

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CITOLOGICAS

Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas

TESIS DOCTORAL

EL CICLO DE LA UREA: REGULACION, NUEVAS FUNCIONES
Y PATOGENESIS DE SUS ALTERACIONES

Memoria para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas,
presentada por:

Miguel Angel García Pérez

Valencia, Junio de 1994

UMI Number: U607672

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607672

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

6860
6.10.94

SIGNATURA
346.T.D

Nº LIBIS: 216913 68

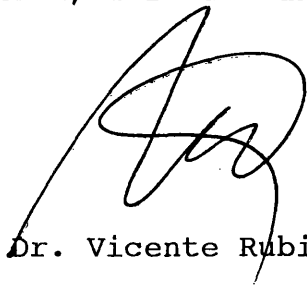
↳ Biológicas

31 cms.

VICENTE RUBIO ZAMORA, Investigador del CSIC y Jefe del Departamento de Citología Cuantitativa del Instituto de Investigaciones Citológicas de la Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral titulada "EL CICLO DE LA UREA: REGULACION, NUEVAS FUNCIONES Y PATOGENESIS DE SUS ALTERACIONES" ha sido realizada por el Licenciado en Ciencias Biológicas, D. Miguel Angel García Pérez bajo mi dirección en este Instituto.

En Valencia, a 27 de Junio de 1994



Fdo. Dr. Vicente Rubio Zamora

Este trabajo de Tesis ha sido financiado por las Ayudas 89/0554 y 92/0374 del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISS) y por la Ayuda CPE-049 de la Institució Valenciana d'Estudis i Investigació (IVEI). Durante una parte del tiempo de realización de este trabajo, el autor ha disfrutado de una beca del FISS con cargo al proyecto 89/0554.

Para la realización de un trabajo de esta índole muchas son las personas con las que se ha de colaborar y a las que se tiene que recurrir en diversas ocasiones para pedir consejo ante unos resultados no satisfactorios, o cualquier otro tipo de problema. Sin la ayuda de todas estas personas la realización de este trabajo hubiese sido, sin duda alguna, mucho más difícil.

Deseo expresar mi agradecimiento, en primer lugar, al Dr. Vicente Rubio, director de este trabajo, sin cuya continua ayuda, estímulo y consejo no se hubiera podido realizar. Agradezco sinceramente la amistad y la desinteresada ayuda prestada por la Dra. Eulalia Alonso; ella ha sido, en no pocas ocasiones, orientadora a la vez que colaboradora. Debo agradecer, de forma especial, la colaboración y la amistad de todas las personas con las que he compartido el trabajo durante todo este tiempo: Filo Bote, Inmaculada Micó, Jorge Bueso, Alberto Marina, Hugo Cabedo, Toni García-España y Elvira de la Peña. Todos ellos han contribuido para que el laboratorio del tercero derecha sea un lugar agradable para trabajar; con todos ellos tengo alguna deuda pendiente. Agradezco asimismo a todos los demás miembros del Instituto de Investigaciones Citológicas su colaboración y disponibilidad para prestarme la ayuda necesaria en todo momento.

Deseo expresar mi agradecimiento a los Drs. Barcia Salorio y Paco Cortés del Hospital Clínico y La Fe, respectivamente, por la donación desinteresada de muestras de

tumores obtenidos en intervenciones quirúrgicas; y a la Dra. Consuelo Guerri por la disección de las regiones cerebrales y por permitirme usar, con bastante frecuencia, su ordenador.

De forma muy especial quiero agradecer a mi familia, y especialmente a mis padres, todo el derroche de cariño, esfuerzo y sacrificio que me han regalado durante tantos años para que me pudiese dedicar a este campo, y a Marina Garcés, que me ha apoyado en todo momento, ha soportado y comprendido mejor que nadie mi estado de ánimo, y ha supuesto, en definitiva, una valiosísima ayuda.

A mi familia

A Marina

INDICE

1. PREAMBULO.....	1
2. ACIDURIA OROTICA EXPERIMENTAL: DETERMINANTES METABOLICOS DE LA ACUMULACION DE CARBAMIL FOSFATO.....	3
2.1 INTRODUCCION.....	4
2.2 MATERIAL.....	19
2.2.1 Productos químicos.....	19
2.2.2 Aparatos.....	20
2.2.3 Animales.....	21
2.2.4 Dietas.....	22
2.3 METODOS.....	23
2.3.1 Tratamiento de los animales.....	23
2.3.2 Obtención del extracto hepático.....	24
2.3.3 Determinación de carbamil fosfato.....	25
2.3.4 Determinación de acetilglutamato.....	27
2.3.5 Determinación de ornitina y arginina.....	28
2.3.6 Determinación de citrulina.....	29
2.3.7 Determinación de argininosuccinato.....	30
2.3.8 Determinación de orotato.....	30
2.3.9 Otras determinaciones.....	31
2.4 RESULTADOS Y DISCUSION.....	34
2.4.1 Inducción de aciduria orótica.....	34
2.4.2 Orotato y carbamil fosfato hepáticos.....	37
2.4.3 Determinantes metabólicos de la acumulación de carbamil fosfato tras la administración de glicina.....	43
2.4.4 Influencia de la administración de ornitina sobre la acumulación de carbamil fosfato inducida por glicina.....	51
2.4.5 Determinantes metabólicos de la acumulación de carbamil fosfato tras la administración de alanina.....	60

2.4.6 Consideraciones finales.....	66
2.5 REFERENCIAS.....	74
3. N-ACETIL-L-GLUTAMATO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: INVESTIGACIONES SOBRE SU ORIGEN Y METABOLISMO.....	82
3.0 ABREVIATURAS.....	83
3.1 INTRODUCCION.....	83
3.2 MATERIAL.....	94
3.2.1 Productos químicos.....	94
3.2.2 Animales y tejidos.....	95
3.2.3 Aparatos.....	97
3.3 METODOS.....	98
3.3.1 Síntesis de acetilglutamato y acetilaspartato radiac- tivos.....	98
3.3.2 Obtención de fracciones subcelulares.....	99
3.3.3 Determinación de acetilglutamato, acetilaspartato y acetilaspartilglutamato.....	100
3.3.4 Determinación de N-Acetil-L-glutamina.....	106
3.3.5 Ensayo de las actividades aspartoacilasa y deacilasa de acetilglutamato.....	106
3.3.6 Ensayo de la actividad L-aspartato-N-acetil- transferasa.....	107
3.3.7 Ensayo de transacetilasa en el cerebro.....	108
3.3.8 Otros ensayos.....	109
3.4 RESULTADOS.....	110
3.4.1 Niveles cerebrales de acetilglutamato en animales adultos.....	110
3.4.2 Cambios en el nivel de acetilglutamato durante el desarrollo.....	116
3.4.3 Acetilglutamato en tumores intracraneales humanos...	118
3.4.4 Actividades cerebrales capaces de sintetizar y de degradar acetilglutamato.....	120
3.4.5 Estudios adicionales sobre la actividad hidrolítica	

de acetilglutamato.....	123
3.4.6 Distribución regional de la deacilasa de acetil- glutamato y de la aspartoacilasa.....	131
3.5 DISCUSION.....	136
3.6 REFERENCIAS.....	142
4. HALLAZGO DE LA MUTACION SPF-ASH EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE ORNITINA TRANSCARBAMILASA DE MODERADA SEVERIDAD.....	152
4.1 INTRODUCCION.....	153
4.2 MATERIAL.....	162
4.2.1 Instrumentos.....	162
4.2.2 Compuestos radiactivos.....	163
4.2.3 Oligonucleótidos y sondas.....	163
4.2.4 Enzimas.....	164
4.2.5 Soluciones.....	164
4.3 METODOS.....	166
4.3.1 Marcado de la sonda con digoxigenina.....	166
4.3.2 Obtención de ADN genómico y detección de fragmentos de restricción polimórfica (RFLP).....	167
4.3.3 Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	169
4.3.4 Polimorfismos conformacionales de simple cadena (SSCP).....	172
4.3.5 Secuenciación directa de fragmentos de PCR de doble cadena.....	173
4.3.6 Otros ensayos.....	175
4.4 RESULTADOS.....	178
4.4.1 Historias clínicas.....	178
4.4.2 Actividad ornitina transcarbamilasa.....	181
4.4.3 Análisis de la herencia de los RFLP en la familia A..	184
4.4.4 Análisis de microsátélites cercanos al gen de la OTC en la familia A.....	186

4.4.5 Análisis de los SSCP..... 188

4.4.6 Secuenciación directa del exón 4 amplificado por PCR. 190

4.4.7 Digestión del exón 4 con MspI..... 194

4.5 DISCUSION..... 196

4.6 REFERENCIAS..... 202

6. CONCLUSIONES..... 208

1. PREAMBULO

Este trabajo de Tesis consta de tres partes. La primera estudia los mecanismos metabólicos que hacen que, tras la administración de una dosis elevada de un aminoácido, se produzca la excreción de cantidades elevadas de ácido orótico [1]. Nuestros estudios demuestran que dicha excreción se debe a la acumulación en el hígado de niveles muy elevados de carbamil fosfato procedente del ciclo de la urea, y reflejan el hecho de que el segundo enzima más activo de este ciclo, la ornitina transcarbamilasa [2], puede de hecho limitar la actividad del ciclo "in vivo", subrayando la importancia de las diferencias entre los ensayos de actividad enzimática "in vitro" y la actividad real de los enzimas en su locus natural.

Tal situación tiene su correlato clínico en las deficiencias de ornitina transcarbamilasa humana que son objeto de la tercera parte de esta Tesis. Como se verá, los enfermos estudiados presentan actividades de este enzima, medidas en el tubo de ensayo, que son comparables a las de los enzimas menos abundantes del ciclo. Sin embargo, los enfermos fueron diagnosticados por su dificultad en metabolizar el amonio, y, como se verá en una de las familias, sólo uno de los varones afectados sobrevive. En esta tercera sección de la memoria de Tesis describimos por primera vez una nueva mutación en el gen de la ornitina transcarbamilasa humana, en dos familias no relacionadas.



Presenta esta mutación la peculiaridad de ser la misma que se ha descrito previamente en una cepa de ratones deficientes en ornitina transcarbamilasa, los ratones "sparse-fur/abnormal skin and hair" (spf-ash). Estos ratones son pues modelos útiles para el estudio de la fisiopatología de este déficit congénito, como se discute en esta sección de la memoria de Tesis.

La segunda sección de esta memoria de Tesis se ocupa de uno de los determinantes más importantes de la generación de carbamil fosfato, el N-acetil-L-glutamato, activador esencial del primer enzima del ciclo de la urea (carbamil fosfato sintetasa). Aquí nos ocupamos, sin embargo, de acetilglutamato "ectópico", es decir, localizado en el sistema nervioso, donde no hay carbamil fosfato sintetasa. Este fue un hallazgo sorprendente, ya que en mamíferos no se conoce otra función del acetilglutamato que activar la carbamil fosfato sintetasa I. Investigamos aquí el origen y metabolismo de este compuesto en el sistema nervioso.

NOTA: La bibliografía de esta sección se incluye en la de la sección siguiente.

2. ACIDURIA OROTICA EXPERIMENTAL:
DETERMINANTES METABOLICOS DE LA
ACUMULACION DE CARBAMIL FOSFATO.

2.1 INTRODUCCION

La figura 2.1 esquematiza el ciclo de la urea, y la 2.2 ilustra los niveles relativos de los cinco enzimas clásicos de este ciclo, en el hígado humano y de rata, en condiciones de alimentación normal. Los niveles de enzimas se determinaron en homogeneizados, en ensayos que aproximan condiciones de V_{max} [2]. La flecha horizontal para el hígado humano ilustra la actividad requerida del ciclo para la excreción normal diaria de urea en el hombre alimentado con 1 g de proteína por Kg de peso corporal, por día.

Queda claro a partir de la figura 2.2 que existe una considerable reserva funcional del ciclo de la urea, ya que las actividades máximas de los enzimas son muy superiores a las necesidades diarias de excreción de urea. Sin embargo, si se considera que, al menos en el hombre, el aporte nitrogenado se distribuye principalmente a lo largo del día en 2-4 comidas, y considerando un período de absorción postprandial de unas 2-3 horas, el aporte nitrogenado a convertir en urea requiere de una actividad efectiva del ciclo 3-6 veces mayor, durante el período postprandial, lo que corresponde aproximadamente al 80% de la actividad argininosuccinato sintetasa, el enzima menos activo del ciclo, en el hígado humano [2].

El segundo punto a destacar de la figura 2.2 es la existencia, desde el punto de vista de la actividad máxima,

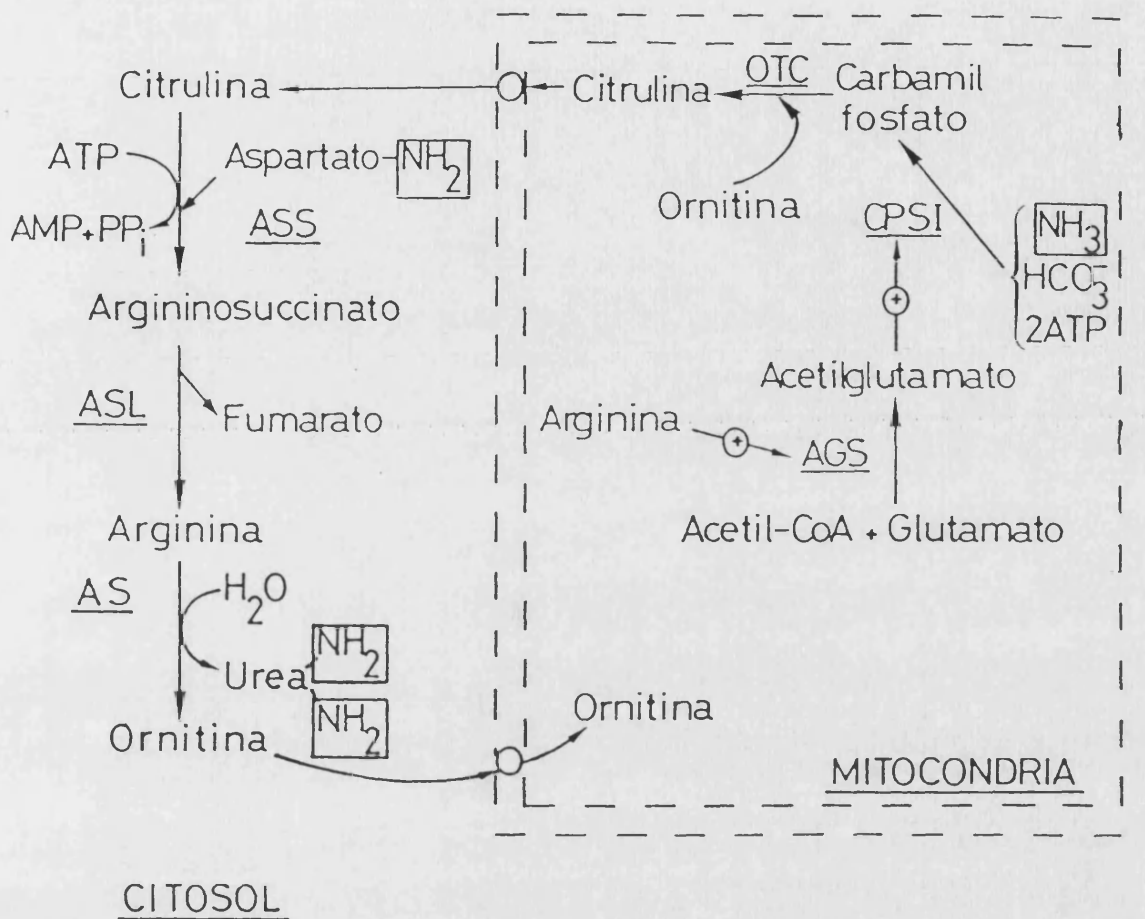


Figura 2.1. Ciclo de la urea. El signo (+) inscrito en un círculo representa activación. La doble línea discontinua representa la doble membrana mitocondrial. CPS: carbamil fosfato sintetasa; OTC: ornitina transcarbamilasa; ASS: argininosuccinato sintetasa; ASL: argininosuccinato liasa; AS: arginasa; AGS acetilglutamato sintetasa.

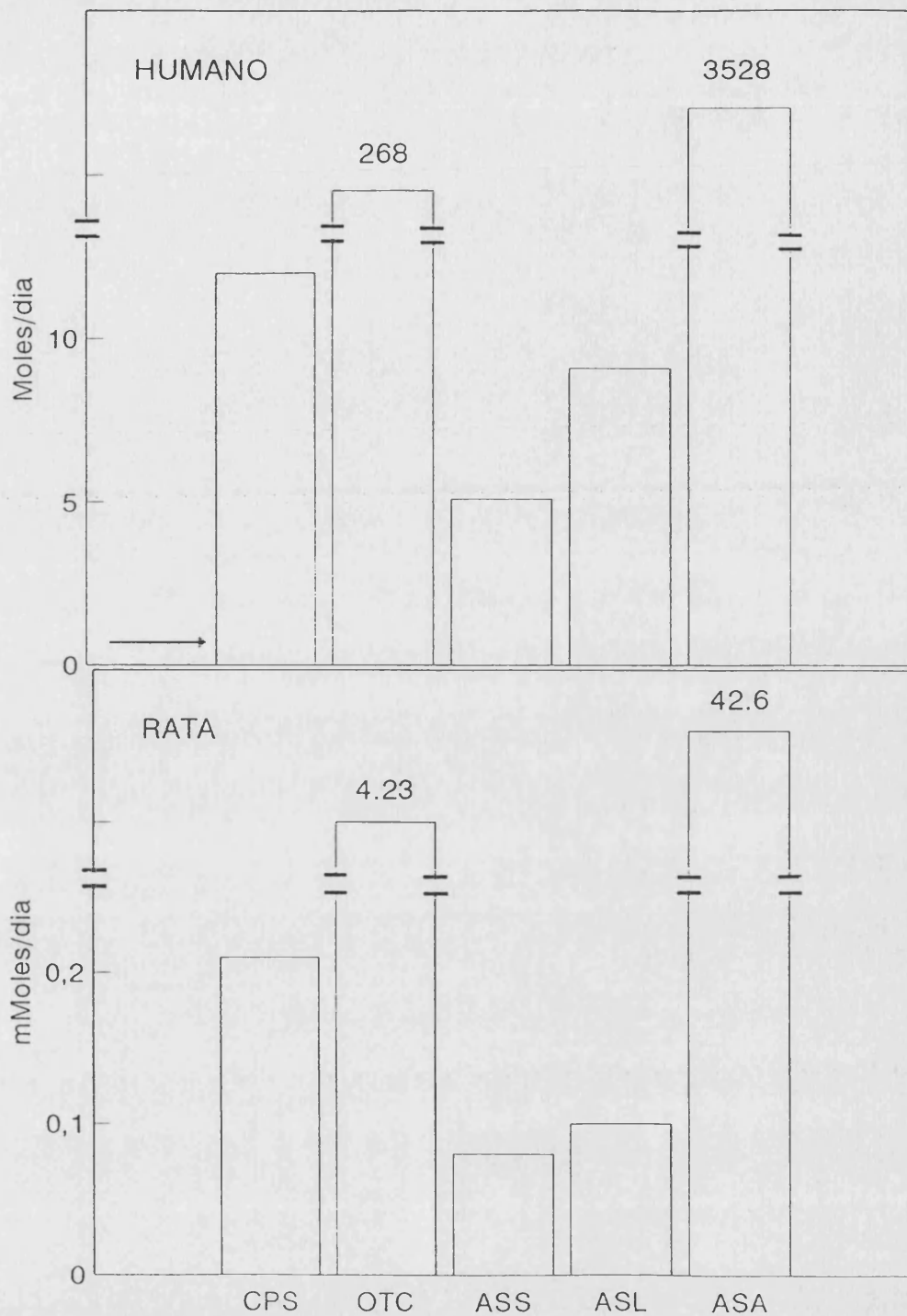


Figura 2.2. Niveles de los enzimas del ciclo de la urea en el hígado humano y en el de la rata [2]. CPS: carbamil fosfato sintetasa; OTC: ornitina transcarbamilasa; ASS: arginino-succinato sintetasa; ASL: argininosuccinato liasa; ASA: arginasa. La flecha horizontal para el hígado humano ilustra la actividad requerida del ciclo para la excreción normal diaria de urea en el hombre alimentado diariamente con 1 g de proteína por Kg de peso corporal.

de dos grupos de enzimas. El primer grupo incluye a la carbamil fosfato sintetasa, argininosuccinato sintetasa y argininosuccinato liasa, tres enzimas con actividades en el hígado humano entre 5 y 12 moles de producto/día [2]. Por contraposición, los otros dos enzimas, ornitina transcarbamilasa y arginasa, exhiben valores de V_{max} unas 20 y 300 veces mayores, respectivamente. A partir de este dato habría que suponer que la síntesis de urea viene limitada normalmente por alguno de los tres pasos menos activos, y nunca por ornitina transcarbamilasa o arginasa.

La figura 2.3 ilustra el hecho de que el primer paso del ciclo, catalizado por la carbamil fosfato sintetasa, requiere de la presencia de un activador alostérico, el N-acetil-L-glutamato [3,4], y que las fluctuaciones fisiológicas de este activador [5], representadas en la abscisa, son importantes en determinar cuál es la actividad real de la carbamil fosfato sintetasa en el tejido, independientemente del K_D del enzima para este activador. El acetilglutamato se sintetiza a partir de glutamato y acetil CoA por un enzima con valores de K_m elevados para ambos sustratos [5,8]. Además, el acetilglutamato sufre un recambio rápido, en el rango de minutos [9]. Ambas propiedades determinan que fluctue ampliamente en períodos breves de tiempo y sea un buen sensor, a través de los niveles hepáticos de glutamato, del grado de sobrecarga nitrogenada [10-13].

Combinando todos estos datos, puede pensarse que el control del ciclo se ejerce primariamente en períodos de

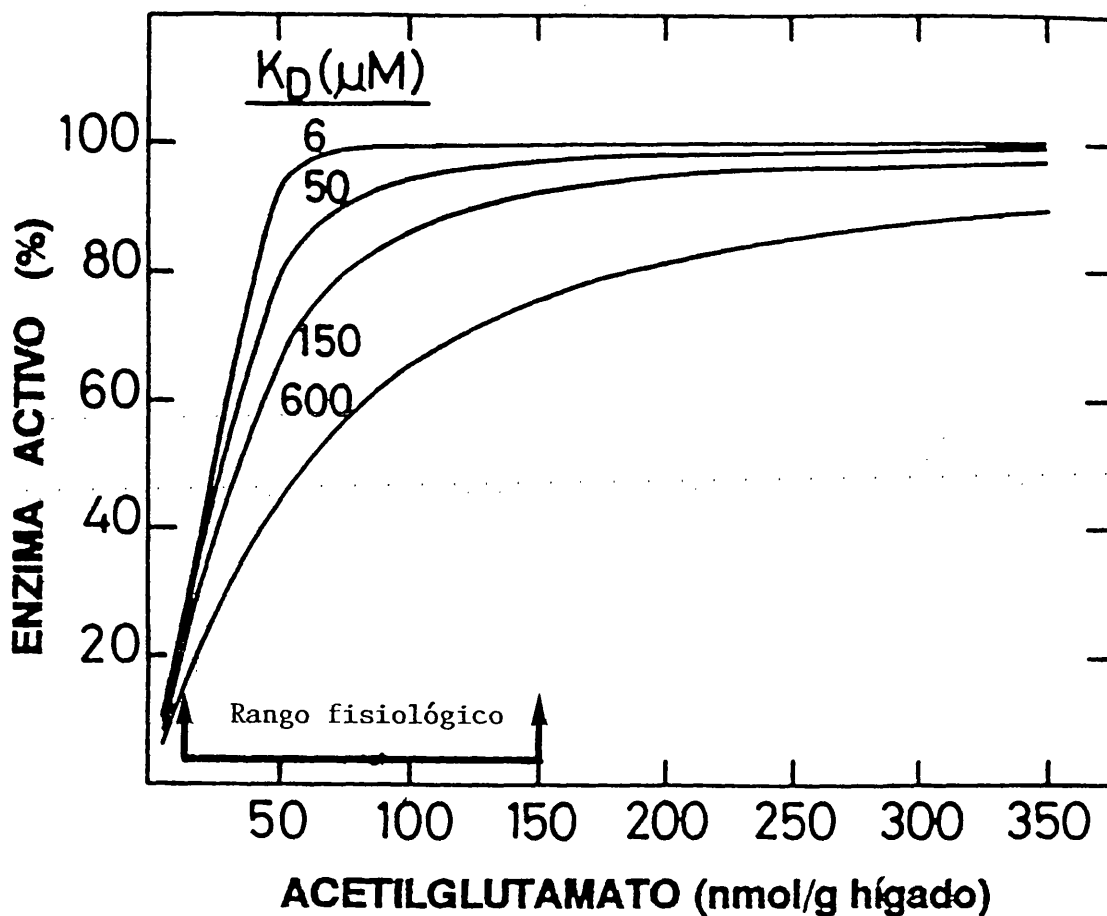


Figura 2.3. Estimación teórica de la fracción de carbamil fosfato sintetasa en la forma de complejo enzima-acetilglutamato. Calculada a partir de la reacción $E + AG \rightleftharpoons EAG$, para una concentración de enzima de 0.82 mM [7] y el rango de concentraciones indicadas de acetilglutamato (AG) total (libre + ligado) en la matriz mitocondrial. Se ha usado un valor de 0.06 ml para el volumen de agua en la matriz/g de hígado [6]). Se han utilizado para los cálculos varios valores de K_D (constante de disociación) dentro de límites razonables [3,4]. Se ha indicado entre 2 flechas el rango fisiológico de acetilglutamato [5].

escasa sobrecarga nitrogenada a nivel del primer paso, mediante dos mecanismos primordiales: el reducido aporte de sustrato, (el amonio) y el bajo nivel de acetilglutamato. Sin embargo, en los períodos absorptivos, de máxima sobrecarga nitrogenada, hay que esperar elevados niveles de acetilglutamato, y por tanto la quasi-saturación de la carbamil fosfato sintetasa por el activador [5,10,13]. Dado el K_m de este enzima para el amonio (aproximadamente 1 mM [13]) y los niveles de este metabolito en sangre portal (≈ 0.9 mM, [14]) también hay que esperar en esta fase que el enzima funcione al menos a la mitad de su V_{max} . Por tanto en estas condiciones hay que esperar que el paso limitante sea la síntesis de argininosuccinato, produciéndose, como consecuencia de la relación entre las actividades carbamil fosfato sintetasa y ornitina transcarbamilasa [2], la acumulación de citrulina.

Obscurece algo este cuadro relativamente simple la compartimentación del ciclo de la urea [15,16] y la insuficiente información existente sobre la velocidad de transporte de ornitina y citrulina dentro y fuera de la mitocondria, habiéndose planteado la posibilidad de que dicho transporte limite la velocidad de operación del ciclo [17,18]. Precisamente este trabajo de Tesis se ocupa de situaciones en que es posible que la utilización de carbamil fosfato por la ornitina transcarbamilasa limite la velocidad del ciclo, lo que puede implicar tanto un aporte de ornitina a la mitocondria inadecuado como a la reacción misma de la ornitina transcarbamilasa.

La ornitina transcarbamilasa (OTC) limita la velocidad del ciclo en los déficits congénitos de este enzima [19-21]. Como se verá en el último capítulo de esta memoria de Tesis, para una actividad residual OTC comparable a la de los enzimas menos abundantes del ciclo de la urea hay manifestaciones clínicas importantes de deficiencia. Estas manifestaciones incluyen, además de la hiperamoniemia y un bajo nivel de citrulina, la excreción de cantidades muy elevadas de ácido orótico. La figura 2.4 ilustra el mecanismo de esta aciduria orótica. La acumulación de carbamil fosfato intramitocondrial determina su salida de la mitocondria, siendo utilizado en el citosol en una síntesis de pirimidinas excesiva al haber cortocircuitado el paso limitante normalmente en esta síntesis, la síntesis de carbamil fosfato por la carbamil fosfato sintetasa II (CPS II). Esta CPS es citosólica y está presente en el hígado a un nivel unas 1000 veces menor al de la CPS mitocondrial [22,23]. En cualquier caso, la síntesis excesiva de pirimidinas a partir de carbamil fosfato mitocondrial es abortiva ya que resulta en la acumulación de orotato, que escapa a la orina, donde aparece a elevada concentración en estos déficits congénitos de ornitina transcarbamilasa [19-21].

Pero la excreción de orotato no sólo se da en casos en que la OTC se encuentra disminuida en alto grado por un déficit congénito. La alimentación con una dieta exenta de arginina, ornitina y citrulina [24-26], la administración de una sobrecarga de cualquier aminoácido distinto a los

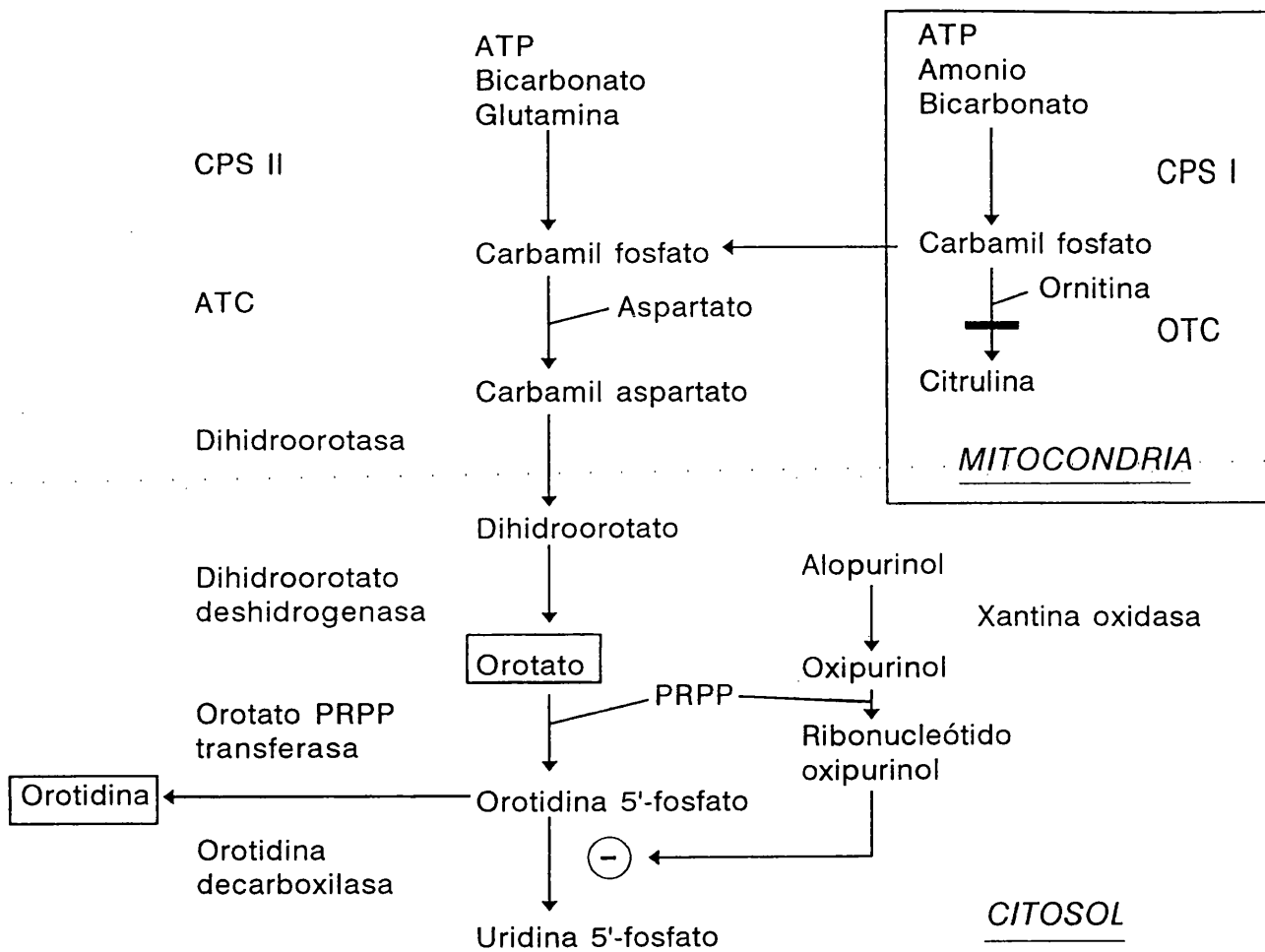


Figura 2.4. Mecanismo de la aciduria orótica cuando existe un déficit de ornitina transcarbamilasa. Se ilustra también el mecanismo de inhibición de la ruta de síntesis de pirimidinas por el alopurinol y sus metabolitos. CPS: carbamil fosfato sintetasa; ATC: aspartato transcarbamilasa; PRPP: fosfo-ribosil pirofosfato; OTC: ornitina transcarbamilasa. El signo menos incluido en un círculo indica inhibición. La línea horizontal en el paso catalizado por la OTC indica déficit de este enzima.

anteriores [1,27], o la hiperamonemia por administración de amonio o de ureasa [1,28-32] inducen aciduria orótica. El mecanismo de la aciduria orótica causada por la alimentación sin arginina, ornitina o citrulina puede entenderse en forma simplista suponiendo que, en el pico de sobrecarga nitrogenada postprandial, las demandas de ornitina para el funcionamiento del ciclo no pueden suplirse por la síntesis endógena de este aminoácido y que, como consecuencia, existe un déficit funcional de actividad OTC. Sin embargo, en experimentos previos de nuestro laboratorio, el nivel de la ornitina total hepática solo disminuyó a la mitad en estas condiciones, mientras que el nivel de carbamil fosfato aumentó entre 10 y más de 100 veces [24]. Por tanto hay que pensar que los niveles hepáticos de ornitina no reflejan el nivel de este aminoácido accesible a la ornitina trans-carbamilasa, lo que en último término puede implicar al proceso de transporte de ornitina a la mitocondria [17,18].

Aquí examinamos otra situación experimental que se acompaña de aciduria orótica, la inducida por la administración de una sobrecarga de un aminoácido, superpuesta a la ingestión de una dieta normoproteica, en que se utiliza una proteína de alto valor nutritivo (caseína), que contiene arginina (4.2% de los aminoácidos de la caseína, [33]). En esta situación los determinantes metabólicos de la aciduria orótica son, a primera vista, más complejos que en el caso de la supresión de la arginina de la dieta. Aunque la interpretación más sencilla es que la aciduria orótica debe estar causada por una desproporción entre el suministro de

nitrógeno a metabolizar y el de los aminoácidos reciclados en el ciclo de la urea (ornitina, citrulina, y arginina), las razones de esta desproporción pueden buscarse no solo en la estequiometría del ciclo como en las posibilidades de inhibición por otros aminoácidos de pasos del ciclo de la urea ulteriores a la síntesis de carbamil fosfato, incluyendo el transporte mitocondrial de ornitina-citrulina [34-38]. En última instancia también consideraremos aquí -y descartaremos- la posibilidad de que la aciduria orótica se deba a un aumento de la síntesis de carbamil fosfato citosólico por la CPS II, como consecuencia de un nivel más elevado de glutamina. Diferimos para apartados ulteriores la discusión de estas cuestiones, que tan sólo hemos enumerado aquí en forma sumaria.

En realidad existe un buen número de preguntas que quedan por responder en torno a la aciduria orótica inducida por aminoácidos y que nos planteamos -y cuando ha sido posible, respondemos- aquí:

1) ¿Es con toda seguridad la aciduria orótica el resultado de acumulación de carbamil fosfato mitocondrial?. Ya se ha mencionado antes la posibilidad de que fuera debida a una génesis aumentada de carbamil fosfato citosólico.

2) ¿Es el hígado el órgano responsable de la generación del orotato que se excreta?. Hay que recordar que la mucosa intestinal es el otro tejido con capacidad de síntesis de carbamil fosfato mitocondrial, utilizándose normalmente este

carbamil fosfato para la síntesis "de novo" de arginina, mediante la cooperación entre el intestino que exporta citrulina, y el riñón, que la importa, la convierte en arginina, y exporta la arginina [39].

Experimentos recientes de terapia génica en ratones con déficit congénito de OTC han planteado la posibilidad de que, en esta deficiencia, sea el intestino delgado el responsable de la producción del orotato [40]. Esta es una cuestión de abordaje difícil. A la postre, sin actividad OTC intestinal no hay síntesis "de novo" de arginina, y los experimentos en que se restringe el aporte de arginina demuestran la importancia del aporte de este aminoácido en la generación de de la aciduria orótica. La ausencia de síntesis intestinal de citrulina en realidad disminuye el aporte de arginina y podría resultar en una desproporción entre el aporte nitrogenado y la disponibilidad de arginina. Precisamente nuestros experimentos investigan la importancia de este tipo de desproporción y permiten concluir que el hígado produce la mayoría del orotato excretado.

