticoides (54,55). La actividad de carbamil fosfato sintetasa I en el período fetal tardío, es dependiente de la presencia de glucocorticoides (54).

Lin y Col. (56) observaron en un medio de cultivo de monocapa de hepatocitos de rata adulta, conteniendo bacitracina y concentraciones de $10^{-8}M$ de dexametasona a las 29-77 horas y posteriormente añadiendo glucagón $10^{-9}M$ a las 29,45,53 y 69 horas, se observó que la carbamil fosfato sintetasa I aumentó 1.5 veces su actividad, pero concentraciones más altas de glucagón no tuvieron gran efecto (56). Dexametasona sola, no aumenta la actividad de la enzima, en un rango de dosis de $10^{-8}M - 10^{-5}M$ (56). El aumento de la actividad de carbamil fosfato sintetasa I por glucagón (10^{-9} ó $10^{-8}M$) y por dexametasona ($10^{-8}M$) se debe a un efecto sinérgico (56).

Este mismo ensayo se hizo con las tres enzimas citosólicas del ciclo de la urea (56). Con glucagón (10^{-8}) o dexametasona $10^{-8}M$ más bacitracina, se observó únicamente un aumento de 1.2 veces en la actividad de arginino succínico sintetasa, pero cuando las dos hormonas estuvieron presentes durante 48 horas se observó un aumento en la actividad de las tres enzimas, dos veces

sobre la arginino succínico sintetasa, 2.1 veces sobre la arginino succinasa y 1.8 veces sobre la arginasa (56). El efecto de la combinación de las dos hormonas también fué sinergista sobre arginino succínico sintetasa (56). La dexametasona causo un pequeño aumento de la actividad dependiente del tiempo, sobre la arginino succínico sintetasa y arginino succinasa pero no de arginasa (56).

La adrenalectomia disminuyó la actividad de la enzima arginasa en la cuarta semana posnatal (53). La actividad de arginasa fué estimulada por prednisolona y glucagón a todas las edades estudiadas. La hormona del tiroides tiene su mayor efecto antes del nacimiento e insulina, inhibe la actividad de ésta antes del nacimiento (53).

Por otro lado, la síntesis de urea es regulada también por la concentración de ornitina y N-acetil glutamato en el hígado (57). Además, la administración de una dieta rica en proteínas aumenta los niveles de la enzima que participan en la biosíntesis de la urea, y también aumentan los de N-acetil glutamato (58). Por otro lado la biosíntesis de la urea es regulada por el suministro de proteínas en la dieta(59,60) y por las hormonas glucocorticoides y glucagón (61), pero en este ultimo caso, es una forma lenta el incremento de la actividad debido a que las enzimas del ciclo de la urea tienen una vida media larga (62) .

Por lo anterior esta bien establecido que la síntesis de urea es un proceso perfectamente regulado, cuya finalidad metabólica es la conversión de cantidades potencialmente tóxicas de amoníaco a urea. Esto implica, que tal via es una de las principales, en el camino que puede seguir el amoníaco, sin embargo, la velocidad de la via dependerá también de la producción de este metabolito y de su utilización por otras vias, por lo cual, es importante considerar algunas de las enzimas que intervienen y además tienen relevancia en estos aspectos.

Como ya se indicó, existen dos isoenzimas de alanina aminotransferasa en la célula hepática, la mitocondrial esta involucrada en la conversión de alanina a piruvato, mientras, que la isoenzima citosólica está relacionada en la formación de alanina a partir del piruvato (25).

Se ha observado que la isoenzima mitocondrial, es más susceptible a cambios en su actividad por el tipo de dieta, así como la estimulación hormonal y dietética presenta un efecto aditivo entre ambos (63). Se ha postulado que el aumento en la actividad de la enzima después de la administración de glucocorticoides, se debe a un aumento en la actividad de sus moléculas (63). La actividad de la alanina aminotransferasa total, se ve aumentada por el efecto de la hidrocortisona y una dieta que contiene vitamina B₆, debido a un incremento en la síntesis de la enzima (64). Swick y Col. en 1965 (13), observaron una disminución de la actividad específica de las dos isoenzimas de la alanina aminotransferasa, cuando se administro la hidrocortisona a ratas intactas. En condiciones de diabetes por aloxano, se observó un incremento, en la actividad de las dos isoenzimas, aunque el efecto de la isoenzima mitocondrial fué menos claro que lo observado en la fracción soluble (13). Estos datos muestran que la actividad de la isoenzima mitocondrial puede ser substancialmente modificada por la dieta y por interacciones hormonales pero la respuesta, de la forma mitocondrial no siempre es paralela a aquella de la fracción soluble. La alanina aminotransferasa mitocondrial, a diferencia de otras enzimas estudiadas en ratas adrenalectomizadas, no es inducible por la hidrocortisona en ratas jóvenes, pero sí lo es en ratas viejas, y la inducción de alanina aminotransferasa citosólica disminuye después de haber llegado a la madurez el animal (65).

Los niveles normales de alanina aminotransferasa mitocondrial son dos veces más altos que la alanina aminotransferasa citosólica en ratas inmaduras, pero tal diferencia no existe en ratas adultas y viejas (66).

Es interesante hacer notar que la adrenalectomia causa una -- considerable disminución de la actividad de la alanina aminotrans-- ferasa mitocondrial, en hígado de ratas viejas (65), sin embargo al administrarles hidrocortisona la actividad aumentó tres veces, en una acción que es bloqueada por actinomicina D (65).

La actividad de alanina aminotransferasa citosólica, disminuyó después de la adrenalectomia y aumentó importantemente después de la administración de hidrocortisona, ambos efectos son mayores en ratas adultas, en las cuales los niveles endógenos de la enzima son también altos. La actinomicina D, también inhibe esta induc--- ción (65). Estos estudios muestran que la hidrocortisona induce la síntesis de ambas isoenzimas por la estimulación de la trans--- cripción de los correspondientes ARNm; también parece ser, que esta hormona adrenal por lo menos en parte, mantiene los niveles de las isoenzimas (65).

La aspartato aminotransferasa es una enzima gluconeogénica. Existen como ya se indicó dos isoenzimas en hepatocitos de rata, la aspartato aminotransferasa mitocondrial, que corresponde al -- 84% de la actividad total y la citosólica corresponde al 16% -- (67). El amino-oxiacetato es un inhibidor de las transaminasas e inhibe la gluconeogénesis a partir de lactato, pero no inhibe - la síntesis de glucosa a partir de piruvato, que es un precursor para la gluconeogénesis formando oxalacétato, que es transferido de la mitocondria al citosol por medio de la aspartato aminotransg ferasa (67).

La transaminación del piruvato no está involucrada en la salida del malato mitocondrial, que es un precursor mediato del oxalacetato citosólico y de los equivalentes reductores de la síntesis de glucosa (67). La aspartato aminotransferasa es una enzima que es inhibida por amino-oxiacetato, aunque la inhibición puede ser revertida por piruvato en presencia de cloruro de amonio y ornitina como sustratos (68).

De acuerdo a nuestros conocimientos no existen datos en la literatura que indiquen que la aspartato aminotransferasa mitocondrial presenta cambios significativos en su actividad enzimática, por efecto de diferente contenido de proteína en la dieta (68), ó por efecto hormonal, significando que no es una enzima completamente adaptativa.

La glutamato deshidrogenasa de hígado de rata, tiene un peso molecular de 320 000 daltones, y contiene seis subunidades idénticas, cada una de las cuales tiene dos sitios de unión para la coenzima, estas subunidades no forman polímeros (66,69). La adrenalectomía después del nacimiento, disminuye la actividad de la enzima, pero la prednisolona, el glucagón y la hormona del tiroides tienen un efecto estimulante sobre dicha actividad a cualquier edad (53). La adrenalectomía en la segunda semana de vida postnatal disminuye el efecto de la hormona del tiroides.

El amonio funciona como sustrato de la enzima y a la vez como producto inhibidor de ésta. El amonio inhibe competitivamente el estado de equilibrio en la oxidación del glutamato catalizado por la glutamato deshidrogenasa (26,70).

La reversible desaminación oxidativa de L-glutamato, catalizada por la glutamato deshidrogenasa ha sido demostrado ser un proceso multifásico a alta concentración de la enzima (26).

La glutamina sintetasa, predomina en las fracciones microsomal y citosólica (31). La actividad de glutamina sintetasa en el cul-

tivo de adipocitos es mediado por cambios en el contenido celular de las moléculas de glutamina sintetasa, y no por cambios en la actividad de cada molécula (33).

El efecto de hidrocortisona ($10^{-7}M$), sobre la enzima glutamina sintetasa produce un aumento en el rango de síntesis de la enzima en cultivo de células de hepatoma (71,72), y en el cultivo de células 3T3-L1 (8), pero no tiene efecto en la degradación de glutamina sintetasa (72).

Cuando un cultivo de células 3T3-L1, se trata con dibutiril AMPc, se produce una disminución en la actividad de glutamina sintetasa que es casi el reverso de los incrementos de la actividad enzimática causada por la insulina ó por la hidrocortisona (8), y estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el cultivo de células V-79 de hígado de hamster chino (34), las cuales al incubarse con dibutiril AMPc provoca un aumento de casi seis veces la actividad de glutamina sintetasa (8).

Schmidt y Thompson (73), observaron que la dexametasona ($10^{-6}M$) aumenta la actividad específica de glutamina sintetasa en aproximadamente dos veces en células leucémicas de sézary, las cuales contienen receptores citoplásmicos de glucocorticoides (73). Los niveles de glutamina sintetasa en cultivo de tejido (hepatoma) de hamster chino, son aumentados por la concentración de glutamina disminuyendo la actividad de la enzima, ya sea por aceleramiento de su inactivación (71), ó por oxidación de una forma modificada ó inestable de la misma (43).

En cultivo de células de la glia expuestas a glucocorticoides provoca una inducción efectiva de la glutamina sintetasa, pero progesterona y testosterona no tienen ningún efecto (74).

Se ha reportado que la insulina acelera la conversión de fibroblasto a adipocito, en cultivo de células 3T3-L1 y durante esta conversión la actividad de glutamina sintetasa aumenta más de seis ve-

ces, este incremento procede a cambios morfológicos y al incremento de proteínas en el cultivo (8).

Estudios iniciales llevados a cabo en este laboratorio (46,68) relacionados con el efecto en el contenido de proteína en la dieta, mostraron los siguientes resultados: la alanina aminotransferasa mitocondrial y cotosólica presentaron un aumento en su actividad cuando el animal fué alimentado con dieta hiperprotéica, y una leve disminución después de una dieta hipoprotéica (68). La aspartato aminotransferasa presentó el mismo patrón aunque estos efectos se observaron menos pronunciados (68). Las enzimas glutamato deshidro-genasa y glutamina sintetasa, no fueron afectadas por el diferente contenido protéico en la dieta, sino que respondieron solo a la presencia de sus efectores alostericos (68).

Carbamil fosfato sintetasa I, arginino succínico sintetasa y arginasa mostraron un patrón bastante notable con un gran aumento en sus actividades después de una dieta hiperprotéica y una clara disminución de las mismas con una dieta hipoprotéica (68).

Estudios previos indicaron la presencia de tres formas molé-culares de arginasa de hígado de rata por cromatografía en CM-celulo-sa (47); la primera eluye en el volúmen vacío y las otras dos con arginina 50 mM y 100 mM respectivamente. Con una dieta patrón (27% de proteína) ó una dieta hiperprotéica (64% de proteína), las tres formas moleculares de la enzima (designadas I, II y III de acuerdo a su posición de elución) eluyeron con una distribución semejante. En el caso del grupo que se alimentó con una dieta hipoprotéica solo las formas I y II fueron obtenidas por cromatografía y con una actividad menor (46). Estos últimos datos podrían suponer que las tres formas de arginasa están relacionadas con cambios en su forma-ción ó con el recambio de la enzima (46).

HIPOTESIS

Es conocido que el estado diabético está asociado con un gran aumento en la excreción del nitrógeno (75), y que el glucagón es una hormona íntimamente relacionada con el catabolismo de proteínas, aumentando su degradación al igual que la de los aminoácidos y por lo tanto la síntesis de urea (75). Lo anterior indica que las dos hormonas secretadas por el páncreas (insulina y glucagón) tienen un poderoso y antagonista efecto sobre el metabolismo del nitrógeno. Se supone un íntimo paralelismo en las modificaciones producidas -- por la insulina y el glucagón (75).

La adrenalectomía disminuye la excreción del nitrógeno y la -- actividad de todas las enzimas del ciclo de la urea, así como la -- actividad de la glutamato deshidrogenasa, glutamina sintetasa y de -- alanina aminotransferasa. Los cambios en la actividad de las enzimas del ciclo de la urea localizadas en la fracción soluble de la célula fueron más marcadas que aquellas de la fracción mitocondrial; en cam bio, la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa no se modi fica.

Sin embargo, estas actividades son cambiadas al administrarle -- al animal hidrocortisona, pero solo por un tratamiento de 2.5 mg de hormona diarios, durante dos días (76).

Nuestra hipótesis de trabajo establece, que los glucocorticoi-- des aumentan la actividad de las enzimas del ciclo de la urea, de -- la aspartato aminotransferasa y de la alanina aminotransferasa, como consecuencia de un aumento en el catabolismo de proteínas esto en ra -- tas intactas, cuando las ratas son adrenalectomizadas el efecto de -- glucocorticoides no es inmediato, sino que es necesario un tiempo pa -- ra que la enzima tenga su actividad normal y además aumente.

Si el estado diabético aumenta la excreción de nitrógeno en for -- ma de urea, también aumenta las enzimas relacionadas con su biosínte --

sis, esta situación es cambiada para algunas enzimas, principalmente para glutamina sintetasa la cual, su actividad está disminuída, lo que ocasiona que la mayor parte del amonio sea utilizado para la biosíntesis de urea. Por efecto de la insulina se podría observar un aumento en la actividad de la enzima glutamaina sintetasa con ningún cambio en la biosíntesis de la urea, en relación al animal no diabético.

En síntesis la interacción hormonal de los glucocorticoides e insulina debería ser tal que la primera hormona indujera enzimas cuya actividad ocasionaría producción de amonio y urea (aminotransferasas y enzimas del ciclo de la urea) y la insulina enzimas relacionadas con la utilización del amonio con fines anabólicos, glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa esto fundamentalmente en el período postnatal, específicamente en el estado adulto, dado que el tipo de dieta puede sufrir cambios y las finalidades metabólicas de la célula están encaminadas a la adaptación del organismo.

OBJETIVO

El presente estudio está encaminado a establecer el efecto de hidrocortisona e insulina en la rata adulta, sobre las actividades de algunas enzimas relacionadas con el metabolismo del amonio. Las enzimas que hemos escogido para tal fin son: alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa, por tratarse por dos transaminasas más adaptativas al medio y estar más directamente relacionadas con los cambios aparentes en la concentración del amonio; glutamato deshidrogenasa por ser una enzima clave en la producción ó utilización del amonio; glutamina sintetasa por considerarse una enzima anabólica, que al formar glutamina, en este metabolito se puede almacenar el amonio y a la vez utilizarlo según las necesidades. - Esta enzima es controlada por efectores alostéricos. Y por último las enzimas relacionadas con el ciclo de la urea: carbamil fosfato sintetasa I, arginino succínico sintetasa y arginasa; la primera, por depender tanto de la cantidad de amonio, que es uno de los sustratos, así como de N-acetil glutamato, metabolito que refleja a su vez un aumento de la concentración de glutamato del medio, y en cuyo caso la glutamato deshidrogenasa está orientada a la forma---ción de amonio y alfa-cetoglutarato, de esta manera, formándose --fosfato de carbamilo, que es principalmente el que ocasiona el -inicio del ciclo de la urea; la arginino succínico sintetasa, por tratarse de una enzima limitante de la biosíntesis de la urea, y arginasa, por ser una de las enzimas más adaptativas que se conoce, y a la vez de que por su acción se forma la urea.

Por consiguiente, la finalidad del proyecto, es correlacionar las actividades de las enzimas mencionadas, bajo las condiciones -indicadas, para tratar de obtener una integración mejor del metabo-lismo del amonio y su revelación; y que, como se observa en los an-tecedentes no hay un estudio que integre el efecto del contenido -

de proteína en la dieta, y el efecto hormonal sobre las actividades de las enzimas del metabolismo del amonio; los que existen se enfocan a cada enzima por separado. El modelo que se obtenga se usará como patrón para establecer, en la misma forma, lo que podría suceder en el tejido transformado (hepatoma).

MATERIALES

L-alanina, L-aspártico, L-citrulina, L-ornitina, L-glutamina, L-arginina, L-glicina, alfa-cetoglutarato, NAD, ATP, ADP, hidroxiamina, N-ácetil glutámico, gamma monohidroxamato, lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, HEPES, PIPES, Trizma base, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (Saint Louis Missouri, USA).

Acido perclórico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, cloruro de magnesio, ácido clorhídrico de Merck México.

Cloruro de amonio, EDTA, cloruro de manganeso, cloruro de potasio, fosfato disódico, fosfato monosódico, bicarbonato de potasio y sacarosa de Baker de México.

Arsenato de sodio de Mallinckrodt Chemical Works (Saint Louis, New York).

Succinato de hidrocortisona de Productos Gedeon, Richter México (América).

Insulina cristalina de Lilly Eli, México.

El resto de los reactivos fueron de la más alta calidad.

Animales. Ratas albinas Wistar machos, de 150 a 200 g de peso corporal, criadas en nuestro laboratorio, fueron utilizadas en todos los experimentos. Los animales se sometieron a una dieta a base de 27% de proteína (dieta patrón) en un régimen 8 + 16, y ritmo circadiano invertido (77), obscuridad de las 8:00 a 20:00 horas y agua "ad libitum".

MÉTODOS

Tratamiento hormonal de los animales.

Gluc corticoides: Ratas machos adultas, fueron adrenalectomizadas bilateralmente por vía abdominal (laparotomía), en condiciones de asepsia y previa anestesia con éter. Los riñones se visualizaron, las cápsulas suprarrenales se identificaron y la arteria renal se ligo. Posteriormente las cápsulas suprarrenales fueron extraídas. Los animales adrenalectomizados fueron mantenidos en las condiciones antes mencionadas, pero además con solución de cloruro de sodio al 0.85%. Cinco a siete días después de la adrenalectomía, a un grupo se les administró por vía intraperitoneal, succinato de hidrocortisona 10 mg/100g de peso; a otro grupo, que sirvió como control, se les administró el solvente de la hormona. Un grupo, al que no se le hizo ningún tratamiento, fué considerado como normal (íntegro).

Los animales fueron sacrificados a los tiempos indicados en los resultados.

Insulina: Ratas machos adultas, se les provocó diabetes, por la administración de aloxano, por vía intravenosa (80 mg/Kg de peso). Se consideró diabético el animal con niveles de 400 mg % 6 - mayor de glucosa plasmática (generalmente ocurrió 24 horas después de la administración de aloxano).

A un subgrupo de ratas diabéticas se les administró 2 U.I. de insulina cristalina (acción rápida), por vía subcutánea y a otro subgrupo (diabético) fué considerado como control, únicamente administrándole solución salina. Otro grupo de ratas, a las que no se les administró aloxano ni insulina fueron consideradas como normales (íntegras).

Los animales fueron sacrificados dos horas después de la administración de la hormona.

Preparación de fracciones celulares.

Las diferentes fracciones celulares, fueron obtenidas de acuerdo al método descrito por De Duve y Col. (78), modificado por Rodríguez y Pitot (79). En síntesis, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, los hígados extraídos y divididos en tres partes, que fueron homogenizadas de la siguiente manera:

Una tercera parte del hígado fué homogenizada en tres volúmenes de amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M , pH 7.5 , conteniendo sacarosa 0.44 M . El homogenado se centrifugó a 600 xg, por 10 minutos para separar la fracción nuclear (centrífuga refrigerada de alta velocidad, modelo Sorvall RC-5 B). El sobrenadante fué centrifugado a 3300 xg por 10 minutos, sedimentándose la fracción mitocondrial, la cual, fué resuspendida en el mismo amortiguador pero sin sacarosa, y centrifugándose nuevamente a 3300 xg por 10 minutos. El sedimento se disolvió en el mínimo volumen, usando la solución de homogenización, pero sin sacarosa. Esta preparación se denomina la fracción mitocondrial.

El sobrenadante de la sedimentación mitocondrial, fué centrifugado a 24300 xg por 45 minutos, y el sobrenadante (fracción microsomal-citosólica), se utilizó como fuente de enzima de la glutamina sintetasa.

Otra tercera parte del hígado fué homogenizada en tres volúmenes de amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M , pH 7.5 ; el homogenado se centrifugó a 105 000 xg, durante una hora, el sobrenadante así obtenido, se utilizó como fuente de las enzimas citosólicas de nuestro estudio; alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y arginino succínico sintetasa.

Y una última tercera parte del hígado, fué homogenizada en 2.5 volúmenes de amortiguador Tris 10 mM, pH 7.5, con cloruro de potasio 0.15 M y cloruro de magnesio 0.05 M; este homogenado se centrifugó a 105 000 xg durante una hora y el sobrenadante obtenido se --

utilizó como fuente de enzima de la arginasa.

Todos los pasos anteriores se efectuaron a 4°C. La homogeneización se realizó en un homogenizador tipo Potter-Elvehjem NS1-12, con un pistón de teflón a 1 200 rpm con 2-3 golpes.

Sonicación

Las suspensiones mitocondriales fueron sonicadas a 250 W durante 15 segundos y a 4°C, en un "Sonicador Cell Disrupter B-30", utilizando la suspensión sonicada como fuente de las enzimas: alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, glutamato deshidrogenasa y carbamil fosfato sintetasa-1

Ensayos enzimáticos

Alanino aminotransferasa. Su actividad fué ensayada de acuerdo al método descrito por Swick y Col. (13). La mezcla de reacción contenía:

- 2 ml de amortiguador de fosfato de potasio (200 mM), pH 7.6
- 200 micromolas de L-alanina (100 mM)
- 40 micromolas de alfa-cetoglutarato (20 mM)

En un volumen final de 2 ml

Los tubos fueron preincubados durante 5 minutos a 37°C. La reacción fué iniciada añadiendo 0.1 ml de la fracción mitocondrial o citosólica diluidas 1:10, como fuente de la enzima, y se incubó durante 8 minutos a 37°C, después de los cuales se añadió 0.1 ml de una solución de NADH (4 mM) y la lactato deshidrogenasa (3 unidades). Se dejó incubar 5 minutos más y se midió la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo 25. Los tubos controles se hicieron sin alfa-cetoglutarato. La cantidad de piruvato formada, fué medida por la oxidación del NADH catalizada por la posterior adición de la enzima lactato deshidrogenasa; acoplando así, las dos reacciones enzimáticas. Una unidad de actividad enzimática

se define, como la oxidación de una molécula de NADH por minuto a 37°C (13). La actividad de esta enzima y de todas las que emplean NADH se calcularon en base a una curva previa de concentración usando el valor de 6.22×10^6 como coeficiente de extinción molar de NADH (80).

Aspartato aminotransferasa. Su actividad fué medida por una modificación del método de Karmen (81), la mezcla de reacción contenía:

- 3 ml de amortiguador de fosfato de potasio (50 mM) pH 7.5
- 50 micromolas de ácido L-aspartico (16 mM)
- 20 micromolas de alfa-cetoglutarato (6.6 mM)
- 300 micromolas de NADH (0.14 mM)
- 5 unidades de malato deshidrogenasa

En un volumen final de 3 ml

La mezcla se preincubó a 25°C durante 5 minutos, y se inició la reacción por la adición de 0.1 ml de fuente de enzima (mitocondrial o citosólica), diluida 1:10. La disminución de la absorbancia fué medida a una longitud de onda de 340 nm después de 5 minutos de incubación, usando como control una mezcla de reacción sin alfa-cetoglutarato. Una unidad de actividad de esta enzima se define como la oxidación de una micromola de NADH por minuto a 25°C, como se indicó para alanina aminotransferasa.