3) ¿Cuál es la relación temporal entre la acumulación de carbamil fosfato y de orotato? ¿Existe una proporcionalidad directa entre los niveles de ambos compuestos?. Abordaremos aquí ambas cuestiones, mediante las determinaciones seriadas en el tiempo de ambos metabolitos en el hígado. Como se verá, nuestros resultados demuestran un curso temporal similar, y la saturación del proceso de síntesis de orotato a partir de ciertos niveles de carbamil fosfato.

4) ¿Qué importancia relativa tienen los cambios en la actividad CPS y en la actividad OTC "in situ" en la acumulación de carbamil fosfato?. Esta cuestión se investiga aquí mediante la determinación de amonio, acetilglutamato y ornitina hepáticos. Diferimos a más adelante la discusión de estas cuestiones.

5) ¿Pueden explicarse en forma sencilla los cambios en el nivel de acetilglutamato, el activador de la CPS al administrar la dosis del aminoácido?. Los niveles de acetilglutamato desempeñan un papel clave en el control del flujo a través del ciclo de la urea. Por ello es importante entender los determinantes metabólicos de sus cambios de nivel y ello se intenta, "in vivo", en nuestro trabajo.

6) ¿Cómo cambian los niveles de amonio y de aspartato tras la administración del aminoácido?. El aporte del nitrógeno a convertir en urea sucede como amonio y como aspartato. Los niveles de ambos compuestos son factores importantes que condicionan el flujo a través de dicho ciclo. Por ello hemos investigado los niveles de ambos compuestos, y nos hemos cuestionado experimentalmente, cuando ha sido factible, mecanismos de sus cambios de nivel.

7) ¿Causa la administración del aminoácido bloqueos en el ciclo de la urea y en qué punto y mediante qué mecanismo tienen lugar estos bloqueos, caso de producirse?. Se investiga esta cuestión estudiando los cambios en los niveles

de los diferentes compuestos intermedios del ciclo de la urea, a diferentes tiempos tras la administración del aminoácido.

Hay dos puntos adicionales que deseamos resaltar en esta introducción. Uno de ellos es la característica positiva de este trabajo de constituir un estudio "in vivo". La mayor parte de los estudios previos sobre el control del ciclo de la urea y sobre los determinantes metabólicos de la producción de ácido orótico se han realizado en preparaciones derivadas del hígado del animal objeto de estudio: cortes de tejido, células aisladas, homogeneizados u orgánulos aislados [6,13,41,42]. Estos estudios adolecen del problema de que es posible que en ellos el aporte de metabolitos difiera dramáticamente del que tiene lugar en el tejido del animal vivo. Los estudios realizados previamente sobre aciduria orótica en animales vivos, con la excepción del realizado previamente en este laboratorio [10,24], se han limitado en general, al análisis de los excretas y del plasma y al estudio del balance metabólico global del animal experimental. Sin embargo, nosotros investigamos las concentraciones de metabolitos presentes en el tejido en el momento mismo en que se interrumpe súbitamente la actividad metabólica del tejido mediante el procedimiento del criopinzado [43]. Esta estrategia no introduce más variables en el modelo experimental que aquellas objeto de estudio sistemático. Cuando de las observaciones realizadas por este procedimiento experimental se pueden derivar conclusiones incontrovertibles, estas conclusiones son aplicables

inmediatamente a la fisiología del animal experimental, sin requerir extrapolación o suposición alguna.

Sin embargo, estos estudios adolecen de la debilidad de no permitir investigar la compartimentación de los metabolitos estudiados. El hígado es un sistema complejo, constituido por hepatocitos y otros tipos de células (de Kupfer y endoteliales, fundamentalmente). Los hepatocitos difieren en sus propiedades dependiendo de su localización en el lobulillo hepático, siendo menos ureogénicos cuanto más se apartan de los vasos portales y se aproximan a la venula centrolobulillar, inmediatamente alrededor de la cuál los hepatocitos son incapaces de sintetizar urea y sintetizan activamente glutamina [15,16]. Las concentraciones de metabolitos determinadas aquí son necesariamente la media ponderada de los niveles en los diferentes compartimentos: diferentes tipos celulares y diferentes orgánulos subcelulares. No existe forma simple de cortocircuitar esta debilidad en estudios en animales vivos, mientras que en estudios con hepatocitos aislados sí existen procedimientos rápidos de separación, al menos, de citosol y mitocondrias. Aunque para órganos completos se describieron procedimientos de fraccionamiento en solventes orgánicos, tras la eliminación del agua, que supuestamente permitían la separación de diferentes orgánulos sin redistribución o pérdida de metabolitos, estos procedimientos son engorrosos y su validez no se ha demostrado concluyentemente [44]. Una alternativa es en ocasiones la resonancia magnética nuclear [45]. Cuando el metabolito a estudiar posee grupos ionizables

en diferente estado de ionización dependiendo de su localización en la célula -es decir, dependiendo del pH del compartimento en que se encuentre- es posible determinar la concentración del metabolito en cada compartimento por resonancia magnética, si el metabolito está presente a una concentración lo bastante elevada y es identificable mediante NMR. No hemos utilizado esta técnica aquí por no disponer de medios adecuados para abordarla, y también por dificultades intrínsecas derivadas de la concentración de la mayoría de los metabolitos estudiados. Aún así, las concentraciones de carbamil fosfato observadas aquí deben poder detectarse directamente mediante NMR, y esta técnica debe permitir establecer qué fracción de carbamil fosfato está en la mitocondria y cuál es citosólica.

Como se verá, aún sin datos sobre compartimentación, nuestros resultados permiten formarse una idea seguramente bastante certera sobre los mecanismos subyacentes a la aciduria orótica inducida por aminoácidos.

2.2 MATERIALES

2.2.1 Productos químicos

Acido orótico, glicina, L-alanina, L-ornitina y carbamil fosfato (sal dilítica) se obtuvieron de Sigma. La resina de intercambio catiónico AG 50W-X8 (forma H⁺) y la de intercambio aniónico AG 1-X8 (forma acetato), ambas de tamaño de malla 200-400, se obtuvieron de Bio Rad. El agua desionizada se preparó mediante un sistema Milli-Q (Millipore) y su resistividad fue siempre superior a 10 megaohmios (cerca de 18 generalmente). Las soluciones empleadas para cromatografía líquida de alta eficacia fueron filtradas a través de membranas Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro, mediante succión por trompa de agua, y fueron degaseadas posteriormente a baja presión.

$\text{Na}_2^{14}\text{CO}_2$ (55 Ci/mol) y L-[carbamil-¹⁴C]citrulina (55 Ci/mol) se obtuvieron de Amersham y L-[2,3-³H]ornitina (55 Ci/mmol) de New England Nuclear. Antes de usar la ornitina se purificó usando una columna de intercambio catiónico AG 50W X 8 de 0.1 ml preparada en una jeringuilla de insulina. Tras aplicar la ornitina a la columna, se lavó la columna sucesivamente con 0.2 ml de HCl 10 mM, 2 ml de piridina al 10% y 0.2 ml de HCl 1.5 M y se eluyó la ornitina con 0.2 ml de HCl 6 M. Este eluido se secó bajo vacío sobre pentóxido de fósforo y NaOH y se redisolvió en 0.2 ml de HCl 10 mM, conservándose a 4°C hasta su uso (<1 mes). El [¹⁴C]carbamil fosfato (55 Ci/mol), preparado con carbamil fosfato sintetasa

a partir de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (55 Ci/mol), fue suministrado por el Dr. Vicente Rubio [24].

La carbamil fosfato sintetasa de hígado de rata (actividad específica 30 μmoles de carbamil fosfato/mg proteína en 15 min a 37°C), purificada como se describe previamente [46], se encuentra disponible normalmente en nuestro laboratorio. La ornitina transcarbamilasa (Streptococcus faecalis) y la glutaminasa (Escherichia coli, grado V, liofilizada) se obtuvieron de Sigma. La arginasa (de hígado de buey), la aminoacilasa I (de riñón de cerdo; suspensión en sulfato amónico), la glutámico deshidrogenasa (de hígado de buey), la malato deshidrogenasa (de corazón de cerdo) y la glutámico oxalacético transaminasa (de corazón de cerdo, suspensión en sulfato amónico) se obtuvieron de Boehringer Mannheim. La arginasa fue disuelta a una concentración de 3 mg/ml en tampón maleato 10 mM (ajustado a pH 7.5 con KOH) y dializada durante 3 h (diálisis más exhaustivas pueden llevar a la inactivación de la enzima a causa de la depleción de Mn^{++}) en el mismo tampón [2]. La solución resultante fue congelada a -20°C hasta su uso. La glutaminasa fue disuelta (1 mg/ml) en tampón acetato sódico 50 mM pH 5.0 y fue congelada a -20°C hasta su uso.

2.2.2 Aparatos

Se utilizó una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B con rotor SS-34; centrífugas clínicas modelos IEC o Selecta; y microcentrífuga Eppendorf modelo 5412. El homogeneizador

utilizado fue un Potter-Elvehjem con émbolos de teflón de diferentes tamaños. Se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Varian Cary y un espectrofotómetro convencional Pye-Unicam SP6-300. El sistema cromatográfico utilizado (Millipore-Waters) estuvo constituido por dos bombas de alta presión (510) conectadas a una estación de control programable ("Programmable System Controller"), un inyector manual (U6K), una columna de fase reversa (Resolve 5 μ m Spherical C₁₈ de dimensiones 3.9 x 150 mm), un detector de fluorescencia (420-AC) provisto de filtros para excitación y emisión de 338 e 425 nm y un registrador (Servogor 210). Se utilizó un contador de centelleo líquido LKB 1211-Rackbeta.

2.2.3 Animales

Se utilizaron normalmente ratas albinas macho, tipo Sprague-Dawley, de 125-150 g obtenidas de Interfauna Ibérica (Barcelona). Normalmente se utilizaron jaulas de polietileno con enrejado superior de acero inoxidable. Cuando se restringió el tiempo de acceso al alimento, se utilizó una rejilla elevada de acero inoxidable en el suelo de la jaula para evitar la coprofagia o el reciclado de residuos alimenticios. Cuando se determinó la excreción urinaria de metabolitos, se usaron jaulas metabólicas de policarbonato para ratas de hasta 300 g (modelo 1700, Tecniplast Gazzada, Buguggiate, Italia).

2.2.4 Dietas

La dieta de mantenimiento fue la usual para roedores de laboratorio (14.5% de proteína) (Labsure RMM; de Biosure S.A., Barcelona). La dieta experimental fue la descrita por Hatchwell y Milner [1], modificada de modo que la glucosa se reemplazó por azúcar de mesa. La dieta está constituida por un gel de agar en el que se han incluido los nutrientes. La composición fue la siguiente (g/Kg de gel):

-Caseina (Sigma)	75.0
-Dextrina-maltosa (2:1)(L.A.I.S.A.; Barcelona)	241.5
-Azúcar de mesa	127.0
-Aceite de maiz	25.0
-Metionina (Sigma)	1.5
-Mezcla de minerales de Hegsted (ICN)	25.0
-Mezcla de vitaminas (ICN)	5.0
-Agar (Sigma)	15.0
-Agua	485.0

La dieta se preparó mezclando bien todos los componentes, salvo el agar, y luego dispersando homogéneamente la mezcla en un peso igual de solución de agar al 3%, a temperatura suficiente para garantizar su fusión. La dieta se suministró como cubos de gel de unos 2 cm de arista y se mantuvo a 4°C en oscuridad, en recipientes herméticos, hasta su uso (siempre menos de una semana).

2.3 METODOS

2.3.1 Tratamiento de los animales

Los animales se mantuvieron a 22-24°C con ciclos de luz y oscuridad alternantes de 12 horas de duración. Al recibir los animales, se les suministró "ad libitum" durante 1 a 3 días comida de mantenimiento y luego se siguió la pauta alimenticia descrita por Hatchwell y Milner [1,27], consistente en períodos de ayuno de 22 h seguidos de alimentación con la dieta experimental durante 2 h/día (de 10 a 12 h) para el número de días indicados. El agua se suministró "ad libitum".

Transcurridos los días deseados se administró a las ratas mediante inyección intraperitoneal, a distintos tiempos después de retirar la comida, 3 ml de tampón fosfato sódico 0.15 M, pH 7.4, conteniendo o no las cantidades indicadas de glicina, alanina, ornitina etc. Después de la inyección los animales usados para determinación de metabolitos urinarios se colocaron en jaulas metabólicas y se recogió la orina sobre ácido sulfúrico 10 N (25 μ l), generalmente durante las 5 h que siguieron a la inyección, ya que demostramos que durante este período se excreta más del 90% del orotato (Fig. 2.5).

Para la determinación de los metabolitos hepáticos, a los tiempos indicados tras la inyección, se anestesió a las ratas ligeramente con éter durante 1-2 minutos, se practicó una

incisión abdominal y se obtuvo rápidamente aproximadamente 1 g de tejido del lóbulo hepático izquierdo, mediante la técnica del criopinzado [43] entre bloques de aluminio preenfriados en nitrógeno líquido.

2.3.2 Obtención del extracto hepático

Excepto cuando se indique, todos los pasos se realizaron a 0-4°C en la cámara fría y todos los accesorios (homogenizadores de Potter-Elvehjem, centrífuga, rotor, puntas de pipetas, tubos, etc.) fueron preenfriados a 0-4°C. Las muestras de hígado se pulverizaron bajo nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. Tras dejar evaporar el nitrógeno se taró el tubo de homogenización, se le añadió el polvo, se volvió a pesar rápidamente y se le añadieron 2 ml de ácido perclórico 0.3 M por cada gramo de polvo, homogeneizando inmediatamente la muestra, sumergida en un baño de hielo fundente, mediante varios ascensos y descensos del émbolo de teflón. Se dejó reposar 10 min el homogeneizado en hielo y se centrifugó en una centrífuga Sorvall (rotor SS-34) durante 10 min a 10000 rpm (12000 g). Se utilizó el precipitado para determinar proteína (previa disolución en NaOH 0.2 N a 37°C) y el sobrenadante se usó para determinación de metabolitos. Una muestra de 0.6 ml se usó inmediatamente para determinar amonio, acetil CoA, ATP y carbamil fosfato, y el resto se neutralizó con una mezcla 3:1 de 0.2 M KOH-KHCO₃. Después de eliminar mediante centrifugación el precipitado formado de KClO₄, una muestra del sobrenadante se usó inmediatamente para la separación cromatográfica de argininossuccinato, y el

resto se congeló a -70°C hasta el momento de la determinación de otros metabolitos.

2.3.3 Determinación de carbamil fosfato

El carbamil fosfato se determinó como citrulina [47] tras su conversión en este metabolito usando ornitina transcarbamilasa:



Como normalmente la cantidad de ornitina en el extracto es muy superior a la de carbamil fosfato [13], se utiliza la ornitina endógena como sustrato de la transcarbamilasa suplementando con ornitina exógena cuando fue necesario. Para detectar la citrulina formada, se añade una traza de ornitina radiactiva antes de añadir la ornitina transcarbamilasa, y, al terminar la reacción, se separa la ornitina de la citrulina, determinando la radiactividad en ésta última. La cantidad de citrulina formada se estima por interpolación en una recta patrón construida añadiendo cantidades variables de carbamil fosfato al extracto deplecionado de carbamil fosfato endógeno mediante calentamiento previo.

Todas las operaciones, excepto las incubaciones, se realizaron en la cámara fría, con los tubos sumergidos en hielo fundente y utilizando material preenfriado a 4°C . Se utilizaron tubos eppendorf de 1.5 ml. Se tomaron tres alícuotas del sobrenadante ácido. Una (blanco) se calentó 1



min a 100°C, para destruir el carbamil fosfato, enfriándose a 0°C inmediatamente. A otra (patrón interno) se le añadió una cantidad conocida de carbamil fosfato en 5 µl. La tercera (problema) se dejó intacta. Se neutralizaron con una mezcla 3:1 de 0.2 M KOH y 0.2 M CO₃HK, y, tras dejar reposar 10 min, se eliminó el perclorato precipitado mediante centrifugación (2 min). La muestra hervida se distribuyó en alícuotas de 25 µl y se añadieron a al menos 3 de ellas cantidades conocidas de carbamil fosfato. Tanto de la muestra problema como del patrón interno se tomaron también alícuotas de 25 µl. Se igualó el volumen a 35 µl mediante la adición de agua, y, tras añadir 15 µl de una solución que contenía [¹⁴C]-ornitina (165000 dpm, 0.35 nmoles), ornitina transcarbamilasa (7 U; 1 U es la cantidad de enzima que sintetiza 1 µmol de citrulina/min a 37°C y pH 8.5), Cl₂Mg 330 mM y tampón tri-etanolamina-HCl 225 mM, pH 7.7, se incubaron los tubos 30 min a 37°C.

Se terminó la reacción mediante adición de 5 µl de una solución de 4.5 mM ornitina y 4.5 mM citrulina en ácido perclórico 2.72 M, separándose ornitina y citrulina mediante aplicación a columnas de AG 50W-X8 de 0.1 ml, preparadas en jeringuillas de insulina. Tras lavar la columna con 2 x 0.1 ml de 0.01 M HCl, se eluyó la citrulina, libre de ornitina, con 1.5 ml de piridina al 10%, determinándose la radiactividad en el efluente. La recuperación fue siempre superior al 80%. Se corrigieron los valores experimentales para la recuperación, estimada en cada muestra a partir del patrón interno.

2.3.4 Determinación de acetilglutamato

Se determinó como glutamato por HPLC tras deacilación con aminoacilasa I [48]. Una muestra de 0.5 ml de extracto hepático neutralizado se acidificó con HCl 1 M hasta pH 3-4, se añadió una traza de [¹⁴C]acetilglutamato (para estimar la recuperación y el grado de deacilación; ver Métodos de la Sección 3 para detalles sobre la síntesis del acetilglutamato marcado) y se aplicó a una columna de AG 50W-X8 (200-400 de tamaño de malla, forma H⁺) de 0.2 ml preparada en una jeringuilla de tuberculina, eluyéndose el acetilglutamato con 0.4 ml de HCl 10 mM. Esta columna retiene el glutamato y deja pasar el acetilglutamato. El eluido se neutralizó con KOH 1 M y se mezcló con 0.4 ml de tampón citrato-fosfato sódico 0.1 M pH 5.62. Esta mezcla se dividió en dos partes iguales; a una de ellas se le añadieron 25 µl de aminoacilasa (10 mg/ml; desalada en tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7.4 mediante gel-filtración centrífuga [49] para eliminar trazas de glutamato y sulfato amónico) y se incubó 1 h a 37°C. Al otro tubo (blanco) no se le añade nada y se mantiene durante ese tiempo a 0°C. Transcurrido ese tiempo, se añadió 1/10 del volumen de la mezcla de HClO₄ concentrado y se añadió luego al blanco la aminoacilasa. Tras 10 min se llevó la solución a pH 3-4 mediante neutralización parcial con KOH 10 N y después de 10 min se centrifugó la suspensión para eliminar proteína precipitada y KClO₄. El sobrenadante se aplicó a una nueva columna de AG 50W-X8 de 0.1 ml. Tras lavar la columna en sucesión con 0.2 ml de H₂O y de HCl 10 mM, se eluyó el

glutamato procedente de la deacilación del acetilglutamato con 1 ml de piridina al 10%. Tras evaporar la solución de piridina (rotavapor) se determinó el glutamato en el residuo mediante HPLC, utilizando orto-ftaldialdehído (OPA) y separación en una columna de fase reversa (resolva C18) [48]. Los resultados se corrigieron para la recuperación de [¹⁴C]acetilglutamato como glutamato, estimada a partir de la radiactividad en el residuo usado para análisis por HPLC. Dicha recuperación siempre fue superior al 80%.

2.3.5 Determinación de ornitina y arginina

El ensayo para la determinación de ornitina se basa en su conversión en [¹⁴C-carbamil]citrulina mediante su reacción con [¹⁴C]carbamil fosfato, catalizada por la ornitina transcarbamilasa [10,24]:



La reacción se lleva a cabo en una campana de gases con extracción. Muestras de 20 μl del extracto hepático neutralizado se incubaron a 37°C con 30 μl de tampón trietanolamina 0.2 M, pH 7.7, conteniendo 0.6 unidades de ornitina transcarbamilasa y 1.5 nmol de [¹⁴C]carbamil fosfato (6000 cpm/nmol). Tras 15 min de incubación, la mezcla se acidificó con 0.5 ml de HClO₄ 0.5 M que contenía citrulina (0.5 mM), se calentó durante 60 min a 100°C (para la destrucción del [¹⁴C]carbamil fosfato y transformarlo en ¹⁴CO₂, que se volatiliza), y se determinó la radiactividad no

volátil, correspondiente a la citrulina generada a partir de ornitina. La arginina se determinó por diferencia en ensayos paralelos con y sin 3 μg de arginasa. Cantidades conocidas de ornitina o arginina, añadidas a agua o a extractos de tejido, dieron resultados idénticos en ambos casos, tras la sustracción del contenido endógeno del extracto hepático. Los resultados fueron lineales hasta más de 10 nmol de ornitina o arginina. El grado de conversión de la ornitina endógena del tejido en citrulina (estimado a partir de patrones internos) fue siempre superior al 81% (en promedio, del 95%).

2.3.6 Determinación de citrulina

Para la determinación de citrulina, 0.1 ml del extracto hepático neutralizado se mezcló con una traza de [^{14}C]-citrulina para estimar la recuperación, y se aplicó a una columna de AG 50W-X8 (tamaño de malla 200-400, forma H^+) preparada en una jeringuilla de tuberculina y, después de lavar con 5 ml de HCl 1 N (para eluir la urea y otros compuestos que son cromogénicos en este ensayo), la citrulina se eluyó con 0.75 ml de HCl 6 N. Después de tomar 25 μl para determinar la recuperación de la citrulina radiactiva (siempre >85%), el resto del eluido se mezcló con 0.25 ml de solución A (3.7 g de antipirina, 2.5 g de sulfato férrico-amónico, 250 ml de H_2SO_4 concentrado, 250 ml de H_3PO_4 concentrado y H_2O hasta 1 litro), y con 0.25 ml de solución B (diacetilmonoxima 0.4%, NaCl 7.5%). Tras agitar la mezcla, se incubó 15 min a 100°C , se enfriaron los tubos en agua, y se determinó la absorbancia a 464 nm. A partir de la incubación,

todos los pasos se realizaron en la oscuridad [2].

2.3.7 Determinación de argininosuccinato

El argininosuccinato se determinó por HPLC (fase reversa, tras derivatización con OPA [50]) después de purificarlo parcialmente [51] mediante la aplicación del extracto hepático neutralizado a una columna de intercambio aniónico de 1 ml (0.5 x 5 cm, Econo-column, de Bio-Rad) de AG 1-X8, tamaño de malla 200-400, forma acetato. Tras la aplicación de la muestra, la columna se lavó con 6 volúmenes de ácido acético 0.05 N y el argininosuccinato se eluyó con 3 volúmenes de ácido acético 0.1 N sobre tubos de ensayo en un baño de hielo fundente. La recuperación fue estimada con standards internos (0.02-2 $\mu\text{mol/g}$ hígado; añadidos al extracto hepático neutralizado) y siempre excedió del 70%.

2.3.8 Determinación de orotato

Se determinó colorimétricamente según el método de Stajner y cols. [52]. El método se basa en la adición de bromo al doble enlace del anillo del orotato. A 0.25 ml de orina neutralizada y convenientemente diluida (rango de dilución desde 1:2 a 1:45) o a 25-225 μl del sobrenadante hepático neutralizado, se le añade 1 ml de tampón citrato sódico 0.4 M pH 2.5. A continuación se le añade, a temperatura ambiente, 0.25 ml de agua saturada de bromo, se agita la solución y, tras un período de tiempo entre 0.5 y 5 min, se reduce el exceso de bromo con 0.5 ml de ácido

L-ascórbico al 5% y se incuban los tubos 5 min a 40°C. Tras añadir 1 ml de una solución al 2.5% de p-dimetilaminobenzaldehído en 1-propanol, con agitación vigorosa, se continua la incubación a 40°C durante 10 min y luego se extrae el producto coloreado mediante la agitación (15 s) con 2 ml de n-butyl acetato, seguida de centrifugación (centrífuga clínica, 5 min) para separar las fases. Se determina el color de la fase superior (solvente) a 458 nm, restando el color obtenido en muestras idénticas en que se omitió la brominación mediante reemplazamiento del agua de bromo por agua destilada. Los resultados se compararon con los obtenidos con patrones de orotato. Se analizaron en paralelo en todos los casos muestras duplicadas conteniendo un patrón interno de orotato, obteniéndose una recuperación de 90-110%.

2.3.9 Otras determinaciones

El glutamato se determinó espectrofotométricamente usando glutámico deshidrogenasa [53] y, en la misma muestra, la glutamina se estimó por diferencia tras incubar la muestra con glutaminasa [53].

Para la determinación de amonio, se añadió a 100 µl del extracto 300 µl de ácido tricloroacético al 10% y 240 µl de KHCO_3 2 M ambos a 0°C, se centrifugó la muestra a 4°C, y el sobrenadante neutralizado así se guardó a -70°C hasta su uso. El amonio se determinó espectrofotométricamente usando glutámico deshidrogenasa [54].

El aspartato se determinó espectrofotométricamente a 340 nm usando glutámico oxalacético transaminasa y malato deshidrogenasa [55].

El acetil-CoA se determinó radiométricamente [56]. Para ello, 100 μ l del extracto ácido se neutralizaron con 300 μ l de una solución de tampón fosfato 10 mM, KOH 25 mM pH 7.0, y se congelaron a -70°C hasta su determinación. El fundamento del método consiste en la condensación aldólica del acetil CoA del extracto hepático con $[4-^{14}\text{C}]$ oxalacetato (preparado por nosotros a partir de α -cetoglutarato y L- $[4-^{14}\text{C}]$ aspartato usando aspartato transaminasa), catalizada por la citrato sintetasa. El nivel de acetil CoA se estimó como la radiactividad que queda (en forma de citrato) tras la eliminación del exceso de $[4-^{14}\text{C}]$ oxalacetato mediante calentamiento a 100°C de los tubos de reacción en una campana de gases.

Para la determinación de ATP, a 100 μ l del extracto ácido se le añadieron 400 μ l de tampón Hepes-K 0.5 M, pH 7.6 y se congeló a -70°C hasta su uso. La determinación se realizó mediante luminometría (luminómetro de LKB) usando el kit comercial (Test-Combination, ATP bioluminiscense CLS 567736, de Boehringer Mannheim).

La creatinina se determinó mediante el método clásico de Jaffé [57,58] usando un test comercial (Test-Combination 124192, de Boehringer Mannheim).

La urea se determinó tras su hidrólisis con ureasa y medida de amonio generado mediante el procedimiento de Berthelot [59] usando un test comercial (Test-Combination 124770, de Boehringer Mannheim).

La proteína se determinó por el método de Lowry [60] usando seroalbúmina bovina como standard.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSION

2.4.1 Inducción de aciduria orótica

La figura 2.5 demuestra que la administración del aminoácido glicina tras la ingesta de una única comida de 2 horas de duración induce aciduria orótica en la rata. La excreción de ácido orótico es de breve duración, ya que sucede predominantemente en las 5 horas siguientes a la administración de la glicina, reduciéndose mucho a partir de este periodo. Por tanto, los determinantes metabólicos de dicha excreción tienen una corta vida. Excepto para la dosis más elevada de glicina, la excreción de orotato fué mucho mayor cuando la glicina se administró a las dos horas tras acabar la ingesta que cuando se administró inmediatamente tras la ingesta. La excreción fué mínima para 0.5 mmoles de glicina, y aumentó con la dosis hasta 3 mmol de glicina, no creciendo e incluso disminuyendo para dosis superiores. Nuestros resultados reproducen, por tanto, y son cuantitativamente similares a los de Hatchwell y Milner [1,27], quienes describieron por primera vez la aciduria orótica inducida por aminoácidos. En los experimentos que siguen siempre se administró el aminoácido 2 horas tras la terminación de la ingesta y se recogió la orina durante 5 horas tras la inyección conteniendo el aminoácido.

La figura 2.6 demuestra que, de acuerdo con los resultados de Hatchwell y Milner [1,27], la administración de alanina también induce aciduria orótica. En los controles en

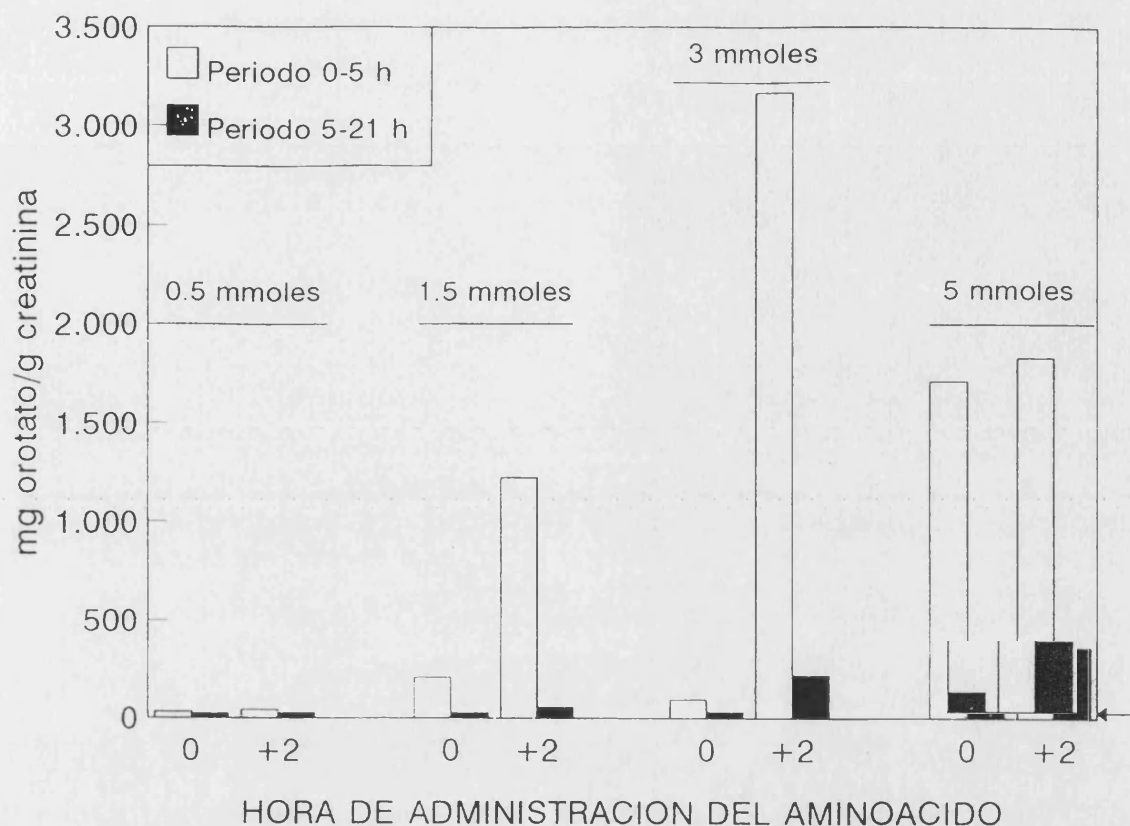


Figura 2.5. Influencia de la dosis de glicina, del intervalo entre la ingesta y la administración de glicina y del período de recogida de orina sobre la excreción de orotato. Grupos de ratas de 125-150 g se alimentaron 2 h/día durante 5 días con dieta en gel (ver Material y Métodos). El 5º día, al final del período de comida o 2 horas después, se administró a grupos de 2 ratas (colocadas en la misma jaula metabólica) la dosis indicada de glicina por rata y se recogió la orina durante las 5 horas siguientes (barras vacías) y durante el período 5-21 horas desde la administración de glicina (barras llenas). La flecha externa indica la excreción de orotato de ratas tratadas igualmente pero a las que no se administró glicina.

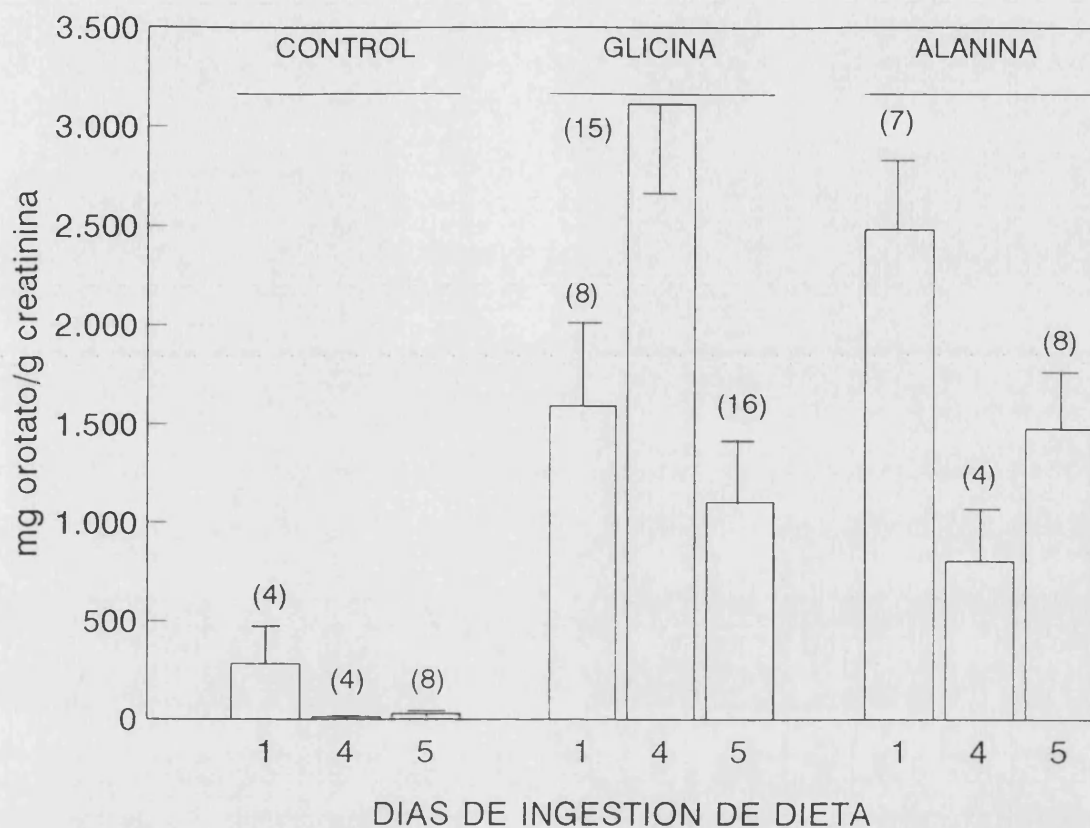


Figura 2.6. Influencia del número de días de ingestión de la dieta sobre la excreción de orotato tras la administración de 3 μ moles de glicina o alanina a las 2 horas tras la terminación de la ingesta. Los resultados se expresan como media \pm error standard. Entre paréntesis se indica el número de animales usados.

que se administró sólo vehículo (tampón fosfato) se observó una excreción pequeña pero sustancial de orotato en el primer día de ingestión de la dieta y excreciones muy bajas de orotato a los 4 y 5 días de alimentación durante 2 h/día. La excreción de orotato fué considerablemente mayor tras la administración de glicina o alanina, observándose la excreción más elevada tras la administración de glicina a los 4 días de ingestión de dieta. En experimentos ulteriores se utiliza siempre la administración del aminoácido en el 4º día de ingestión de dieta.

2.4.2 Orotato y carbamil fosfato hepáticos

La figura 2.7 demuestra que tras la administración de glicina o de alanina se acumula orotato en el hígado. La acumulación fué rápida, alcanzó un máximo de unos 200 nmol/g de hígado al cabo de una hora tras la administración de cualquiera de ambos aminoácidos, encontrándose en franca disminución o habiéndose alcanzado los valores basales a las 2 horas, siendo el descenso más lento para la glicina.