Glutamato deshidrogenasa. Su actividad fué determinada de acuerdo al método de Shachter y Col. (80), la mezcla de reacción contenía:

- 0.4 ml de amortiguador de fosfato de potasio (125 mM) pH 7.4
- 0.25 micromolas de NADH (2.5 mM)
- 5 micromolas de cloruro de amonio (50 mM)
- 1 micromola de alfa-cetoglutarato (10 mM)
- 10 micromolas de EDTA (100 mM)
- 0.1 ml de Tritón X-100 diluido 1:100

En un volumen final de 1 ml

La reacción se inició agregando 0.1 ml diluido 1:10 de la fracción mitocondrial sonicada, se incubó durante 10 minutos a 25°C, -- después se midió la desaparición de NADH a 340 nm, utilizando como control una mezcla de reacción sin alfa-cetoglutarato. La actividad se expresó en micromolas del producto formado por minuto en condiciones ya mencionadas para la alanina aminotransferasa?

Glutamina sintetasa. La actividad de glutamina sintetasa fué descrita por una modificación del método de Levintow (82), la --- mezcla de reacción contenía:

- 1.0 ml de Pipes (25 mM) ph 6.8
- 50 micromolas de hidroxilamina (50 mM)
- 100 micromolas de glutamina (100 mM)
- 25 micromolas de arsenato de sodio (25 mM)
- 0.1 micromolas de ADP (0.2 mM)
- 0.5 micromolas de cloruro de manganeso (0.05 mM)

En un volumen final de 1 ml.

Se disuelven todos los reactivos en el amortiguador, en el caso de los controles, exceptuando el arsenato de sodio. Las mezclas de reacción se preincuban a 38°C, durante 5 minutos, y se inicia la reacción enzimática, adicionando 0.1 ml de la fuente de enzima diluida 1:20. Se incubó durante 12 minutos y se detiene la reacción añadiendo 1 ml de solución de Himbler (TSA 1.45%, $\text{FeCl}_3 \cdot 2.42\%$, -- HCl 1.82 N), se centrifuga y el sobrenadante se lee a 505 nm. Una unidad de actividad enzimática, se define como la cantidad de enzima que cataliza la reacción de una micromola de gamma-glutamilhidroxamato en 12 minutos a 38°C, de acuerdo a la curva patrón que se -- muestra en la figura 1.

Carbamil fosfato sintetasa I. Esta enzima fué ensayada por el método descrito por Mori y Cohen (83), la mezcla de reacción contenía:

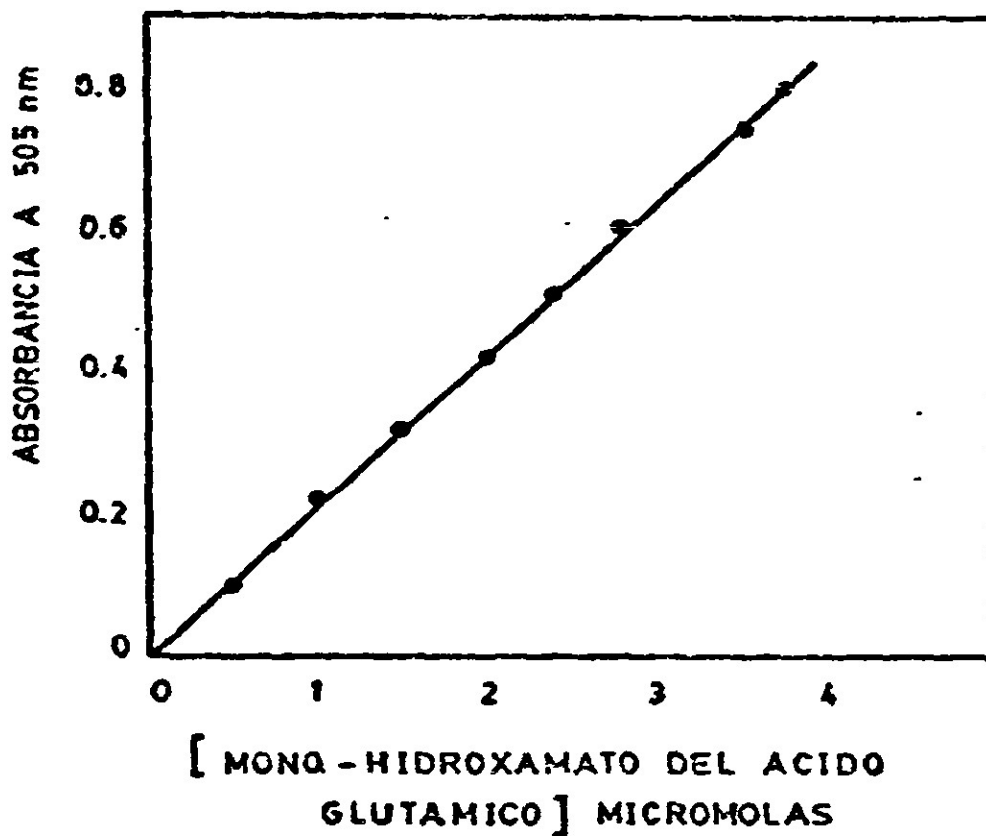


Fig. 1 CURVA PATRON DE GAMA-MONO-HIDROXAMATO DEL ACIDO GLUTAMICO. EL MONOHIDROXAMATO DEL ACIDO GLUTAMICO FUE DETERMINADO COMO SE DESCRIBE EN "MATERIALES Y METODOS" (82). CADA PUNTO REPRESENTA LA MEDIA ARITMETICA DE DOS DETERMINACIONES.

- 0.05 ml de HEPES (50 mM) pH 8.0
- 5 micromolas de ATP (10 mM)
- 7.5 micromolas de cloruro de magnesio (15 mM)
- 2.5 micromolas de N-acetilglutamato (5 mM)
- 5 micromolas de cloruro de amonio (10 mM)
- 25 micromolas de bicarbonato de potasio (50 mM)
- 2.5 micromolas de L-ornitina (5 mM)

En un volumen total de 0.05 ml.

La reacción se inició agregando 0.1 ml. de la fuente de enzima e incubando durante 10 minutos a 37°C., después de los cuales la reacción fue detenida añadiendo 2 ml. de ácido perclórico 2.49 M. El material precipitado fue removido por centrifugación, el sobrenadante se utilizó para medir la cantidad de citrulina producida. La determinación de citrulina fue efectuada por el método descrito por Hunninghake y Col. (84): A 2 ml. de sobrenadante anterior se le agregó 2 ml de mezcla crómica (1 parte de ácido sulfúrico y 3 partes de ácido fosfórico). Posteriormente se agitó vigorosamente, se agregó 0.25 ml de diacetilmonoxima al 3%, se colocó en un baño de agua hirviendo en obscuridad durante 15 minutos, después de los cuales se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a 490 nm. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce una micromola de citrulina por minuto a 37°C, de acuerdo a la curva patrón de concentración, como se muestra en la figura 2.

Arginino succínico sintetasa. Su actividad se midió por el método de Tabor y Col. (85), la mezcla de reacción se preparo de la siguiente manera:

- 0.1 ml de buffer de fosfato de potasio (1 M) pH 7.4
- 13.2 micromolas de sulfato de magnesio (66 mM)
- 2.5 micromolas de ATP (25 mM)

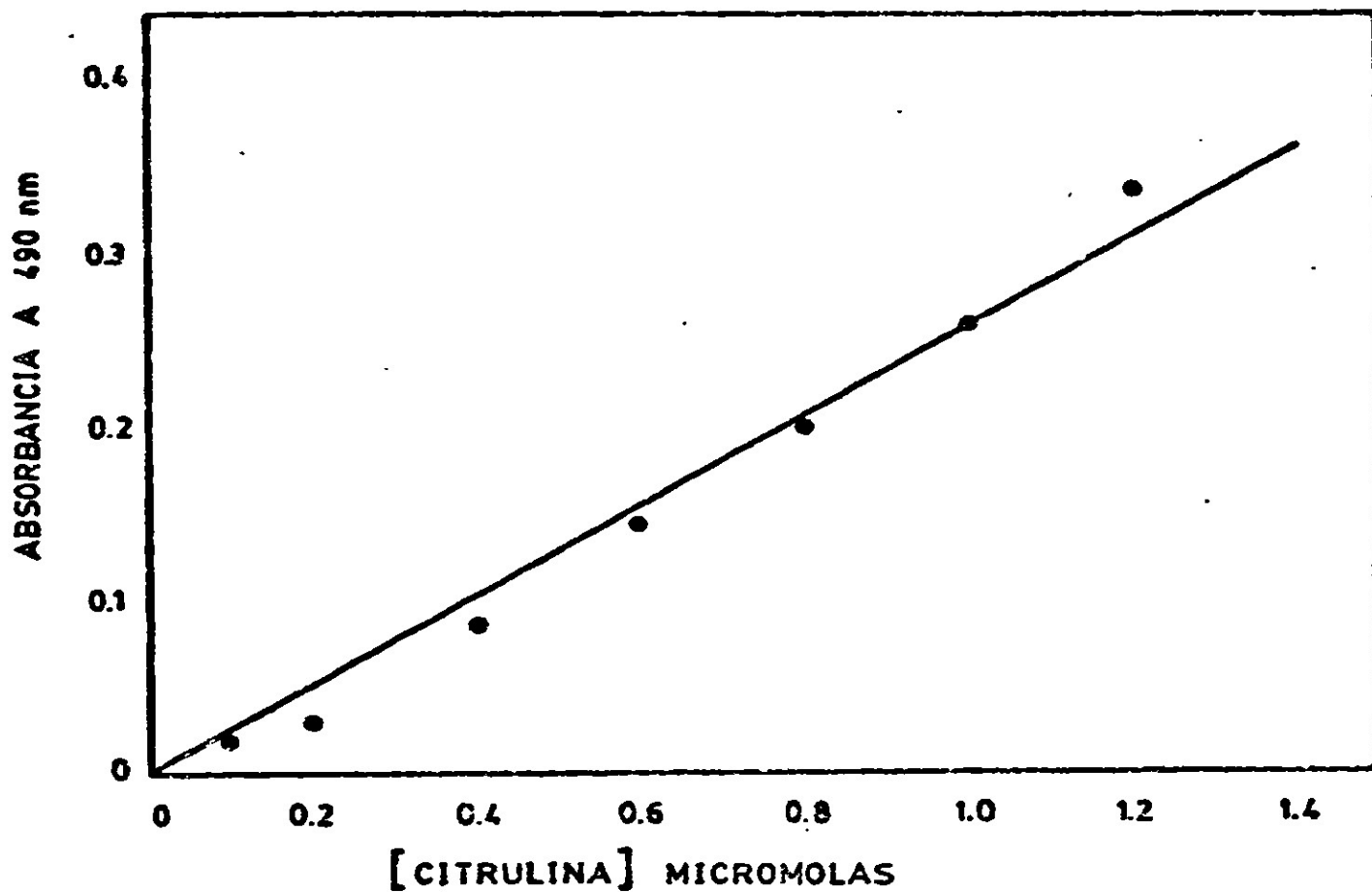


Fig. 2 CURVA PATRON DE CITRULINA. LA CITRULINA FUE DETERMINADA COMO SE DESCRIBE EN "MATERIALES Y METODOS (84). CADA PUNTO REPRESENTA LA MEDIA ARITMETICA DE DOS DETERMINACIONES.

- 5 micromolas de citrulina (50 mM)
- 10 micromolas de L-aspártico (100 mM) pH 7.4 -KOM
- 1.3 ml de H₂O

En un volúmen final de 2 ml

La mezcla de reacción se preincubó a 38°C durante 5 minutos, la reacción enzimática se inició añadiendo 0.1 ó 0.2 ml de la fuente de enzima citosólica, se incubó durante 20 minutos a 38°C, se detuvo la reacción añadiendo 3 ml de ácido tricloroacético al 8.5%. El material precipitado se removió por centrifugación, el sobrenadante fué utilizado para la determinación de citrulina por el método descrito para carbamil fosfato sintetasa I, pero utilizando 0.2 ml de sobrenadante (84) como se observa en la figura 2.

Arginasa. La actividad de esta enzima fué determinada por el método de Tarrah y Col. (47), la mezcla de reacción contenía:

- 0.1 ml de amortiguador de glicina-hidróxido de sodio (250 mM) pH 9.5
- 25 micromolas de L-arginina (125 mM)
- 0.25 micromolas de cloruro de magnesio (2.5 mM)

En un volúmen final de 1 ml

Se preincubó la mezcla de reacción de 2 a 5 minutos a una temperatura de 37°C, se inició la reacción añadiendo 0.2 ml de la fuente de enzima, incubándose 2 minutos a 37°C y la reacción fué parada por la adición de 5 ml de ácido perclórico 0.5 M, los controles fueron realizados agregándoles antes el ácido perclórico, que la fuente de enzima, el precipitado se removió por centrifugación y el sobrenadante se utilizó para la determinación de urea. Para la determinación de urea se utilizó un reactivo cromógeno que estaba constituido:

- 1.- Solución ácido férrica: 100 ml de ácido fosfórico (85% y $d= 1.67$), se añadieron a 300 ml de ácido sulfúrico (95-98% y $d= 1.84$), llevando este volúmen a 600 ml, disolviendo en esta solución 100 mg de cloruro férrico.

2.- Solución de diacetilmonoxima-tiozemicarbazida, se disolvió 500 mg de DAMO y 10 mg de TSC en agua destilada y llevando a un volumen de 100 ml.

3.- Reactivo cromógeno: Mezclar dos partes del reactivo 1, con una parte del reactivo 2, inmediatamente antes de usarse. Según el método descrito por Archibald (86).

Para la determinación clorimétrica de urea, a 0.05 ml de la muestra desproteïnizada se le añadió 3 ml del reactivo cromógeno. La mezcla se agitó vigorosamente y se calentó en un baño de agua hirviendo por 5 minutos, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 525 nm . Una unidad de actividad enzimática de arginasa, es definida como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 micromola de urea por minuto a 37°C De acuerdo a la curva patrón de urea que se ilustra en la figura 3.

Determinación de proteínas. En todos los experimentos la determinación de proteínas fué hecha por el método de Lowry y Col. (87), usando como patrón albúmina de suero bovino con un E% 280= 6.67 (Fig. 4).

Tratamientos estadísticos. Se emplearon los métodos comunmente conocidos de centralización, medidas de dispersión y distribución "t" de Student de muestras pareadas.

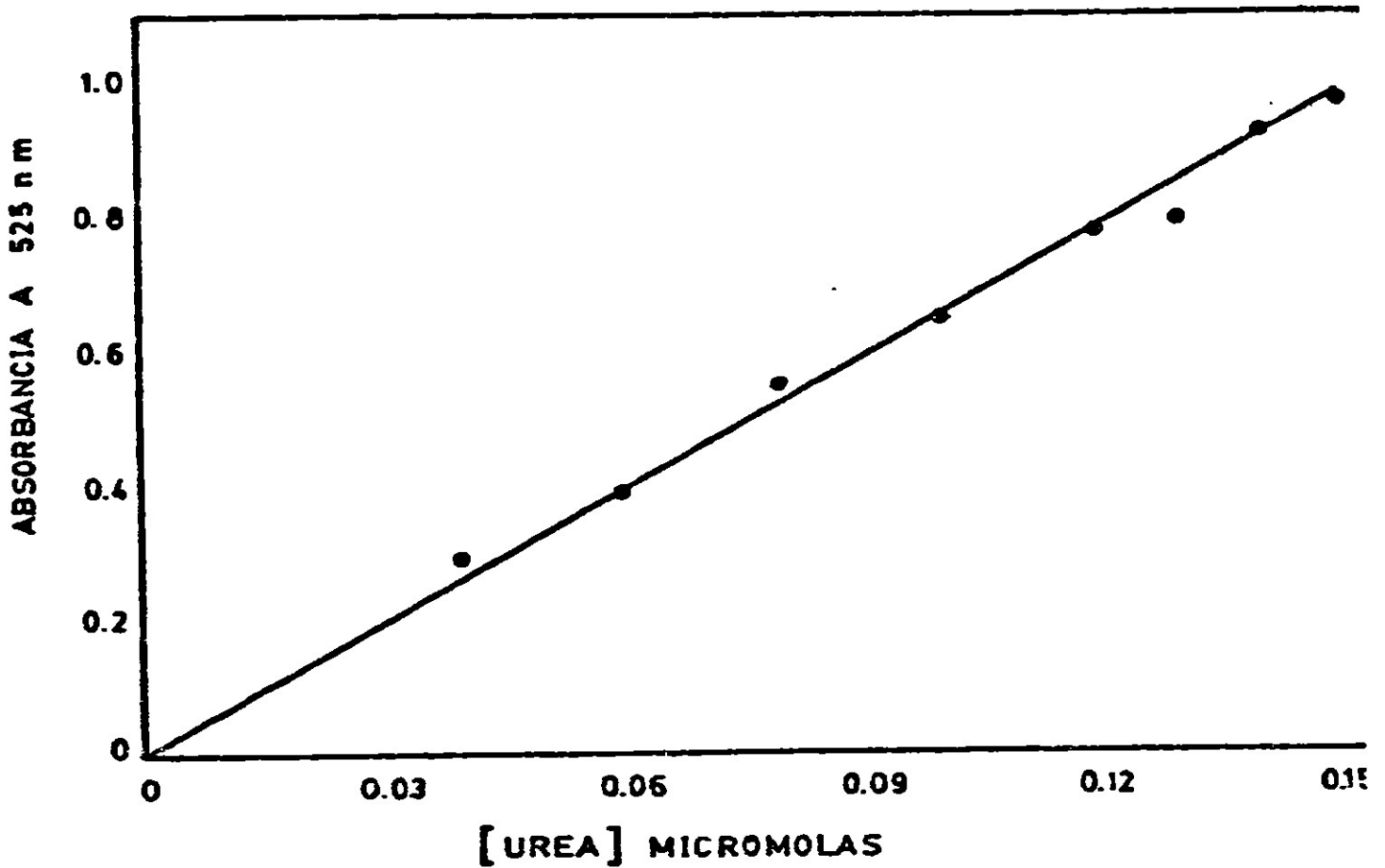


Fig. 3 CURVA PATRON DE UREA FUE DETERMINADA COMO SE DESCRIBE EN "MATERIALES Y METODOS" (86), CADA PUNTO REPRESENTA LA MEDIA ARITMETICA DE DOS DETERMINACIONES.

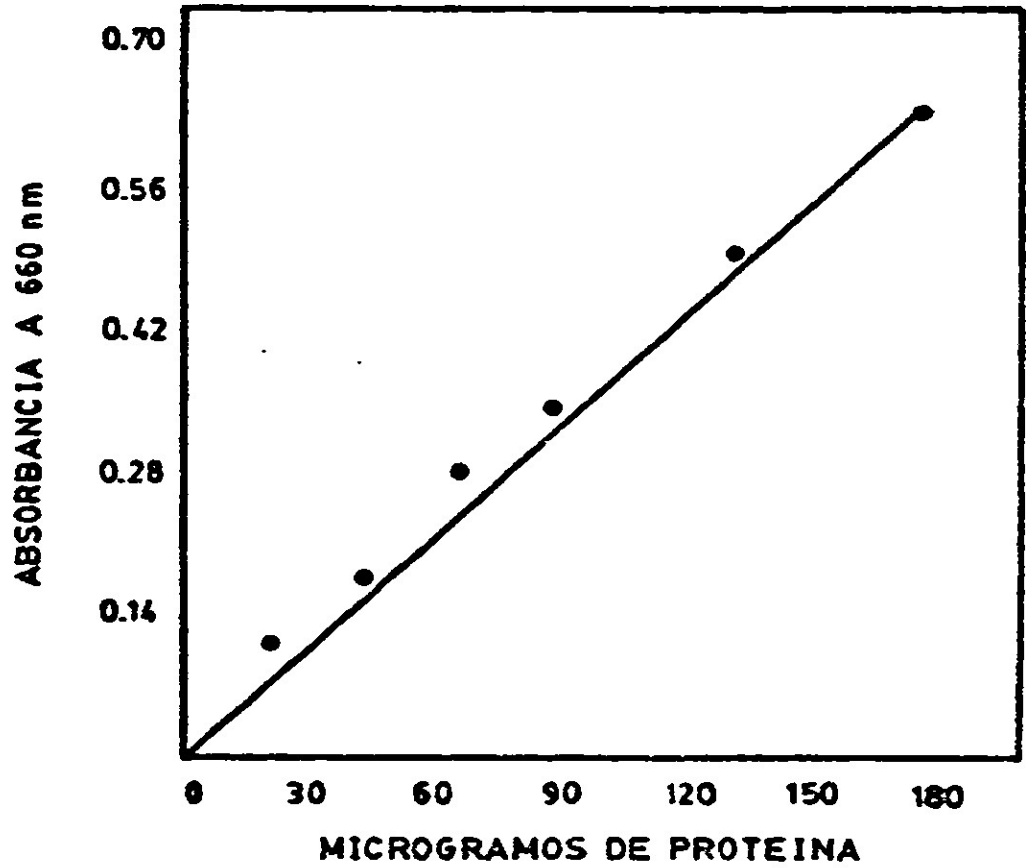


Fig. 4 CURVA PATRON DE ALBUMINA BOVINA PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS. LA PROTEINA FUE DETERMINADA POR EL METODO DE LOWRY COMO SE DESCRIBE EN MATERIALES Y METODOS (87), CADA PUNTO REPRESENTA LA MEDIA ARITMETICA DE DOS DETERMINACIONES.

RESULTADOS

Preparación y tratamiento de los animales

Los animales fueron adrenalectomizados bilateralmente por lo general a las 8:00 horas del día, y para el caso de los diabéticos el aloxano se les administro entre las 11:00 y 13:00 horas del día. Después de ser mantenidas como ya se indicó en materiales y métodos, la hidrocortisona fue administrada entre las 8:00 y 9:00 horas del día a los primeros y a los segundos. De esta forma se obtuvo, a la hora del sacrificio de los animales una concordancia en relación al ritmo circadiano con respecto a las actividades de las enzimas estudiadas según el pico de máxima actividad como ya fue reportado previamente (68).

Efecto de la adrenalectomía bilateral o el estado diabético del animal sobre el peso corporal, el peso hepático y el contenido proteico del hígado.

El peso de los animales en todas las condiciones fue de 150-200 gr inicialmente, mostrandben general un aumento del 10% después de 5 a 7 días que duro el animal adrenalectomizado. Para el caso de los diabéticos no hubo cambio debido a que solamente se mantuvieron 24 horas en esa condición.

Como puede observarse en la Tabla I no hubo cambios significativos en el peso del hígado, en la relación de éste con el peso corporal y en el contenido de proteína hepatica en mg de tejido húmedo de los animales íntegros (normales) en comparación de los animales adrenalectomizados y diabéticos. Los mismo puede indicarse por el efecto de hidrocortisona durante 2 a 6 horas o por insulina para los casos respectivos (Tabla I).

TABLA. 1 EFECTO DE ADRENALECTOMIA, DIABETES Y LA ADMINISTRACION DE HIDROCORTISONA E INSULINA RESPECTIVAMENTE SOBRE EL PESO DEL HIGADO Y EL CONTENIDO DE PROTEINA HEPATICA.

CONDICIONES ** EXPERIMENTALES	n	PESO DEL HIGADO (g)	PESO DEL HIGADO/PESO CORPORAL (%)	PROTEINA HEPATICA mg/9 DE PESO DE TEJIDO HUMEDO
NORMALES	n=8	202.03 ± 15.15	3.55 ± 0.430	186.95 ± 36.98
ADRENALECTOMIZADAS (Control)	n=7	202.6 ± 26.26	3.5 ± 0.300	160.00 ± 27.84
ADRENALECTOMIZADAS HIDROCORTISONA 2 H. n=11		189.6 ± 19.12	3.7 ± 0.700	166.00 ± 36.97
ADRENALECTOMIZADAS HIDROCORTISONA 2 H n=7		167.0 ± 18.65	3.6 ± 0.900	151.20 ± 34.40
ADRENALECTOMIZADAS HIDROCORTISONA 6 H n=4		164.0 ± 11.74	3.8 ± 0.300	157.00 ± 27.60
DIABETICAS (Control)	n=9	179.5 ± 19.95	3.4 ± 0.650	180.91 ± 38.25
DIABETICAS INSULINA 2 H	n=10	177.6 ± 23.80	3.2 ± 0.470	167.21 ± 24.38

* Los valores representan la media aritmetica y su desviación estándar

* Dosis de hidrocortisona = 10 mg/100g de peso corporal v/a intraperitoneal. Dosis de insulina = 2 U.l de insulina cristalina por animal por v/a subcutanea.

Efecto de hidrocortisona sobre las actividades de algunas enzimas del metabolismo del amonio.