La figura 2.7 ilustra también los cambios en el nivel de carbamil fosfato hepático. Cuando no se administró el aminoácido el carbamil fosfato sólo alcanzó un nivel de 4.2 nmol/g a los 60 min del comienzo del experimento, seguramente coincidiendo con la máxima sobrecarga nitrogenada post-ingesta. Sin embargo, con la administración de glicina o alanina se produjeron aumentos muy importantes en el nivel de carbamil fosfato, con una curva temporal similar aunque algo

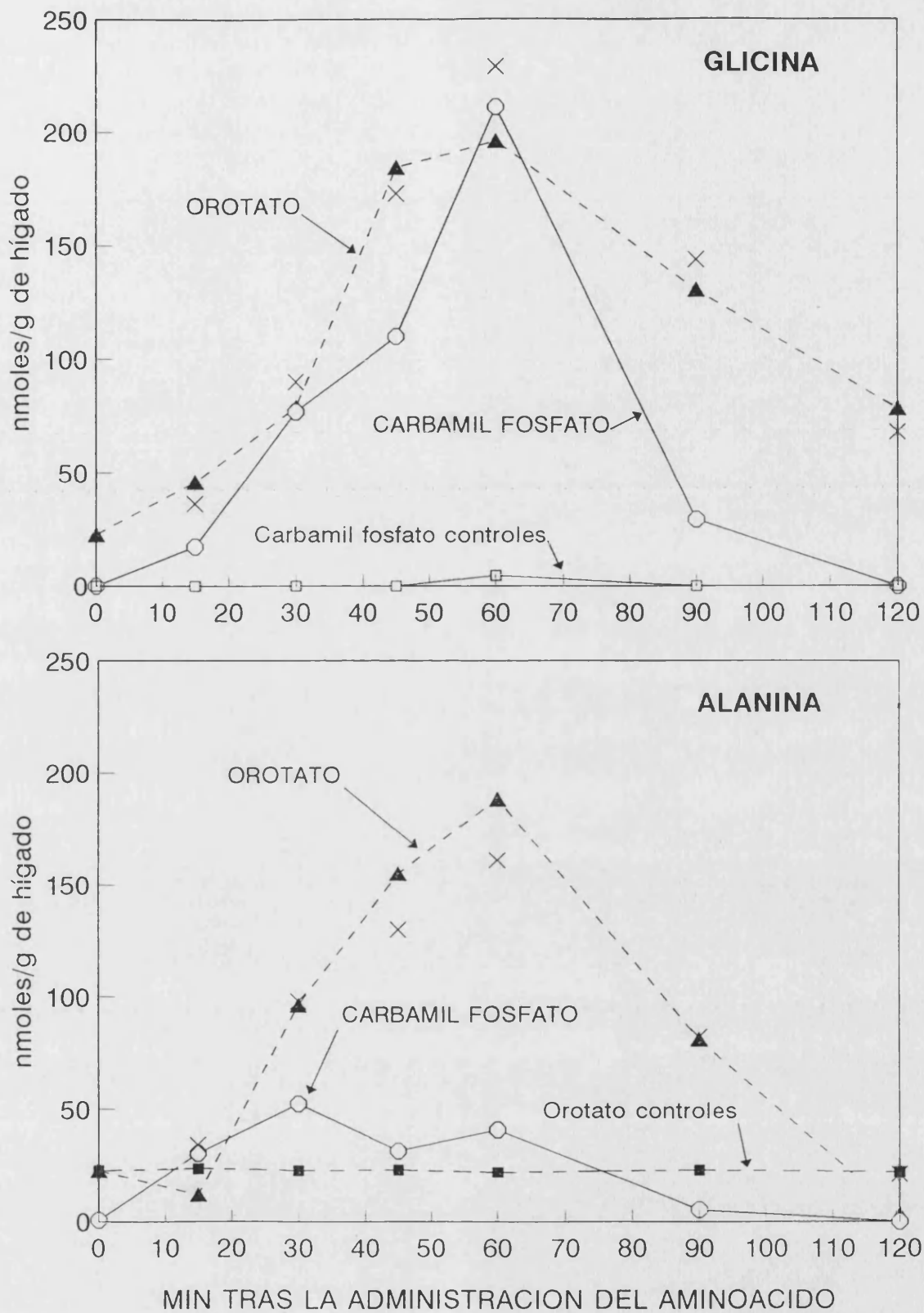


Figura 2.7. Niveles de orotato y de carbamil fosfato hepáticos a distintos tiempos tras la administración postprandial de glicina o alanina. Ratas de unos 150 g, alimentadas 2 h/día (de 10 a 12 h) durante 4 días con la dieta conteniendo 15% de caseína en gel (ver Materiales y Métodos) recibieron el cuarto día, a las 2 h tras la retirada del alimento, por vía intraperitoneal, 3 ml de tampón fosfato Na 0.15 M pH 7.4 solo (controles, □, ■), o conteniendo 3 μ moles/rata de glicina o de alanina. A los tiempos indicados desde la administración intraperitoneal se sacrificaron grupos de tres ratas bajo anestesia etérea ligera, obteniéndose muestras de tejido hepático mediante criopinzado. Se mezclaron las muestras de los tres animales, de modo que cada punto experimental en realidad representa la media de tres hígados. ▲, ■, niveles de orotato. ○, □, niveles de carbamil fosfato. X, niveles de orotato calculados a partir del nivel de carbamil fosfato tal como se describe en el texto.

adelantada con respecto a los cambios en los niveles de orotato, como hay que esperar si el orotato deriva del carbamil fosfato. Los niveles máximos se alcanzaron para la glicina a los 60 min y fueron de la misma magnitud que el nivel máximo de orotato, mientras que para la alanina el nivel máximo de carbamil fosfato fué unas cuatro veces menor, distinguiéndose en este caso dos máximos, uno a los 30 minutos y el segundo a los 60 min. Para la glicina se observa un hombro a los 30 min, muy inferior al máximo observado a los 60 min. Además, para la alanina, el nivel de carbamil fosfato retornó prácticamente al nivel inicial a los 90 min desde la administración del aminoácido, mientras que con la glicina el nivel estaba elevado todavía a los 90 min.

Aceptando que el orotato proviene del carbamil fosfato acumulado, la disminución en el nivel de orotato hepático entre los 90 y 120 min tras la administración de alanina, cuando hay muy poco carbamil fosfato, hace posible estimar una $t_{1/2}$ para la desaparición del orotato de unos 10 min, que corresponde a una constante de velocidad de pseudoprimer orden para dicha desaparición, k' , de 0.069 min^{-1} .

Si se hace la simplificación de considerar que la concentración de orotato hepático es constante para cada intervalo entre dos determinaciones, valiendo el promedio de ellas, puede estimarse groseramente el orotato formado y decaído en cada intervalo, mediante la ecuación (1):

Orotato formado y decaído = $k' \times t \times [\text{Orotato}] \times \text{peso hígado}$
(1)

(donde t es tiempo en min, k' es 0.069 min^{-1} , y peso hígado es 12 g/rata). Sumando las estimaciones para todos los intervalos en el periodo estudiado de 2 horas, hemos estimado una producción hepática de orotato inducida por la administración del aminoácido, por rata, de 1.9 mg para la glicina y de 1.1 mg para la alanina. Estas estimaciones coinciden con la observación de que la excreción de orotato fue mayor para la glicina que para la alanina (Fig. 2.6, día 4). Las estimaciones son del mismo orden de magnitud que las cantidades de orotato excretadas durante las 5 horas tras la administración del aminoácido, calculadas, a partir de los resultados de la figura 2.6, en 1.9 mg para la glicina y 0.5 mg para la alanina. Ello apoya la idea de que el hígado produce el orotato excretado tras la administración del aminoácido.

En cuanto a la relación entre las acumulaciones hepáticas de orotato y de carbamil fosfato, hemos usado la ecuación (2) para estimar los niveles esperables de orotato:

$$d[\text{Orotato}]/dt = [\text{CP}] \times k - [\text{Orotato}] \times k' \quad (2)$$

$[\text{CP}]$ representa el nivel de carbamil fosfato y k' es la constante de primer orden para la desaparición del orotato, calculada anteriormente (0.069 min^{-1}). Esta ecuación supone que el orotato deriva del carbamil fosfato con una cinética

de pseudoprimer orden, siendo k la constante de velocidad. Ello es solo cierto cuando la síntesis de orotato está lejos de estar saturada por el carbamil fosfato. A partir de los cambios en las concentraciones de carbamil fosfato y orotato entre los minutos 15 y 30 tras la administración de alanina hemos estimado un valor para k de 0.233 min^{-1} . Utilizando este valor y las concentraciones de orotato y carbamil fosfato estimadas por interpolación en la figura 2.7 para la alanina, para tiempos correspondientes a 5 min antes de cada punto experimental (es decir, a 10, 25, 40, 55, 85 y 115 min) se han estimado los valores esperados de orotato 5 min después (aspa en la figura 2.7, ALANINA). Para la administración de alanina existe un acuerdo razonable entre las predicciones y los valores experimentales, lo que apoya la validez de la ecuación (2). A 45 y 60 min la predicción es inferior al resultado experimental, lo que sugiere que el valor de k utilizado para estos tiempos es inferior al real. De hecho, se obtiene un ajuste perfecto para todos los puntos si se supone que k vale 0.10 min^{-1} para el intervalo 0-15 min, 0.233 para 15-30 min, 0.3 para 30-45 min, 0.39 para 45-60 min, 0.25 para 60-90 min y 0.13 para 90-120 min. Los cambios en el valor de k indican que la eficacia de la conversión del carbamil fosfato en orotato varía con el tiempo, siendo máxima hacia los tiempos centrales del experimento, cuando las concentraciones de carbamil fosfato son más altas. Ello es lo contrario de lo que habría que esperar si la síntesis de orotato se hubiera saturado por concentraciones elevadas de carbamil fosfato. El aumento de k se debe muy probablemente a un aumento en la eficacia de la

reacción de la aspartato transcarbamilasa, quizá como consecuencia del aumento en los niveles de aspartato observados en los tiempos centrales del experimento (ver más adelante).

En fuerte contraste con lo observado tras la administración de alanina, tras la administración de glicina la acumulación hepática de orotato es muy inferior a la predicha por la ecuación (2) usando valores de k y k' de 0.233 y 0.069 min^{-1} , respectivamente, con la excepción de los puntos a 15 y 120 min, en que la predicción está razonablemente próxima al valor experimental. Ello indica que la eficacia de conversión de carbamil fosfato a orotato disminuye cuando la concentración de carbamil fosfato excede de 50 nmoles/g de hígado, es decir, que la síntesis de orotato se satura a concentraciones muy elevadas de carbamil fosfato. Hay que señalar que tras la administración de alanina el nivel hepático de carbamil fosfato fue siempre inferior a 50 nmoles/g. De hecho, la observación de un mismo nivel máximo de orotato tras la administración de glicina y de alanina, a pesar de que en el primer caso el nivel de carbamil fosfato alcanza valores al menos 4 veces superiores, constituye también evidencia de que la síntesis de orotato tiende a saturarse a concentraciones elevadas de carbamil fosfato. Por tanto, hemos ajustado los resultados experimentales para la glicina a la ecuación (3), que supone una dependencia hiperbólica de la síntesis de orotato con respecto al nivel de carbamil fosfato:

$$d[\text{Orotato}]/dt = [\text{CP}] \times V_{\text{max}} / ([\text{CP}] + K_m) - [\text{Orotato}] \times k' \quad (3)$$

La ecuación (2) es un caso particular de la (3), sólo aplicable cuando $[\text{CP}] \ll K_m$, siendo $k = V_{\text{max}}/K_m$. Las aspas en la figura 2.7 en el panel correspondiente a la glicina representan los niveles calculados usando la ecuación (3) utilizando valores de V_{max} y K_m de 42 nmol/min·g y de 180 nmol/g de hígado, respectivamente. Como en el caso de la alanina, se han usado para el cálculo los valores interpolados de carbamil fosfato y orotato a 10, 25, 40, 55, 85 y 115 min. Los valores usados de V_{max} y K_m se han tomado mediante prueba y error entre los pares de valores que cumplen la condición $k = V_{\text{max}}/K_m = 0.233 \text{ min}^{-1}$. Existe un acuerdo razonable entre los valores predichos y los encontrados experimentalmente (Fig. 2.7, GLICINA), confirmando que la síntesis de orotato en el tejido depende hiperbólicamente de la concentración de carbamil fosfato.

2.4.3 Determinantes metabólicos de la acumulación de carbamil fosfato tras la administración de glicina.

La Tabla 2.1 y la figura 2.8 comparan los niveles hepáticos de los distintos metabolitos del ciclo de la urea y compuestos relacionados a los 50 min tras la administración de 3 mmoles de glicina, con los niveles observados si solo se administra el vehículo tamponado. Se observa que la administración de glicina se asocia a aumentos variables de todos los metabolitos examinados, con la excepción de urea, ornitina y arginina, que no cambian sustancialmente, y de

Tabla 2.1 Niveles hepáticos de metabolitos relacionados con el ciclo de la urea tras la administración de glicina a la rata. Los resultados se dan como media \pm error standard de 5 "pools" de 3 hígados de rata tratados de igual forma. Las ratas se trataron como se indica en Métodos. El cuarto día de la pauta alimenticia, 2 horas después de retirar la comida, se les inyectó intraperitonealmente tampón fosfato sin (control) o con 3 mmoles de glicina por rata (glicina). Las ratas fueron anestesiadas después de transcurrir 50-60 min desde la inyección, se obtuvo un trozo de hígado mediante criopinzado y se determinaron los metabolitos. Σ (Orn+Arg+Cit+ASA) denota la suma de los niveles de ornitina, arginina, citrulina y argininosuccinato. Los asteriscos denotan diferencias significativas (test t de Student): * $p < 0.02$; ** $p < 0.002$; *** $p < 0.001$.

METABOLITO (nmoles/g)	CONTROL	GLICINA
Glutamina	5810 \pm 210	3710 \pm 505*
Glutamato	3020 \pm 237	3990 \pm 201*
Acetil CoA	29.3 \pm 2.2	43.3 \pm 2.8*
Acetilglutamato	16.1 \pm 1.7	38.9 \pm 7.2*
Amonio	331 \pm 67	1451 \pm 98***
Carbamil fosfato	5.1 \pm 4.3	90.0 \pm 15.2***
Orotato	33.0 \pm 11.9	136.4 \pm 12.9***
Ornitina	66.9 \pm 9.4	67.2 \pm 27.7
Citrulina	67.2 \pm 8.9	292.8 \pm 26.7***
Aspartato	1270 \pm 223	3520 \pm 389**
Argininosuccinato	13.0 \pm 1.8	27.4 \pm 3.4*
Arginina	34.7 \pm 3.3	34.9 \pm 4.6
Urea	2182 \pm 250	2368 \pm 228
Σ (Orn+Arg+Cit+ASA)	182 \pm 11	422 \pm 50**
Proteína (mg/g)	156 \pm 5	155 \pm 2

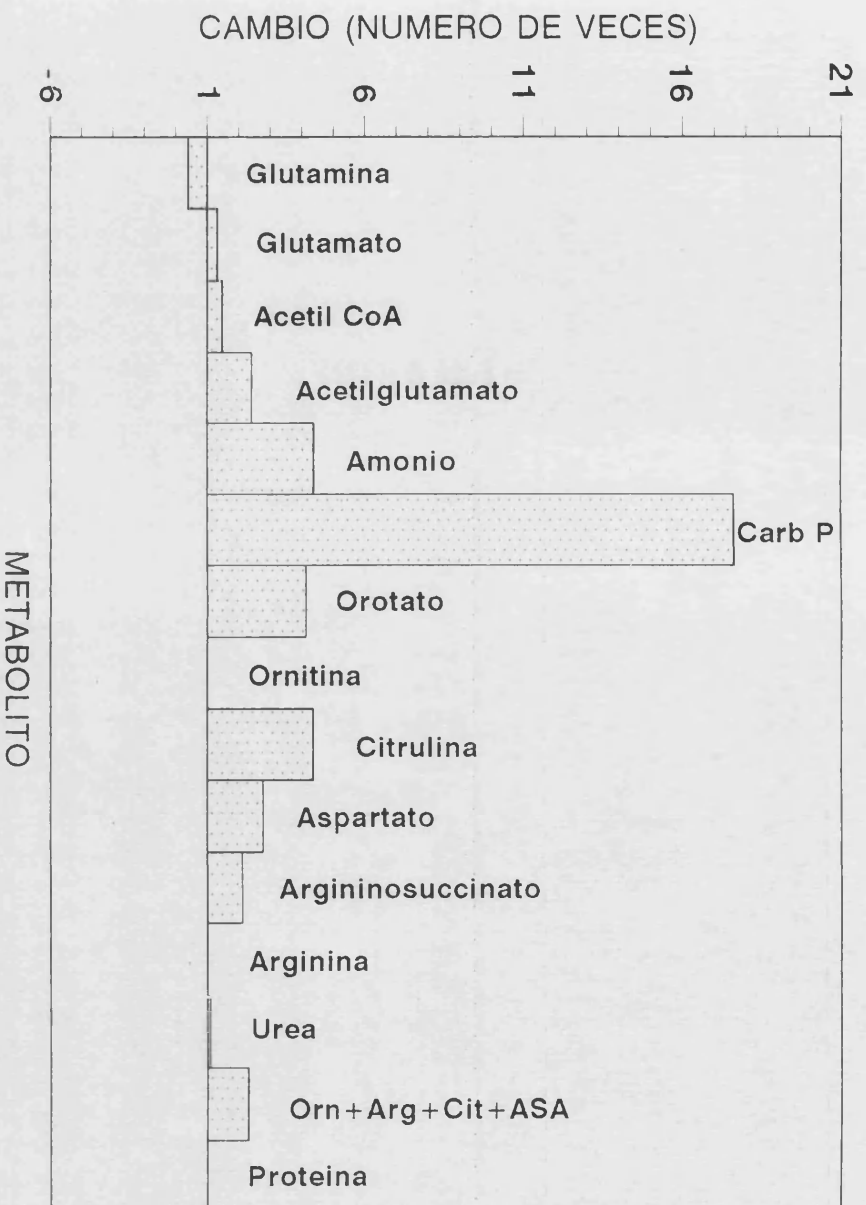


Figura 2.8 Cambios relativos en los niveles de algunos metabolitos del ciclo de la urea y compuestos relacionados tras la administración de 3 mmoles de glicina a la rata. Los resultados expresan el número de veces que aumenta (signo +) o disminuye (signo -) cada metabolito. El valor unidad expresa ausencia de cambios.

glutamina, que disminuye $1/3$. De acuerdo con los resultados de otros estudios [10], el nivel de carbamil fosfato fue (Tabla 2.1), cuando no se administró glicina, el más bajo de los niveles de los distintos compuestos intermedios del ciclo de la urea, como cabe esperar si en estas condiciones la síntesis de carbamil fosfato limita la velocidad del ciclo. Aún así, dicho nivel fue unas 10 veces superior al nivel medio encontrado en ratones alimentados 4 horas con una dieta sintética de aminoácidos conteniendo arginina [24], y fue del mismo orden que los niveles más bajos observados cuando dicha dieta carecía de arginina [24]. Puesto que las dietas de aminoácidos sin arginina inducen acumulación de carbamil fosfato por déficit relativo de ornitina [24], nuestros resultados sugieren que la dieta de Milner [1] que hemos administrado a nuestras ratas es relativamente deficitaria en arginina. De hecho, el contenido de arginina de la caseína, usada como componente proteico de dicha dieta, es el 4.2% del peso de la proteína [33], mientras que la arginina en la dieta sintética de aminoácidos recomendada por Rogers y Harper y utilizada en [24] representa el 8% del peso de los aminoácidos. También apoya la idea de que la dieta de Milner supone un aporte bajo de arginina (y por tanto de ornitina) nuestro hallazgo de un bajo nivel hepático de ornitina en estas ratas controles (Tabla 2.1), comparable al observado en ratones alimentados crónicamente con una dieta sin arginina [61]. Todo ello apunta a que el nivel de carbamil fosfato hepático relativamente alto encontrado en nuestras ratas controles se deba a una baja actividad de la ornitina trans-carbamilasa hepática, condicionada por un bajo nivel de

ornitina. En este contexto hay que recordar que la ornitina transcarbamilasa exhibe un K_m para la ornitina en el rango mM [62]. Además, los bajos niveles de amonio y acetilglutamato encontrados en los controles (comparar, por ejemplo, con los niveles publicados en [10]) excluyen una síntesis muy rápida de carbamil fosfato como causa de su acumulación.

Con la administración de glicina, el carbamil fosfato aumentó unas 20 veces mientras que la citrulina y el argininosuccinato solo aumentaron unas 4.5 y 2 veces, respectivamente, lo que indica que la ornitina transcarbamilasa fue, en estas condiciones, el paso limitante (Fig. 2.8). Como la administración de glicina no se acompañó de disminución alguna en el nivel de ornitina, hay que concluir en principio que el aumento en el nivel de carbamil fosfato se debe a un aumento en la velocidad de su síntesis que no se acompaña de un aumento similar en la velocidad de su utilización por la ornitina transcarbamilasa. Los aumentos en el nivel de amonio de casi 4.4 veces y de acetilglutamato de algo más de 2 veces, como consecuencia de la administración de glicina, justifican una elevación considerable (5-10 veces) en la velocidad de síntesis de carbamil fosfato. Sin embargo, para explicar plenamente el alto grado de acumulación de este metabolito, hay que postular que con la elevación del nivel de carbamil fosfato la ornitina transcarbamilasa se satura por este sustrato, lo que es de esperar a partir de su K_m (<0.1 mM, [62]), particularmente si el carbamil fosfato se encuentra, como es lógico, mayoritariamente en la matriz mitocondrial, donde alcanzaría una

concentración a los 50 min de 1.5 mM, y en el máximo (Fig. 2.7) de algo más de 3 mM (suponiendo 1 μ l de agua en la matriz mitocondrial por mg de proteína mitocondrial [6]).

Por tanto, son determinantes metabólicos de la acumulación de carbamil fosfato hepático tras la administración de glicina una actividad de la carbamil fosfato sintetasa mitocondrial muy aumentada con respecto a los controles como consecuencia del aumento del amonio y del acetilglutamato, y una actividad ornitina transcarbamilasa baja por limitación de ornitina, e independiente de la concentración de carbamil fosfato por saturación con respecto a este sustrato. Suponiendo una distribución homogénea de la ornitina en el hígado y un K_m para ornitina de la ornitina transcarbamilasa de 1 mM [63], puede estimarse, para el nivel encontrado de ornitina, una actividad ornitina transcarbamilasa en el tejido [2], a saturación de carbamil fosfato, del mismo orden o algo menor que la actividad carbamil fosfato sintetasa. Los resultados implican, por tanto, a la carbamil fosfato sintetasa mitocondrial en la generación del carbamil fosfato, y no apoyan la participación de la carbamil fosfato sintetasa citosólica, que usa predominantemente glutamina [64], ya que el nivel de este aminoácido disminuye casi a la mitad con el tratamiento con glicina (Tabla 2.1).

En cuanto a las elevaciones de amonio y acetilglutamato, la primera puede justificarse por la sobrecarga nitrogenada que supone la administración de un aminoácido que genera amonio en la mitocondria hepática en un sólo paso (glicina

sintetasa [65]). Las modestas elevaciones de los niveles de acetil CoA y de glutamato, combinados, probablemente justifican la elevación en el nivel de acetilglutamato, ya que la acetilglutamato sintetasa exhibe valores muy elevados de K_m para ambos sustratos [11]. La similitud en el nivel de arginina en los animales controles y en los tratados con glicina no apoya que cambios en el nivel de arginina, que es un activador de la acetilglutamato sintetasa [11], induzcan cambios en la actividad del enzima. Sin embargo, existen incertidumbres sobre este punto principalmente derivadas de que la sensibilidad de la acetilglutamato sintetasa a la activación por arginina varía con el tiempo y con la situación metabólica [66], no estando bien caracterizado cuándo es sensible y cuándo no lo es.

La Tabla 2.1 y la figura 2.8 recogen además los cambios en los niveles de otros compuestos que, aunque no son directamente relevantes para explicar el aumento en los niveles de carbamil fosfato, sí son de interés para entender el funcionamiento del ciclo de la urea tras la administración de glicina. La elevación en el nivel de carbamil fosfato con la administración de glicina hace esperar un aumento en la velocidad de síntesis de citrulina que podría ser de hasta 4 veces. Tal aceleración en la síntesis sería compatible con la elevación observada en el nivel de citrulina de alrededor de 4 veces. Para un K_m de 0.04 mM para la citrulina de la argininosuccinato sintetasa (K_m estimado en estudios "in vitro" [67]), este aumento en el nivel de citrulina debería tener un efecto pequeño sobre la velocidad de síntesis de

argininosuccinato. Sin embargo, estudios en hepatocitos permeabilizados sugieren un K_m de la argininosuccinato sintetasa para la citrulina "in situ" más elevado (>0.2 mM, [13,15]), por lo que el aumento en el nivel de citrulina es compatible con el ascenso de 2 veces en los niveles de argininosuccinato. Sin embargo, el aumento del argininosuccinato parece poco compatible con la no variación en el nivel de arginina. Dado el elevado K_m de la argininosuccinato liasa para el argininosuccinato [15], un aumento al doble de este metabolito debería resultar en un aumento de casi también al doble de la velocidad de síntesis de arginina y, por tanto, del nivel de arginina, lo que no ocurre. Desconocemos las razones para que sea así.

No se observa un aumento significativo del nivel hepático de urea con la administración de glicina, lo que indica que la velocidad de síntesis de urea es aproximadamente constante. Ello está de acuerdo con la constancia del nivel de arginina, ya que el K_m de la arginasa para la arginina es muy elevado [13,38], siendo por tanto la velocidad de este paso muy sensible a los cambios en el nivel de arginina. La constancia de los niveles de urea indica, por tanto, que, a pesar de la existencia de aumentos importantes en los niveles de amonio, carbamil fosfato y citrulina, la administración de 3 mmoles de glicina no induce un aumento sustancial en la velocidad de síntesis de urea, al menos a los 50 min tras la administración de este aminoácido. Puesto que previamente demostramos [10] que tras la administración de alanina y ornitina hay un aumento de casi tres veces en el nivel de

urea hepática; la limitación de ornitina en nuestros experimentos actuales parece esencial en la limitación de la síntesis de urea.

En este contexto, es relevante señalar que el nivel hepático total de compuestos intermedios del ciclo de la urea aumenta a algo más del doble tras administrar glicina, debiéndose la mayor parte del incremento al aumento en el nivel de citrulina (Tabla 2.1, Fig. 2.8). Desconocemos el mecanismo de este aumento, que podría resultar quizás de disminución de la degradación de la ornitina por la ornitina aminotransferasa mitocondrial hepática [68], o de aumento en la captación hepática de cualquiera de estos compuestos intermedios.

2.4.4 Influencia de la administración de ornitina sobre la acumulación de carbamil fosfato inducida por la glicina.

Milner y cols. [1] demostraron que la coadministración de ornitina o arginina previene la aciduria orótica inducida por aminoácidos. La figura 2.9 ilustra los efectos de dosis crecientes de ornitina administradas junto con la glicina, sobre los niveles hepáticos de ornitina, orotato, carbamil fosfato, amonio y acetilglutamato. En estos experimentos la técnica del criopinzado se modificó incluyendo un lavado rápido (≈ 1 seg) de la muestra en suero fisiológico a 0°C antes de congelarla entre los bloques metálicos de criopinzado. Ello fue esencial para evitar contaminaciones por la ornitina de la solución inyectada. La administración

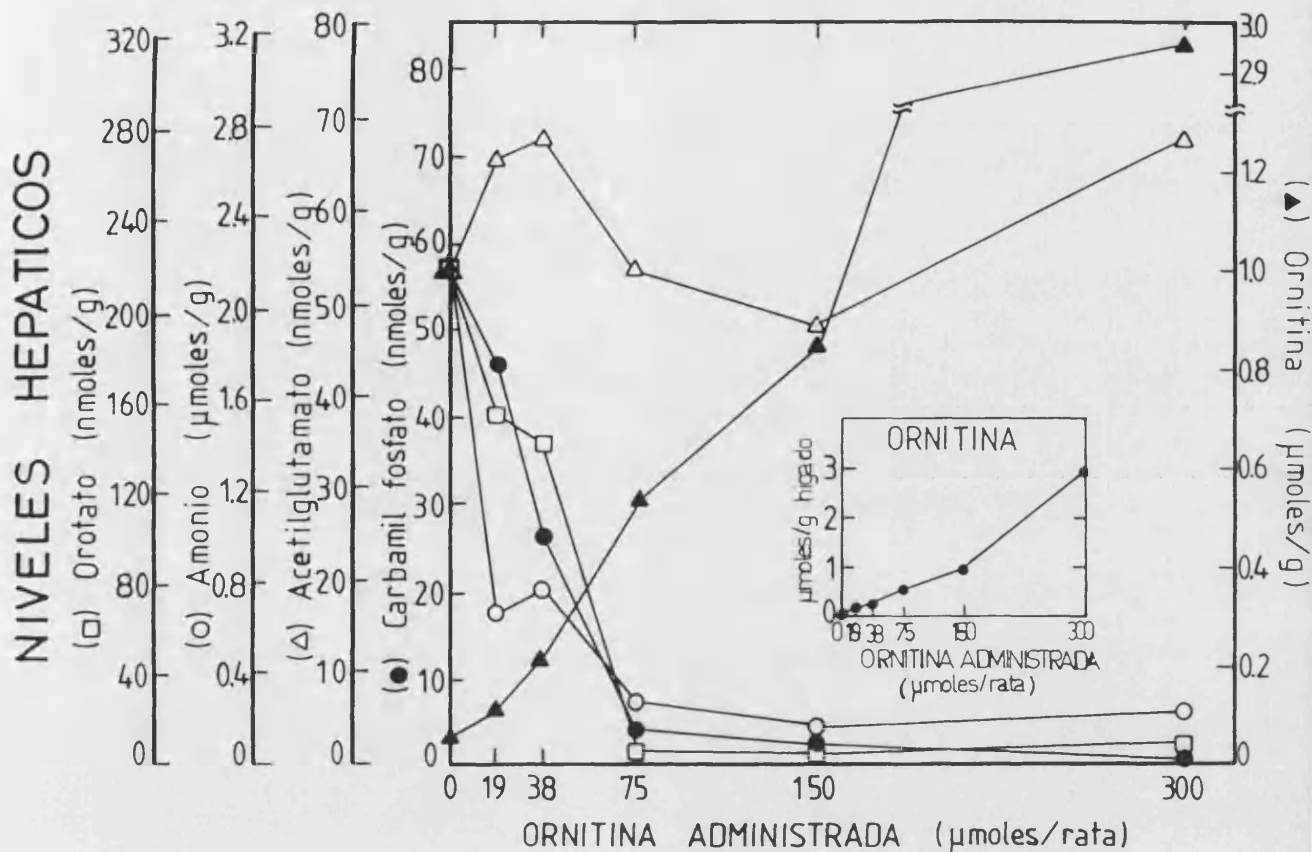


Figura 2.9 Niveles hepáticos de ornitina, orotato, carbamil fosfato, amonio y acetilglutamato tras la administración de dosis crecientes de ornitina junto con glicina a la rata. A las 2 h de retirar el alimento se administró intraperitonealmente una mezcla de glicina (3 mmoles/rata) junto a las cantidades indicadas de ornitina, en 3 ml de tampón fosfato. A los 50 min se obtuvo una muestra hepática (ver texto) y se determinaron los metabolitos. Cada punto experimental representa la mezcla de tres hígados de rata tratados de la misma forma. Nótese que, para que sean bien visibles los cambios en el nivel de ornitina, la escala de ordenadas para la ornitina se ha roto en 1.3 μmoles . El inserto representa los cambios en el nivel de ornitina sin rotura de escala.

de ornitina induce aumentos aproximadamente proporcionales en el nivel hepático de ornitina, que se asocian con disminuciones en el nivel hepático de orotato, de modo que, para concentraciones hepáticas de ornitina de alrededor de 0.5 μ moles/g de hígado el nivel de orotato hepático alcanza los valores de los controles que no recibieron aminoácidos (ver Tabla 2.1) y ya no cambia sustancialmente para concentraciones superiores de ornitina. Tal descenso del orotato sucede concomitantemente con un descenso de los valores de carbamil fosfato a niveles similares a los de los controles. La figura 2.10, que relaciona los niveles hepáticos de orotato y de carbamil fosfato para todos los experimentos de esta memoria de Tesis, confirma que el orotato aumenta con el nivel de carbamil fosfato y que hay saturación, como ya indicamos en epígrafes anteriores, a niveles de carbamil fosfato superiores a 50 nmoles/g de hígado.

La figura 2.11 ilustra la existencia de una relación inversa entre el nivel de ornitina y los niveles de orotato, amonio y carbamil fosfato. El hecho de que los niveles de carbamil fosfato sigan disminuyendo para niveles de ornitina por arriba de 0.5 μ moles/g de hígado indica que ni siquiera a este elevado nivel de ornitina está completamente saturada la ornitina transcarbamilasa, lo que denota un K_m elevado para la ornitina, que concuerda con nuestros conocimientos sobre este enzima [15,64].

El amonio hepático también desciende drásticamente con el

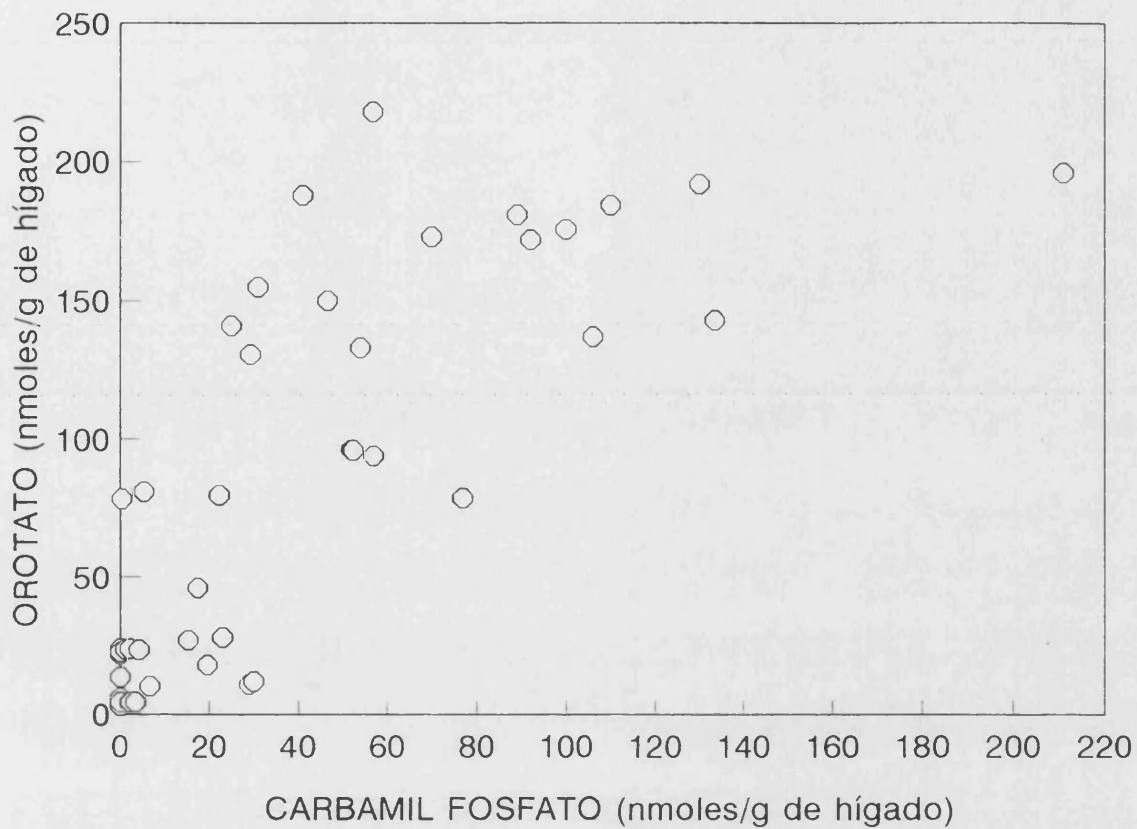


Figura 2.10 Relación entre los niveles hepáticos de orotato y de carbamil fosfato. Se han utilizado todos los valores obtenidos en este trabajo de Tesis, independientemente de la situación experimental del animal. Cada punto representa los niveles de metabolitos en una mezcla de tres hígados obtenidos de animales tratados en forma idéntica.

NIVELES HEPATICOS

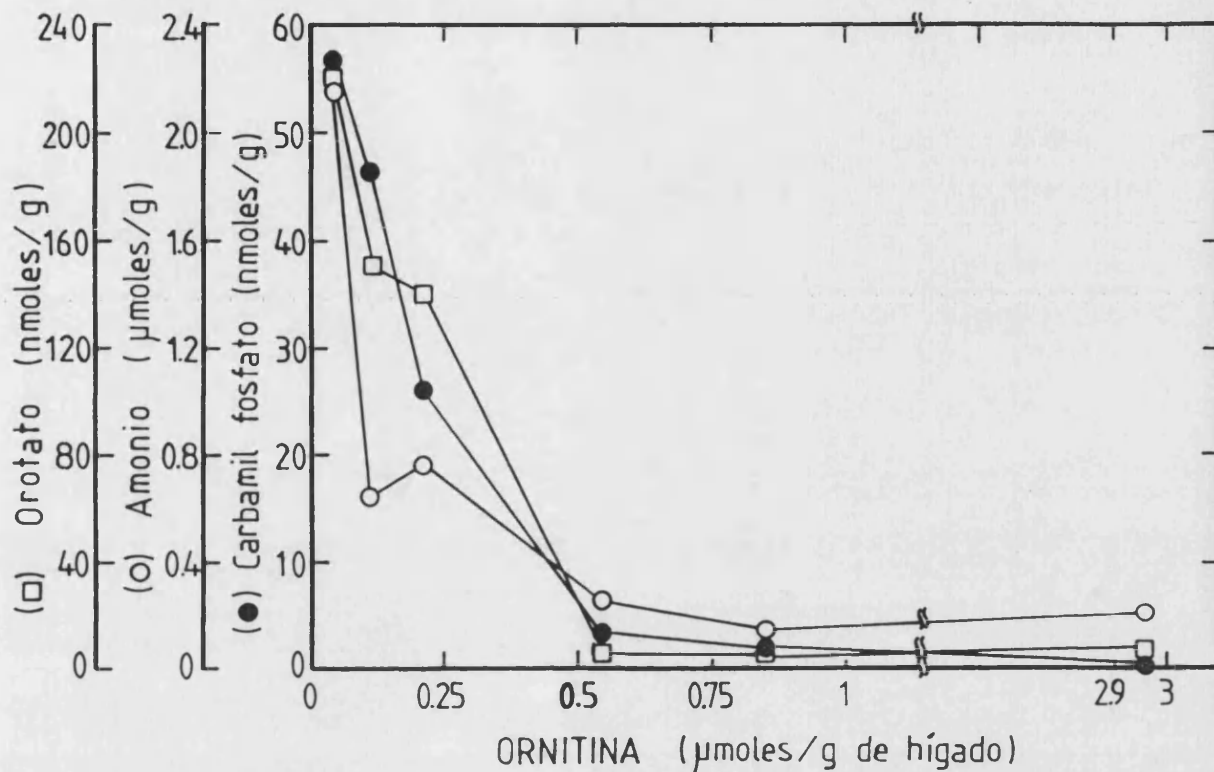


Figura 2.11 Relación entre los niveles hepáticos de orotato, amonio o carbamil fosfato y de ornitina. Se han utilizado los niveles encontrados en el experimento que ilustra la figura 2.9. Cada punto representa los niveles de metabolitos en una mezcla de tres hígados.

aumento en el nivel de ornitina (Figs. 2.9 y 2.11), alcanzándose los niveles de los controles cuando la ornitina alcanza un nivel de aproximadamente 0.5 μ moles/g. La disminución del nivel de amonio como consecuencia del aumento en el nivel de ornitina no puede explicarse en forma sencilla, ya que la reacción catalizada por la carbamil fosfato sintetasa es irreversible [11,69] (si bien cataliza una reversión parcial a una velocidad de hasta del 20% de la reacción directa, [70]) y el carbamil fosfato no es un buen inhibidor del enzima [71]. Estos dos factores hacen que una elevación en el nivel de carbamil fosfato no tenga por qué inducir retrógradamente un nivel más elevado de amonio. La mayor disminución del nivel de amonio que de carbamil fosfato observada para niveles de ornitina de 0.12 y 0.23 μ moles/g de hígado (Fig. 2.11) confirma que la acumulación de amonio no depende directamente de la acumulación de carbamil fosfato como habría que esperar si se debiera a reversión de la carbamil fosfato sintetasa o a su inhibición por el carbamil fosfato, o bien fuera consecuencia de la descomposición química o enzimática del carbamil fosfato acumulado.

Existen evidencias de que, "in situ", la carbamil fosfato sintetasa es activada por la adición de ornitina, y que este efecto requiere de ornitina transcarbamilasa activa [72,73]. Estos efectos no se observan en preparaciones solubles de carbamil fosfato sintetasa [73], y no se han explicado satisfactoriamente. Una activación de la carbamil fosfato sintetasa por el aumento de flujo a través de la ornitina transcarbamilasa inducido por el incremento de los niveles de

ornitina explicaría la disminución de amonio observada aquí al administrar ornitina. Por tanto, el efecto de la ornitina sobre el nivel de amonio parece indicar que la carbamil fosfato sintetasa sufre cierto grado de inhibición a los 50 min de la administración de los 3 mmoles de glicina, y que la administración de ornitina elimina dicha inhibición.

En comparación con los cambios de los metabolitos ya comentados en esta sección, las variaciones en el nivel de acetilglutamato con la administración de ornitina (Fig. 2.9) fueron poco importantes, no representando más de un 27% del valor sin ornitina. Ello indica que los cambios en los niveles de acetilglutamato no son responsables (via activación de la síntesis de carbamil fosfato) de la muy importante disminución del nivel de amonio observada al administrar ornitina.

En cuanto a citrulina y arginina (Fig. 2.12), ambos aminoácidos aumentan sustancialmente su nivel con la administración de ornitina, si bien en el caso de la arginina el aumento mayor se produce al aumentar la dosis de ornitina administrada desde 150 hasta 300 μ moles/rata. Como la ornitina es un potente inhibidor de la arginasa [74], tal aumento muy bien podría representar inhibición competitiva de este enzima por los elevados niveles tisulares de ornitina, que alcanzan valores de 3 μ moles/g.

Los niveles máximos de citrulina alcanzados fueron del mismo orden de los observados previamente tras administrar al

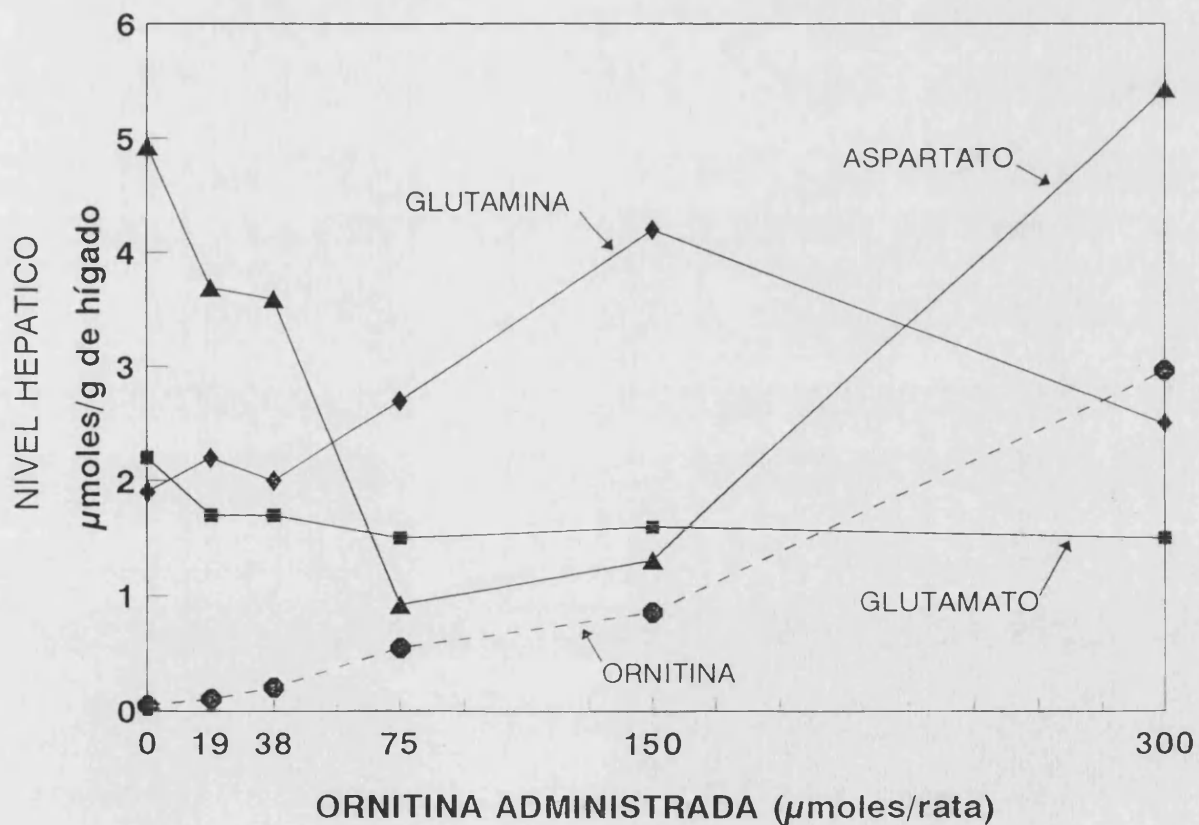
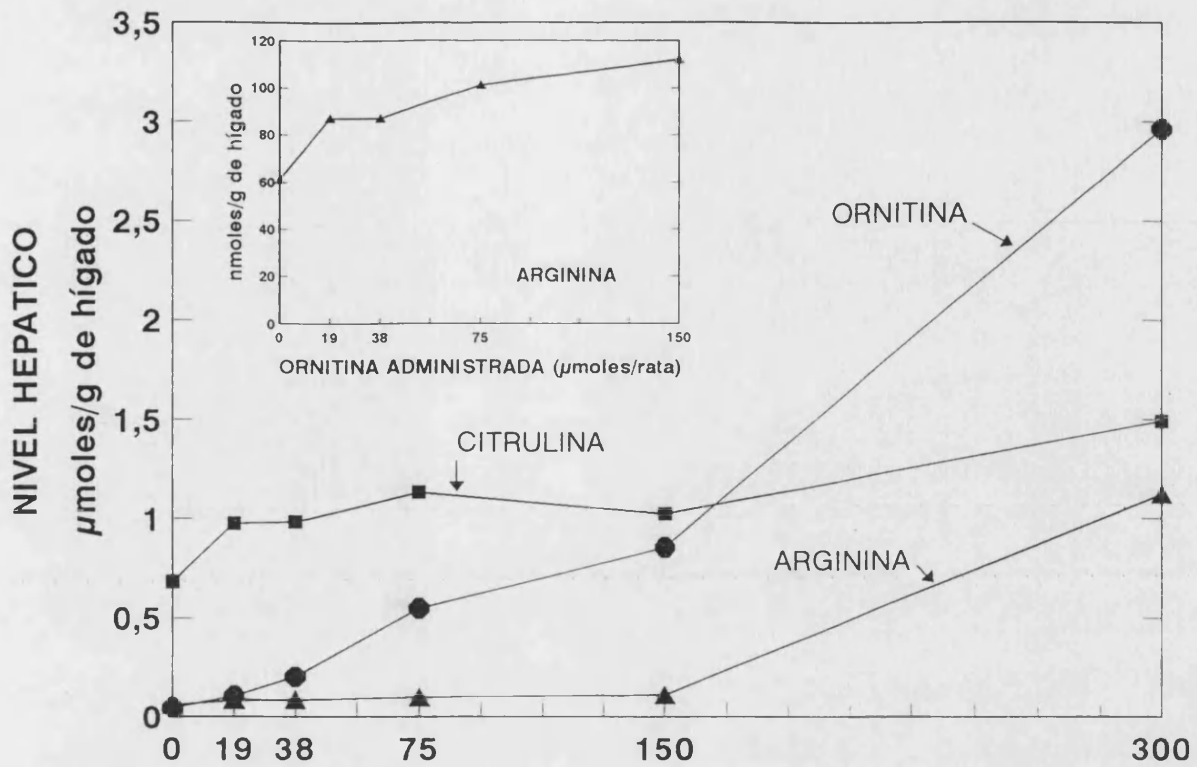


Figura 2.12 Niveles hepáticos de algunos metabolitos relacionados con el ciclo de la urea tras la administración de dosis crecientes de ornithina junto con glicina a la rata. Los detalles de este experimento se dan en la leyenda de la figura 2.9 y en el texto. Cada punto experimental representa la mezcla de tres hígados de rata tratados de la misma forma. El inserto representa en más detalle los cambios en el nivel de arginina.

ratón mezclas de alanina y ornitina [10], suponiendo un aumento de más de 20 veces con respecto a los niveles de citrulina antes de administrar glicina. Aunque en los experimentos que se presentan en esta sección no determinamos los cambios en el nivel de argininosuccinato con la administración de ornitina, experimentos previos de este grupo indican que, al menos tras la administración de alanina y ornitina, la síntesis de argininosuccinato se convierte en el paso limitante del ciclo [10]. Los elevados niveles de citrulina observados en los experimentos presentes están de acuerdo con que sea así. El hecho de que la administración de ornitina junto con glicina induzca un aumento en el nivel de citrulina con respecto al nivel observado al administrar glicina solamente, prueba que la ornitina transcarbamilasa no estaba saturada por la ornitina presente en el tejido tras la administración de glicina sin ornitina.

Finalmente, la administración de ornitina no cambia notablemente los niveles de glutamato, aumenta los niveles de glutamina hepática, sin que conozcamos el mecanismo de este aumento, y disminuye los niveles de aspartato concomitantemente con los de amonio y carbamil fosfato, quizá como consecuencia del más rápido aporte de citrulina al paso de síntesis de argininosuccinato. Además, existen mecanismos que aseguran aportes proporcionados de amonio y aspartato al ciclo de la urea [72]; la disminución en el aporte de amonio cabe esperar se acompañe de una disminución proporcionada en el nivel de aspartato, que en nuestros experimentos se observa hasta dosis de ornitina de 80 μ moles/rata. Con dosis

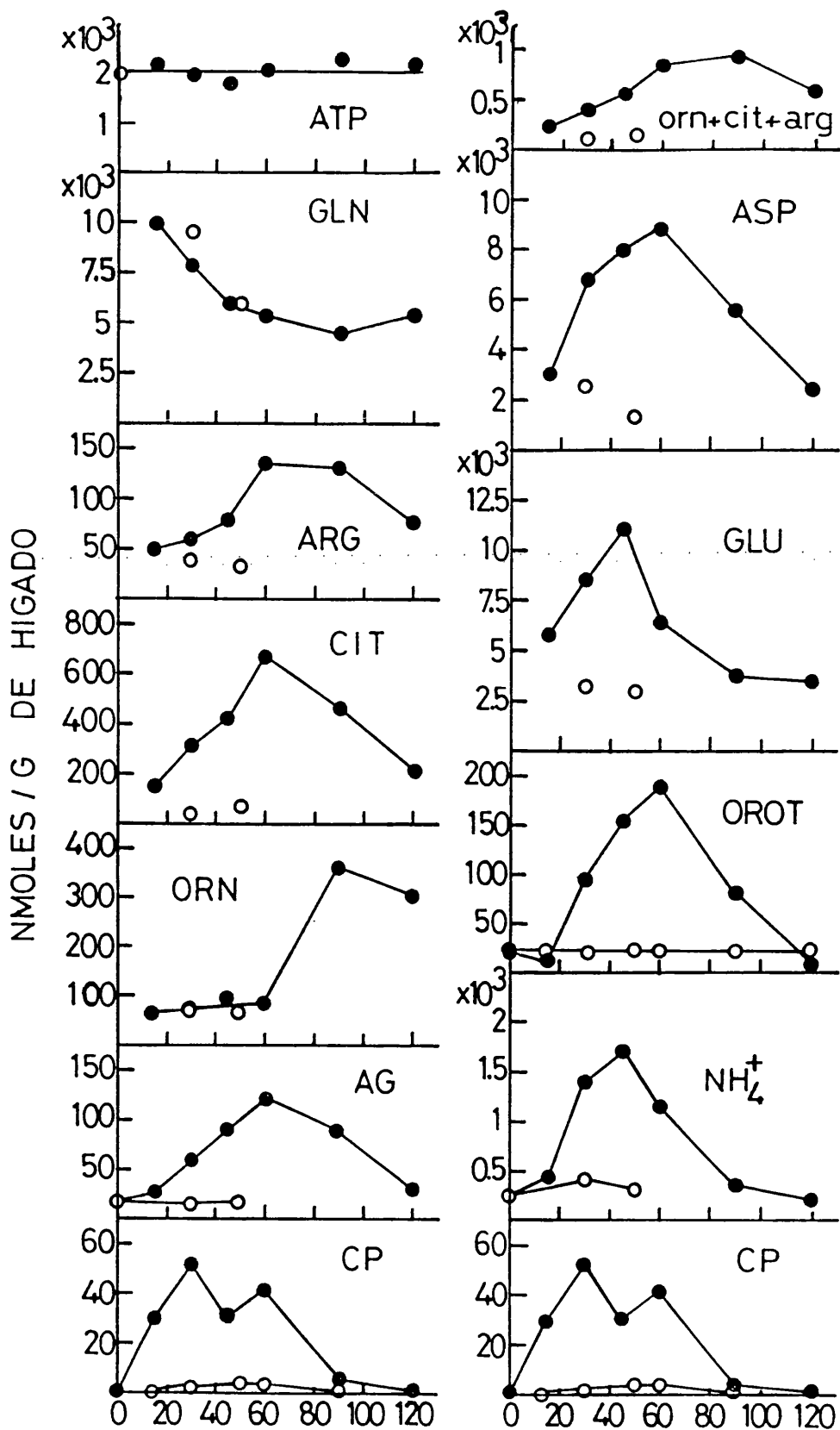
de ornitina superiores, particularmente para 300 μ moles/rata, vuelven a elevarse considerablemente los niveles de aspartato, disociándose éstos así de los niveles de amonio. Puede justificarse esta elevación en el nivel de aspartato por la metabolización hepática de la ornitina, que generará cantidades elevadas de glutamato en la matriz mitocondrial [61]. Dicho aumento en la generación intramitocondrial de glutamato podría hacer más activa la transaminación intramitocondrial al oxaloacetato, explicando así una mayor generación de aspartato [65].

2.4.5 Determinantes metabólicos de la acumulación de carbamil fosfato tras la administración de alanina

Como la alanina difiere de la glicina en su menor potencial amoniogénico [65], y dado el carácter bimodal de la curva del nivel de carbamil fosfato tras la administración de alanina (Fig. 2.7), decidimos investigar los cambios temporales en los niveles de metabolitos del o relacionados con el ciclo de la urea, para tratar de relacionar sus cambios con el tiempo con los del carbamil fosfato.

La figura 2.13 ilustra dichos cambios. Cada punto corresponde a la determinación en la mezcla de tres hígados. Por razones técnicas sólo se realizaron dos determinaciones en animales controles, a los 30 y 50 min tras administrarles el vehículo tamponado sin alanina.

La figura 2.13 demuestra niveles similares y bajos de



MIN TRAS LA ADMINISTRACION DE ALANINA

Figura 2.13 Niveles hepáticos de algunos metabolitos del ciclo de la urea y compuestos relacionados a distintos tiempos tras la administración de alanina. (●): administración de 3 nmoles de alanina por rata; (○): controles a los que sólo se administró el vehículo tamponado. Cada punto es el resultado del análisis del extracto obtenido a partir de tres hígados procesados conjuntamente. GLN: glutamina; ARG: arginina; CIT: citrulina; ORN: ornitina; AG: acetilglutamato; CP: carbamil fosfato; ASP: aspartato; GLU: glutamato; OROT: orotato; NH_4^+ : amonio; Orn+Cit+Arg: es la suma de los niveles de ornitina, citrulina y arginina.

ornitina en los controles y en las ratas que recibieron la alanina, durante los primeros 60 min desde la inyección, que es el período en el que hay acumulación de carbamil fosfato. A los 90 min desde la inyección de alanina los niveles de ornitina ascienden a valores unas 3 veces superiores a los observados a tiempos anteriores, y a este aumento se corresponde un descenso del nivel de carbamil fosfato a valores muy bajos. Por tanto, estos resultados están de acuerdo con que también con la administración de alanina el bajo nivel de ornitina sea un determinante esencial en la acumulación de carbamil fosfato.

Sin embargo, el carbamil fosfato está ya aumentado considerablemente a los 15 min tras la administración de alanina, a pesar de que los niveles de amonio a ese tiempo son esencialmente iguales a los de los controles y el nivel de acetilglutamato ha aumentado sólo unas 2 veces con respecto al valor basal. Como otro sustrato de la carbamil fosfato sintetasa, el ATP, no varió a lo largo de todo el experimento, estos resultados no permiten explicar el aumento en el nivel de carbamil fosfato 15 min tras la administración de alanina como consecuencia exclusiva de aumento de velocidad de la carbamil fosfato sintetasa, que como máximo podría ser del doble con respecto al control. Para explicar el aumento mucho mayor del carbamil fosfato a los 15 min hay que postular la existencia de inhibición de la ornitina transcarbamilasa por altas concentraciones de alanina [38].

Los cambios en el nivel de citrulina son probablemente un

buen indicador de los cambios en la actividad ornitina transcarbamilasa. Como el nivel de ornitina se mantiene relativamente constante entre 15 y 60 min y el nivel de carbamil fosfato solo fluctua durante este periodo en <30% alrededor de un valor medio de 40 nmoles/g, cabria esperar que la producción de citrulina durante ese período hubiera sido aproximadamente constante, mientras que en realidad el nivel de citrulina aumenta a ritmo aproximadamente constante entre los 15 y los 60 min. Una explicación simple para tal aumento es que refleja un aumento también constante en la velocidad de síntesis de citrulina que, al no poder atribuirse a los cambios en los niveles de ornitina y de carbamil fosfato, debe reflejar disminución con el tiempo de la inhibición de la ornitina transcarbamilasa por la alanina, al descender el nivel de este aminoácido con el tiempo desde su administración.

Por tanto, el primer pico de carbamil fosfato observado tras administrar alanina muy probablemente refleja la combinación de dos factores: inhibición de la ornitina transcarbamilasa por la alanina y aumento de la síntesis de carbamil fosfato por aumento del amonio y acetilglutamato, siendo este aumento sólo importante para períodos superiores a 15 min desde la administración del aminoácido. Ello explicaría también el que a los 45 min, cuando se alcanza el máximo de amonio y el nivel más alto encontrado hasta entonces de acetilglutamato, y cuando los niveles de ornitina no han sufrido aún un cambio importante, se produzca un descenso en el nivel de carbamil fosfato, que debe reflejar aumento en la actividad ornitina

transcarbamilasa, explicable por disminución de un inhibidor, que podría ser la alanina [38]. Aunque no hemos determinado los niveles de este aminoácido, los picos de amonio y de glutamato muy probablemente reflejan aproximadamente el pico de alanina, siendo indicativos del período temporal en que cabe esperar la inhibición de la ornitina transcarbamilasa por este aminoácido.

El segundo pico de carbamil fosfato sugiere que el aumento observado en el nivel de acetilglutamato entre los 45 y los 60 min se acompaña de un aumento proporcional en la actividad de la carbamil fosfato sintetasa, y que, por tanto, la carbamil fosfato sintetasa no está saturada por el acetilglutamato. El desfase entre las curvas para amonio y para acetilglutamato, alcanzándose el máximo antes para el primero que para el segundo, y la coincidencia entre el segundo pico del carbamil fosfato y el pico de acetilglutamato, da apoyo a la propuesta de Meijer de que "in vivo" una función importante del acetilglutamato es garantizar una actividad elevada de la carbamil fosfato sintetasa a concentraciones subóptimas de amonio [13,62].

A diferencia de lo que sucedía para la administración de glicina, los niveles de carbamil fosfato observados a los 45 y 60 min de la administración de alanina son explicables adecuadamente por los aumentos esperables de actividad carbamil fosfato sintetasa, como consecuencia de las elevaciones observadas en los niveles de amonio y acetilglutamato. Los niveles de amonio y glutamato exhiben curvas

similares con el tiempo, con máximos a los 45 min, que representan unas 4 veces los niveles presentes en los controles. Ello está de acuerdo con la metabolización de la alanina via transaminación y con generación de amonio a partir del glutamato [65].

El aumento en el nivel de glutamato es temporalmente anterior e insuficiente en magnitud para explicar por sí solo el amplio pico de acetilglutamato, razonablemente simétrico y centrado en los 60 min. No hemos estimado el nivel de acetil CoA, y por tanto desconocemos en qué medida aumentos en los niveles de este sustrato de la acetilglutamato sintetasa han podido contribuir al aumento en el nivel de acetilglutamato. Otro factor a considerar por su posible papel en los cambios del nivel de acetilglutamato es el nivel de arginina, que aumenta 3-5 veces a lo largo del experimento, alcanzando un máximo a los 60 min y evolucionando desde entonces aproximadamente en paralelo a los niveles de acetilglutamato, no pudiendo excluirse, por tanto, que los cambios en los niveles de arginina hayan influido en la actividad de la acetilglutamato sintetasa, como fue postulado previamente por Tatibana y cols. [5].

La comparación de los máximos para los distintos metabolitos indica que el máximo para el amonio precede al de la citrulina, que éste es simultáneo con el máximo de aspartato, y que ambos preceden al máximo de arginina, como hay que esperar del orden de los diferentes pasos en el ciclo de la urea [11]. La suma de ornitina + citrulina + arginina revela

la incorporación neta por el hígado, tras la administración de alanina, de casi 1 $\mu\text{mol/g}$ de los compuestos intermedios del ciclo de la urea, posiblemente derivados de síntesis intestinal "de novo" de ornitina a partir del glutamato producido por la metabolización de la alanina [61,65].

2.4.6 Consideraciones finales

Hay buenas razones para implicar a la carbamil fosfato sintetasa mitocondrial en la síntesis de carbamil fosfato acumulado al administrar aminoácidos: 1) no se producen aumentos en el nivel hepático de glutamina que puedan justificar una activación de la síntesis de carbamil fosfato por la carbamil fosfato sintetasa II [64]; 2) la actividad carbamil fosfato sintetasa II ^[23] es insuficiente para justificar la veloz acumulación observada de carbamil fosfato, particularmente si se tiene en cuenta la rápida utilización del carbamil fosfato hepático ($t_{1/2} < 0.15$ seg, en una situación de inhibición de la ornitina transcarbamilasa similar a la actual [24]); 3) los cambios en los metabolitos del ciclo de la urea justifican una aceleración importante en la velocidad de síntesis de carbamil fosfato por la carbamil fosfato sintetasa mitocondrial hepática; 4) el bajo nivel de ornitina y su constancia a pesar de la aceleración en la síntesis de carbamil fosfato justifican la existencia de un bloqueo relativo en el consumo de carbamil fosfato mitocondrial por la ornitina transcarbamilasa; 5) la administración de ornitina resulta en una drástica reducción en el nivel de carbamil fosfato, que demuestra su utilización

por la ornitina transcarbamilasa; es de esperar tal eficiente utilización si el carbamil fosfato se acumula preferentemente en la mitocondria hepática, donde se encuentra la ornitina transcarbamilasa [11]; si el carbamil fosfato hubiera de penetrar al interior de la mitocondria para tener acceso a la ornitina transcarbamilasa, habría que esperar que la barrera de permeabilidad constituida por las membranas mitocondriales limitara drásticamente la capacidad de la ornitina transcarbamilasa para competir por el carbamil fosfato citosólico presente fuera de la mitocondria.

En todo caso el carbamil fosfato mitocondrial debe atravesar las membranas de este orgánulo y escapar al citosol antes de poder ser utilizado en la síntesis de pirimidinas [41]. Varios autores han demostrado la existencia de esta salida [41,42] aunque no se ha aclarado su mecanismo exacto. En estudios con mitocondrias aisladas se ha demostrado la necesidad de que exista un gradiente considerable de carbamil fosfato entre el interior y el exterior de la mitocondria para que se de dicha salida [73]. Por tanto, la mayoría del carbamil fosfato hepático encontrado aquí (al menos un 90 %, de acuerdo con [6]) debe estar localizado en la matriz mitocondrial y por tanto la concentración de este metabolito en dicho compartimiento debe ser, durante el pico de la acumulación, muy elevada (suponiendo 60 μ l de H₂O en la matriz por gramo de hígado [6], 3.3 mM para la glicina y 0.83 mM para alanina). El hecho de que la aspartato transcarbamilasa, que forma parte de una proteína multienzimática [64] junto con la carbamil fosfato sintetasa

II y la dihidroorotasa, acepte el carbamil fosfato procedente de la mitocondria prueba que, "in vivo", la canalización del carbamil fosfato desde la carbamil fosfato sintetasa II a la aspartato transcarbamilasa no es absoluta, y que el lugar de unión de esta última para carbamil fosfato está expuesto al medio.

Nuestros resultados también apoyan la propuesta de que es el hígado el órgano responsable de la generación del orotato excretado en exceso al administrar glicina o alanina. Aunque solo aproximadas, nuestras estimaciones predicen una producción hepática de orotato similar o aún superior a lo excretado, justificando enteramente dicha excreción. Es lógico que sea así ya que, además del hígado, la carbamil fosfato sintetasa I sólo se encuentra en la mucosa del intestino delgado, donde sólo se encuentra a un nivel de <5% del nivel hepático [75]. Además, a diferencia del hígado, el intestino delgado sintetiza "de novo" ornitina [61], por lo que es de esperar que la síntesis de citrulina se vea menos limitada en este órgano que en el hígado por déficit de aporte de ornitina, que es uno de los factores implicados en la acumulación de carbamil fosfato observada aquí.

En realidad no sabemos si el carbamil fosfato mitocondrial y la aspartato transcarbamilasa se encuentran en los mismos hepatocitos, ya que estas células presentan considerable heterogeneidad dependiendo de su localización en el lobulillo hepático, encontrándose los enzimas del ciclo de la urea en el área periportal [15] y desconociéndose dónde se

localizan los de la síntesis de pirimidinas. Se ha demostrado que el tratamiento con tetracloruro de carbono daña selectivamente el área perivenosa [16] e induce hiperamoniemia [16] y aciduria orótica [75]. La hiperamoniemia se atribuye a la pérdida de la actividad glutamina sintetasa [16] (exclusivamente perivenosa) y la aciduria orótica sería secundaria a dicha hiperamoniemia, y estaría de acuerdo con la síntesis de ácido orótico en la región no perivenosa.

En cualquier caso, la excreción observada de orotato representa una fracción despreciable con respecto al aporte nitrogenado que supone la administración de 3 mmoles de glicina o alanina. Por ejemplo, la excreción de 1.9 mg de orotato tras la administración de 3 mmoles de glicina representa <1% del nitrógeno total administrado con el aminoácido, lo que refleja la baja capacidad de síntesis de la vía de las pirimidinas hepática, que no puede ser considerada en ningún caso una ruta alternativa al ciclo de la urea para la excreción nitrogenada.

La dependencia aproximadamente hiperbólica encontrada aquí de los niveles de orotato con respecto a los de carbamil fosfato, revela que la síntesis de pirimidinas es un proceso saturable con respecto a la concentración de carbamil fosfato, como hay que esperar tanto del paso del carbamil fosfato a través de las membranas mitocondriales como de la reacción catalizada por la aspartato transcarbamilasa.

Si esta relación hiperbólica refleja el paso del carbamil fosfato a través de las membranas mitocondriales, puede estimarse para él, a partir de la figura 2.10, un K_m del orden de 0.5 mM carbamil fosfato. Por el contrario, si se trata de saturación de la aspartato transcarbamilasa, el K_m estimado sería, suponiendo que la concentración extramitocondrial de carbamil fosfato es el 1% de la intramitocondrial [73], de 5 μ M carbamil fosfato, un valor probablemente demasiado bajo para la aspartato transcarbamilasa de mamíferos [64]. Por tanto, lo más probable es que la relación aproximadamente hiperbólica de la figura 2.10 refleje salida de carbamil fosfato a través de las membranas mitocondriales, un proceso no bien estudiado hasta el momento [62].

Nuestros experimentos ilustran la importancia del aporte de cantidades apropiadas de ornitina y lo limitado de la producción endógena de este aminoácido, que no es capaz de satisfacer las necesidades de ureogénesis cuando la demanda creada por la sobrecarga nitrogenada es importante. En este sentido una conclusión básica ha sido que, como para la administración de una dieta desprovista de arginina [24], la excreción de ácido orótico y la acumulación de carbamil fosfato responden a la desproporción entre las ofertas de nitrógeno y de arginina. La universalidad de la arginina en los alimentos proteicos, y por tanto la dificultad de exponerse, en condiciones de alimentación normal, a sobrecargas nitrogenadas que no vayan acompañadas de suministro proporcionado de arginina, seguramente justifican la ausencia de una actividad de síntesis "de novo" de ornitina suficiente

para hacer frente a sobrecargas nitrogenadas importantes a corto plazo. Como hemos visto con la alanina, desempeñan un papel relevante en la demanda de ornitina la existencia de inhibición de la ornitina transcarbamilasa por alanina y, probablemente, por otros aminoácidos. Siendo aminoácidos los sustratos de los enzimas citosólicos del ciclo de la urea, también es concebible su inhibición (de hecho descrita [34,38,62]) por aminoácidos distintos a sus sustratos naturales. Estos procesos de inhibición, dado su carácter competitivo con los sustratos, deben poder ser revertidos por los sustratos normales, la ornitina para la ornitina transcarbamilasa o sus metabolitos para los pasos siguientes del ciclo. Por ello la administración de ornitina es importante tanto como sustrato en sí de la ornitina transcarbamilasa como para desplazar a posibles aminoácidos inhibidores de la ornitina transcarbamilasa, y los metabolitos ulteriores del ciclo derivados de la ornitina también deben desempeñar un papel similar con los pasos citosólicos del ciclo de la urea.

Una cuestión aún no resulta sobre la funcionalidad del ciclo de la urea es el papel de la ornitina sobre la actividad del paso de síntesis de carbamil fosfato. Krebs fue el primero en postular, sobre la base de experimentos de perfusión hepática, que la carbamil fosfato sintetasa hepática es activada por ornitina [72]. Sin embargo, a diferencia de la carbamil fosfato sintetasa de E. coli [77], la actividad del enzima ureotélico en solución no se influye por este aminoácido. Experimentos ulteriores con mitocondrias aisladas han concluido que, en ausencia de ornitina, existe

una síntesis inicial rápida de carbamil fosfato que al poco tiempo declina, sin que se conozcan las razones de tal disminución. La adición de ornitina previene esta disminución a condición de que la ornitina transcarbamilasa sea activa [73]. Este hecho y la necesidad de que la estructura mitocondrial permanezca intacta para que se observen estos efectos, han hecho suponer que la síntesis de carbamil fosfato declina como consecuencia de su acoplamiento a algún proceso de transporte a través de la membrana mitocondrial, que es reactivado por la extrusión de citrulina desde la mitocondria, habiéndose postulado por Meijer que la inhibición de la síntesis de carbamil fosfato se debería a inhibición de la anhidrasa carbónica mitocondrial por acumulación de protones en la matriz [62]. No existen evidencias directas de que sea así, pero nuestros resultados con la administración de cantidades razonables de ornitina favorecen la idea de que hay inhibición de la carbamil fosfato sintetasa por bajo aporte de ornitina y que dicha inhibición no está mediada directamente por la acumulación de carbamil fosfato, tal como habría que esperar si se debiera a inhibición de la ornitina transcarbamilasa por este metabolito.

En cualquier caso, nuestros resultados no apoyan la conclusión mantenida inicialmente por Krebs, de que la administración al hígado de alanina sin ornitina resulta en acumulación de amonio pero no de carbamil fosfato [72]. Aunque sin duda se acumula amonio, revelando una desproporción entre la velocidad a que se genera dicho

metabolito y su utilización por la carbamil fosfato sintetasa, también se acumula carbamil fosfato, alcanzando muy probablemente en la matriz mitocondrial niveles comparables a los del amonio, y, para la administración de glicina, más elevados. Ello no es óbice para postular que la carbamil fosfato sintetasa se inhibe en ausencia de ornitina. Como han demostrado experimentos con mitocondria aislada [73], tal inhibición no sucede desde el principio, sino que se instaura al cabo de cierto tiempo, cuando se han establecido ya niveles estacionarios elevados de carbamil fosfato en la matriz mitocondrial.