En la tabla II, se muestra el efecto de hidrocortisona a diferentes tipos de acción sobre la actividad de algunas enzimas hepáticas, relacionadas con el metabolismo del amonio en animales adrenalectomizados sin hidrocortisona e íntegros, en ratas adrenalectomizadas (control) en comparación con animales íntegros (normales).

La actividad de la alanina aminotransferasa mitocondrial no fue detectable en el animal adrenalectomizado sin o con hidrocortisona. En el animal íntegro fue de 0.03 unidades de enzima/mg de proteína. Alanina aminotransferasa citosólica en el animal adrenalectomizado mostró un aumento significativo del 49% en su actividad en relación a los animales íntegros; aumento que fue más aparente a las 2 horas después de haberles administrado la hidrocortisona, siendo éste además la actividad máxima que se observó (Tabla II, Fig 5 Panel AATc).

Los resultados obtenidos en relación con la actividad de aspartato aminotransferasa, indican que la isoenzima citosólica presenta un comportamiento similar a la alanina aminotransferasa citosólica, con un aumento del 75% a 213% entre el animal adrenalectomizado sin hidrocortisona y el adrenalectomizado 6 horas después de haber recibido hidrocortisona en relación con las ratas íntegras (Tabla II, Fig 5 Panel ASTc). La adrenalectomía no influyó en la actividad de aspartato aminotransferasa mitocondrial y la administración de hidrocortisona en los periodos cortos disminuyó su actividad para mostrar una recuperación 6 horas después de la administración de la hormona (Tabla II, Fig. 5 Panel ASTm). Estos datos en general nos indican que las isoenzimas de las transaminasas estudiadas responden diferentemente a la adrenalectomía y al efecto de hidrocortisona según se trate de la mitocondrial o citosólica pero similar para alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa.

TABLA II EFECTO DE HIDROCORTISONA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS DEL METABOLISMO DEL AMONIO EN HIGADO DE RATAS MACHOS

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL ANIMAL

ENZIMA	INTEGRO (Normal)	ADRENALECTOMIZADO		ADRENALECTOMIZADOS MAS HIDROCORTISONA: 10mg/100g DE PESO .	
		(Control),	Tiempo después de administrada la hormona 4h	POR VIA I.P.	6h
AAT(c)	0.059(10) ^a ± 0.020 ^b	0.088(4) ^a ± 0.014	0.11(8) ^a ± 0.019	0.070(8) ^a ± 0.007 ^b	0.088(4) ^a ± 0.014 ^b
AST(m)	0.13 (11) ^a ± 0.030	0.103(4) ^a ± 0.026	0.052(9) ± 0.020	0.052(9) ^a ± 0.020 ^b	0.082(2) ^a ± 0.011 ^b
AST(c)	0.145(13) ^a ± 0.039	0.254(6) ^a ± 0.045	0.27(13) ± 0.08	0.27 (10) ^a ± 0.065 ^b	0.310(7) ^a ± 0.03 ^b
GDH	0.054(12) ^a ± 0.007	0.06 (6) ^a ± 0.003	0.052(10) ^a ± 0.008	0.049(12) ^a ± 0.01 ^b	0.047(5) ^a ± 0.007 ^b
GS	1.24 (11) ^a ± 0.42	1.19 (4) ^a ± 0.33	1.151(7) ^a ± 0.36	1.36 (9) ^a ± 0.36	1.1 (4) ^a ± 0.15
CPS I	0.046(10) ^a ± 0.01	0.013(4) ^a ± 0.001	0.034(3) ^a ± 0.006	0.057(3) ^a ± 0.016	0.023(2) ± 0.006
ASS	0.10 (4) ^a ± 0.013	0.043(3) ^a ± 0.005	0.045(2) ± 0.02	0.055(2) ^a ± 0.006	0.047(4) ± 0.007
ASA	4.6 (9) ^a ± 1.2	3.8 (3) ^a ± 0.5	3.4 (7) ± 0.86	4.5 (4) ^a ± 0.07	2.2 (4) ± 0.32

El nombre de las enzimas se expresa mediante siglas cuyas equivalencias aparecen en abreviaturas
> la actividad se expresa en micromolas de productos formados min⁻¹. ml⁻¹. mg de proteína⁻¹

a) Número de ratas

b) desviación estandar.

Fig. 5

EFFECTO DE HIDROCORTISONA

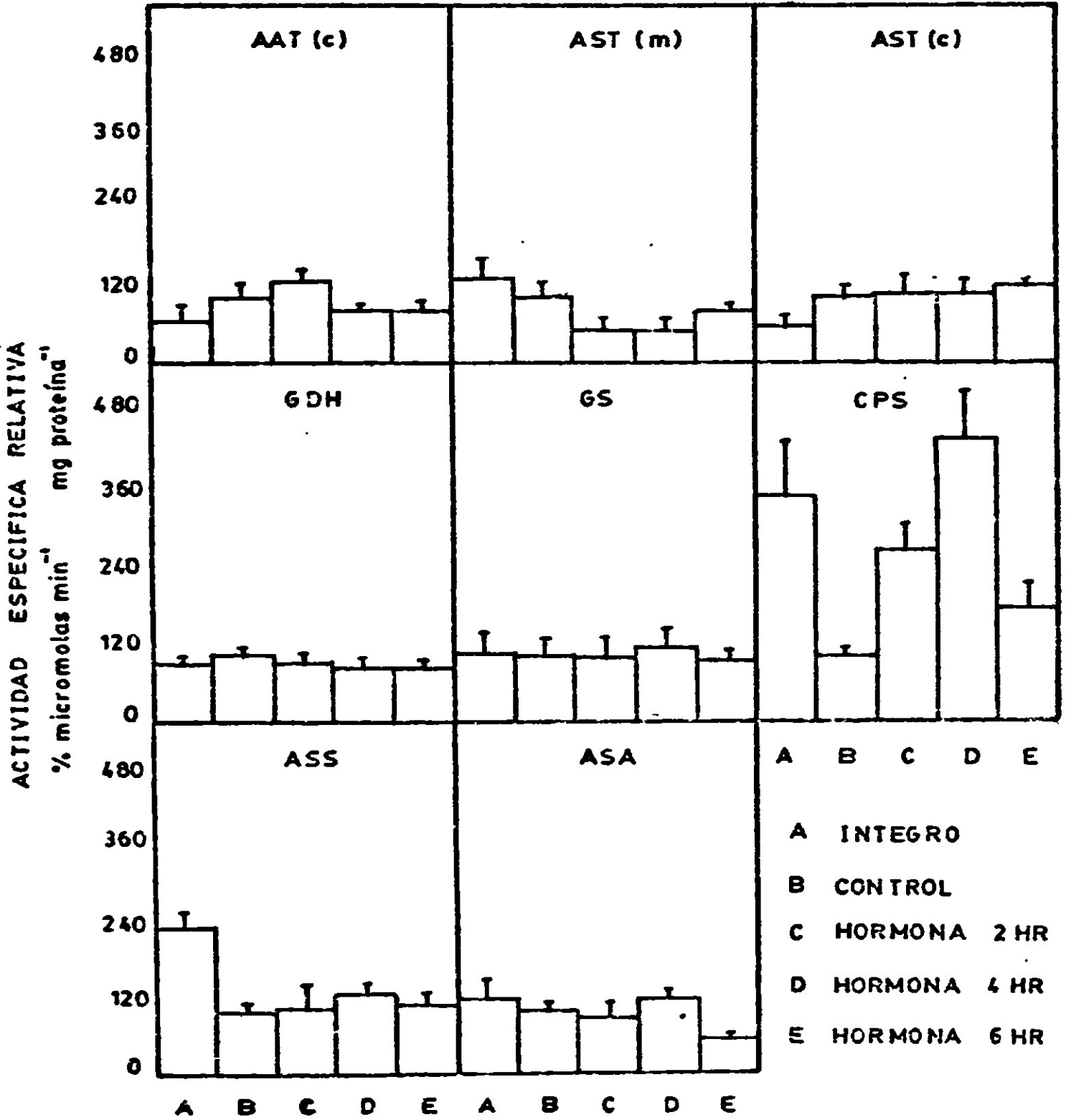


Fig 5. Efecto de hidrocortisona sobre la actividad específica relativa (% micromolas. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$) de algunas enzimas del metabolismo del amonio. Ratas machos de 150-200 gramos, se mantuvieron en un cuarto regulado de luz-obscuridad, obscuridad de las 8:00 a las 20:00 horas del día, las cuales fueron alimentadas con una dieta estandar (23% de proteína) en un regimen de 8+16 y agua "ad libitum". Un grupo de ratas fueron adrenalectomizadas bilateralmente y se les mantuvo con dieta estandar y solución salina "ad libitum", después de 5 a 7 días un grupo de estas ratas fueron inyectadas con hidrocortisona (10 mg/100 g de peso) y sacrificadas después de 2, 4 y 6 horas. Las ratas adrenalectomizadas sin hidrocortisona fueron consideradas como controles, y otro grupo de ratas intactas se consideraron normales. Los hígados de todos los grupos de animales fueron extraídos, separandose las fracciones subcelulares como se indica en "Materiales y Metodos" y la actividad de las diferentes enzimas fue determinada como se mencionó en "Materiales y Metodos".

Al igual que con el diferente contenido de proteína en la dieta (68) las enzimas glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa no mostraron cambios significativos en sus actividades (Tabla II, Fig 5 Panel GDH y GS) por efecto de la adrenalectomía o por efecto de hidrocortisona a diferentes tiempos de acción en animales adrenalectomizados.

De las enzimas relacionadas con la biosíntesis de urea se observa que la adrenalectomía ocasiona un cambio muy significativo en las actividades de carbamil fosfato sintetasa y arginino succínico sintetasa, que por el efecto de hidrocortisona y el ensayo de las actividades de estas enzimas a diferentes tiempos después de la administración de la hormona solamente carbamil fosfato sintetasa I presenta actividad mayor a las 4 horas, que los encontrados en los animales íntegros (Tabla II, Fig 5 Panel CPS I); pues arginino succínico sintetasa se mantuvo con una actividad muy por debajo en presencia de hidrocortisona de la presentada en el animal íntegro (43%) (Tabla II, Fig 5 Panel ASS). El estudio de la actividad enzimática de arginasa muestra que la adrenalectomía y la administración de hidrocortisona a animales adrenalectomizados no tuvieron efecto significativo en su actividad ya que esta corresponde a un 82.6% y 97% (4 horas) respectivamente; sin embargo, se observa una disminución significativa (53%) en su actividad por efecto de hidrocortisona 6 horas después de su administración (Tabla II, Fig 5 Panel ASA).

Efecto de insulina sobre la actividad de algunas de las enzimas del metabolismo del amonio.

En la Tabla III, se muestra el efecto de insulina en las actividades de las enzimas estudiadas en el presente trabajo, en animales diabéticos en comparación con las actividades encontradas en los animales íntegros sin insulina exógena.

Alanina aminotransferasa mitocondrial muestra un 226% de aumento en su actividad en animales diabéticos y por acción de insulina esa actividad aumenta aún más (42%) en relación al animal íntegro (Tabla III, Fig 6 Panel AATm). Por otro lado, la isoenzima de la fracción soluble no muestra cambios significativos en las condiciones estudiadas (Tabla III, Fig 6 Panel AATc).

Efectos similares a los obtenidos para alanina aminotransferasa mitocondrial y alanina aminotransferasa citosólica se observan en aspartato aminotransferasa mitocondrial y aspartato aminotransferasa citosólica, es decir la isoenzima mitocondrial de esta última enzima aumenta 3.3 veces en el animal diabético y 4.3 veces al administrarle insulina y la isoenzima citosólica no muestra cambios significativos (Tabla III, Fig 6 Paneles AATm, AATc, ASTm y ASTc). Estos datos nos indican que las isoenzimas mitocondriales de ambas aminotransferasas responden al efecto de insulina y también al estado diabético a diferencia de la adrenalectomía y el efecto de hidrocortisona en que las isoenzimas citosólicas de estas aminotransferasas son más adaptables a estas condiciones.

Las enzimas glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa no muestran cambios significativos en sus actividades en las tres condiciones estudiadas.