2.5 REFERENCIAS

1. Hatchwell, L.C., and Milner, J.A. (1978) Amino acid induced orotic aciduria. J. Nutr. 108, 578-584.
2. Nuzum, C.T., and Snodgrass, P.J. (1976) Multiple assays of the five urea-cycle enzymes in human liver homogenates. In: Grisolia, S., Báguena, R., and Mayor, F. (eds.), The urea cycle, 325-349, Wiley and Sons, New York.
3. Alonso, E., and Rubio, V. (1983) Binding of N-acetyl-L-glutamate to rat liver carbamoyl phosphate synthetase (ammonia). Eur. J. Biochem. 135, 331-337.
4. García-España, A., Alonso, E., and Rubio, V. (1991) Influence of anions on the activation of carbamoyl phosphate synthetase (ammonia) by acetylglutamate. Arch. Biochem. Biophys. 288, 414-420.
5. Tatibana, M., and Shigesada, K. (1976) Regulation of urea biosynthesis by acetylglutamate-arginine system. In: Grisolia, S., Báguena, R., and Mayor, F. (eds.), The urea cycle, 301-311, Wiley and Sons, New York.
6. Meijer, A.J., Lof, C., Ramos, I.C., and Verhoeven, A.J. (1985) Control of ureogenesis. Eur. J. Biochem. 148, 189-196.
7. Raijman, L., and Jones, M.E. (1976) Purification, composition, and some properties of rat liver carbamyl phosphate synthetase (ammonia). Arch. Biochem. Biophys. 175, 270-278.
8. Tatibana, M., Shigesada, K., and Mori, M. (1976) Acetylglutamate synthetase. In: Grisolia, S., Báguena, R., and Mayor, F. (eds.), The urea cycle, 95-105, Wiley and Sons, New York.
9. Shigesada, K., Aoyagi, K., and Tatibana, M. (1978) Role of acetylglutamate in ureotelism. Variations in acetylglutamate levels and its possible significance in control of urea synthesis in mammalian liver. Eur. J. Biochem. 85, 385-391.
10. Alonso, E., Girbés, J., García-España, A., and Rubio, V. (1989) Changes in urea cycle-related metabolites in the

- mouse after combined administration of valproic acid and an amino acid load. Arch. Biochem. Biophys. 272, 267-273.
11. Grisolia, S., y Rubio, V. (1986) Algunos aspectos del ciclo de la urea. En: Ochoa, S., Leloir, L.F., Oro, J., y Sols, A. (eds.) Bioquímica y biología molecular, 173-180, Salvat, Barcelona.
 12. Stewart, P.M., and Walser, M. (1980) Short term regulation of ureogenesis. J. Biol. Chem. 255, 5270-5280.
 13. Meijer, A.J., and Hensgens, H.E.S.J. (1982) Ureogenesis. In: Sies, H. (ed.) Metabolic compartmentation, 259-286, Academic Press, London and New York.
 14. Brosnan, J.T. (1976) Factors affecting intracellular ammonia concentration in liver. In: Grisolia, S., Báguena, R., and Mayor, F. (eds.), The urea cycle, 95-105, Wiley and Sons, New York.
 15. Häussinger, D., Meijer, A.J., Gerok, W., and Sies, H. (1988) Hepatic nitrogen metabolism and acid-base homeostasis. In: Häussinger, D. (ed.) pH homeostasis. Mechanisms and control, 337-377, Academic Press, London.
 16. Häussinger, D., and Gerok, W. (1984) Hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism: impairment of glutamine synthetase in CCl₄ induced liver cell necrosis with no effect on urea synthesis. Chem. Biol. Interact. 48, 191-194.
 17. Metoki, K., and Hommes, F.A. (1984) A possible rate limiting factor in urea synthesis by isolated hepatocytes: the transport of ornithine into hepatocytes and mitochondria. Int. J. Biochem. 16, 1155-1157.
 18. Indiveri, C., Tonazzi, A., and Palmieri, F. (1992) Identification and purification of the ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem 207, 449-454.
 19. Bachmann, C., and Colombo, J.P. Orotic aciduria in urine and hyperammonemia. In: Lowenthal, A., Mori, A., and Marescau, B. (eds.), (1982) Urea cycle diseases, 313-319, Plenum Press, New York.



20. Walser, M. (1983) Urea cycle disorders and other hereditary hyperammonemic syndromes. In: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrikson, B.S., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (eds), The Metabolic Basis of Inherited Disease, 402-438, Mc Graw-Hill, New York.
21. Goldstein, A.S., Hoogenraad, N.J., Johnson, J.D., Fukanaga, K., Swierczewski, E., Cann, H.M., and Sunshire, P. (1974) Metabolic and genetic studies of a family with ornithine transcarbamylase deficiency. Pediatr. Res. 8, 5-12.
22. Hager, S.E., and Jones, M.E. (1967) A glutamine-dependent enzyme for the synthesis of carbamyl phosphate for pyrimidine biosynthesis in fetal rat liver. J. Biol. Chem. 242, 5674-5680.
23. Tatibana, M., and Shigesada, K. (1972) Two carbamyl phosphate synthetases of mammals: specific roles in control of pyrimidine and urea biosynthesis. Advances in Enzyme Regulation 10, 249-271.
24. Alonso, E., and Rubio, V. (1989) Orotic aciduria due to arginine deprivation: changes in the levels of carbamoyl phosphate and other urea cycle intermediates in mouse liver. J. Nutr. 119, 1188-1195.
25. Milner, J.A., Prior, R.L., and Visek, W.J. (1975) Arginine deficiency and orotic aciduria in mammals. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 150, 282-288.
26. Morris, J., and Rogers, Q.R. (1978) Ammonia intoxication in the near-adult cat as a result of a dietary deficiency of arginine. Science 199, 431-432.
27. Hatchwell, L.C., and Milner, J.A. (1978) Factors affecting amino acid induced orotic aciduria. J. Nutr. 108, 1976-1981.
28. Fico, M.E., Motyl, T., and Milner, J.A. (1984) Species comparison of the influence of ammonia on orotic acid and urea biosynthesis in liver. J. Nutr. 114, 613-621.
29. Paush, J.G., Keppler, D.O.R., and Gerok, W. (1977) Increased de novo pyrimidine nucleotide synthesis in liver induced by ammonium ions in amounts surpassing the urea cycle capacity. Eur. J. Biochem. 76, 157-163.

30. Kesner, L. (1965) The effect of ammonia administration on orotic acid excretion in rats. J. Biol. Chem. 240, 1722-1724.
31. Statter, M., Russel, A., Abzug-Horowitz, A., and Pinson, A. (1974) Abnormal orotic acid metabolism associated with acute hyperammonaemia in the rat. Biochem. Med. 9, 1-18.
32. Monks, A., Chisena, C.A., and Cysyk, R.L. (1985) Influence of ammonium ions on hepatic de novo pyrimidine biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 236, 1-10.
33. Rechcigl, M. Jr. (ed.) (1978) Handbook series in Nutrition and Food III, CRC Press, Inc., Cleveland, Ohio.
34. Kato, T., Sano, M., and Mizutani, N., (1987) Inhibitory effect of intravenous lysine infusion on urea cycle metabolism. Eur. J. Pediatr. 146, 56-58.
35. Ulman, E.A., Kari, F.W., Hevia, P., and Visek, W.J. (1981) Orotic aciduria caused by feeding excess lysine to growing rats J. Nutr. 111, 1772-1779.
36. Fico, M.E., Hassan, A.S., and Milner, J.A. (1982) The influence of excess lysine on urea cycle operation and pyrimidine biosynthesis. J. Nutr. 112, 1854-1861.
37. Hunter, A., and Down, C.E. (1945) The inhibition of arginase by amino acids. J. Biol. Chem. 157, 427-446.
38. Hensgens, H.E.S.J., and Meijer, A.J. (1980) Inhibition of urea-cycle activity by high concentrations of alanine. Biochem. J. 186, 1-4.
39. Ratner, S. (1973) Enzymes of arginine and urea synthesis. Adv. Enzymol. 39, 1-90.
40. Shimada, T., Noda, T., Tashiro, M., Murakami, T., Takiguchi, M., Mori, M., Yamamura, K.I., and Saheki, T. (1991) Correction of ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency in spf-ash mice by introduction of rat OTC gene. FEBS lett. 279, 198-200.

41. Wemdlar, P.A., Blanding, J.H., and Tremblay, G.C. (1983) Interaction between the urea cycle and the orotate pathway: studies with isolated hepatocytes. Arch. Biochem. Biophys. 224, 36-48.
42. Pausch, J., Rasenack, J., Häussinger, D., and Gerok, W. (1985) Hepatic carbamoyl phosphate metabolism. Role of cytosolic and mitochondrial carbamoyl phosphate in de novo pyrimidine synthesis. Eur. J. Biochem. 150, 189-194.
43. Wollenberger, A., Ristau, O., and Schoffa, G. (1960) Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. Pflügers. Arch. 270, 399-412.
44. Akerboom, T.P.M., Van der Meer, R., and Tager, J.M. Techniques for the investigation of intracellular compartmentation. Techniques in Metabolic Research, 1-33.
45. Cohen, S.M. (1987) ^{13}C and ^{31}P NMR study of gluconeogenesis: utilization of ^{13}C -labeled substrates by perfused liver from streptozotocin-diabetic and untreated rats. Biochemistry 26, 563-572.
46. GuthÖrlein, G., and Knappe, J. (1968) Structure and function of carbamoylphosphate synthase. Transitions between two catalytic inactive forms and the active form. Eur. J. Biochem. 7, 119-127.
47. Raijman, L. (1974) Citrulline synthesis in rat tissues and liver content of carbamoyl phosphate and ornithine. Biochem. J. 138, 225-232.
48. Alonso, E., and Rubio, V. (1985) Determination of N-acetyl-L-glutamate using high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 146, 252-259.
49. Penefsky, H.S. (1977) Reversible binding of P_i by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 252, 2891-2899.
50. Portolés, M., and Rubio, V. (1986) High-performance liquid chromatographic assay of argininosuccinate: its application in argininosuccinic aciduria and in normal man. J. Inher. Metab. Dis. 9, 31-38.

51. Ratner, S. (1975) Determination of argininosuccinate in normal blood serum and liver. Anal. Biochem. 63, 141-155.
52. Stajner, A., Suva, J., and Musil, F. (1968) The determination of orotic acid in the blood serum by means of the spectrophotometric method. Experientia 24, 116-117.
53. Lund, P. (1985) L-glutamine and L-glutamate. UV method with glutaminase and glutamate deshydrogenase. In: Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, S., and Grabl, M. (eds), Methods of enzymatic analysis, Weinheim, VCH Publishers, 357-336.
54. Bergmeyer, H.U., and Beutler, H.O. (1985) Ammonia. In: Bergmeyer, H.U. Methods of enzymatic analysis, th edn, vol. VIII. Weinheim, VCH Publishers, 454-461.
55. Möllering, H. (1985) L-aspartate and L-asparagine. In: Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, S., and Grabl, M. (eds), Methods of enzymatic analysis, Weinheim, VCH Publishers, 350-357.
56. Decker, K. (1985) Acetyl-CoA: Radiometric method. In: Bergmeyer, H.U. Methods of enzymatic analysis, th edn, vol. VIII. Weinheim, VCH Publishers, 193-200.
57. Instrucciones de trabajo. Metódicas manuales de los Laboratorios Boehringer.
58. Dubnoff, J.W. (1957) Glycocyamine and creatine. Methods Enzymol III, 635-639.
59. Kerschler, L., and Ziegenhorn, J. (1985) Urea. In: Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, S., and Grabl, M. (eds), Methods of enzymatic analysis, Weinheim, VCH Publishers, 444-453.
60. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
61. Alonso, E., and Rubio, V. (1989) Participation of ornithine aminotransferase in the synthesis and catabolism of ornithine in mice. Biochem. J. 259, 131-138.

62. Meijer, A.J., Lamers, W.H., and Chamuleau, R.A.F.M. (1990) Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. Physiol. Rev. 70, 701-748.
63. Lusty, C.J., Jilka, R.L., and Nietsch, E.H. (1979) Ornithine transcarbamylase of rat liver. Kinetic, physical, and chemical properties. J. Biol. Chem. 254, 10030-10036.
64. Jones, M.E. (1980) Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. Ann. Rev. Biochem. 49, 253-279.
65. Bender, D.A. (1975) Amino acid metabolism, John Wiley & Sons, New York.
66. Kawamoto, S., Ishida, H., Mori, M., and Tatibana, M. (1982) Regulation of N-acetylglutamate synthetase in mouse liver. Postprandial changes in sensitivity to activation by arginine. Eur. J. Biochem. 123, 637-641.
67. Saheki, T., Kusumi, S., Takada, S., and Katsunuma, T. (1975) Studies of rat liver argininosuccinate synthetase. I. Physicochemical, catalytic and immunochemical properties. J. Biochem. 81, 687-696.
68. McGivan, J.D., Bradford, N.M., and Beavis, A.D. (1977) Factors influencing the activity of ornithine aminotransferase in isolated rat liver mitochondria. Biochem. J. 162, 147-156.
69. Rubio, V., Britton, H.G., Grisolia, S., Sproat, B.S., and Lowe, G. (1981) Mechanism of activation of bicarbonate ion by mitochondrial carbamoyl phosphate synthetase: formation of enzyme-bound adenosine diphosphate from the adenosine triphosphate that yields inorganic phosphate. Biochemistry 20, 1969-1974.
70. Rubio, V., Britton, H.G., and Grisolia, S. (1983) Activation of carbamoyl phosphate synthetase by cryoprotectants. Mol. Cell. Biochem. 53/54, 279-288.
71. Elliott, K.R.F., and Tipton, K.F. (1974) Product inhibition studies on bovine liver carbamoyl phosphate synthetase. Biochem. J. 141, 817-824.

72. Krebs, H.A., Hems, R., and Lund, P. (1973) Some regulatory mechanisms in the synthesis of urea in the mammalian liver. Adv. Enzyme Regul. 11, 361-377.
73. Cohen, N.S., Cheung, C.W., and Raijman, L. (1980) The effects of ornithine on mitochondrial carbamyl phosphate synthesis. J. Biol. Chem. 255, 10248-10255.
74. Kaysen, G.A., and Strecker, H.J. (1973) Purification and properties of arginase of rat kidney. Biochem. J. 133, 779-788.
75. Dubois, N., Cavard, C., Chasse, J.F., Kamoun, P., and Briand, P. (1988) Compared expression levels of ornithine transcarbamylase and carbamylphosphate synthetase in liver and small intestine of normal and mutant mice. Biochim. Biophys. Acta 950, 321-328.
76. Visek, W.J. (1985) Arginine and disease states. J. Nutr. 115, 532-541.
77. Rubio, V., Cervera, J., Lusty, C.J., Bendala, E., and Britton, H.G. (1991) Domain structure of the large subunit of Escherichia coli carbamoyl phosphate synthetase. Location of the binding site for the allosteric inhibitor UMP in the COO-terminal domain. Biochemistry 30, 1068-1075.

3. N-ACETIL-L-GLUTAMATO EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL: INVESTIGACIONES SOBRE SU ORIGEN Y
METABOLISMO.

3.0 ABREVIATURAS

NAG y acetilglutamato: N-acetil-L-glutamato.

NAA y acetilaspartato: N-acetil-L-aspartato.

NAAG y acetilaspartilglutamato: N-acetil-L-aspartilglutamato.

LANAT: L-aspartato-N-acetiltransferasa.

3.1 INTRODUCCION

La única función conocida del N-acetil-L-glutamato en mamíferos es la de ser el activador alostérico fisiológicamente esencial de la carbamil fosfato sintetasa I [1-4], el enzima que cataliza el primer paso comprometido en la síntesis de urea [5-8]. La función principal de este ciclo metabólico es la detoxificación del amonio derivado del catabolismo proteico [8,9]. En los vertebrados ureotélicos, tanto la carbamil fosfato sintetasa I como el acetilglutamato se localizan en la mitocondria de los órganos responsables de la síntesis de urea y citrulina (hígado e intestino, respectivamente), pero no se encuentran en cantidades sustanciales en riñón, bazo, y corazón, tres órganos que no sintetizan citrulina [1,10]. Sólo el hígado ureotélico posee toda la dotación enzimática necesaria para sintetizar urea; otros órganos poseen parte de esta dotación, utilizándola para la síntesis de arginina (intestino y riñón) [11-14].

Los niveles hepáticos de acetilglutamato son, en general, relativamente bajos (10-100 nmoles/g de tejido; ver

Resultados de la Sección 2 y [1,4,15,16]), si bien pueden incrementarse de forma rápida y considerable [16,16a] en situaciones experimentales que impliquen una mayor necesidad de funcionamiento del ciclo de la urea, habiéndose descrito valores de hasta 300 nmoles/g de hígado [17]. Existe una correlación entre el nivel de acetilglutamato y la síntesis de citrulina [16,16a], por lo que se considera al acetilglutamato un determinante metabólico importante en el funcionamiento y control del ciclo de la urea (ver Sección 2), a pesar de que este punto ha sido objeto de discusión [18-20].

Otra función que se ha propuesto en mamíferos para el acetilglutamato es la de activar la glutaminasa hepática dependiente de fosfato [21]. Sin embargo, la K_a para esta activación (6-8 mM) es tan alta en relación a las concentraciones hepáticas descritas de acetilglutamato (ver Resultados de esta Sección, de la Sección 2, y [1,4,9,15-17]), que hace improbable que esta función tenga "in vivo" algún significado real.

En microorganismos y plantas el NAG es precursor biosintético de la ornitina, siendolo por tanto de la arginina sintetizada "de novo" [6,11,22]. Esta es probablemente su función filogenéticamente más antigua. En esta vía metabólica, el acetilglutamato es el primero de una serie de aminoácidos N-acetilados que finaliza con la N-acetilornitina, a partir de la cuál se obtiene, bien por deacilación o transacetilación al glutamato, ornitina [22].

En los mamíferos no ha podido detectarse la presencia de esta ruta [11,12]. En estos organismos la síntesis de arginina tiene lugar a partir de glutamato sin la intervención de compuestos N-acetilados [11-14].

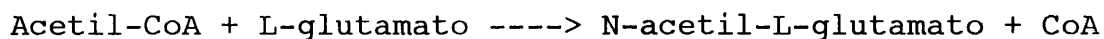
En mamíferos, por tanto, dada la presencia de carbamil fosfato sintetasa I sólo en el hígado e intestino, existía la creencia generalizada de que la distribución del acetilglutamato era la misma que la de la sintetasa [1]. Sin embargo, hace ya casi 30 años se describió [23-25] la presencia de acetilglutamato, a niveles comparables o incluso mayores a los del hígado ureotélico, en el cerebro de mamífero, un órgano que no contiene cantidades sustanciales de carbamil fosfato sintetasa I [5,26]. Este hallazgo quedó en el olvido hasta que experimentos de nuestro grupo en que estuvimos muy involucrados demostraron concluyentemente [27], utilizando varias aproximaciones metodológicas, que el N-acetil-L-glutamato está presente en cerebro a concentraciones comparables a las observadas en el hígado de los organismos ureotélicos, que su localización subcelular en el sistema nervioso es similar a la del N-acetil-L-aspartato, es decir, predominantemente citosólica, y que su distribución en distintas áreas del cerebro difiere de la del N-acetil-L-aspartato. También se excluyó concluyentemente en dichos experimentos que hubiera carbamil fosfato sintetasa I en el cerebro (límite de detección, 0.18% del nivel hepático) y se demostró la presencia de acetilglutamato en el cerebro de pollo, un animal no ureotélico. Por todo ello se concluyó que el acetilglutamato cerebral no está implicado en la

ureogénesis, quedando enteramente en el aire cómo se sintetiza y se degrada y cuál es su función en el sistema nervioso central.

Recientemente se ha descrito [28] que el NAG inhibe "in vitro" con un K_i de 58 μM (la concentración de NAG en cerebro es de este mismo orden, ver Resultados) a la dipeptidasa encargada de hidrolizar el dipéptido cerebral N-acetil-L-aspartil-glutámico (NAAG) por el enlace peptídico existente entre el aspartato y el glutamato. Existen evidencias importantes en favor de que el NAAG sea un neurotransmisor [29], por lo que sería concebible que el acetilglutamato estuviera implicado en la modulación de los niveles de NAAG, influyendo en su degradación.

En cuanto al metabolismo del acetilglutamato, se han descrito dos enzimas que catalizan la síntesis de acetilglutamato en diferentes organismos: la acetilglutamato sintetasa [30-33] y la ornitina acetiltransferasa [22,34-36].

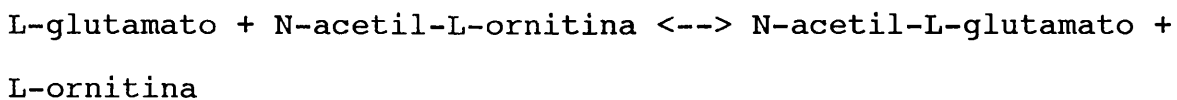
La acetilglutamato sintetasa (EC 2.3.1.1.) cataliza la reacción:



Este enzima es modulado alostéricamente por la arginina. Este aminoácido inhibe (inhibición por producto final) a la enzima de organismos inferiores, en los que la enzima cataliza el primer paso en la vía de síntesis "de novo" de

ornitina [6,30,31], pero es activadora de la acetilglutamato sintetasa en los organismos ureotélicos [32], en los que el acetilglutamato actúa como activador alostérico de la carbamil fosfato sintetasa I [1,6,32,33]. En estos últimos organismos, el elevado K_m de la acetilglutamato sintetasa para el glutamato [33] hace de ella un buen sensor del nivel de compuestos nitrogenados en equilibrio con el glutamato, lo que es de importancia para modular la actividad de síntesis de urea [8].

La ornitina acetiltransferasa (EC 2.3.1.35), se encuentra en la mayoría de los organismos que sintetizan ornitina a partir de acetilglutamato [22,34-36]. Cataliza de forma reversible la reacción:

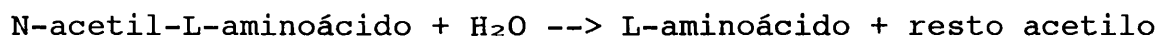


No se ha descrito esta actividad transacetilasa en vertebrados [37], ni se ha encontrado acetilornitina en hígado e intestino de rata [11]. En los organismos que poseen la transacetilasa también existe con mucha menor actividad la acetilglutamato sintetasa, que tiene una función puramente cebadora, de iniciar la síntesis de acetilglutamato, pues luego éste se regenera por transacetilación desde la acetilornitina al glutamato, catalizada por la transacetilasa [36].

Otro enzima descrito recientemente [38], la L-aspartato-N-acetiltransferasa (L-ANAT) podría participar en la síntesis

de acetilglutamato. Este enzima cataliza normalmente la síntesis de N-acetil-L-aspartato (ver más adelante), pero experimentos "in vitro" con análogos del L-aspartato han demostrado [38] que la L-aspartato N-acetiltransferasa es capaz de utilizar también glutamato, aunque con una eficacia considerablemente menor que para el aspartato. En contraposición, la acetilglutamato sintetasa es muy específica para el glutamato [33], no siendo capaz de usar aspartato.

En cuanto a la degradación del acetilglutamato, el enzima que cataliza dicha degradación en el hígado es la aminoacilasa I (EC 3.5.1.14) [37]. Esta enzima cataliza la reacción de hidrólisis [39]:



La aminoacilasa presenta una elevada actividad en riñón, hígado y páncreas [40], y, aunque inicialmente, dada su baja actividad, no se había detectado en cerebro [40], Grisolia y cols. [41] han descrito actividad de formilasa y Marks y cols. [42] han descrito actividad de acilasa compatibles con la presencia de aminoacilasa I en el cerebro. La aminoacilasa I es una enzima citosólica que hidroliza una variedad de acetil-derivados de L-aminoácidos con la excepción del acetil-aspartato, sobre el que carece de actividad [39]. El pH óptimo es diferente para cada sustrato [37,43], siendo para el acetilglutamato ligeramente ácido [27]. Como se verá en esta memoria de Tesis, una actividad con características de

aminoacilasa I es probablemente responsable de la degradación del acetilglutamato cerebral.

Aunque la ornitina acetil transferasa es capaz de degradar acetilglutamato, ya que cataliza una trans-acetilación reversible, su función fisiológica es la contraria [36], no estando, además, presente en animales [37].

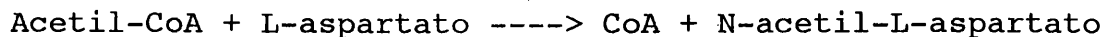
Es importante centrar el tema de esta sección con respecto al hecho bien conocido de que el sistema nervioso central es extremadamente rico en un L-aminoácido N-acetilado homólogo del acetilglutamato, el N-acetil-L-aspartato. Este compuesto fue descubierto por Tallan y cols. [44,45] en el sistema nervioso de diferentes especies de mamíferos, aves y reptiles. La concentración en cerebro de mamíferos y aves es muy alta (6-10 mM; ver Resultados y [44,45]), siendo superada únicamente, entre los aminoácidos, por el glutamato [46]. Su nivel es menor en el cerebro de reptiles y peces que en el de mamíferos, y es prácticamente nulo en anfibios e invertebrados [45,47]. En tejidos no nerviosos, la concentración de NAA es despreciable (<1%) frente a su nivel en el sistema nervioso central (ver Resultados y [44,47]). Su distribución regional cerebral es decreciente en el sentido rostro-caudal [45]. Se localiza preferentemente en la materia gris [45,48,49], y es mayoritariamente citosólico [25,27]. Su nivel prenatal es bajo y creciente con el desarrollo, alcanzando el máximo, en el caso de la rata, alrededor del vigésimo día tras el nacimiento (ver Resultados y

[45,50,51]). El NAA parece ser un compuesto neuronal [49,52,53], aunque más recientemente se ha encontrado en cantidades elevadas en células progenitoras de los oligodendrocitos tipo 2 y en oligodendrocitos inmaduros [54].

Inicialmente se consideró al NAA como un metabolito inerte dado su alto nivel cerebral y su bajo recambio metabólico [49,55]. Aunque se le han propuesto desde entonces numerosas funciones, como la de ser precursor del neurotransmisor NAAG [56,57], la de ser un anión para cubrir el déficit de aniones en el tejido neural [55] y la de incrementar los niveles de cAMP [58], la función más ampliamente aceptada es la de ser transportador de restos acetilo desde la mitocondria al citosol para la biosíntesis de ácidos grasos cerebrales [59-61]. Aunque como hemos comentado, su nivel es bastante constante, se ha encontrado una disminución cerebral de este metabolito en individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana [62], en la enfermedad de Huntington [63] y en la enfermedad de Alzheimer [64], aunque la mayor alteración descrita en su metabolismo ocurre en la enfermedad de Canavan, debida al déficit de aspartoacilasa, el enzima que lo degrada específicamente [65]. En esta enfermedad hay un gran aumento en los niveles de acetilaspártato, apareciendo a concentración elevada en la orina [66], y existiendo en los enfermos importantes anomalías neurológicas (leucodistrofia), con desmielinización.

Como ya se indicó antes, la L-aspartato-N-acetil-

transferasa (EC 2.3.1.17), cataliza la reacción de síntesis de acetilaspártato:



En los vertebrados, esta enzima sólo se detecta en el sistema nervioso asociada a membranas [38]. Es bastante selectiva para el L-aspartato y sólo admite D-aspartato o L-glutamato con un 10% de eficacia en relación al aspartato [38]. Su nivel aumenta en sentido rostrocaudal [38], lo que sorprende, pues es inverso al de su producto [27], y su nivel durante el desarrollo postnatal [61] se correlaciona muy bien con el nivel de NAA. Los resultados del presente trabajo están de acuerdo con que este enzima sea responsable de la síntesis del acetilglutamato cerebral.

La degradación del acetilaspártato se lleva a cabo por la aminoacilasa II [38] (aspartoacilasa, EC 3.5.1.15).



Este enzima es citosólico [67] o está muy débilmente asociado a membrana [48]. Hidroliza el N-acetil-L-aspartato con un alto grado de especificidad [39], por lo que también se denomina aspartoacilasa. Está presente en el sistema nervioso y, curiosamente, también en otros tejidos no nerviosos, principalmente riñón e hígado, en los cuales no existen cantidades apreciables de NAA [67]. Como ya se ha indicado, el déficit congénito de aminoacilasa II va asociado

a la enfermedad de Canavan [65].

Otro compuesto N-acetilado presente en el sistema nervioso a concentración relativamente elevada es el N-acetil-L-aspartilglutamato (NAAG). Fue descubierto por Curatolo y cols. [68] y Miyamoto y cols. [69]. El NAAG es un dipéptido neurotransmisor abundante y ampliamente distribuido en el sistema nervioso de vertebrados (mamíferos, reptiles, aves, anfibios, etc.), encontrándose también en invertebrados (anémonas, planarias) [29]. No se encuentra, o su nivel es <1% del nivel cerebral, en tejidos no nerviosos de vertebrados [47,50]. La concentración en el cerebro de mamíferos aumenta en sentido rostrocaudal [52,68,70]. El nivel de NAAG es mayor en la sustancia blanca que en la gris [47]. Los niveles cerebrales neonatales son aproximadamente iguales a los del cerebro adulto [47,50,51]. El NAAG está concentrado en subpoblaciones de neuronas [29,71,72], aunque recientemente se ha encontrado en células gliales en cultivo [73]. Se ha descrito presencia de NAAG en vesículas sinápticas de la retina de anfibios [74] y es liberado mediante despolarización de forma dependiente de calcio en cortes de corteza piriforme de rata [75], en sinaptosomas de cerebro de rata [76], y en el sistemas visual del pollo [77]. El NAAG induce una serie de respuestas neuronales que incluyen la activación de baja potencia de receptores NMDA [78], influencia la liberación de otros neurotransmisores [79], o disminuye los niveles intracelulares de cAMP vía receptor metabotrópico del glutamato [80].

Sobre la síntesis de NAAG se sabe muy poco [29]. Su degradación la lleva a cabo una dipeptidasa ácida de dipéptidos N-acetilados α -unidos, que degrada el NAAG a NAA y glutamato [28,81-85]. Esta enzima es una metalopeptidasa clorodependiente unida a membrana [28,81-85]; posee un K_m para el NAAG de 540 nM [28], y parece encontrarse en la cara externa de la membrana tanto de neuronas como de células gliales [82,83]. Así, la liberación sináptica de NAAG puede tener dos efectos fisiológicos; por sí mismo al unirse a receptores NMDA [84], o a través del glutamato resultante tras su degradación por la dipeptidasa en el espacio extracelular [82-84].

La presente sección de esta memoria de Tesis es una continuación de nuestro trabajo anterior sobre el acetilglutamato cerebral [27]. Ahora hemos investigado más extensamente la distribución (incluyendo estudios en tumores) y cambios con el desarrollo de este compuesto, comparándolo con los niveles de NAA y NAAG. De esta comparación, y del estudio de actividades enzimáticas con capacidad de sintetizar y degradar acetilglutamato en el cerebro, elevaremos la propuesta de que este acilaminoácido es sintetizado por el mismo enzima que el acetilaspártato, la L-aspartato-N-acetiltransferasa, y es degradado por una aminoacilasa de tipo I, diferente a la aspartoacilasa que degrada acetilaspártato.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Productos químicos

Glutamato, aspartato, N-acetil-L-glutamato, N-acetil-L-aspartato, N-acetil-L-aspartil-L-glutamato y N-acetil-L-glutamina se obtuvieron de Sigma. Las resinas de intercambio catiónico AG 50W-X8 (forma H⁺) y de intercambio aniónico AG 1-X8 (forma acetato), ambas de tamaño de malla de 200-400, se obtuvieron de Bio Rad. La forma formato de la resina AG 1-X8 se preparó a partir de la de acetato tras lavarla exhaustivamente con ácido fórmico 1 M y posterior lavado con agua hasta alcanzar un pH 5-6. El agua desionizada y las soluciones para HPLC se obtuvieron como se describe en el capítulo anterior.

L-[2,3,4-³H]Glutamato (46 Ci/mmol), L-[U-¹⁴C]glutamato (285 Ci/mol), L-[4-¹⁴C]aspartato (54 Ci/mol), y el Na₂¹⁴CO₃ (50 Ci/mol) se obtuvieron de Amersham. L-[2,3-³H]Glutamato (15-25 Ci/mmol) y L-[1-¹⁴C]glutamato (55 mCi/mmol) se obtuvieron de New England Nuclear. N-Acetil-L-[4-¹⁴C]-aspartato, N-acetil-L-[2,3,4-³H]glutamato, N-acetil-L-[U-¹⁴C]glutamato y N-acetil-L-[2,3-³H]glutamato de las mismas actividades específicas que las de los aminoácidos de partida se sintetizaron mediante reacción con anhídrido acético [3] (ver Métodos).

La carbamil fosfato sintetasa I, la ornitina trans-carbamilasa y la aminoacilasa I se obtuvieron como se indica

en la Sección 2. La aminoacilasa I de riñón de rata se purificó como describe Birnbaum [39]. La creatina quinasa (de músculo de conejo, cristalina) se obtuvo de Boehringer. Piruvato quinasa (de músculo de conejo), láctico deshidrogenasa (de músculo de conejo) y albúmina de suero bovino (esencialmente libre de ácidos grasos) se obtuvieron de Sigma.

3.2.2 Animales y tejidos

Se utilizaron ratas Wistar (200-250 g de peso) y ratones albinos tipo Swiss (20-25 g de peso), de Interfauna Ibérica (Barcelona), alimentados "ad libitum" con comida estandar para roedores con un contenido proteico del 14.5%. Los pollos se obtuvieron de la granja avícola Penyes Males (Massanasa, Valencia). Ranas (50-60 g de peso) se obtuvieron de Ranassa (Orense) y fueron sacrificadas inmediatamente al recibirlas. Se obtuvo un cerebro de cordero de un matadero local (Mercavalencia); dicho cerebro fue homogeneizado en dicho matadero antes de 10 min desde el sacrificio del animal. Pollos, roedores y ranas fueron sacrificados mediante decapitación e inmediatamente (aproximadamente 1 min) se extrajo el cerebro y/o el hígado.

El cerebro y glándula suprarrenal de un cerdo se obtuvieron de un matadero local (Paterna, Valencia) y tanto la sustancia gris y blanca del cerebro, como la médula adrenal y la corteza de la glándula suprarrenal fueron separadas mediante disección sobre una placa petri enfriada

sobre hielo. Los tumores humanos así como tejido cerebral normal (obtenido junto con el tumor) se obtuvieron en intervenciones quirúrgicas en el Hospital Clínico Universitario y en el Hospital La Fe (Valencia) antes de 5 min desde la extracción quirúrgica. Estas muestras fueron mantenidas a 0-4°C hasta la homogenización (antes de 1 h de la obtención).

Para investigar el desarrollo pre y postnatal de los metabolitos en cerebro de rata, se aparearon ratas hembras con machos de la misma cepa, confirmándose la cópula mediante observación microscópica de esperma en la vagina. Las ratas preñadas se colocaron en cajas individuales y a los -6, -2, 0, 4, 7, 15, y 25 días con respecto al día del parto, los fetos o crias fueron sacrificados por decapitación y los cerebros (o cabezas, para el día -6) fueron extraídos y homogeneizados para la determinación de metabolitos.

Las regiones cerebrales (corteza, hipocampo, hipotálamo, estriado, cerebelo y el conjunto formado por puente y bulbo raquídeo) de rata fueron obtenidas mediante disección del cerebro sobre una placa de Petri enfriada sobre hielo. Dichas regiones cerebrales se homogeneizaron antes que transcurriesen 10 minutos desde la decapitación.

Todos estos tejidos se homogeneizaron lo más rápidamente posible en 5 volúmenes de HClO₄ 0.5 M frío o se procesaron o congelaron a -70°C para la determinación de las actividades enzimáticas. Cuando la muestra resultó muy pequeña (algún

tumor humano, etc.), ésta se homogeneizó en 3 ml de HClO₄ 0.5 M frío (el suficiente para poder usar el homogeneizador Ultraturrax).

3.2.3 Aparatos

La mayoría de los aparatos usados en esta parte del trabajo se describen en este mismo apartado de la Sección anterior. Específicamente en esta parte se usó una batidora Taurus (Madrid) para homogeneizar el cerebro de cordero en el mismo matadero. La ultracentrífuga utilizada, modelo L8-M con rotor angular 50Ti, fue de Beckman. El sistema cromatográfico de HPLC usado fue el descrito en la Sección 2, excepto por que además se usó un detector de absorción óptica (modelo 440) y una columna de intercambio aniónico Partisil SAX (10 μ Radial Pak, 8x100 mm) dispuesta en un módulo de compresión radial (módulo Z), todo ello de Waters. Se usó posteriormente otra columna de intercambio aniónico de alta presión (Partisil 10 SAX, 25 cm) de Whatman.

3.3 METODOS

3.3.1 Síntesis de acetilglutamato y acetilaspartato radiactivos

Se utilizaron glutamato o aspartato radiactivos de las actividades específicas que se indican en "Material" y se acetilaron como describe Marshall y cols. [3]. Antes de acetilar el aminoácido, se purificó mediante adsorción a una columna de AG 50W-X8 de 0.2 ml preparada en una jeringuilla de tuberculina. Se lavó la columna sucesivamente con 0.6 ml de HCl 0.1 N y 0.4 ml de HCl 0.5 N, y se eluyó el aminoácido con 1.2 ml de HCl 1 N. Este último eluido se liofilizó hasta sequedad y el residuo se resuspendió en 100 μ l de agua y se neutralizó con KOH 0.1 M. Inmediatamente se añadieron 100 μ l de anhídrido acético (Merck) y se agitó vigorosamente en un vórtex hasta que se formó una sóla fase. El anhídrido acético que no reaccionó se hidrolizó añadiendo 100 μ l de agua y agitando (vórtex) hasta la formación de una sóla fase. Esta mezcla se liofilizó hasta sequedad y el residuo se resuspendió en 0.5 ml de HCl 10 mM y se aplicó a otra columna de 0.2 ml de AG 50W-X8. En esta columna, el glutamato o aspartato acetilados no se retienen, mientras que los aminoácidos no acetilados quedan retenidos. Se recogió el percolado más un lavado de 200 μ l de HCl 10 mM y las muestras se neutralizaron con KOH 0.1 M y se congelaron a -20°C . El grado de acetilación, estimado mediante la columna de AG 50W-X8, fue siempre próximo al 100%. El acetilglutamato fue repurificado mediante adsorción a una columna de AG 1-X8

(formato) de 0.7 x 6 cm. Antes de su aplicación, la muestra fue acidificada con 10 mM ácido fórmico (concentración final). La columna se lavó con 50 ml de ácido fórmico 0.1 N y se eluyó con ácido fórmico 1 N (8 aplicaciones de 2 ml). Las fracciones con radiactividad sustancial se liofilizaron, el residuo se resuspendió en agua y se neutralizó como se describió anteriormente. La pureza del acetilglutamato, establecida mediante incubación durante 10 min a 37°C con 0.5 mg de aminoacilasa en 25 μ l de tampón Tris-HCl 0.5 M pH 7.5 y posterior adsorción del glutamato formado en una columna de AG 50W-X8, fue siempre superior al 99%. Las actividades específicas del acetilaspártato y acetilglutamato sintetizados fueron la de los aminoácidos originales (ver Material).

3.3.2 Obtención de fracciones subcelulares

La corteza cerebral de rata se homogeneizó a 0°C en nueve volúmenes de una solución de sacarosa 0.32 M llevada a pH 7.2 con NaOH, utilizando un homogeneizador de Potter-Elvehjem con émbolo de teflón. Todos los pasos se realizaron a 0-4°C. El homogeneizado se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos para obtener el precipitado de baja velocidad (P₁: fracción nuclear cruda); el sobrenadante se centrifugó a 12000 x g durante 30 minutos para separar el precipitado de alta velocidad (P₂: fracción mitocondrial cruda, que incluye además membranas de mielina y sinaptosomas) y el sobrenadante final (S: fracción citosólica) [86]. Estas fracciones subcelulares se utilizaron para ensayos de actividad

enzimática (ver más adelante) o para determinar acetilglutamato.

3.3.3 Determinación de acetilglutamato, acetilaspártato y acetilaspártilglutamato (Fig. 3.1)

El procedimiento, ha sido publicado ya [27], y se esquematiza en la figura 3.1. Excepto cuando se indica, las operaciones se realizaron a 0-4°C. El tejido se homogeneizó en 5 volúmenes de HClO₄ 0.5 M, (homogeneizador Ultra-turrax o, para muestras muy grandes, batidora Taurus). Los precipitados (P₁ y P₂) del fraccionamiento subcelular se homogeneizaron en un homogeneizador de Potter-Elvehjem con 4 ml de HClO₄ 0.5 M, mientras que a la fracción soluble (S) se le añadió HClO₄ del 70% hasta alcanzar una concentración de 0.5 M HClO₄, y se homogeneizó del mismo modo que los precipitados. Tras 15 minutos a 0°C se centrifugaron los homogeneizados a 6000 x g durante 15 minutos. Los precipitados se disolvieron en NaOH 0.2 M (200 ml/g de tejido inicial) para determinar proteína [87]. A los sobrenadantes se les añadió una traza de N-acetil-L-[³H]glutamato y N-acetil-L-[¹⁴C]-aspártato para seguir y corregir la recuperación de ambos compuestos; a continuación se ajustó el pH a 7 con KOH 10 N y, tras 10 minutos a 0°C, el KClO₄ se eliminó mediante centrifugación a 6000 x g durante 15 minutos. Una cantidad de sobrenadante correspondiente a <1 g de tejido se pasó por una columna de AG 50W-X8 de 0.7 x 5.5 cm, para retener los aminoácidos, pero no acetilglutamato, acetilaspártato y acetilaspártilglutamato, recogiendo el percolado, mezclado

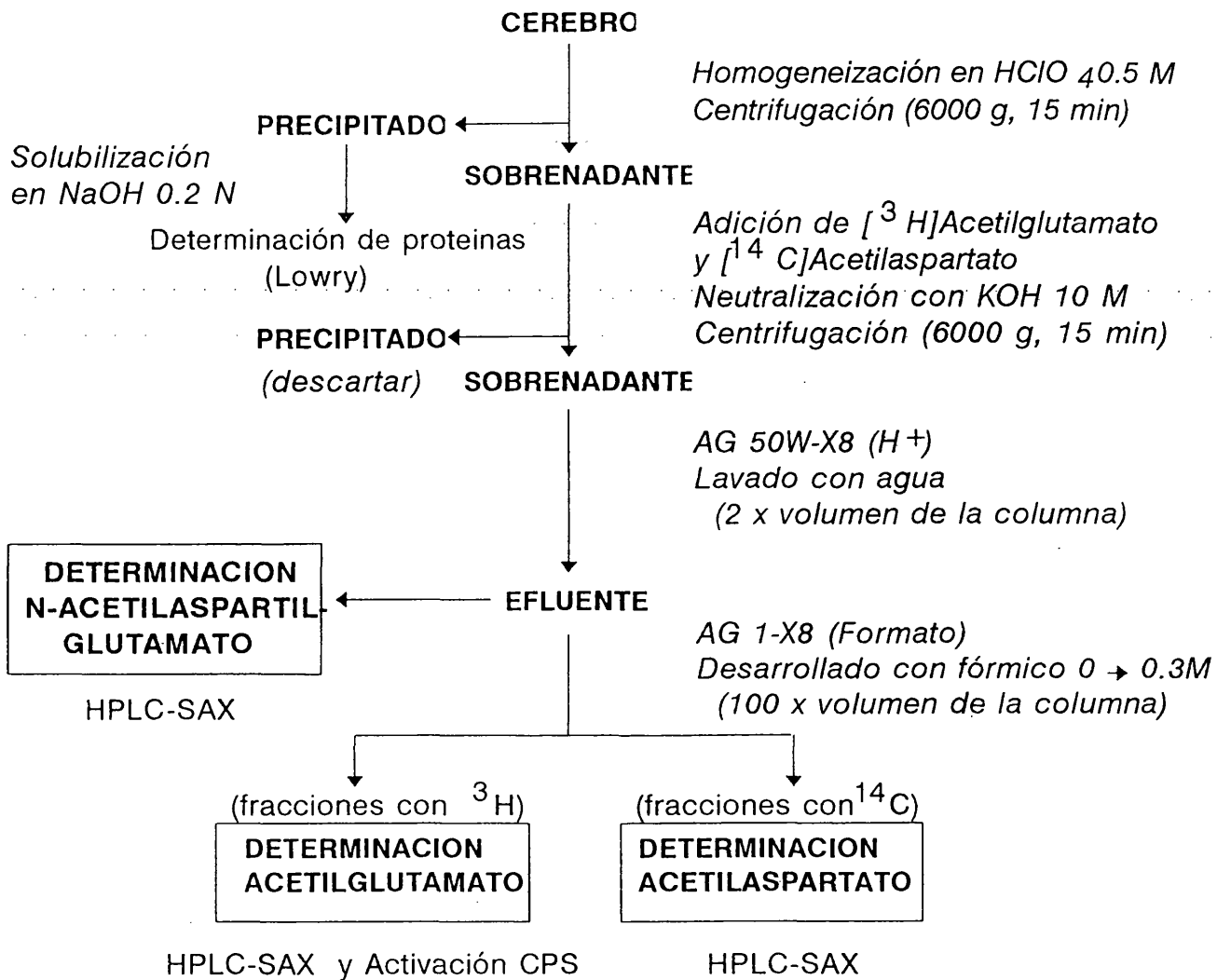


Figura 3.1 Determinación de acetilglutamato, acetilaspartato y acetilaspartilglutamato cerebrales

con un lavado con agua de dos veces el volumen de columna. Una alícuota de este eluido se utilizó directamente para la determinación de NAAG mediante HPLC-SAX [52]. El eluido se aplicó a una columna de AG 1-X8, formato, de 0.7 x 5.5 cm, y tras lavar con 10 volúmenes de H₂O, se inició un gradiente lineal de 500 ml entre 0 y 0.3 M de ácido fórmico. La velocidad de flujo fue de 0.3 ml/min, recogién dose fracciones automáticamente cada 9 min. El acetilglutamato y el acetil-aspartato se eluyeron como picos adyacentes bien resueltos (Fig. 3.2). El acetilglutámico se determinó mediante HPLC-SAX tras reunir las fracciones de su pico y concentrar la muestra por evaporación bajo presión reducida (Rotavapor). El NAA se determinó mediante HPLC-SAX a partir de su pico. La radiactividad en cada pico se utilizó para estimar y corregir las pérdidas (recuperación >88%).

La determinación de NAG, NAA y NAAG mediante HPLC-SAX [27,52], se basa en la detección a 214 nm de los picos para estos compuestos, separados mediante HPLC utilizando una columna de intercambio aniónico Partisil SAX y elución isocrática con fosfato potásico 0.05 M pH 4.6 (Fig. 3.3).

En ocasiones se determinó también el acetilglutamato por su capacidad de activar a la carbamil fosfato sintetasa I. El ensayo radiométrico se describe en [27]. La recta patrón utilizada se ilustra en la figura 3.4.

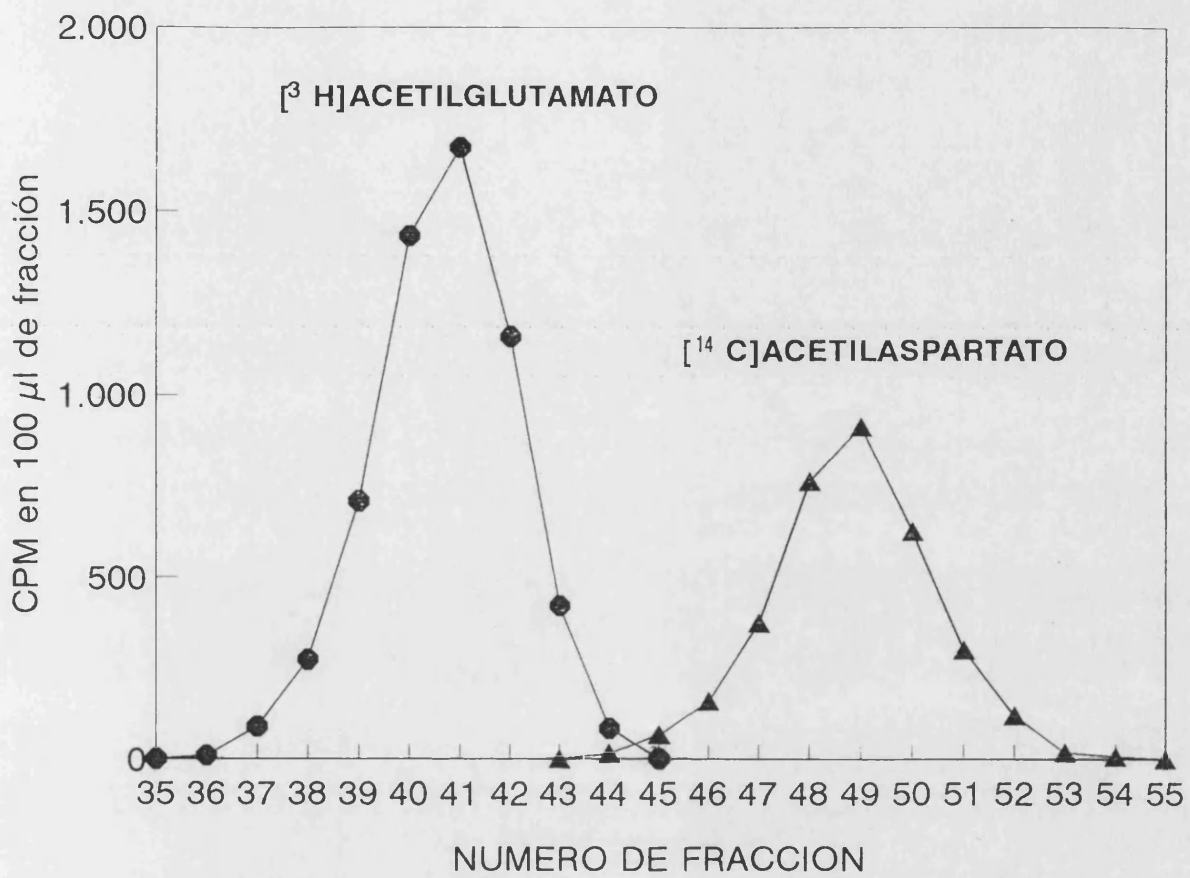


Figura 3.2. Separación de acetilglutamato y acetilaspargato mediante cromatografía en AG 1-X8.

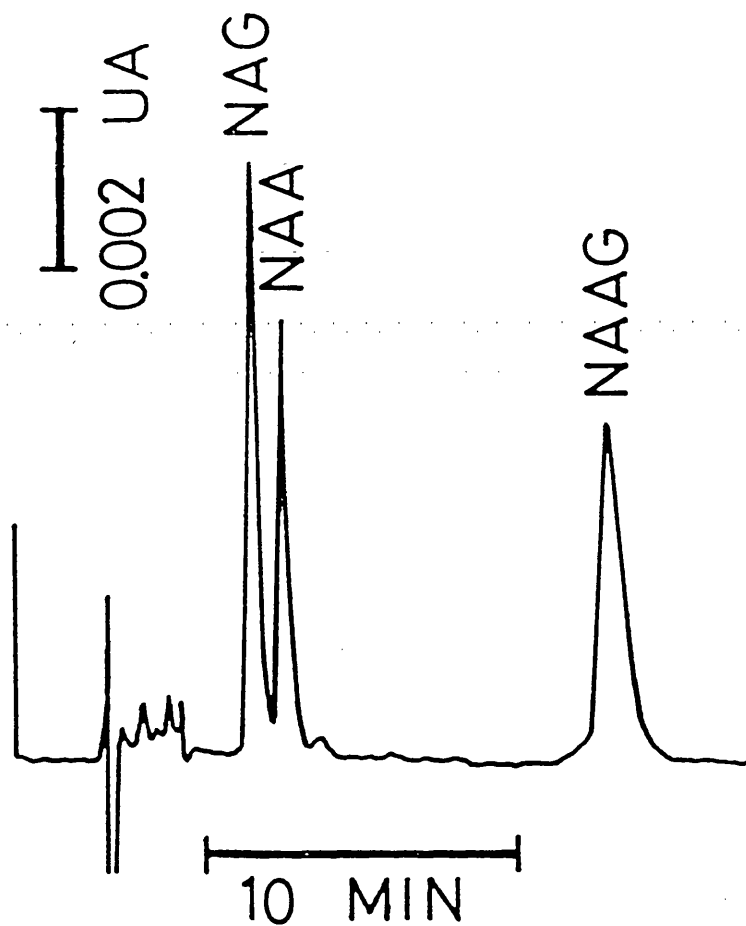


Figura 3.3 Cromatograma típico obtenido por HPLC-SAX. La línea vertical al inicio del cromatograma corresponde a la inyección en el sistema. La figura corresponde al registro obtenido a 214 nm tras la inyección de una mezcla de N-acetil-L-glutamato (NAG), N-acetil-L-aspartato (NAA) y N-acetil-aspartilglutamato (NAAG) comerciales (2 nmoles de cada uno).

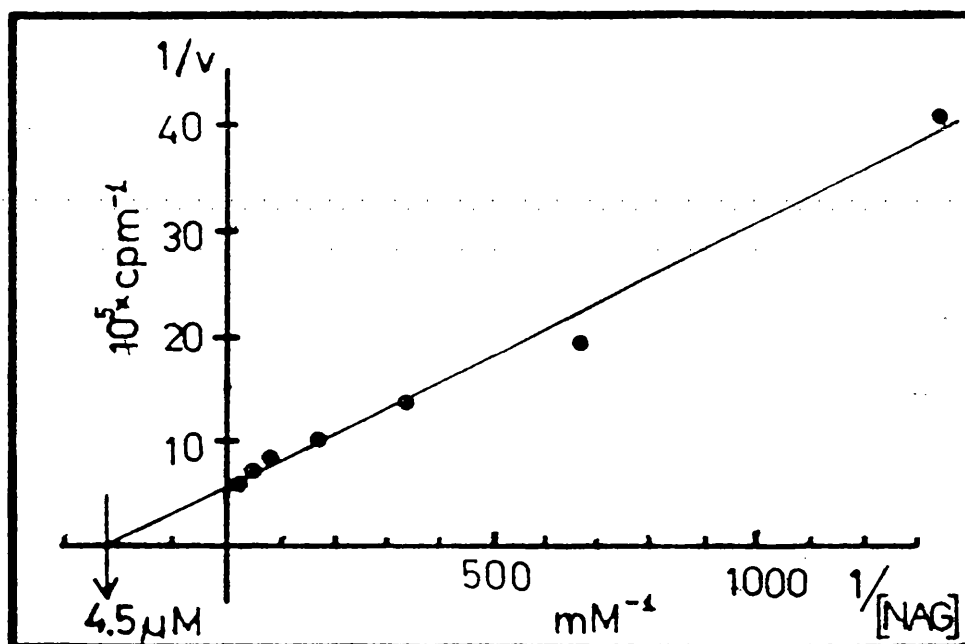


Figura 3.4 Dependencia de la actividad carbamil fosfato sintetasa I con respecto a la concentración de acetylglutamato. Representación de dobles inversos. Las concentraciones de N-acetil-L-glutamato en nuestros problemas se estimó por interpolación en esta recta patrón.

3.3.4 Determinación de N-acetil-L-glutamina

La acetilglutamina se determinó como glutamina mediante el método de HPLC-OPA [15] después de eliminar la glutamina endógena del tejido cerebral y de deacilar la acetilglutamina enzimáticamente con aminoacilasa I. El procedimiento de homogeneización es el usado para el acetilglutamato (ver más arriba). Los extractos neutralizados se aplicaron a una columna de AG 50W-X8 (0.46 x 1.15 cm); la columna se lavó con 0.6 ml de H₂O y el efluente (que contiene acetilglutamina pero no glutamina) se liofilizó. El liofilizado se disolvió en 0.2 ml de tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0 conteniendo 17 µg de aminoacilasa I comercial, y la mezcla se incubó 1 h a 37°C. La incubación se paró enfriando a 0°C en un baño de agua-hielo, y se determinó la glutamina producida mediante HPLC, tras derivatizar la muestra con OPA [15]. Los resultados se corrigieron para el grado de deacilación observada (>70%) en patrones internos de acetilglutamina mezclados con los extractos.

3.3.5 Ensayo de las actividades aspartoacilasa y deacilasa de acetilglutamato

Tras homogeneizar las muestras a 4°C en 9 volúmenes de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.0, usando un homogeneizador de Potter-Elvehjem, la suspensión se ultracentrifugó 60 min a 100000 g y a 4°C, y el sobrenadante se desaló mediante gel filtración a través de Sephadex G-25 (columna PD-10) equilibrado bien con NaCl 100 mM, CaCl₂ 2 mM, ditiotreitól

0.2 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8.0, para la determinación de la aspartoacilasa [48], bien con tampón Mes-sódico 50 mM pH 6.5, para la determinación de la deacilasa que hidroliza acetilglutamato.

Los ensayos se realizaron incubando a 37°C 0.1 ml del tampón usado para desalar conteniendo cantidades variables del extracto desalado y 0.1 ml de [¹⁴C]acetilglutamato o [¹⁴C]acetilaspartato 5mM (35000 cpm por ensayo). Se tomaron muestras de 50 µl al inicio de la reacción y a diferentes períodos de tiempo y se diluyeron en 0.2 ml de HCl 0.1 N a 0°C, determinandose el [¹⁴C]aspartato o [¹⁴C]glutamato producidos mediante aplicación a columnas de AG 50W-X8 (0.2 ml, preparadas en jeringuillas de tuberculina), lavado con 1.3 ml de H₂O y elución de los aminoácidos liberados con 2 ml de piridina al 10%.

3.3.6 Ensayo de actividad L-aspartato-N-acetiltransferasa

La actividad de síntesis de acetilaspartato se ensayó como describen Truckenmiller y cols. [38], usando membranas cerebrales totales obtenidas mediante ultracentrifugación a 100000 g (véase anteriormente). Las membranas se lavaron 3 veces en 10 volúmenes de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6.8, a 0-4°C, homogeneizando (homogeneizador de Potter-Elvehjem) y centrifugando 1 h a 50000 g cada vez. Finalmente, el precipitado se suspendió mediante homogeneización en un volumen del tampón fosfato igual al volumen inicial del homogeneizado. Esta suspensión fue usada para la

determinación de las actividades de síntesis de acetil-aspartato y acetilglutamato.

El ensayo se llevó a cabo a 37°C en 200 µl de una solución de tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6.8, acetil CoA 0.5 mM y [4-¹⁴C]L-aspartato o [1-¹⁴C]L-glutamato 5 mM (6 x 10⁵ cpm/ensayo). Se realizaron controles simultáneos sin acetil CoA o sin membranas. A diferentes tiempos se mezclaron muestras de 50 µl de la reacción con 200 µl de HCl 0.1 N a 0°C. Las muestras acidificadas se aplicaron a columnas de AG 50W-X8 como en el epígrafe anterior, recogiendo el efluente junto con un lavado de 1.3 ml de H₂O, y determinándose en él la radiactividad.

Más del 70% de la radiactividad en estos efluentes correspondió a verdadero acetil-aspartato (comprobado mediante coelución de la radiactividad con un patrón de acetil-aspartato en HPLC-SAX) o acetilglutamato (determinado mediante deacilación con aminoacilasa I y retención del producto en una columna de AG 50W-X8).

3.3.7 Ensayo de transacetilasa en el cerebro

Estudiamos si el cerebro contiene actividades enzimáticas capaces de transferir el grupo acetilo desde el acetil-aspartato al glutamato. Para ello usamos como muestras un extracto total de cerebro homogeneizado en 9 volúmenes de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.0 conteniendo 0.1% Tritón X-100; polvos de acetona de cerebro de rata (obtenidos de Sigma)

tratados de la misma forma; y los precipitados y el sobrenadante del subfraccionamiento celular (P1, P2 y S; ver anteriormente). Se incubaron a 37°C 2-3 mg de proteína de estas muestras en un volumen final de 300 μ l de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4, conteniendo 5 mM de acetilaspártato, [1-¹⁴C]L-glutamato (6-12 x 10⁴ cpm) y 5 mM de glutamato no marcado, excepto para el extracto total, en el que aprovechamos el contenido endógeno en este aminoácido. Se tomaron muestras de 100 μ l al comienzo y a 90 y 240 min, mezclándose inmediatamente con 400 μ l de HCl 0.1 N frío. Tras centrifugar, se aplicaron a columnas de 0.2 ml de AG 50W-X8 y el acetilglutamato o acetilaspártato que pudieran ser sintetizados se determinaron como radiactividad que no era retenida en la columna de AG 50W-X8 y que era deacilada por la aminoacilasa I.

3.3.8 Otros ensayos

La proteína se determinó por el método de Lowry [87]; las muestras particuladas o precipitadas se disolvieron en NaOH 0.2 N antes del ensayo de proteína. Los aminoácidos se determinaron por el método de HPLC-OPA (ver Sección 2 y [15]).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Niveles cerebrales de acetilglutamato en animales adultos.

De las distintas especies investigadas (Tabla 3.1) todas las ureotélicas, incluyendo la rana, exhibieron niveles hepáticos de acetilglutamato dentro del rango de fluctuación descrito hasta ahora para este activador de la carbamil fosfato sintetasa hepática (ver Fig. 2.3, sección 2). Por el contrario, en el pollo, que es uricotélico, el nivel de acetilglutamato hepático fue muy bajo. Los niveles de acetil-aspartato hepático fueron del mismo orden de magnitud en rata, rana y pollo, siendo comparables a los niveles de acetilglutamato en los organismos ureotélicos. Sólo se midió el N-acetil-aspartil-glutamato en tejido hepático en la rana, siendo indetectable (límite de detección, 2 nmoles/g).

A diferencia de lo observado en el hígado, el nivel cerebral de acetilglutamato fue similar en todas las especies investigadas incluida el pollo, con la única excepción de la rana, en que no se encontró NAG en el cerebro (el valor que se da en la Tabla es el límite de detección). Excepto en este último animal, el nivel cerebral de NAG fue del mismo orden o incluso algo mayor que el nivel de NAG en el hígado ureotélico. El nivel más alto se encontró en la corteza cerebral humana. Cuando se compararon las sustancias blanca y gris de la corteza cerebral de cerdo, el nivel de NAG más alto se encontró en la gris, siendo del orden del doble del

Tabla 3.1 Niveles de acetilglutamato y compuestos relacionados en diferentes tejidos y especies. Los valores se expresan como media \pm desviación estandar. Los números entre paréntesis indican el número de muestras. Las determinaciones en la rana, la médula suprarrenal de cerdo y el hígado de rata se realizaron en "pools" de órganos: 8-12 cerebros/"pool" y 3-4 hígados/"pool" para la rana, 5 médulas/pool para la médula suprarrenal y 3 hígados/"pool" para el hígado de rata. ND, no determinado. ^aValor obtenido de Tuchman y cols. [97].

ESPECIES Y ORGANOS	NAG	NAA	NAAG
nmoles/g de tejido			
CORDERO			
Cerebro (1)	26.6	6450	ND
RATON			
Cerebro (9)	33 \pm 4	8760 \pm 770	ND
RATA			
Cerebro (5)	32.2 \pm 7	10052 \pm 1050	1000 \pm 40
Hígado (6)	18.4 \pm 5.6	<15	ND
CERDO (Corteza cerebral)			
Corteza (3)	53 \pm 6.4	10133 \pm 321	721 \pm 105
S. Gris (3)	67 \pm 10	10567 \pm 666	741 \pm 145
S. Blanca (3)	26 \pm 10	5667 \pm 404	1483 \pm 214
CERDO (Glándula suprarrenal)			
Glándula (1)	1.5	210	<25
Corteza (1)	1.5	150	<30
Médula (1)	1.4	650	16
HOMBRE (corteza cerebral e hígado)			
Corteza (3)	86.6 \pm 15	2033 \pm 890	179 \pm 142
Hígado (5)	41.6 \pm 19.3 ^a	ND	ND
POLLO			
Cerebro (2)	48 \pm 1	9080 \pm 580	ND
Hígado (2)	3.1 \pm 0.3	27.5 \pm 3.8	ND
RANA			
Cerebro (4)	\leq 3	221 \pm 59	1534 \pm 79
Hígado (5)	34	20 \pm 2	<2

nivel encontrado en la sustancia blanca. La médula suprarrenal, que en realidad está constituida por neuronas modificadas (células cromafines) no exhibió niveles significativos de acetilglutamato, siendo los muy bajos niveles encontrados (confirmados además mediante ensayos de activación de la carbamil fosfato sintetasa) comparables a los encontrados en la corteza suprarrenal, constituida por células de estirpe y funcionalidad distintas a las de la médula.

Las determinaciones cerebrales de NAA fueron coincidentes con determinaciones previas de otros [45,47,50,88]: los valores estuvieron en el rango mM, fueron más altos en la sustancia gris que en la sustancia blanca [45,48,49] y fueron en la rana casi dos órdenes de magnitud menores que en las demás especies investigadas. La corteza cerebral humana examinada se obtuvo de la perifería de tumores y dió valores de alrededor de 1/3 de los observados por otros [45] en lóbulo occipital humano obtenido mediante necropsia. Ignoramos las razones de esta diferencia, aunque se ha descrito disminución de niveles de NAA en zonas de edema peritumoral [64]. Los niveles de acetilaspártato en la médula suprarrenal del cerdo, aunque elevados para un tejido no estrictamente nervioso, fueron un orden de magnitud menores que los niveles encontrados en el sistema nervioso.

Los niveles cerebrales de NAAG en rata, cerdo, y hombre fueron unas 10 veces menores que el nivel de NAA en el mismo tejido, lo que está de acuerdo con las observaciones de otros

[29,47,50]. Sin embargo, el NAAG fue, a diferencia del NAA, más abundante en la sustancia blanca que en la gris (estudiado en la corteza cerebral de cerdo). El nivel de este posible neurotransmisor en el cerebro de rana fue similar al nivel encontrado en los mamíferos investigados. El nivel de NAAG en la glándula suprarrenal de cerdo fue muy bajo.

Previamente hemos postulado [27] que el acetilglutamato presente en el sistema nervioso podría ser sintetizado en el cerebro por el enzima que sintetiza NAA [38]. Tal interpretación está de acuerdo con el hallazgo simultáneo de bajos niveles de NAA y NAG en el cerebro de rana, y con la demostración de niveles más altos de NAA y de NAG en la sustancia gris que en la sustancia blanca. Los resultados, por el contrario, no apoyan relación alguna entre los niveles de NAG y de NAAG.

Los resultados de la Tabla 3.1 confirman y extienden nuestra conclusión de que el acetilglutamato cerebral no está relacionado funcionalmente con la síntesis de arginina o de urea, ya que el pollo, que es ureotélico [89], tiene un nivel de acetilglutamato cerebral similar al de los mamíferos, mientras que la rana, que es ureotélica, carece de acetilglutamato cerebral. En contraste con estas observaciones, los niveles hepáticos de acetilglutamato en estas especies se corresponden estrictamente con su capacidad de síntesis de urea.

Dada la gran diferencia entre los niveles cerebrales de

NAA y NAG, y puesto que sólo encontramos NAG en el cerebro cuando había NAA en este órgano, sería concebible que el NAG se generara a partir del NAA, mediante algún tipo de trans-acetilación anormal que sólo se diera tras el fallecimiento del animal. Si esto fuera así habría que esperar aumentos en el nivel de NAG cerebral con el tiempo tras el sacrificio. Sin embargo, la figura 3.5 demuestra niveles similares de NAG si el cerebro no se homogeneiza hasta 15 min desde el sacrificio del animal, y un ligero descenso en los niveles de NAG con tiempos más largos de espera. Estos resultados indican que el acetilglutamato no es producido postmortem. La estabilidad del NAG en el tejido a 0°C se explotó cuando determinamos acetilglutamato en tejidos humanos y de cerdo; esas muestras fueron procesadas entre 30 y 60 min tras obtenerlas, manteniéndolas hasta entonces a 0°C.

También cabría, en principio, la posibilidad de que el NAG cerebral fuera generado durante el proceso de homogeneización y purificación, como consecuencia de la deamidación de acetilglutamina, un N-aminoácido que ha sido encontrado en pequeñas cantidades en el cerebro humano [90]. Determinamos acetilglutamina en cerebro de rata y encontramos niveles de este acilaminoácido (11 y 20 nmoles/g, en dos cerebros estudiados) inferiores a los de acetilglutamato. El acetilglutamato no pudo generarse por deamidación de la acetilglutamina durante el procesamiento de las muestras, ya que cuando añadimos a cerebros de rata cantidades conocidas de acetilglutamina, su recuperación como acetilglutamato al final de todo el proceso de purificación de acetilglutamato

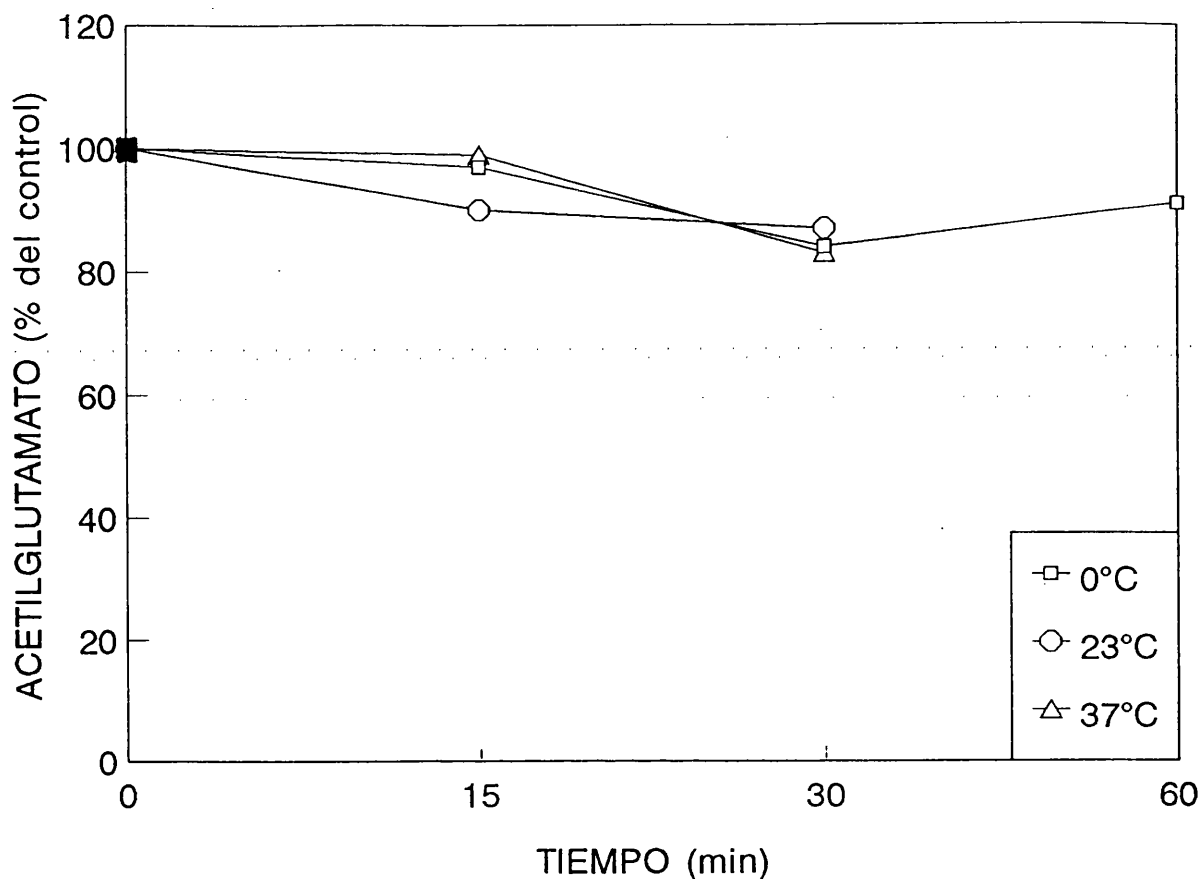


Figura 3.5 Cambios postmortem en el nivel de acetilglutamato. Se sacrificaron 4 ratas a la vez, y se dividió cada cerebro longitudinalmente en dos mitades iguales. Cada mitad se mantuvo durante el tiempo indicado a la temperatura señalada, antes de iniciar la determinación de acetilglutamato. Los resultados se han referido al nivel observado en el medio cerebro procesado inmediatamente.

fue sólo del 3% de la acetilglutamina añadida.

3.4.2 Cambios en el nivel de acetilglutamato durante el desarrollo.

La figura 3.6 compara los cambios en los niveles cerebrales de acetilglutamato, acetilaspártato y acetilaspártilglutamato con el desarrollo. Nuestros resultados para NAA y NAAG confirman observaciones previas de otros autores [45,47,50,51], demostrando un aumento importante del NAA durante el período del desarrollo examinado, con una aceleración en la acumulación entre los días 7 y 25 del período postnatal, en que el proceso de mielinización en la rata es muy activo [91]. Por el contrario, como ya se mencionó en la introducción, el nivel de NAAG cambió mucho menos durante el período postnatal, siendo ya sustanciales los niveles 6 días antes del nacimiento. El patrón de desarrollo del NAG se parece al del desarrollo del NAA, con un aumento importante a lo largo del desarrollo, particularmente entre los días 7 y 25 tras el nacimiento. Por tanto, estos resultados son compatibles con que NAG y NAA se sinteticen por el mismo enzima, y no apoyan relación alguna entre los procesos de síntesis de NAG y de NAAG.