La glutamato deshidrogenasa presenta un 70.3% de la actividad en el estado diabético y 90.7% en el animal diabético con insulina en relación a la actividad de la enzima en el animal íntegro (Tabla III, Fig 6 Panel GDH)

TABLA III EFECTO DE INSULINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS DEL METABOLISMO DEL AMONIO EN HIGADO DE RATAS MACHOS

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL ANIMAL

* ENZIMA	INTEGRO (Normal)	DIABETICO (Control)	DIABETICO MAS 2 U.I. DE INSULINA POR VIA SUBCUTANEA (Problema)
AAT(m)	0.030 (7) ^a ± 0.008 ^b	0.098 (9) ^a ± 0.030 ^b	0.140 (9) ^a ± 0.030 ^b
AAT(c)	0.059 (10) ^a ± 0.020 ^b	0.068 (7) ^a ± 0.0065 ^b	0.054 (19) ± 0.01 ^b
AST(m)	0.13 (11) ^a ± 0.030 ^b	0.43 (6) ^a ± 0.020 ^b	0.56 (9) ± 0.094 ^b
AST(c)	0.145 (13) ^a ± 0.039 ^b	0.18 (9) ^a ± 0.045 ^b	0.15 (11) ^a ± 0.049 ^b
GDH	0.054 (12) ^a ± 0.007 ^b	0.038 (8) ^a ± 0.005 ^b	0.049 (11) ^a ± 0.007
GS	1.24 (11) ^a ± 0.42 ^b	1.01 (9) ^a ± 0.26 ^b	-1.33 (7) ^a ± 0.28
CPS-1	0.046 (10) ^a ± 0.01 ^b	0.044 (7) ^a ± 0.015 ^b	0.042 (9) ^a ± 0.015
ASS	0.10 (4) ^a ± 0.013 ^b	0.152 (4) ^a ± 0.027	-0.084 (8) ^a ± 0.020
ASA	4.6 (9) ^a ± 1.2	6.1 (6) ^a ± 1.4	2.35 (9) ^a ± 0.76

*El nombre de las enzimas se expresa mediante siglas cuyas equivalencias aparecen en abreviaturas y la actividad es expresada en micromolas de productos formadas min⁻¹. ml⁻¹. mg de proteína⁻¹

a. numero de ratas
b. desviación estandar.

Fig. 6

EFEECTO DE INSULINA

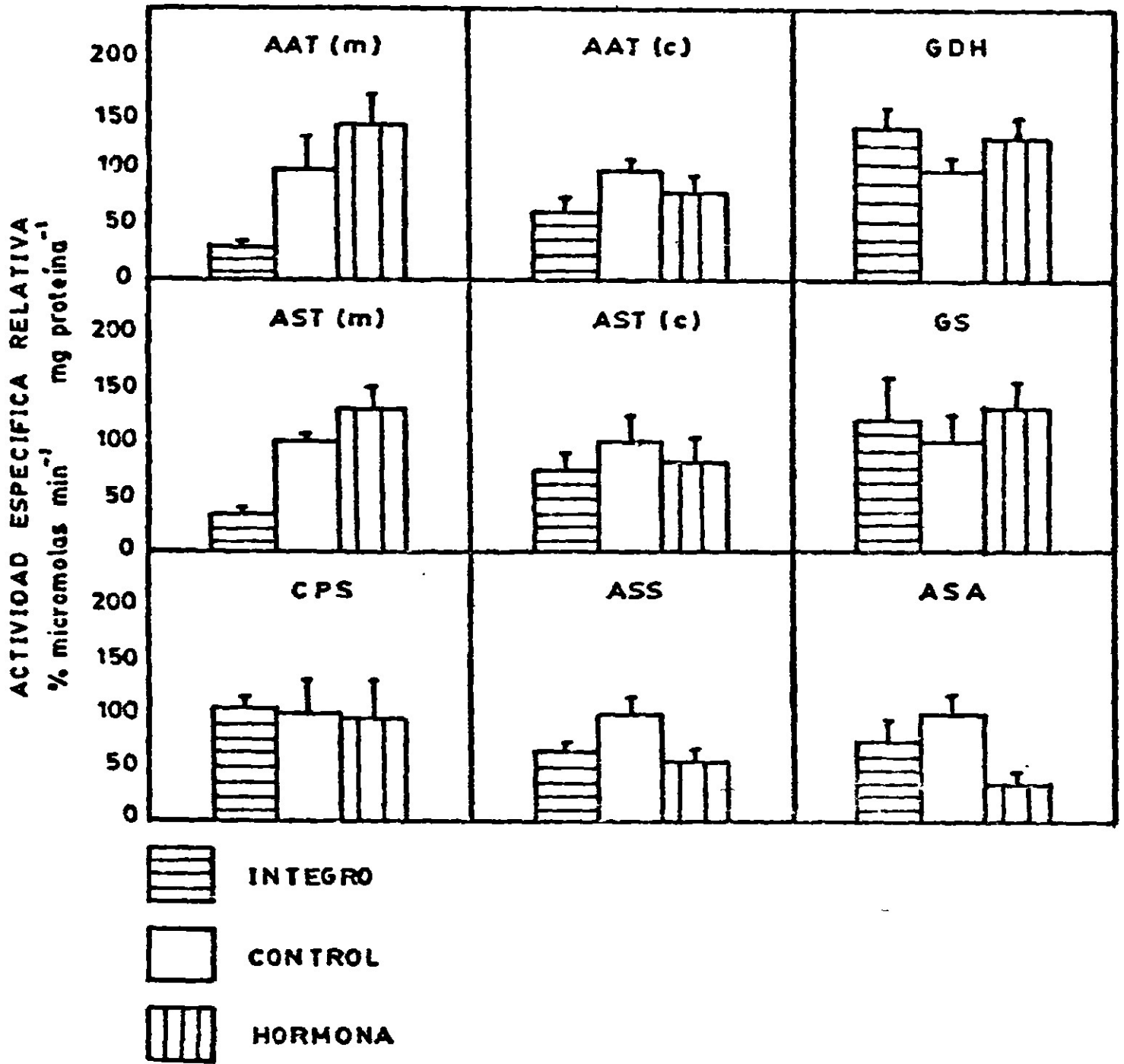


Fig 6. Efecto de insulina sobre la actividad específica relativa ($\% \text{micromolas} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteina}^{-1}$) de algunas enzimas del metabolismo del amonio. A un grupo de ratas machos, mantenidas en las condiciones que se indican en la Fig 5, se les provocó diabetes por la administración de aloxano (80 mg/Kg de peso) por vía intravenosa y fueron consideradas diabéticas cuando los niveles de glucemia alcanzaron valores mayores de 400 mg% (generalmente ocurrió 24 horas después). A un subgrupo de las ratas diabéticas se les administró 2 U l de insulina cristalina por vía subcutánea y otro subgrupo fue considerado como control. Ambos subgrupos fueron sacrificados 2 horas después de la administración de la hormona. Otro subgrupo de ratas a las que no se les administró aloxano ni insulina, fueron consideradas como íntegras. Los hígados de todos los grupos de animales fueron extraídos y determinadas las actividades de las enzimas mencionadas en su fracción subcelular -- correspondiente como se indicó en "Materiales y Metodos".

Glutamina sintetasa muestra una actividad de 81.4% y 107% en el animal diabético y 100% en el animal íntegro (Tabla III, Fig 6 Panel GS).

De las enzimas estudiadas con relación a la biosíntesis de urea, carbamil fosfato sintetasa I no presenta cambio alguno en las tres condiciones estudiadas (Tabla III, Fig 6 Panel CPS I). Arginino succínico sintetasa en el animal diabético, su actividad aumenta significativamente en un 52%, que por efecto de insulina disminuye hasta presentar el 84% de la actividad observada en el animal íntegro (Tabla III, Fig 6 Panel ASS).

En el animal diabético, la actividad de arginasa aumenta 32% y por efecto de insulina disminuye 62% y 49% en relación al animal diabético y al animal íntegro respectivamente (Tabla III, Fig 6 Panel ASA).

DISCUSION

Los estudios del presente trabajo son complementarios de dos anteriores, previamente elaborados en el departamento de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de San Luis Potosí S.L.P. -- (46,68), y en conjunto están encaminados a encontrar una correlación entre las actividades de algunas enzimas hepáticas de rata -- que participan en el metabolismo del amonio con el fin de establecer una integración del proceso en el tejido normal como el punto de partida y de base para tener un mejor entendimiento en lo que -- podría suceder en el tejido transformado.

El presente estudio se enfocó al efecto de las hormonas; hidrocortisona e insulina sobre las actividades de las enzimas; alanina aminotransferasa mitocondrial y citosólica, aspartato aminotransferasa mitocondrial y citosólica, glutamato deshidrogenasa, glutamina sintetasa, carbamil fosfato sintetasa I, arginino succínico sintetasa y arginasa de hígado de rata adrenalectomizadas ó diabéticas respectivamente en comparación al animal íntegro (normal), que no recibió ningún tratamiento.

A diferencia del diferente contenido de proteína en la dieta (68), los animales adrenalectomizados sin hidrocortisona y adrenalectomizados con hidrocortisona, como los diabéticos sin insulina y diabéticos con insulina no presentaron cambios significativos en el peso del hígado y en el contenido de proteína hepática (Tabla I), lo que indicaría que estas condiciones no modificarían en forma general la cantidad de proteína hepática, aunque no se descarta que tengan un efecto específico.

Al igual que en otros reportes (14), hemos encontrado que la actividad de alanina aminotransferasa citosólica aumenta dos horas deses de la administración de hidrocortisona a animales adrena

lectomizados (Tabla II, Fig 5 Panel AATc), lo cual se podría explicar porque los glucocorticoides (hormona que tiene un efecto en el catabolismo), aumenta la producción de amonio (52,71), el -- cual se incorpora al hígado formando parte del glutamato, que es -- uno de los sustratos de la alanina amoniotransferasa citosólica en el que el equilibrio de la reacción está desplazado hacia la formación de L-alanina (25).

Por otro lado, en el estado diabético esta isoenzima tiende a aumentar su actividad (Tabla III, Fig 6 Panel AATc), probablemente por ausencia de insulina por una acción de antagonismo fisiológico, ya que en presencia de la hormona la actividad de la isoenzima tiende a "regresar" a los valores de la actividad encontrados en el animal íntegro (Tabla III, Fig 6 Panel AATc).

El exceso de glutamato proveniente de una dieta hiperprotéica (68), puede ser sustrato para la formación de glutamina ó la síntesis de amonio, por la acción catalítica de glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa respectivamente, ambas enzimas importantes en el metabolismo del amonio. La actividad de las dos enzimas no es modificada después de la adrenalectomía, ni después de la administración de hidrocortisona a animales adrenalectomizados. Estos datos refuerzan en parte el hecho de tratarse de enzimas no adaptativas y cuyas actividades están controladas por la concentración de amonio actuando como efector alostérico positivo para la glutamina sintetasa y como producto inhibidor de la glutamato deshidrogenasa.

Los resultados del efecto de insulina en relación a glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa (Tabla III, Fig 6 Panel GS, GDH), el comportamiento fué muy similar para las dos enzimas ya que en animales diabéticos sus actividades disminuyeron ligeramente pero mientras que para glutamina sintetasa podría deberse a la necesidad de la insulina, puesto que en presencia de la hormona la actividad es regenerada a la presentada a los animales íntegros.

hechos por otro lado se pone de manifiesto en algunos estados de la diferenciación celular (8), en caso de glutamato deshidrogenasa la actividad de la enzima está disminuída en el animal diabético debido a que en esta situación disminuye la glucólisis y por lo tanto, efectores alostéricos positivos también están disminuídos, como es el NDAH lo que originaría cambios conformacionales de la enzima reflejandose en una menor actividad enzimática y se ha manifestado más estable al ser ensayada in vitro . Al administrar insulina al animal diabético glutamato deshidrogenasa tiende a alcanzar la actividad mostrada en el animal íntegro por revertirse las condiciones anteriores que dan lugar a un conformero más activo de la enzima y posiblemente este aumento en la actividad no sea debido a una modificación en la cantidad de la enzima.

La aspartato aminotransferasa mitocondrial tiene mayor afinidad por el aspartato que la isoenzima de la fracción soluble (17) y junto con alfa-cetoglutarato que puede transportarse de una manera facilitada dentro y fuera de la mitocondria, cataliza la formación de oxalacetato y glutamato. De esta manera la cantidad de glutamato mitocondrial se ve favorecida contribuyendo a una manifestación de la actividad tanto de la glutamina sintetasa como de la glutamato deshidrogenasa.