También hemos estimado el nivel hepático de NAG entre el nacimiento y el día 25. A diferencia de lo que sucede con el NAG cerebral, el nivel hepático de este compuesto asciende fuertemente tras el nacimiento, se estabiliza a un nivel relativamente elevado durante la segunda semana, y desciende

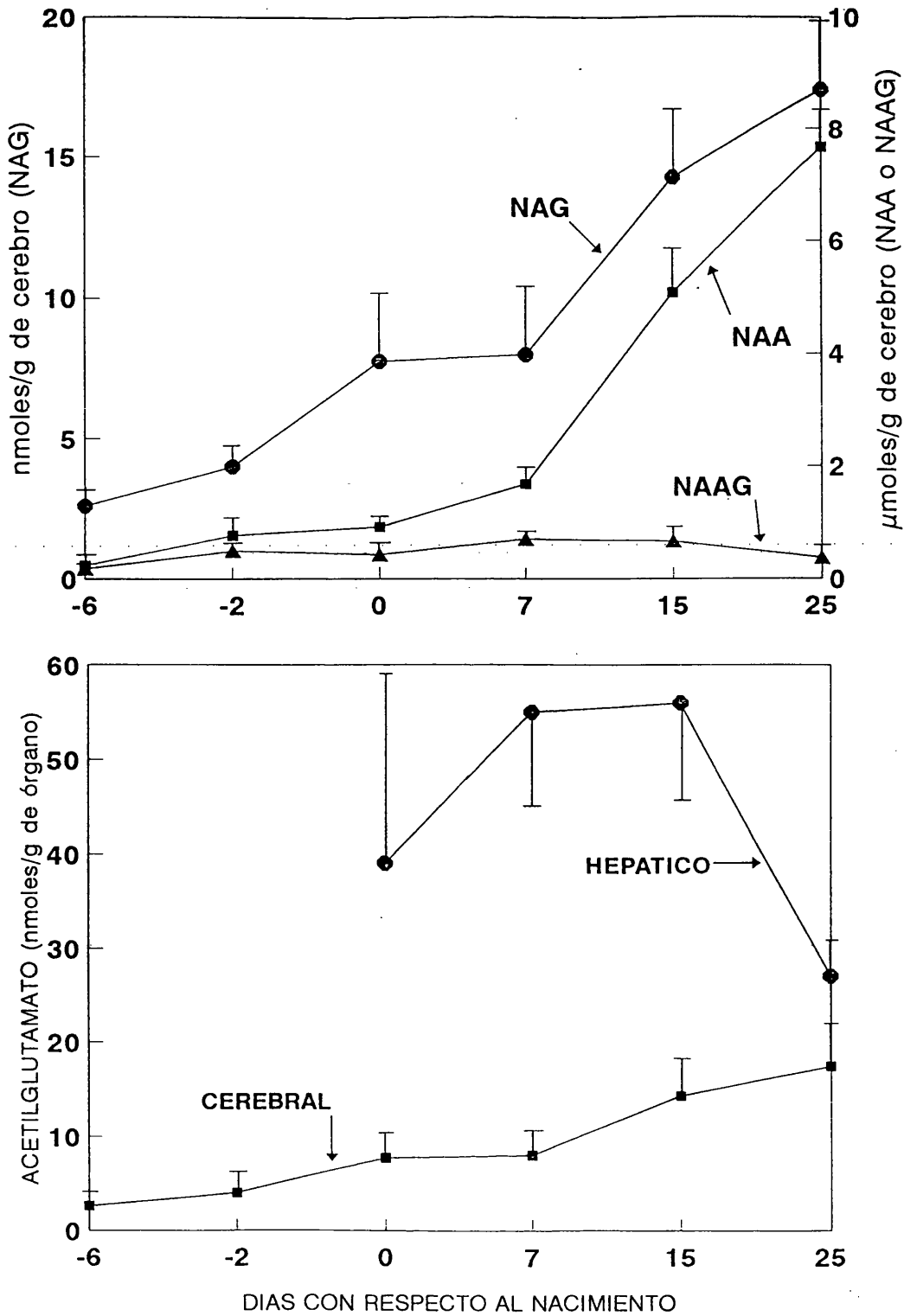


Figura 3.6 Niveles cerebrales pre y postnatales de acetilglutamato (NAG), acetilaspártato (NAA) y acetilaspártilglutamato (NAAG) y niveles hepáticos de acetilglutamato en la rata. Los resultados se expresan como media \pm desviación standard de: (-6 días) 2 "pools" de cabezas (4-6 cabezas/"pool"); (-2 días) 3 "pools" de cerebros (3-4 cerebros/"pool"); (0 días) 5 "pools" de cerebros (4-6 cerebros/"pool"); (7 días) 1 cerebro y 4 "pools" de 2 cerebros cada uno; (15 días) y (25 días) 5 cerebros. En el panel inferior se muestran los niveles hepáticos de acetilglutamato comparados con los cerebrales; el número de hígados fueron 4 "pools" de 2-8 hígados/"pool" para los días (0, 7, 15) y 5 hígados para el día 25.

a valores más bajos en el día 25. Estos cambios muy probablemente reflejan diferencias en el contenido proteico de la dieta, dependiendo de que ésta se base en la lactación, o en la dieta de laboratorio, como ya sucede en el día 25. Si es así, la comparación de los niveles cerebrales y hepáticos de NAG indica que unos y otros son sensibles a diferentes factores reguladores, lo que apoya nuestra conclusión previa de que el NAG cerebral, a diferencia del hepático, no está relacionado con el ureotelismo [27].

3.4.3 Acetilglutamato en tumores intracraneales humanos.

La Tabla 3.2 demuestra la presencia de cantidades sustanciales de acetilglutamato en todos los tumores intracraneales examinados, independientemente de su naturaleza, con la excepción del meningioma, que no exhibió niveles significativos de acetilglutamato. Este fue el único tumor con niveles también extremadamente bajos de acetil-aspartato y de acetil-aspartilglutamato. Existe información previa [49,92] sobre el contenido de NAA en tumores intracraneales. Nuestros resultados coinciden totalmente con dichos resultados previos, que demuestran niveles variables pero sustanciales de NAA en gliomas, ausencia de NAA en meningiomas, y niveles considerables de NAA en tumores vasculares y en metástasis de adenocarcinoma de pulmón. Sorprende el encontrar NAA en la metástasis de origen pulmonar [49], sugiriendo que el entorno cerebral tiene capacidad inductora de la actividad de síntesis de NAA. La ausencia de NAG en el tumor que no contiene niveles

Tabla 3.2 Acetilglutamato y acetilaspártato en tumores intracraneales humanos.

<u>TUMOR</u>	<u>Acetilglutamato</u>	<u>Acetilaspártato</u>
	nmol/g	
GLIOMAS		
1	68	410
2	33	122
3	41	1405
4	46	3286
5	26	240
	-----	-----
Mediata	43±16	1093±1326
MENINGIOMA (1)	<0.3	20
CAVERNOMA (1)	18	610
METASTASIS CEREBRAL DE		
ADENOCARCINOMA DE PULMON (1)	59	1550

sustanciales de NAA (meningioma) apoya la idea de que NAA y NAG son sintetizados, en el cerebro, por el mismo enzima.

3.4.4 Actividades cerebrales capaces de sintetizar y de degradar acetilglutamato.

La Tabla 3.3 demuestra síntesis de acetilglutamato a partir de glutamato y acetil CoA catalizada por membranas cerebrales, a una velocidad unas 15 veces menor que la síntesis de acetilaspártato observada en iguales condiciones cuando se usó aspartato como sustrato. Ello es lo esperado de la actividad L-aspartato-N-acetiltransferasa (LANAT), que, como se ha descrito [38], se localiza en membranas y utiliza el glutamato con una eficacia un orden de magnitud menor que el aspartato. La adición de 5 mM arginina, el activador de la acetilglutamato sintetasa, enzima que sintetiza NAG en el hígado [10,32,33,93], no tuvo ningún efecto sobre las actividades de síntesis de NAA o de NAG por las membranas cerebrales, lo que, añadido a la capacidad de dichas membranas de utilizar aspartato con preferencia al glutamato en la acetilación, prueba que esta actividad no es del tipo de la acetilglutamato sintetasa hepática, que no es capaz de utilizar aspartato y requiere activación y estabilización en los ensayos por arginina [10,32,33,93]. De hecho, estudios recientes muy cuidadosos han sido incapaces de encontrar actividad acetilglutamato sintetasa en cerebro o cerebelo de rata [93]. De acuerdo con el hallazgo de niveles mayores de acetilaspártato y acetilglutamato en la sustancia gris que en la blanca, la actividad sintetizante de NAA y NAG se encontró

Tabla 3.3 Actividades enzimáticas de síntesis y degradación de acetilglutamato y acetilaspártato en corteza cerebral de cerdo y en cerebro de rana. Las actividades son la media de 3 determinaciones; los resultados de las determinaciones no difirieron entre sí más del 10%. Los niveles de acetilaminoácidos se han tomado de la tabla 3.1.

	<u>Corteza cerebral de cerdo</u>		<u>Cerebro Rana</u>
	Sustancia Gris	Sustancia Blanca	
<u>ACTIVIDADES</u>	nmol/min·mg proteína en la fracción		
L-ANAT (con asp)	0.173	0.072	<0.003
L-ANAT (con glu)	0.014	0.004	<0.003
Aspartoacilasa	0.97	6.88	0.10
NAG-deacilasa	12.56	13.39	0.32
<u>ACETILAMINOACIDOS</u>	nmoles/g		
Acetilaspártato	10568	5667	221
Acetilglutamato	67	26	<3

a un nivel unas 3 veces mayor en la sustancia gris que en la blanca. También se acuerdo con la ausencia de acetilglutamato y el bajísimo nivel de NAA en el cerebro de rana, no se encontró actividad LANAT en este anfibio. Estos resultados sugieren fuertemente que la LANAT es responsable de la síntesis de NAG cerebral. Ensayos similares en los sobrenadantes obtenidos mediante ultracentrifugación de homogeneizados cerebrales de cerdo no detectaron actividad sustancial de síntesis de NAG o NAA.

Otra posibilidad de síntesis de NAG en el cerebro sería la transacetilación desde acetilaspártato. Este último compuesto se encuentra en el cerebro a concentración muy elevada y sería concebible que existiera alguna actividad transacetilasa capaz de catalizar la transferencia del grupo acetilo desde el acetilaspártato al glutamato. Sin embargo, ensayos para tal actividad con extracto cerebral total, polvos de acetona de cerebro o fracciones subcelulares, realizados como se describe en Métodos, fueron negativos, siendo el límite de detección de 0.4 pmoles de NAG sintetizado/min/mg de proteína.

En consecuencia, las evidencias de que disponemos están de acuerdo con que el enzima que sintetiza el NAG cerebral sea la LANAT, el mismo enzima que sintetiza acetilaspártato.

En contraposición con la síntesis, la actividad degradativa en el cerebro (Tabla 3.3) fue más activa para el acetilglutamato que para el acetilaspártato, particularmente

en la sustancia gris, donde la actividad NAG-deacilasa fue más de 12 veces mayor que la actividad aspartoacilasa. Ambas actividades se encontraron en el sobrenadante obtenido al ultracentrifugar los homogeneizados, lo que está de acuerdo con que sean enzimas solubles o ligados ligeramente a membranas [48]. De acuerdo con lo publicado por otros [48,49], la actividad aspartoacilasa fue mucho más importante en la sustancia blanca que en la gris.

Aunque ambas deacilasas fueron detectables en el cerebro de rana, sus niveles fueron 1-2 órdenes de magnitud menores que en el cerebro de cerdo, indicando que estas deacilasas no están implicadas en la metabolización del NAAG cerebral que, a diferencia de NAG y NAA, está presente en el cerebro de rana a niveles comparables a los encontrados en mamíferos. Como la rana sí tiene NAAG cerebral, estos resultados sugieren que los procesos de síntesis y degradación de NAAG y de NAA y NAG no utilizan pasos comunes.

3.4.5 Estudios adicionales sobre la actividad hidrolítica de acetilglutamato.

Tal como hay que esperar de una actividad soluble, esta actividad hidrolítica se encontró exclusivamente en los sobrenadantes resultantes de ultracentrifugar homogeneizados cerebrales en Tris-HCl 50 mM, pH 7.0, conteniendo los precipitados <20% de la actividad (resultados no presentados). Estos sobrenadantes, desalados mediante gel-filtración (columna PD-10, equilibrada con el mismo tampón),

se utilizaron para los ensayos de actividad hidrolítica de acetilglutamato. El desalado incrementó la actividad 20-30%, lo que indica la existencia de sustancias inhibidoras en el extracto no desalado. Al igual que la aminoacilasa I renal [27], la actividad hidrolítica cerebral exhibe un pH óptimo ligeramente ácido cuando se usa acetilglutamato como sustrato (Fig. 3.7). Un estudio preliminar en diferentes tampones (Tris, MOPS, Mes, Hepes y glicilglicina) demostró que con el tampón Mes-sódico 25 mM pH 6.5 se obtiene la mayor actividad. La dependencia de la velocidad con respecto a la concentración de acetilglutamato fue hiperbólica (probado a pHs 6.5 y 7.0), siendo la V_{max} similar en ambos casos (7.86 y 7.55 nmol/min/mg proteína a pH 6.5 y 7.0, respectivamente). Por el contrario, el K_m para el acetilglutamato se influyó fuertemente por el pH (Fig. 3.8), siendo más bajo a pH 6.5 (2.37 mM) que a pH 7.0 (8.11 mM). Este último K_m es similar al encontrado para el acetilglutamato (12 mM) con la aminoacilasa renal a pH 7.0 en tampón MOPS [43].

Cuando el cerebro se homogeneizó en un medio isotónico y se obtuvieron fracciones subcelulares (Fig. 3.9), la actividad deacilasa de acetilglutamato se distribuyó igual que el acetilglutamato, predominando en la fracción soluble, lo que indica que, al igual que la aminoacilasa I renal [39] y que el acetilglutamato cerebral, la deacilasa cerebral del acetilglutamato es citosólica.

La Tabla 3.4 compara la influencia de algunas sustancias sobre la deacilasa de acetilglutamato cerebral de rata y

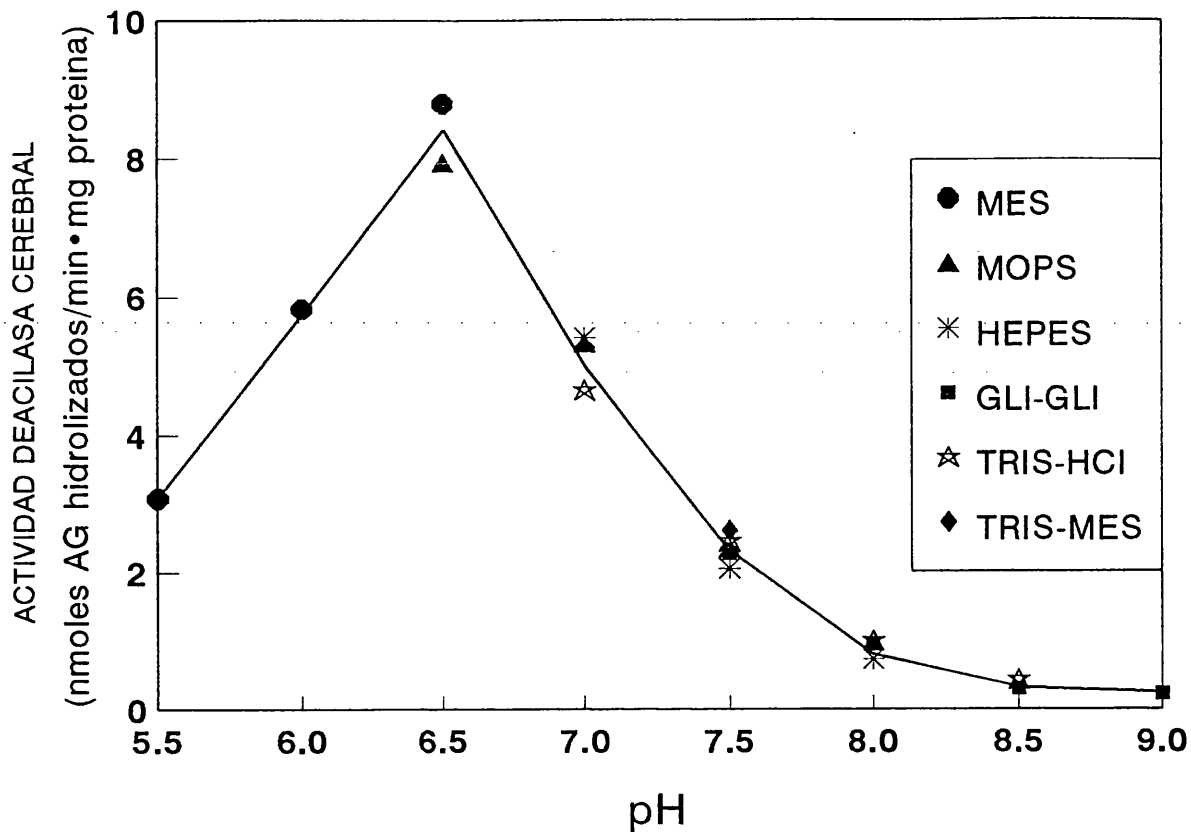


Figura 3.7 Efecto del pH sobre la actividad deacilasa cerebral del acetilglutamato. El sobrenadante de corteza cerebral de rata se desaló mediante gel filtración centrífuga [98] en cada uno de los tampones indicados. La actividad se determinó en los distintos tampones a una concentración de 50 mM (forma potásica). Los resultados son la media de dos determinaciones.



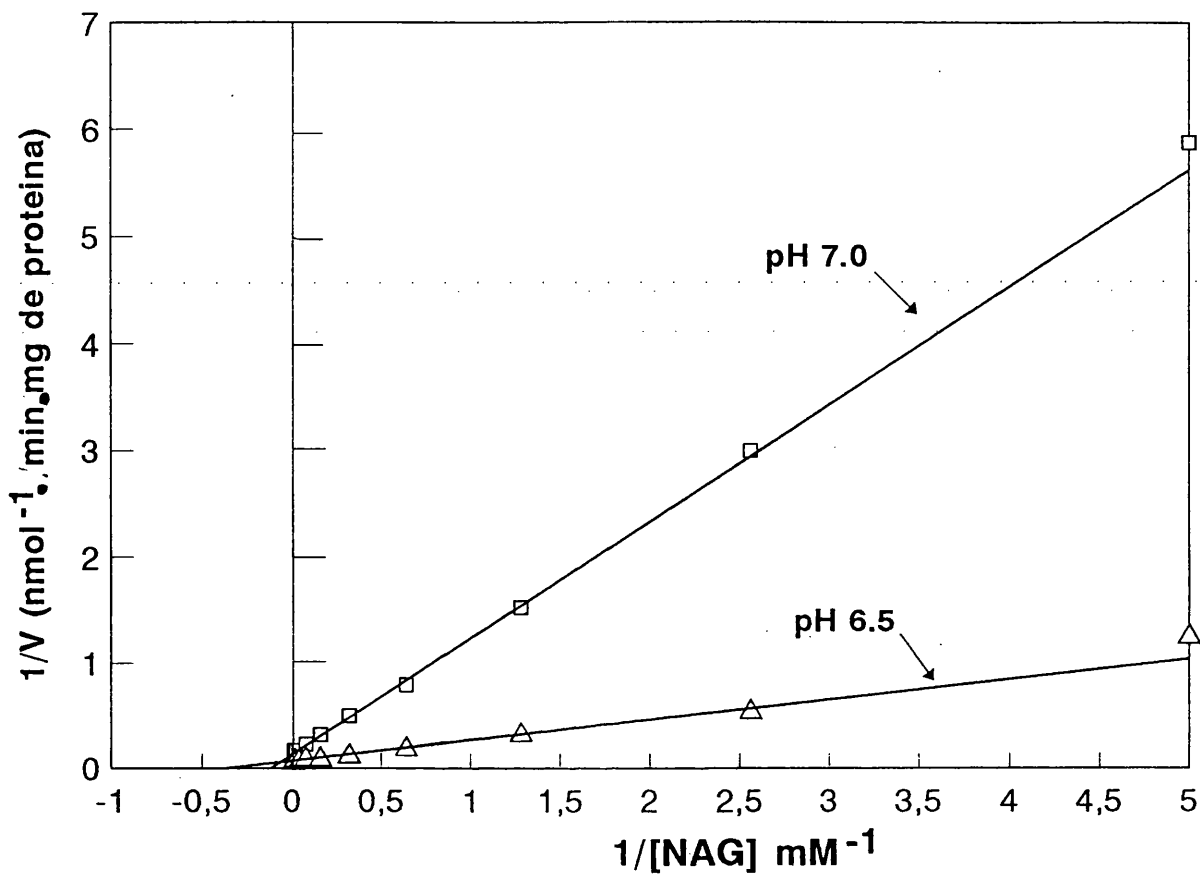


Figura 3.8 Representación de dobles inversos para la deacilasa cerebral del acetilglutamato.

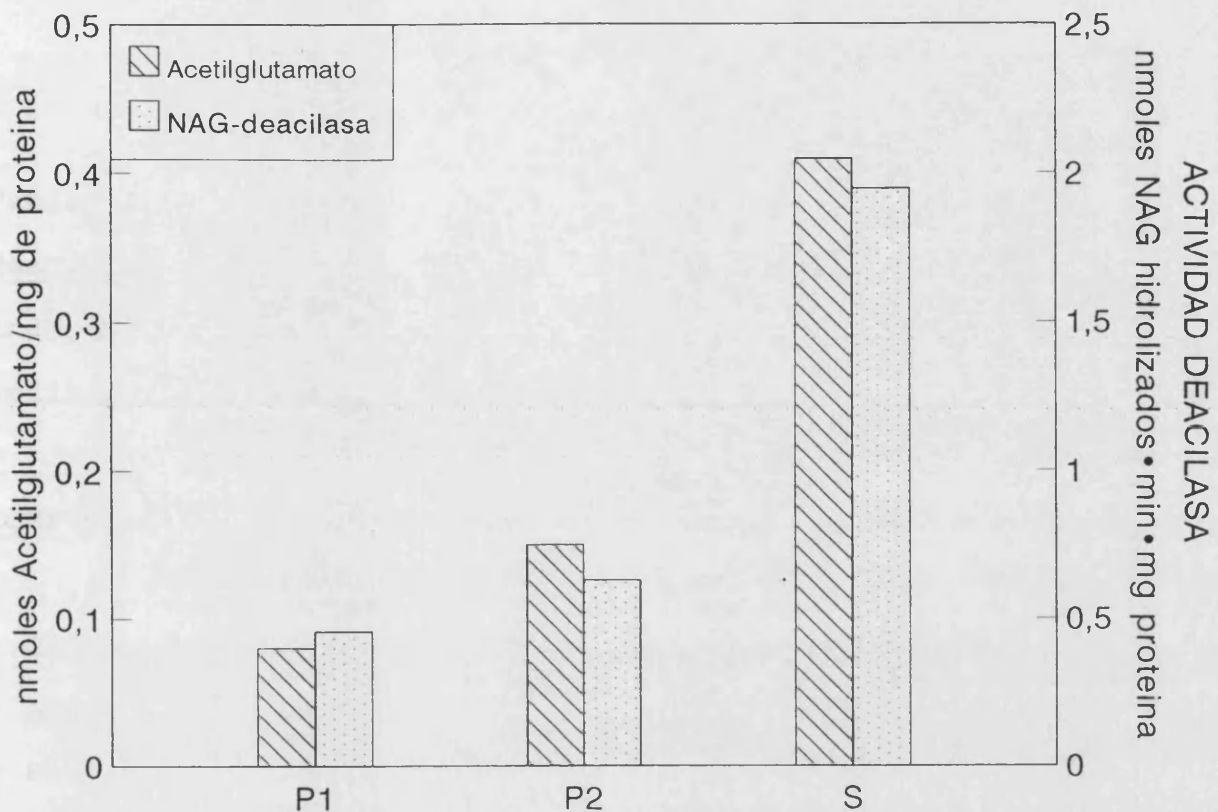


Figura 3.9 Distribución subcelular del acetilglutamato y de actividad deacilasa cerebral del acetilglutamato. Las determinaciones de actividad deacilasa se realizaron en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.0. Las fracciones P1 y P2 se suspendieron en 10 ml de este tampón/g inicial de cerebro, homogeneizándose (homogeneizador de Potter) antes del ensayo de actividad deacilasa. La fracción soluble se desaló mediante paso por una columna de PD-10 equilibrada con ese mismo tampón, antes del ensayo de actividad. Las determinaciones de acetilglutamato se describen en Métodos.

Tabla 3.4 Influencia de algunos compuestos sobre a la actividad deacilasa cerebral y sobre la aminoacilasa de riñón de cerdo. Los ensayos se realizaron por duplicado, dando esencialmente la misma actividad en ambos.

COMPUESTO	% ACTIVIDAD DEACILASA	
	<u>CEREBRAL</u>	<u>RENAL</u>
* Control	100.0	100.0
* Acetil norvalina 1 mM	6.5	6.2
* Fosfato potásico 25 mM	27.3	36.6
* Ditiotreititol 1 mM	27.9	5.5
* Yodoacetato 1 mM	30.7	67.0
* Glutation reducido 10 mM	211.6	27.4
* Norvalina 10 mM	110.6	79.1
* Acetilaspartato 10 mM	79.0	145.0
* α -cetoglutaratato 1 mM	14.7	95.1

sobre la aminoacilasa I de riñón porcino, ensayadas frente a acetilglutamato. Ambas actividades se inhibieron en el mismo grado por N-acetil-L-norvalina y en grado similar por fosfato potásico. El yodoacetato y el ditiotreitól inhibieron también ambas actividades, aunque el yodoacetato inhibió más el enzima cerebral y el ditiotreitól el enzima renal. El glutation también inhibió el enzima renal pero, sorprendentemente, activó a más del doble la deacilasa cerebral. Otras diferencias entre ambos enzimas son la inhibición ligera del enzima cerebral pero no del renal por acetilaspártato y el caso contrario para la norvalina. Una diferencia entre ambos enzimas es que el α -cetogluturato inhibió fuertemente al enzima cerebral pero no al renal porcino. Los resultados revelan importantes semejanzas entre ambos enzimas, aunque las diferencias en sensibilidad a algunos de los agentes probados sugieren que no son idénticas.

La figura 3.10 compara la estabilidad térmica de la deacilasa cerebral con la de la aminoacilasa renal de rata, añadida en un pequeño volumen al extracto cerebral. El perfil de inactivación no es significativamente diferente para ambas actividades, lo que está de acuerdo con que se deban al mismo enzima o formas a isoenzimáticas muy parecidas.

Son rasgos adicionales de la actividad deacilasa cerebral que subrayan su semejanza con la aminoacilasa I renal, la elevada afinidad para la acetilmetionina ($K_i=0.2$ mM; estimado a partir de la inhibición de la hidrólisis de acetil[14 C]-glutamato, Tabla 3.5; K_m publicado [43] 0.9 mM), y la baja

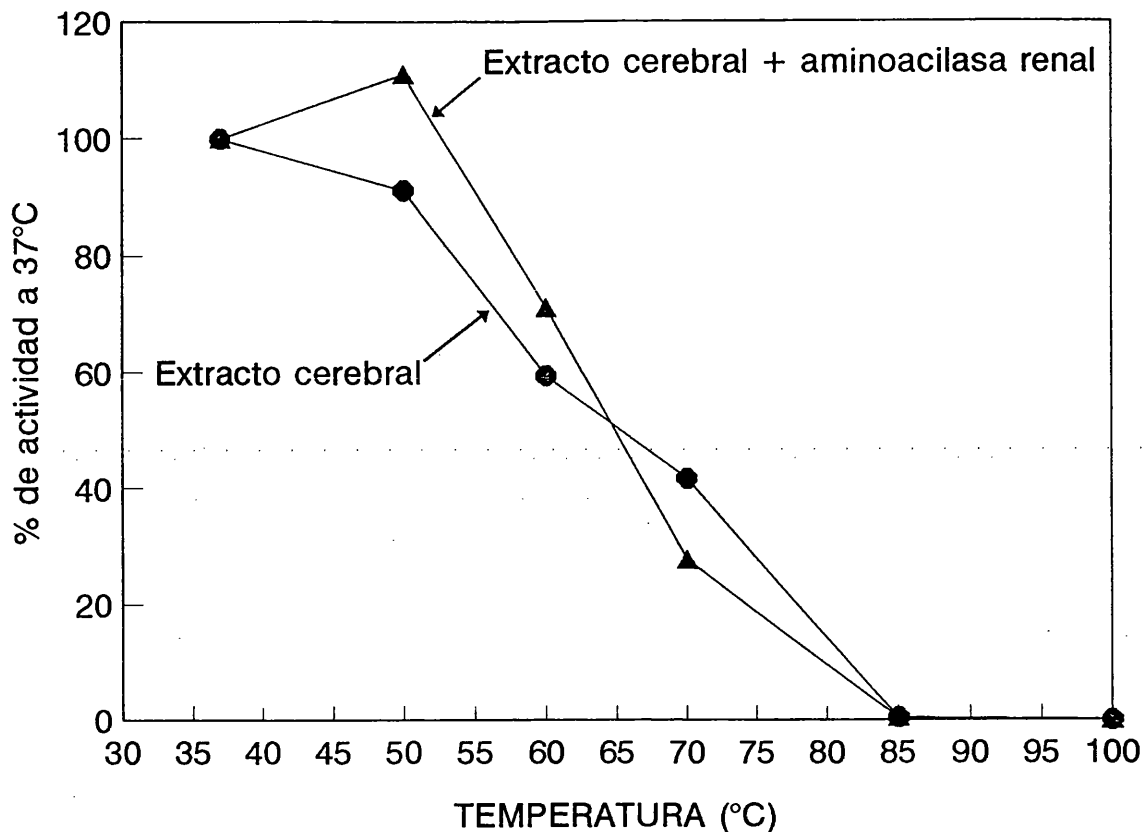


Figura 3.10 Inactivación térmica de la deacilasa cerebral sólo y de la aminoacilasa renal purificada a partir de riñón de rata. Se añadió a la mitad del extracto cerebral desalado en Mes-sódico 25 mM pH 6.5, un pequeño volumen de aminoacilasa renal purificada, conteniendo una actividad deacilasa de acetilglutamato 10 veces mayor a la endógena del extracto. Muestras del extracto intacto y del enriquecido se calentaron 10 min a las temperaturas indicadas, y tras enfriamiento rápido a 0°C se determinó la actividad deacilasa de acetilglutamato remanente tras el calentamiento.

afinidad para N-acetil-L-histidina (K_i estimado, 12 mM, Tabla 3.5; K_m publicado [43] 10 mM), y la mejor y peor afinidad, respectivamente, por el cloroacetil [94] y el formil [95] aminoácido que para el acetil aminoácido (reflejados en la Tabla 3.5 en una inhibición de la hidrólisis de acetil[^{14}C]-glutamato superior al 50% por 2.3 mM cloroacetilglutamato, y solo del 31% por 10 mM formilglutamato; actividad ensayada en presencia de 2.5 mM [^{14}C]acetilglutamato). Además, el EDTA inhibe parcialmente su actividad (Tabla 3.5), un hecho observado previamente y atribuido al contenido en Zn del enzima [96]. El acetilaspártato y acetilaspártilglutamato se unen al enzima con menor afinidad que el acetilglutamato, ya que concentraciones de 10 mM de los dos primeros compuestos sólo inhiben 21 y 50% la actividad del enzima, ensayada en presencia de 2.5 mM acetil[^{14}C]glutamato (Tabla 3.5). Ello confirma que la actividad deacilasa no es una actividad secundaria de la NAALA dipeptidasa o de la aspartoacilasa cerebral. Además, la dipeptidasa es inhibida prácticamente completamente por 1 mM EDTA y en un 50% por 0.5 mM puromicina [28], mientras que la deacilasa es inhibida solo parcialmente por concentraciones mayores de EDTA y no es inhibida por puromicina (Tabla 3.5).

3.4.6 Distribución regional de la deacilasa del acetilglutamato y de la aspartoacilasa.

La distribución de ambas actividades fue no homogénea, variando dentro de un rango aproximado de 2 veces (Figs. 3.11 y 3.12). Para ambas actividades el cortex fue la región menos

Tabla 3.5 Influencia de algunos compuestos sobre la actividad deacilasa de acetilglutamato cerebral

	<u>Concentración</u>	<u>% ACTIVIDAD</u>
N-acetil-L-metionina	0.5 mM	51
	1 mM	32
	5 mM	6.5
	10 mM	3.6
N-acetil-L-histidina	1 mM	105.3
	5 mM	85.6
	10 mM	65.3
N-formil-L-glutamato	10 mM	68.8
N-cloroacetil-L-glutamato	2.3 mM	36.0
N-acetilaspartilglutamato	10 mM	50
EDTA	5 mM	58
Puromicina	0.5 mM	100

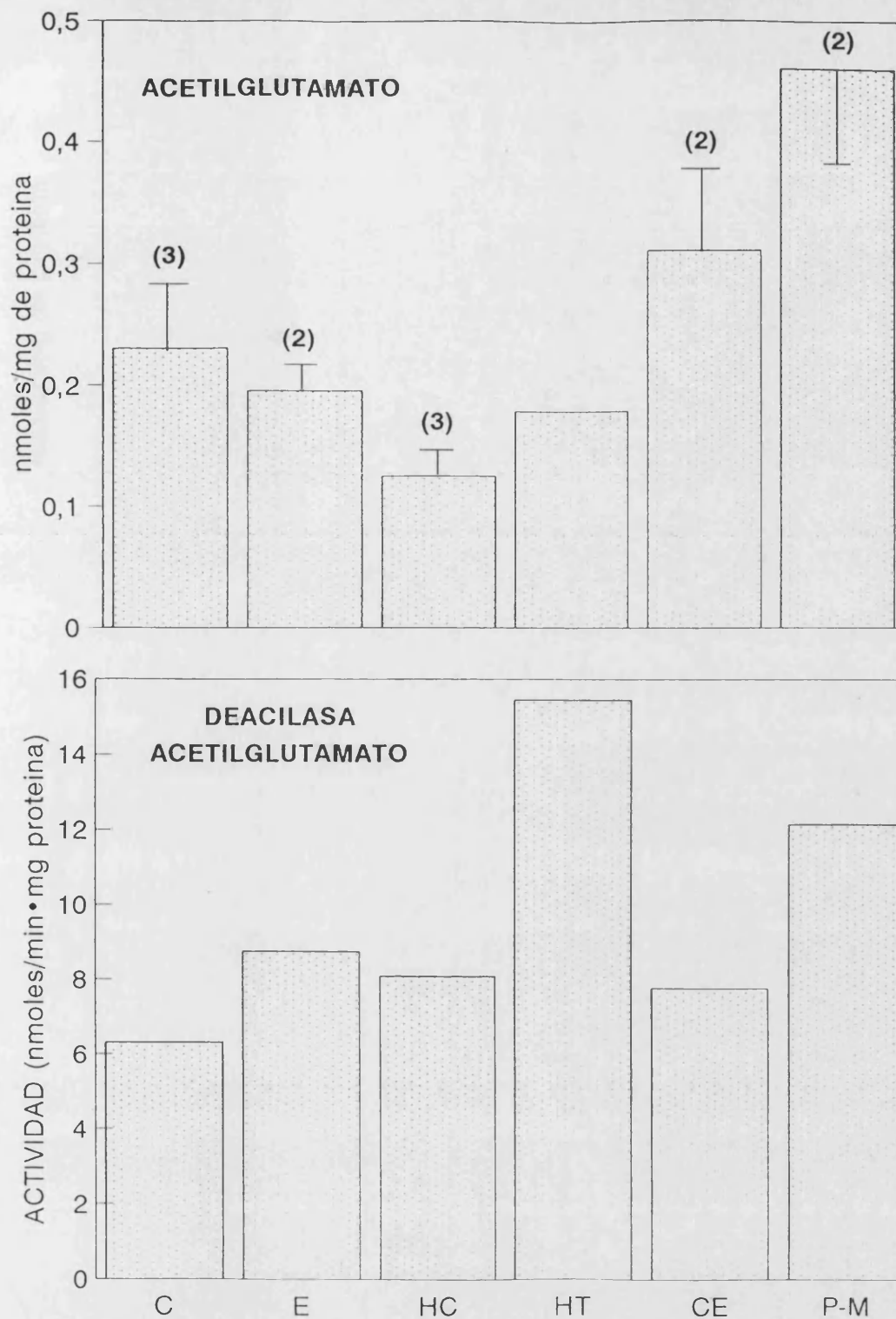


Figura 3.11 Niveles de acetilglutamato y de actividad deacilasa de acetilglutamato en varias regiones del sistema nervioso central de la rata. Entre paréntesis se indica el número de animales usados para la determinación de NAG (determinado mediante HPLC-SAX) y los resultados en este caso se expresan como media \pm desviación standard. Los hipotálamos fueron un "pool" de 5 especímenes. La actividad deacilasa es la media de dos determinaciones en un "pool" de 2 regiones cerebrales/"pool" obtenidas de 2 ratas. C: corteza cerebral; HC: hipocampo; HT: hipotálamo; E: estriado; P-M: puente + bulbo; CE: cerebelo.