Los resultados del presente estudio muestran que la administración de hidrocortisona a animales adrenalectomizados disminuyó la actividad significativamente de la aspartato aminotransferasa mitocondrial (Tabla II, Fig 5 Panel ASTm), y en conjunto con los resultados mostrados con una dieta hiperprotéica (68) hacen pensar que esta isoenzima no participa importantemente en la donación de grupos amino para la formación de urea. Los datos de la Tabla III, Fig 6 muestran que en el animal diabético y diabético más insulina, la actividad de aspartato aminotransferasa mitocondrial aumento significativamente, y es mayor en el último caso en relación a la acti

vidad expresada en el animal íntegro, podrían interpretarse como cambios adaptativos de la isoenzima. Los productos formados por esta reacción: oxalacetato y glutamato; la utilización del primero formado para fines gluconeogénicos por prevalencia de la acción de glucagón en el caso del animal diabético sin insulina y, para fines energéticos la utilización del glutamato para la formación de glutamina en el caso del animal diabético más insulina.

La alanina aminotransferasa mitocondrial presenta una mayor afinidad por L-alanina y la consecuente formación de piruvato (5). Una dieta hiperprotéica favorecerá disponibilidad de sustratos y por lo tanto aumenta la actividad de la enzima (68), la administración de hidrocortisona a animales adrenalectomizados, no se detectó actividad de esta isoenzima como lo reportan (65,), cuya explicación no es del todo clara que quizás debido a cambios conformacionales inactivos ó aumento en la velocidad de degradación de ésta, ó por la disponibilidad de sustrato no adecuado .

Sin embargo en el animal diabético sin insulina y diabético más insulina la actividad de alanina aminotransferasa mitocondrial aumenta similarmente como se observa en aspartato aminotransferasa mitocondrial (Tabla III, Fig 6 Panel AATm y ASTm).

En el primer paso para la biosíntesis de la urea está catalizada por la carbamil fosfato sintetasa I, enzima muy adaptativa cuya actividad aumenta después de una dieta hiperprotéica (6^c), y en este estudio 4 horas después de la administración de hidrocortisona a animales adrenalectomizados, y en la ausencia de la hormona fué muy pobre (Tabla II, Fig 5 Panel CPS I). Estos resultados concuerdan con otros autores (54,55), los que hace suponer que un aumento en la actividad de la enzima es debido a un aumento en la cantidad de la misma ó bien de N-acetil glutamato que es el principal efector positivo de ella (57), utilizando de esta manera el amonio producido por la catálisis de glutamato deshidrogenasa.

Insulina no muestra ningún efecto en la actividad de carbamil fosfato sintetasa I ya que en el animal íntegro, diabético sin insulina y diabético más insulina (Tabla III, Fig 6 Panel CPS I), fué muy similar, puesto que su papel es capturar amonio con fines teleológicos, si la insulina tuviera un efecto inhibitorio le disminuiría "potencia".

La aspartato aminotransferasa citosólica, su equilibrio de -- reacción está desplazado hacia la formación de aspartato, el cual sirve para la donación de grupos amino para la síntesis de urea. En dietas hiperprotéicas la actividad de esta enzima está aumentada por disponibilidad de oxalacetato proveniente de la mitocondria formada por la catálisis de la aspartato aminotransferasa mitocondrial (68). Esta explicación se refutesa con los datos del presente estudio y que tanto insulina como hidrocortisona no modifican la actividad de aspartato aminotransferasa citosólica (Tabla II y III, Fig 5 y 6 Panel ASTc y ASTm).

La arginino succínico sintetasa es una enzima adaptativa cuya actividad aumenta importantemente después de una dieta hiperprotéica (68), dado que la adrenalectomía disminuye significativamente su actividad (Tabla II, Fig 5 Panel ASS) se esperaba que el efecto de hidrocortisona en estas condiciones aumentara la actividad -- ya sea por inducir la enzima como ha sido reportado por otros autores ó de una manera directa por aumentar la disponibilidad de sustrato, sin embargo los resultados no fueron así (Tabla II, Fig 5 Panel ASS) debido a que para que se obtenga el efecto deseado se requeriría más tiempo y más dosis de glucocorticoides (56).

El efecto de insulina sobre arginino succínico sintetasa se -- observó una inhibición ya que en el animal diabético sin insulina se observa un aumento notable en su actividad posiblemente a un efecto de glucagón que no es antagonizado por insulina ya que algunos autores han reportado también una inducibilidad de la enzima

por glucagón (61).

Estudios previos en relación con dietas hipoprotéicas e hiperprotéicas han mostrado que la arginasa es una enzima muy adaptativa (46,68), su actividad aumenta significativamente después de una dieta hiperprotéica probablemente por disponibilidad de sustrato (46,68). En este estudio la adrenalectomía y la administración de hidrocortisona a animales adrenalectomizados no mostró en general cambios en la actividad de la enzima (Tabla II, Fig 5 Panel ASA) aunque seis horas después de la administración de hidrocortisona mostró una disminución significativa cuya explicación no está muy clara. Estos resultados no están de acuerdo con los reportados por otros autores (56), debido probablemente en nuestro caso a que no se utilizaron dosis repetitivas de la hormona y tiempos más prolongados. El comportamiento de la arginasa en animales diabéticos sin insulina y diabéticos más insulina es similar por la arginino succínico sintetasa pero en el caso de la arginasa la insulina inhibió más importantemente que la arginino succínico sintetasa. Las mismas consideraciones para arginino succínico sintetasa podrían aplicarse para explicar el comportamiento de arginasa en estas condiciones.

CONCLUSIONES

1. La adrenalectomía bilateral, la diabétes por aloxano y la administración de hidrocortisona e insulina respectivamente, no tuvieron efecto significativo en el peso corporal y contenido de proteína hepática.
2. La adrenalectomía tuvo por efecto una disminución significativa en las actividades de carbamil fosfato sintetasa I, arginino succínico sintetasa y arginasa.
3. La adrenalectomía no mostró cambio significativo en las actividades de alanina aminotransferasa citosólica, aspartato aminotransferasa mitocondrial y citosólica, glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa.
4. La administración de hidrocortisona a animales adrenalectomizados mostró cambios significativos sólo en la actividad de carbamil fosfato sintetasa I, 4 horas después de la administración de la hormona.
5. La administración de hidrocortisona a animales adrenalectomizados no mostró cambios significativos en las actividades de arginino succínico sintetasa y arginasa como otros autores han reportado, debido probablemente a un requerimiento de dosis repetitivas y tiempos más prolongados de acción de la hormona.
6. La diabétes por aloxano ocasionó aumentos significativos en las actividades de alanina aminotransferasa mitocondrial, aspartato aminotransferasa mitocondrial y citosólica, arginino succínico sintetasa y arginasa.

7. En la diabétes por aloxano la glutamina sintetasa mostró una pobre disminución que fué revertida en presencia de insulina,
8. La administración de insulina a animales diabéticos por aloxano tuvo efecto significante sobre la actividad de alanina aminotransferasa mitocondrial y aspartato aminotransferasa únicamente.
9. El efecto de insulina en animales diabéticos por aloxano mostró una inhibición de arginino succínico sintetasa y arginasa.

Generalmente las enzimas involucradas en el catabolismo están aumentadas, con una dieta hiperprotéica y en el estado diabético el cual está relacionado con un aumento en la excreción de nitrógeno.

Insulina siendo una hormona anabólica tiende a revertir este efecto por una disminución en las actividades de arginino succínico sintetasa y aumentando las actividades de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa.

REFERENCIAS

1. Lehninger, A.L. Biochemistry, Worth Publishers, Inc., second Edition, New York, 1977.
2. Engel, P.C., Enzyme Kinetics. The Steady State Approach, 2a. Ed. Chapman y Hall, London and New York. p 1-96, 1981.
3. Cohn, R.M. y Yandrasitz, J.R., Modulation of Enzyme Activity. In Principales of Metabolic control mammalian system. Herman, R.H. Cohn, R.M. y Mc Namarra, R.D. (Eds) Plenum Press, New York, p135-165, 198
4. Schimke, R.T. Protein synthesis and degradation in animal tissue Biochemistry series one 9:183-221, 1974.
5. Paulou, A., Remesar, X., Arola, L. and Alemany M. Changes in alanine aminotransferase activity in several organs of the rat induced by a 24-hour fast. Horm. Metab. Res. 12 489-564, 1980.
6. Okada, M. and Hirose, M. Regulation of aspartate aminotransferase activity associated with changes of pyridoxal phosphate level Arch. Biochem. Biophys. 193:294-300, 1979.
7. Hillar, M. and Reuben, J., Hormonal induction of glutamate dehydrogenase in rat liver. Experientia 32:653-655, 1976.
8. Miller, R.E. Mackenbery, R. and Jershman, H. Regulation of glutamine synthetase in cultures 3T3-L1 cells by insulin, hidro cortisone and dibutiryl AMP cyclic. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 1418-1422, 1978.
9. Christowitz, D., Mattheyse, F.J. and Balinsky, J. Dietary hormonal regulation of urea cycle enzymes in rat liver. Enzyme 26:113-121, 1981.

10. Matzuzawa, T. and Segal, H. Rat liver alanina aminotransferase. *J Biol. Chem.*, 243:5929-5934, 1968.
11. Lee, K.L., Darke, P. and Kenny, F.P. Role of coenzyme in aminotransferase turnover. *J. Biol. Chem.* 252: 4953-4960, 1977.
12. Gatehouse, P.W., Hopper, S., Schatz, L. and Segal, H.L. Further characterization of alanina aminotransferase of rat liver. *J. Biol. Chem.* 242:2310-2324, 1967.
13. Swick, R.W., Barnstein, P.L. and Stange, J.L. The metabolism of mitochondrial proteins I. *J. Biol. Chem.* 240: 3334-3340, 1965.
14. Swick, R.W., Barnstein, P.L. and Stange, J.L. The metabolism of mitochondrial proteins II. *J. Biol. Chem.* 240: 3341-3345, 1965.
15. Leung, F. Y. and Henderson, A.R. Isolation and Purification of aspartate aminotransferase isoenzymes from human liver by chromatography and isoelectric focusing. Reprinted from *Clinical Chem.* 27:232-238, 1981.
16. Evered, D.F., *Advances in amino-acid metabolism in mammals.* *Biochem Soc. Trans.* 9:1959-1969, 1981.
17. Fleisher, G., Potter, S.C. and Wakim, G.H. Separation of 2-glutamyl-oxalacetic transaminase by paper electrophoresis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103:229-231, 1960.
18. Kopelovich, L., Sweetman, L. and Nisselbaum, J.S. Time dependent inhibition of aspartate aminotransferase isoenzymes by L-glycerinaldehyde 3-phosphate. *J. Biol. Chem.* 245: 2011-2017, 1970.
19. Laarse, V.D., Hollar, L. and Treslong, V.B. Evaluation and comparison of a column chromatographic and an electrophoretic technique

for separation of the two isoenzymes of aspartate aminotransferase
Clin. Chim. Acta, 102:257-260, 1980.

20. Martínez-Carrión, M. and Sneden, D. Substrate-mediated increased reactivity of a cortical sulphidyl group of crystals of cytoplasmic aspartate transaminase I. *Archives of Biochem. and Biophys.* 202:2, 624-628, 1980.
21. Kagamiyama, H., Teranishi, K., Tanase, S., Morino, Y. Sakakibara, R. and Wada, H. Complete amino acid sequence of mitochondrial aspartate aminotransferase from pig heart muscle tryptic peptides. *J. Biol. Chem.* 255:13, 6138-6143, 1980.
22. White, T., Celia. The determination of NH_3 with the use of glutamic dehydrogenase. In: *Methods Enzymology*, Vol XVII, part. A (H. Tabor and C.W. Tabor eds.) Academic Press. Inc. New York, 1970 pp. 955-958.
23. Lan, N.F. and Rawitch, A.B. Activity staining for glutamate and alanine dehydrogenase in polyacrilamide gels of varying porosity. *Enzyme* 24:416-419, 1979.
24. Stephen, A. and Bell, J.E. Dual nucleotide specificity of bovine glutamate dehydrogenase. *Biochem. J.* 191:299-304, 1980.
25. DE Rosa, G. and Swick, R.W. Metabolic implication of the alanine aminotransferase isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 259:7961-7967, 1975.
26. Brown, A., Colen, H.A. and Fisher, F. Effect of ammonia on the glutamate dehydrogenase catalyzed oxidative deamination of L-glutamate. *J. Biochem.* 18:5924-5928, 1979.
27. Baverel, G., Genoux, C., Forissier, M. and Pellet, M. Fate of glutamate carbon and nitrogen in isolated guinea pig kidney cortex tubules. *J. Biochem.* 188:873-880, 1980.

28. Colowick, S.P. and Kaplan, N.L-glutamic dehydrogenase from liver. In: Methods Enzymology, Vol II, (H.J. Stecker, de.) Academic Press, New York. pp.220-224, 1955.
29. Schimke, T.R. Adaptative characteristics of urea cycle enzymes in the rat. J. Biol. Chem. 237:459-467, 1962.
30. Remesar, X., Arola, L.P. and Alemany, M. Distribution of glutamate dehydrogenase activity in the organs of fed and 24-hours fasted rats. IRCS. 8:146, 1980.
31. Prusiner, S. and Milner, L. A rapid radio active assay for glutamine synthetase , glutaminase, asparagine synthetase and asparaginase. Anal. Biochem. 37:429-438, 1970.
32. Devel, T.F., Lerner, A. and Albrycht, D. Regulatory properties of rat liver glutamine synthetase. Biochem. Biophys. Res. Commun 48: 1419-1425, 1972.
33. Miller, E.R. and Carring, A.D. Dibutiryl cyclic AMP decreases glutamine synthetase in cultured 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem. 255:5490-5500, 1980.
34. Tiemeier, B.C. and Milan, G. Regulation of glutamine synthetase in cultured chinese hamsters cells. J. Biol. Chem. 247:5722-5727, 1972
35. Haussinger, D. and Sies, H. Hepatic glutamine metabolism under the influence of portal ammonia concentrations in the influence of portal ammonia concentrations in the perfused rat liver. Eur. J. Biochem. 101:179-184, 1979.
36. Masataka, M., Satoshi, M. and Masamiti, T. Cell-free synthesis and processing of putative precursor of mitochondrial carbamyl phosphate synthetase I of rat liver. Proc. Nat. Acad. Sci. 70:5071-5075, 1979.

37. Zollner, H. and Braver, E. Regulation of urea synthesis by the ammonia concentration in rat liver cells. *IRCS*, 8:574, 1980.
38. Palacios de la Lama, R. La Biosíntesis de la urea un modelo para la integración de un ciclo metabólico. (Tesis para la Licenciatura de Médico Cirujano) Facultad de Medicina, U.N.A.M., 1968.
39. Hayase, K. Yokogoshi, H. and Yoshida, A. Effect of dietary proteins and amino acid deficiencies on urinary excretion of nitrogen and the urea synthesizing system in rats. *J. Nutrition* 110:1327-1337 1980.
40. Kato, H., Mizutani-Funahashi, M., Shiosaka, S. and Nakagama, H. Circadian rhythms of urea formation and arginine succinate synthetase activity in rat liver. *J. Nutrition* 108:1071-1077, 1978.
41. Ratner, S. Enzymatic synthesis of arginine (condensing and splitting enzymes) In: *Methods Enzymology Vol. XVII* (H. Tabor and Tabor, eds.). Academic Press, Inc., New York, pp. 350-360, 1970.
42. Schimke, R.T. Arginase (rat liver) In: *Methods Enzymology Vol. XVII* (S. Ratner, ed) Academic Press, New York, pp. 313-315, 1970.
43. Brown, G.W. and Cohen, P. Comparative biochemistry of urea synthesis. *J. Biol. Chem.* 234:1769-1773, 1959.
44. Rosenthal, O., Gottliber, B., Gorry, J. and Vars, H. Influence of cations on the intracellular distribution of rat liver arginase. - *Fed. Proc.* 13:284, 1954.
45. Schimke, R.T. The importance of both synthesis and degradation in the control of arginase levels in rat liver. *J. Biol. Chem.* 239: - 3808-3817, 1955.

46. Solano, S. y Pineda, M. Efecto de la dieta hiperprotéica e hipoprotéica sobre las actividades de arginasa y glutamina sintetasa del hígado de rata. (Tesis para Licenciatura de Químico Farmacobiólogo) Escuela de Ciencias Químicas, U.A.S.L.P., 1980.
47. Tarrab, R., Rodríguez, J., Huitron, C., Palacios, R. and Soberón, G. Molecular forms of rat-liver arginase. *Eur. J. Biochem.* 49:457-468, 1974.
48. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing. New York, --- U.S.A., 1983.
49. Wong, S.B., Chenoweth, E.M. and Dunn, A. Possible growth hormone control of liver glutamine synthetase activity in rats. *Endocrinology* 106:268-274, 1980.
50. Hayase, K., Yokogoshi, H. and Yoshida, A. Effects of dietary proteins and aminoacid deficiencies on urinary excretion of nitrogen and the urea synthesizing system in rats. *J. Nutrition* 110:1327-1337, - 1980.
51. Schimke, T.R. Differential effects of fasting and proteins free diets on levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem.* 237:1921-1924, 1962.
52. Schimke, T.R. Studies on factors affecting the levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem.* 238:1012-1018, 1963.
53. Lamers, W.H. and Mooren, P.G. Multihormonal control of enzyme clusters in rat liver ontogenesis II. Role of glucocorticoid and thyroid hormone and glucagon and insulin. *Mech. Dev. Ageing* 15:93-118, -- 1981.

54. Gautier, C., Husson, A. et Valliant, R. Evolution de l'activité de la carbamyl phosphate synthetase et de l'ornitine transcarbamylase - du foie foetal de rat au cours du développement. *Experientia* 31:125-126, 1975.
55. Gautier, C., Husson, A. et Valliant, R. Effects des glucocorticostéroïdes sur l'activité des enzymes du cycle de l'urée dans le foie foetal de rat. *Biochimie*. 59:91-95, 1978.
56. Renne, C. Lin Philip, J.S. and Rabier, D. Introduction of urea cycle enzymes by glucagon and dexamethasone in monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 257:5061-5067, 1982.
57. Saheki, T., Ohkudo, T. and Katsunuma, T. Regulation of urea synthesis in rat liver. *J. Biochem.* 84:1423-1430, 1978.
58. Shigesada, K., Aoyagi, K. and Tatibaba, M. Role of acetyl glutamate in ureotelism variations in acetyl glutamate level and its possible significance in control of urea synthesis in mammalian liver. *Eur. J. Biochem.* 85:381-391, 1978.
59. Schimke, R.T. Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in rat. *J. Biol. Chem.* 237:459-467, 1962.
60. Schimke, R.T. Differential effects of fasting and protein free diets on level of urea enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem.* 237:1921-1924, 1962.
61. Snodgrass, P.J. Lin, R.C. Muller, W.A. and Aoki, T.T. Introduction of urea cycle enzymes of rat liver by glucagon. *J. Biol. Chem.* 253:2748-2758, 1976.

62. Schimke, R.T. Protein synthesis and degradation in animal tissue. - In Biochemistry series one 9:183-221, 1974.
63. Swick, R.W., Barnstein, P.L. and Stang, J.L. The metabolism of mitochondrial proteins II J. Biol. Chem. 240:3341-3345, 1965.
64. Lin-Lee, K., Darke, P.L. and Kenney, F.T. Role of coenzyme in amino transferase turnover. J. Biol. Chem. 254:4958-4961, 1977.
65. Swarat, K., Patanik and Kanungo, N.S. Different pattering of induction of the two isoenzymes of alanine aminotransferase of liver of rat a function of age. Biochem. and Biophys. Reseach. Communicatio-
ns 56:845-850, 1974.
66. Schoolwerth, A.C. and La Nove, K.F. The role of microcompartmentation - in the regulation the glutamate metabolism by rat kidney mitochondria. J. Biol. Chem. 37:429-438, 1970.
67. Cornell, N.W. and Crow, K.E. Reactivation by glutamate or aspartate of amino-oxyacetate inhibited aspartate aminotransferase in vitro - and in isolate hepatocytes. J. Biochem. 198:219-223, 1981.
68. Batres, L.E. and Campos, M.B. Efecto del contenido diferente de proteina en la dieta sobre las actividades de algunas enzimas que intervienen en el metabolismo del amonio en el hígado de la rata. (Tesis para Licenciatura de Químico Farmacobiólogo), Escuela de Ciencias Químicas, U.A.S.L.P., 1982.
69. Fohond, L.A. and Kmiolek, E. Effects of aspartate on complexes between glutamate dehydrogenase and varying aminotransferase. J. Biol. Chem. 252:1250-1256, 1977.

70. Pahlich, E. and Gerlitz, C. Deviations from michaelis menten behavior of plant glutamate dehydrogenase with ammonium as variable substrate. *Phytochemistry* 19:11-13, 1980.
71. Kulka, R.C. and Cohen, H. Regulation of glutamine synthetase activity of hepatoma of tissue cultured cells by glutamine and dexamethasone. *J. Biol. Chem.* 248:6738-6743, 1973.
72. Crook, R.B., Lovie, M., Devel, T.F., Tomkins, G.M. Regulation of glutamine synthetase by dexamethasone in hepatoma tissue cultured cell. *J. Biol. Chem.* 253:6125-6131, 1978.
73. Schmidt, T.J. and Thompson, B. Glucocorticoid receptors and glutamine synthetase in leukemik sézary cells. *Cancer receach* 39:376-382, 1979.
74. Plihank, M.R. and Phillips, A.T. Glucocorticoid stimulation of glutamine synthetase production in cultured rat glioma cells. *J. Neurochemistry* 34:866-872, 1980.
75. Mc Lean, P. and Novello, F. Influence of pancreatic hormones on enzymes concerned with urea synthesis in rat liver. *J. Biochem.* 94 : 410-422, 1965.
76. Mc Lean, P. and Gorney, N.W. Effect of adrenalectomy and growth hormone on enzymes concerned with urea synthesis rat liver. *J. Biochem.* 87:96-104, 1963.
77. Reynolds, R.D., Potter, V.R. and Pitot, A.C. Response of several hepatic adaptative enzymes to a shift from low to high protein diet in intact and adrenalectomized rat. *J. Nutrition* 101:797-802 , 1971.

- 78.- Deduve, C., Pressman, G.C., Gianetto, N. Wattiaux, R. - Appelmans, F. Tissue G Intracellular Distribution Patterns of enzymes in rat Liver Tissue. Biochem. J. 60: 604-617, - 1955.
- 79.- Rodríguez, J.M. and Pitot, H.C. Studies on the conversión of multiple forms of Tyrosine Aminotransferase in rat Li - ver. Arch. Biochem. Biophys. 177: 185-195, 1976.
- 80.- Shachter, H., Jabbal, I., Hudging, R.L., Pinteric, J. Mc. Guire, E.J. and Roseman, S. Intracelular localitation of liver suggar nucleotide glycoprotein glycosyltranaferasa in a golgi-rich fraction, J. Biol. Chem 245: 1090-1100, 1970.
- 81.- Karmen, A. Transaminase Activity in Human Blood. J. Clin. Invest. 34: 126-133, 1955.
- 82.- Levintow, L.J., The glutamiltransferase activity of normal and neoplastic tissue., J. Nat. Cancer Institute 15: 347-352, 1954.
- 83.- Mori, M. and Cohen, P. Preparation of Crystalline Carbamyl Phosphate synthetase I from frog liver. J. Biol. Chem. 253: 8337-83339.
- 84.- Hynninghake, A. and Grisolia, S. Asensitive and convenient micromethod for estimation of urea citruline and carbamyl derivatived. Anal. Biochem. 16: 200-205, 1960.
- 85.- Celia, Tabor, H., Methods in Enzymology XVII, Academic Press Inc. New York, 1970 pp 356-360.
- 86.- Rahmatulla H.M. and Boyde, T.R.C. Improvements in the Determination of urea using diacetyl - monoxime; Methods with and with and without deproteinitation Clinical Chemica Acta 109: 3-9 , 1980.
- 87.- Lowry, O.H. Protein Determination by a simple assay with the folin phenol reactive. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.

FUENTE CHICA No.145
TEL. 5-60-63
SAN LUIS POTOSI S. L. P.