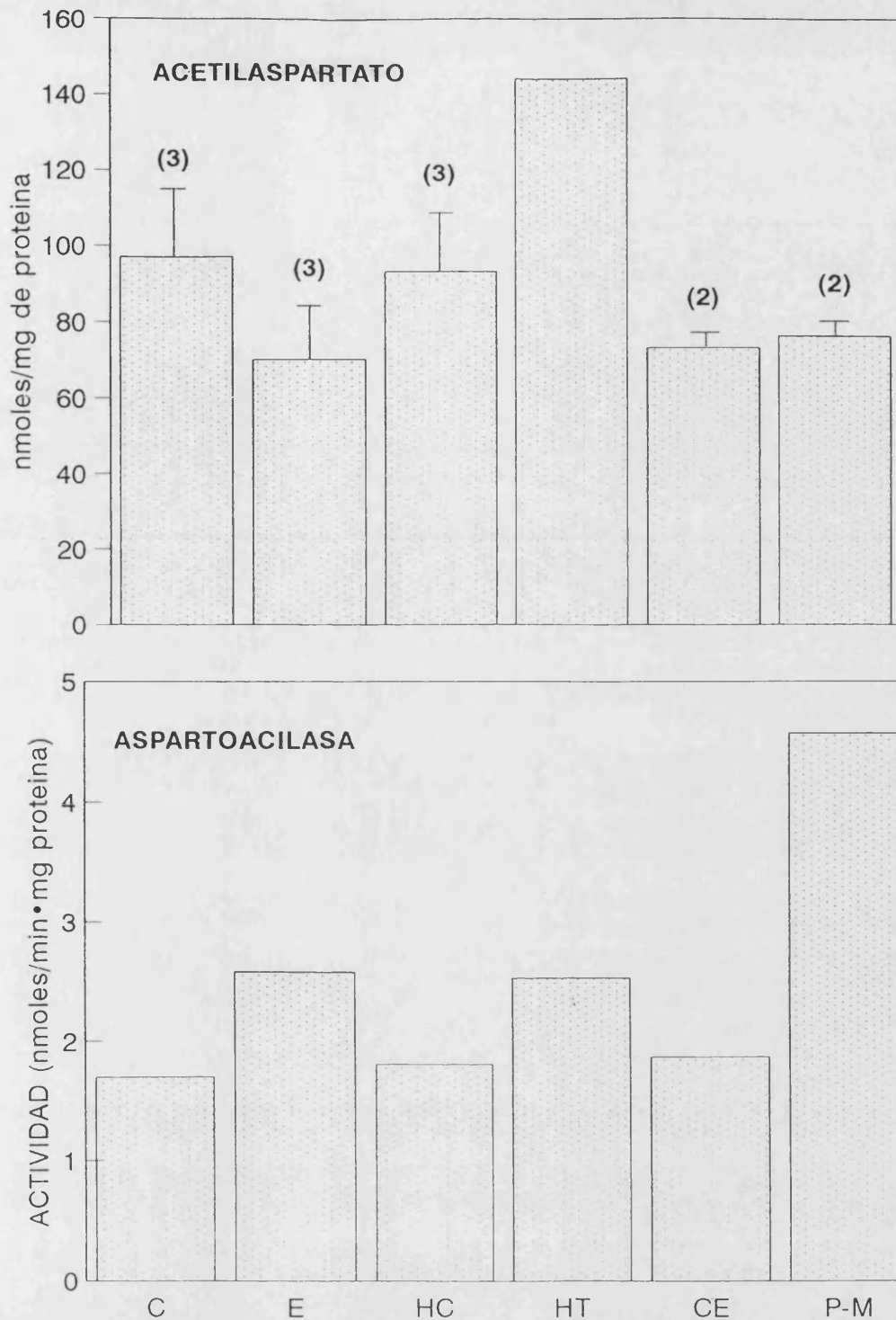


Figura 3.12 Niveles de acetilaspártato y de actividad aspartoacilasa en varias regiones del sistema nervioso central de la rata. Entre paréntesis se indica el número de animales usados para la determinación de NAA (determinado mediante HPLC-SAX) y los resultados en este caso se expresan como media \pm desviación standard. La actividad aspartoacilasa es la media de dos determinaciones en un "pool" de 2 regiones cerebrales/"pool" obtenidas de 2 ratas. C: corteza cerebral; HC: hipocampo; HT: hipotálamo; E: estriado; P-M: puente + bulbo; CE: cerebelo. Los hipotálamos fueron un "pool" de cinco especímenes.

activa. En el caso de la aspartoacilasa la actividad tendió a aumentar en dirección rostro-caudal, encontrándose las actividades más altas en la región ponto-bulbar. Interesa resaltar que, con la excepción del hipotálamo, el nivel de acetilaspártato tiende a decrecer en dirección rostro-caudal. La máxima actividad de acilasa de acetilglutamato se encontró en el hipotálamo, seguido de la región ponto-bulbar. No se observa correlación inversa clara entre la actividad de acilasa y el nivel regional de acetilglutamato.

3.5 DISCUSION

Previamente [27] demostramos concluyentemente, utilizando diversos ensayos, que el sistema nervioso central de los mamíferos y de las aves contiene acetilglutamato, y que los niveles de este compuesto son comparables o incluso superiores a los hepáticos. Concluimos ya entonces que este acetilaminoácido no tiene en el sistema nervioso función relacionada con la síntesis de urea o de arginina, y avanzamos algunas propuestas sobre el mecanismo de síntesis cerebral de acetilglutamato.

Confirmamos ahora la no relación del acetilglutamato cerebral con la síntesis de urea o de arginina al demostrar que la rana, un organismo ureotélico con niveles elevados de acetilglutamato hepático, donde este acilaminoácido cumple la misión de activar la carbamil fosfato sintetasa I, que cataliza el primer paso de la síntesis de arginina y urea, carece de acetilglutamato cerebral.

Seguimos, por tanto, en la oscuridad con respecto a la función del acetilglutamato presente en el sistema nervioso, oscuridad que afecta también a otros acilaminoácidos presentes en pequeña cantidad en el cerebro, (acetil-histidina, acetilglutamina, citrilglutamato [51,88]) y que en parte afecta también al acetilaspártato cerebral, ya que su función de portador de grupos acetilo para la síntesis de ácidos grasos, aunque muy importante para la formación de mielina [61], no parece justificar los elevados niveles de

acetilaspártato cerebrales, ni su permanencia al mismo elevado nivel en el adulto, cuando la actividad mielinogénica es mucho menos importante que durante el desarrollo [91]. En nuestro trabajo anterior, y sobre la base de que el acetilglutamato inhibe la dipeptidasa que degrada NAAG con un IC_{50} del mismo orden que los niveles cerebrales de acetilglutamato [28], propusimos que este compuesto pudiera modular la actividad de esta dipeptidasa, y así los niveles del posible neurotransmisor NAAG. Desde entonces se han sintetizado análogos del acetilglutamato que, inyectados en el estriatum, inhibieron "in vivo" la dipeptidasa [85]. Hay que destacar, sin embargo, que hoy se piensa que esta dipeptidasa es ectocelular, o por lo menos que su función se da en el intersticio, en un ámbito con bajo contenido en glutamato [82,83]. Por tanto, si el acetilglutamato debiera modularla, habría muy probablemente de ejercer sus funciones en el intersticio, donde actúa la dipeptidasa. La presencia de NAAG y la ausencia de NAG en el cerebro de la rana no apoya este posible papel modulador del NAG sobre la dipeptidasa, aunque no puede excluirse que tal posible mecanismo de modulación sea de aparición filogenéticamente tardía, estando reservado a organismos con un sistema nervioso más complejo que el de los anfibios.

Sea cual fuere la función del acetilglutamato cerebral, nuestros resultados aportan evidencias importantes en favor de que NAA y NAG se sintetizan por la misma actividad enzimática: ambos compuestos se encuentran en la fracción soluble [27], predominan en la sustancia gris, aumentan a la

vez con el desarrollo y sólo hay acetilglutamato presente cuando el acetilaspártato está también presente. Estas características difieren notablemente de las del acetilglutamato hepático, que es mitocondrial [1] y está presente a un nivel considerable sin que exista un nivel sustancial de acetilaspártato. Estas diferencias apoyan nuestra visión de que la síntesis de acetilglutamato sucede mediante mecanismos diferentes en hígado y cerebro. La figura 3.13 relaciona los niveles de NAG y NAA en todas las muestras analizadas en este trabajo con la excepción de las muestras hepáticas. Como puede verse existe una correlación razonablemente buena entre los niveles de ambos acilaminoácidos para las muestras de animales experimentales. En las muestras humanas también parece existir correlación, si bien la dispersión es mayor y la pendiente es menor, indicando que a un cierto nivel de acetilaspártato le corresponde un nivel más alto de NAG que a otras especies. El predominio de tumores entre las muestras humanas y los menores niveles de NAA de la corteza cerebral peritumoral quizá den cuenta de estas diferencias entre el hombre y otras especies, aunque no puede descartarse que los mayores niveles humanos se deban a que la LANAT, en el hombre, exhiba mejores propiedades cinéticas frente al glutamato que el enzima de especies inferiores, o a que la actividad degradativa de acetilglutamato sea mucho menos activa en el hombre que en otras especies.

La estrecha relación existente entre acetilaspártato y acetilglutamato hace muy difícil no concluir que un mismo enzima genera ambos acetilaminoácidos en el cerebro. La

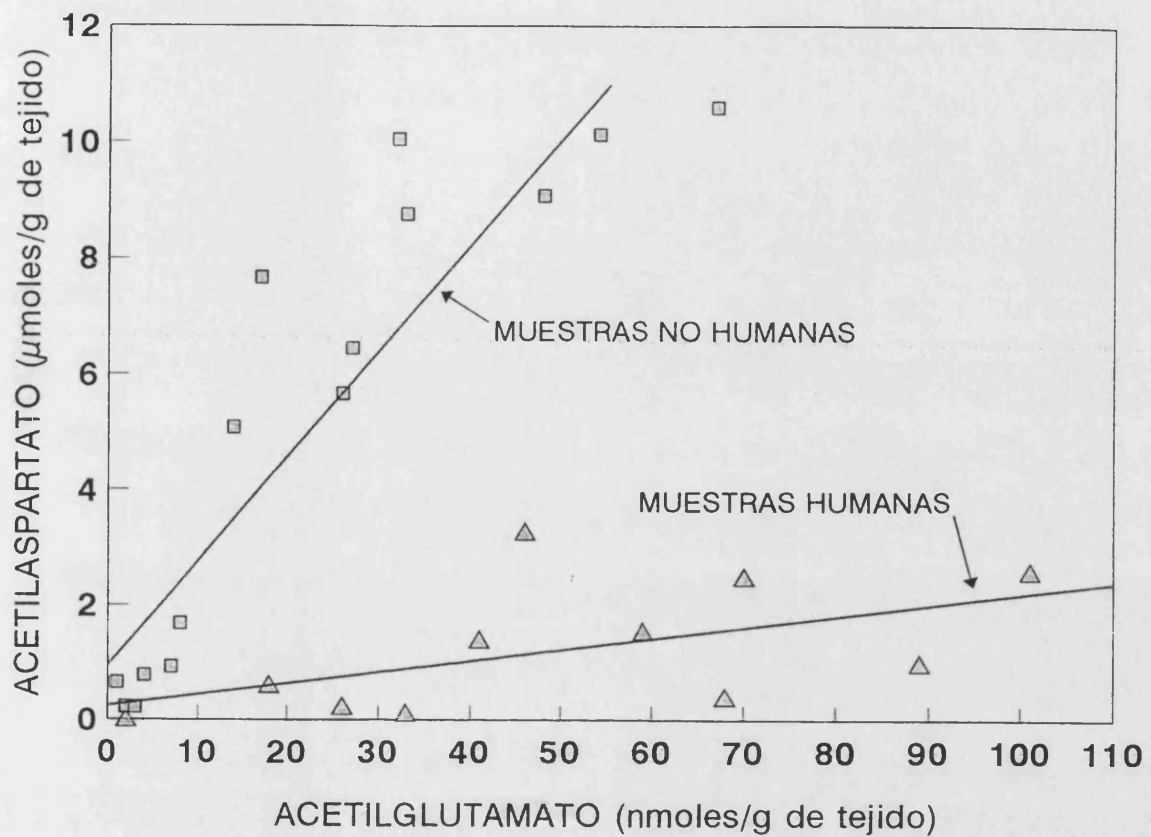


Fig. 3.13 Correlación entre los niveles de acetilglutamato y acetilaspato en las muestras estudiadas (excepto muestras de hígado). Regresión para las muestras de animales, $r=0.9$, y para las humanas, $r=0.54$.

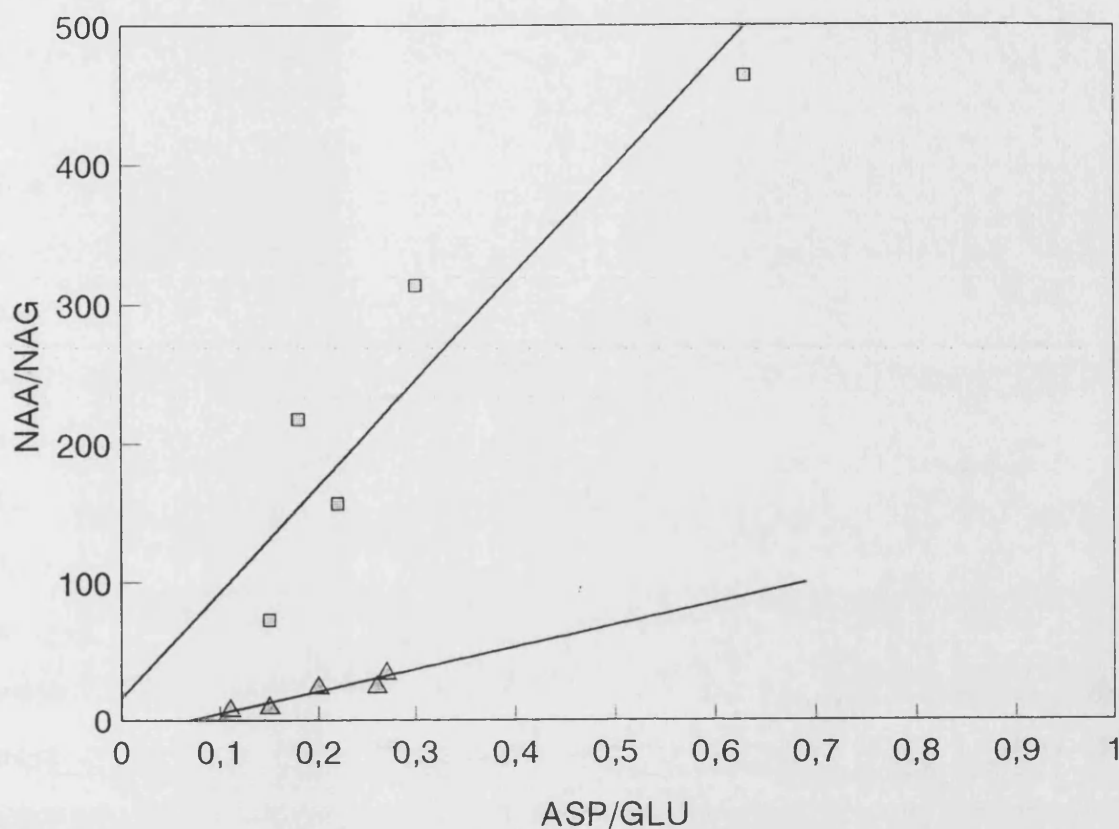


Fig. 3.14. Correlación entre el cociente de los niveles de acetilaspártato y acetilglutamato y el cociente de los niveles de aspártato y glutamato. Se han usado algunas muestras en que se determinó aspártato y glutamato mediante HPLC-OPA. No se han usado muestras de hígado. Regresión para muestras procedentes de animales (□), $r=0.92$, y para las humanas (Δ), $r=0.95$.

existencia de una única actividad capaz de acetilar aspartato y glutamato con diferente eficiencia viene sugerida por la existencia también de cierto grado de correlación entre el cociente NAA/NAG y la relación aspartato/glutamato en las muestras en que se ensayaron estos aminoácidos (Fig. 3.14). Nuevamente pueden trazarse dos rectas, una para el hombre y otra para otras especies, siendo la relación más favorable para el acetilglutamato en el hombre. La existencia de correlaciones como las desveladas en las figuras 3.13 y 3.14 son de esperar si NAA y NAG son sintetizados en cerebro por la LANAT, el enzima que se sabe es responsable de sintetizar NAA y que utiliza el glutamato con menor eficacia [38]. Si se acepta que la LANAT usa el glutamato con una eficacia unas 15 veces menor que el aspartato (Tabla 3.3), y contando con un nivel cerebral de glutamato unas 3 veces mayor al de aspartato [46], puede esperarse una síntesis unas 5 veces más activa de acetilaspartato que de acetilglutamato. En realidad, hay al menos unas 300 veces más acetilaspartato que acetilglutamato en cerebro. Para explicar esa diferencia hay que postular que la degradación del NAG es considerablemente más rápida que la del acetilaspartato, lo que está en términos generales de acuerdo con el hecho de que la actividad deacilasa de acetilglutamato es considerablemente mayor que la aspartoacilasa (Tabla 3.3).

En este trabajo de Tesis se ha investigado en detalle la existencia de actividad deacilasa de acetilglutamato en cerebro. Esta actividad se asemeja considerablemente en propiedades, estabilidad, especificidad y localización

subcelular a la aminoacilasa I, el enzima que, en el hígado, se piensa es responsable de la degradación de acetilglutamato [37]. Por tanto, el acetilglutamato cerebral difiere del hepático en su síntesis, mediada por enzimas diferentes en cerebro e hígado, pero se asemeja en su degradación, mediada por el mismo tipo de enzima. La considerablemente menor actividad aminoacilasa en el cerebro que en el hígado [37] hace posible que en el primero de ambos órganos este enzima y su sustrato coexistan en el mismo compartimento, sin desaparición prácticamente completa del acetilglutamato. En el hígado ello no sería factible dada la actividad aminoacilasa existente, lo que justifica la separación de sustrato y enzima en distintos compartimentos: mitocondria y citosol [37].

3.6 REFERENCIAS

1. Shigesada, K., and Tatibana, M. (1971) Role of acetylglutamate in ureotelism. Occurrence and biosynthesis of acetylglutamate in mouse and rat tissues. J. Biol. Chem. 246, 5588-5595.
2. Hall, L.M., Metzenberg, R.L., and Cohen, P.P. (1958) Isolation and characterization of a naturally occurring cofactor of carbamyl phosphate biosynthesis. J. Biol. Chem. 230, 1013-1021.
3. Marshall, M., Metzenberg, R. L., and Cohen, P.P. (1961) Physical and kinetic properties of carbamyl phosphate synthetase from frog liver. J. Biol. Chem. 236, 2229-2237.
4. Shigesada, K., Aoyagi, K., and Tatibana, M. (1978) Role of acetylglutamate in ureotelism. Variations in acetylglutamate levels and its possible significance in control of urea synthesis in mammalian liver. Eur. J. Biochem 85, 385-391.
5. Ratner, S. (1973) Enzymes of arginine and urea synthesis. Adv. Enzymol. 39, 1-90.
6. Paulus, H. (1983) The evolutionary history of the ornithine cycle as a determinant of its structure and regulation. Curr. Topics. Cell. Regul. 22, 177-200.
7. Meijer, A.J., Lof, C., Ramos, I.C., and Verhoeven, A.J. (1985) Control of ureogenesis. Eur. J. Biochem. 148, 189-196.
8. Meijer, A.J., Lamers, W.H., and Chamuleau, R.A.F.M. (1990) Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. Physiol. Rev. 70, 701-747.
9. Meijer, A.J., and Hensgens, H.E.S.J. (1982) Ureogenesis. In: Sies, H. (ed.) Metabolic compartmentation, 259-286, Academic Press, London and New York.
10. Tatibana, M., Shigesada, K., and Mori, M. (1976) Acetylglutamate synthetase. In: Grisolia, S., Báguena, R., and Mayor, F. (eds.), The urea cycle, 95-105, Wiley and Sons, New York.

11. Alonso, E., and Rubio, V. (1989) Participation of ornithine aminotransferase in the synthesis and catabolism of ornithine in mice. Biochem. J. 259, 131-138.
12. Alonso, E. (1986) Aspectos experimentales del ciclo de la ornitina. Tesis doctoral, Universidad de Valencia.
13. Jones, M.E. (1983) Catalysts of the urea cycle. Transac. N.Y. Acad. Sci. 41, 77-82.
14. Windmueller, H.G., and Spaeth, A.E. (1974) Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. J. Biol. Chem. 249, 5070-5079.
15. Alonso, E., and Rubio, V. (1985) Determination of N-acetyl-L-glutamate using high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 146, 252-259.
16. Alonso, E., and Rubio, V. (1989) Orotic aciduria due to arginine deprivation: changes in the levels of carbamoyl phosphate and other urea cycle intermediates in mouse liver. J. Nutr. 119, 1188-1195.
- 16a. Stewart, P.M., and Walser, M. (1980) Short term regulation of ureagenesis. J. Biol. Chem. 255, 5270-5280.
17. Alonso, E., Girbés, J., García-España, A., and Rubio, V. (1989) Changes in urea cycle-related metabolites in the mouse after combined administration of valproic acid and an amino acid load. Arch. Biochem. Biophys. 272, 267-273.
18. García-España, A., Alonso, E., and Rubio, V. (1991) Influence of anions on the activation of carbamoyl phosphate synthetase (ammonia) by acetylglutamate. Arch. Biochem. Biophys. 288, 414-420.
19. Lund, P., and Wiggins, D. (1984) Is N-acetylglutamate a short-term regulator of urea synthesis? Biochem. J. 218, 991-994.
20. Meijer, A.J., and Verhoeven, A.J. (1984) N-Acetylglutamate and urea synthesis. Biochem. J. 223, 559-560.

21. Blackburn, E.H., Hird, F.J.R., and Jones, I.K. (1972) Metabolism of glutamine and ammonia in rat liver: the effects of N-acetylglutamate and phosphate. Arch. Biochem. Biophys. 152, 265-271.
22. Wolf, E.C., and Weiss, R.L. (1980) Acetylglutamate kinase. A mitochondrial feedback-sensitive enzyme of arginine biosynthesis in *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 255, 9189-9195.
23. Auditore, J.V., Wade, L., and Olson, E.J. (1966) Occurrence of N-acetyl-L-glutamic acid in the human brain. J. Neurochem. 13, 1149-1155.
24. Reichelt, K.L., and Kvamme, E. (1967) Acetylated and peptide bound glutamate and aspartate in brain. J. Neurochem. 14, 987-996.
25. Reichelt, K.L., and Fonnum, F. (1969) Subcellular localization of N-acetyl-L-aspartyl-glutamate, N-acetylglutamate and glutathione in brain. J. Neurochem. 16, 1409-1416.
26. Buniatan, H.Ch., and Davtian, M.A. (1966) Urea synthesis in brain. J. Neurochem. 13, 743-753.
27. Alonso, E., García-Pérez, M.A., Bueso, J., and Rubio, V. (1991) N-acetyl-L-glutamate in brain: assay, levels, and regional and subcellular distribution. Neurochem. Res. 16, 787-794.
28. Robinson, M.B., Blakely, R.D., Couto, R., and Coyle, J.T. (1987) Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. J. Biol. Chem. 262, 14498-14506.
29. Blakely, R.D., and Coyle, J.T. (1988) The neurobiology of N-acetylaspartylglutamate. Int. Rev. Neurobiol. 30, 39-100.
30. Haas, D., Kurer, V., and Leisinger, T. (1972) N-Acetylglutamate synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*. An assay "in vitro" and feedback inhibition by arginine. Eur. J. Biochem. 31, 290-295.
31. Leisinger, T., and Haas, D. (1975) N-Acetylglutamate synthase of *Escherichia coli*: regulation of synthesis

and activity by arginine. J. Biol. Chem. 250, 1690-1693.

32. Kawamoto, S., Ishida, H., Mori, M., and Tatibana, M. (1982) Regulation of N-Acetylglutamate synthetase in mouse liver. Postprandial changes in sensitivity to activation by arginine. Eur. J. Biochem. 123 637-641.
33. Sonoda, T., and Tatibana, M. (1983) Purification of N-acetyl-L-glutamate synthetase from rat liver mitochondria and substrate and activator specificity of the enzyme. J. Biol. Chem. 258, 9839-9844.
34. Vogel, H.J., and Vogel, R.H. (1974) Enzymes of arginine biosynthesis and their repressive control. Adv. Enzymol. 40, 65-90.
35. Davis, R.H. (1986) Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 50, 280-313.
36. Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A., and Stalon, V. (1986) Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. Microbiol. Rev. 50, 314-352.
37. Reglero, A., Rivas, J., Mendelson, J., Wallace, R., and Grisolia, S. (1977) Deacylation and transacetylation of acetyl glutamate and acetyl ornithine in rat liver. FEBS Lett. 81, 13-17.
38. Truckenmiller, M.E., Namboodiri, M.A.A., Brownstein, M.J., and Neale, J.H. (1985) N-Acetylation of L-aspartate in the nervous system: differential distribution of a specific enzyme. J. Neurochem. 45, 1658-1662.
39. Birnbaum, S. M. (1955) Aminoacylase. In: Colowick, S.P., and Kaplan, N.O. (eds.) Methods Enzymol. 2, 115-119, Academic Press, New York.
40. Knox, W. E. (1976) Enzyme patterns in fetal, adult and neoplastic rat tissues. Page 298. S. Karger, Basel.
41. Grisolia, S., Reglero, A., and Rivas, J. (1977) N-formyl-methionine deformylase of animal tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 237-244.

42. Marks, N., Lo, E.S., Stern, F., and Danho, W. (1983) Observations on N^α-deacylation of model amino acids and peptides: distribution and purification of a specific N-acyl amino acid releasing enzyme in rat brain. J. Neurochem. 41, 201-208.

43. Henseling, J., and Röhm, K.H. (1988) Aminoacylase I from hog kidney: anion effects and the pH dependence of kinetic parameters. Biochim. Biophys. Acta 959, 370-377.

44. Tallan, H.H., Moore, S., and Stein, W.H. (1956) N-acetyl-L-aspartic acid in brain. J. Biol. Chem. 219, 257-264.

45. Tallan, H.H. (1957). Studies on the distribution of N-acetyl-L-aspartic acid in brain. J. Biol. Chem. 224: 41-45.

46. Agarwal, H.C., Davis, J.M., and Himwich, W.A. (1966) Postnatal changes in free amino acid pool of rat brain. J. Neurochem. 13, 607-615.

47. Miyake, M., Kakimoto, Y., and Sorimachi M. (1981) A gas chromatographic method for the determination of N-acetyl-L-aspartic acid, N-acetyl- α -aspartylglutamic acid and β -citryl-L-glutamic acid and their distributions in the brain and other organs of various species of animals. J. Neurochem. 36, 804-810.

48. Kaul, R., Casanova, J., Johnson, A. B., Tang, P., and Matalon, R. (1991) Purification, characterization, and localization of aspartoacylase from bovine brain. J. Neurochem. 56, 129-135.

49. Nadler, J.V., and Cooper J.R. (1972) N-acetyl-L-aspartic acid content of human neural tumours and bovine peripheral nervous tissues, J. Neurochem. 19, 313-319.

50. Koller, K.J., and Coyle, T. (1984) Ontogenesis of N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartyl-glutamate in rat brain. Dev. Brain Res. 15, 137-140.

51. Miyake, M., and Kakimoto, Y. (1981) Developmental changes of N-acetyl-L-aspartic acid, N-acetyl- α -aspartylglutamic acid and β -citryl-L-glutamic acid in different brain regions and spinal cord of rat and guinea pig. J. Neurochem. 37, 1064-1067.

52. Koller, K.J., Zaczek, R., and Coyle, J.T. (1984) N-Acetyl-aspartyl-glutamate: regional levels in rat brain and the effects of brain lesions as determined by a new HPLC method. J. Neurochem. 43, 1136-1142.
53. Moffett, J.R., Namboodiri, M.A.A., Cangro, C.B., and Neale, J.H. (1991) Immunohistochemical localization of N-acetylaspartate in rat brain. NeuroReport 2, 131-134.
54. Urenjak, J., Williams, S.R., Gadian, D.G., and Noble, M. (1992) Specific expression of N-acetylaspartate in neurons, oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitors, and immature oligodendrocytes in vitro. J. Neurochem. 59, 55-61.
55. McIntosh, J.C., and Cooper, J.R. (1965) Studies on the function of N-acetyl aspartic acid in brain. J. Neurochem. 12, 825-835.
56. Cangro, C.B., Namboodiri, M.A.A., Sklar, L.A., Corigliano-Murphy, A., and Neale, J.H. (1987) Immunohistochemistry and biosynthesis of N-acetylaspartyl-glutamate in spinal sensory ganglia. J. Neurochem. 49, 1579-1588.
57. Sinichkin, A., Sterri, S., Edminson, P.D., Reichelt, K.L., and Kvamme, E. (1977) "In vivo" labelling of acetyl-aspartyl peptides in mouse brain from intracranially and intraperitoneally administered acetyl-L-[U-¹⁴C]aspartate. J. Neurochem. 29, 425-431.
58. Burgal, M., Jorda, A., and Grisolia, S. (1982) Effects of N-acetyl aspartate, aspartate, and glutamate on cAMP and cGMP levels in developing rat cerebral cortex.. J. Neurochem. 38, 1498-1500.
59. Rous, S. (1973) Acetylaspartate as an extramitochondrial physiological carrier of acetyl CoA for fatty acid synthesis. Life Sci. 13, 1715-1724.
60. D'Adamo, A.F., Gidez, L.I., and Yatsu, F.M. (1968) Acetyl transport mechanisms. Involvement of N-Acetyl aspartic acid in "de novo" fatty acid biosynthesis in the developing rat brain. Exp. Brain Res. 5, 267-273.
61. Burri, R., Steffen, C., and Herschkowitz, N. (1991)

N-acetyl-L-aspartate is a major source of acetyl groups for lipid synthesis during rat brain development. Dev. Neurosci. 13, 403-411.

62. Meyerhoff, D.J., MacKay, S., Bachman, L., Poole, N., Dillon, W.P., Weiner, M.W., and Fein, G. (1993) Reduced brain N-acetylaspartate suggests neuronal loss in cognitively impaired human immunodeficiency virus-seropositive individuals: In vivo ^1H magnetic resonance spectroscopic imaging. Neurology 43, 509-515.
63. Dunlop, D.S., Mc Hale, D.M., and Lajtha, A. (1992) Decreased brain N-acetylaspartate in Huntington's disease. Brain Res. 580, 44-48.
64. Klunk, W.E., Panchalingam, K., Moosy, J., McClure, R.J., and Pettegrew, J.W. (1992) N-acetyl-L-aspartate and other amino acid metabolites in Alzheimer's disease brain. Neurology 42, 1578-1585.
65. Matalon, R., Kaul, R., Casanova, J., Michals, K., Johnson, A., Rapin, I., Gashkoff, P., and Deanching, M. (1989) Aspartoacylase deficiency: the enzyme defect in Canavan disease. J. Inher. Metab. Dis. 12, 329-331.
66. Hagenfeldt, L., Bollgren, I., and Venizelos, N. (1987) N-Acetylaspartic aciduria due to aspartoacylase deficiency. A new aetiology of childhood leukodystrophy. J. Inher. Metab. Dis. 10, 135-141.
67. D'Adamo, A. F., Crispin Smith, J., and Woiler, C. (1973) The occurrence of N-acetylaspartate amidohydrolase (aminoacylase II) in the developing rat. J. Neurochem. 20, 1275-1278.
68. Curatolo, A., D'Arcangelo, P., Lino, A., and Brancati, A. (1965) Distribution of N-acetyl-aspartic and N-acetyl-aspartyl-glutamic acids in nervous tissue. J. Neurochem. 12, 339-342.
69. Miyamoto, E., Kakimoto, Y., and Sano, I. (1966) Identification of N-acetyl- α -aspartylglutamic acid in the bovine brain. J. Neurochem. 13, 999-1003.
70. Guarda, A.S., Robinson, M.B., Ory-Lavollée, L., Forloni, G.L., Blakely, R.D., and Coyle, J.T. (1988) Quantitation of N-acetyl-aspartyl-glutamate in microdissected rat brain nuclei and peripheral tissues: findings with a

novel liquid phase radioimmunoassay. Mol. Brain Res. 3, 223-232.

71. Tieman, S.B., Cangro, C.B., and Neale, J.H. (1987) N-Acetylaspartylglutamate immunoreactivity in neurons of the cat's visual system. Brain Res. 420, 188-193.
72. Tieman, S.B., Neale, J.H., and Tieman, D.G. (1991) N-Acetylaspartylglutamate immunoreactivity in neurons of the monkey's visual pathway. J. Comp. Neurol. 313, 45-64.
73. Cassidy, M., and Neale, J.H. (1993) Localization and transport of N-acetylaspartylglutamate in cells of whole murine brain in primary culture. J. Neurochem. 60, 1631-1638
74. Williamson, L.C., and Neale, J.H. (1988) Ultrastructural localization of N-acetylaspartylglutamate in synaptic vesicles of retinal neurons. Brain Res. 456, 375-381.
75. Zollinger, M., Amsler, U., Quang Do, K., Streit, P., and Cuénod, M. (1988) Release of N-acetylaspartylglutamate on depolarization of rat brain slices. J. Neurochem. 51, 1919-1923.
76. Pittaluga, A., Barbeito, L., Serval, V., Godeheu, G., Artaud, F., Glowinski, J., and Chéramy, A. (1988) Depolarization-evoked release of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate from rat brain synaptosomes. Eur. J. Pharmacol. 158, 263-266.
77. Williamson, L.C., Eagles, D.A., Brady, M.J., Moffett, J.R., Namboodiri, M.A.A., and Neale, J.H. (1991) Localization and synaptic release of N-acetylaspartylglutamate in the chick retina and optic tectum. Eur. J. Neurosci. 3, 441-451.
78. Trombley, P.Q., and Westbrook, G.L. (1990) Excitatory synaptic transmission in cultures of rat olfactory bulb. J. Neurophysiol. 64, 598-606.
79. Galli, T., Godeheu, G., Artaud, F., Pittaluga, A., Barbeito, L., Glowinski, J., and Chéramy, A. Specific role of N-acetyl-aspartyl-glutamate in the "in vivo" regulation of dopamine release from dendrites and nerve terminals of nigrostriatal dopaminergic neurons in the cat. Neuroscience 42, 19-28.

80. Wroblewska, B., Wroblewski, J.T., Saab, O.H., and Neale, J.H. (1993) N-acetylaspartylglutamate inhibits forskolin-stimulated cyclic AMP levels via a metabotropic glutamate receptor in cultured cerebellar granule cells. J. Neurochem. 61, 943-948.
81. Blakely, R.D., Robinson, M.B., Thompson, R.C., and Coyle, J.T. (1988) Hydrolysis of the brain N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate: subcellular and regional distribution ontogeny, and the effect of lesions on N-acetylated- α -linked acidic dipeptidase activity. J. Neurochem. 50, 1200-1209.
82. Fuhrman, S., Palkovits, M., Cassidy, M., and Neale, J.H. (1994) The regional distribution of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) and peptidase activity against NAAG in the rat nervous system. J. Neurochem. 62, 275-281.
83. Cassidy, M., and Neale, J.H. (1993) N-acetylaspartylglutamate catabolism is achieved by an enzyme on the cell surface of neurons and glia. Neuropeptides 24, 271-278
84. Williamson, L.C., and Neale, J.H. (1992) Uptake, metabolism, and release of N-[³H]-acetylaspartylglutamate by the avian retina. J. Neurochem. 58, 2191-2199.
85. Serval, V., Galli, T., Chéramy, A., Glowinski, J., and Lavielle, S. (1992) In vitro and in vivo inhibition of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate catabolism by N-acylated L-glutamate analogs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 260, 1093-1100.
86. Cotman, C.W. (1974) Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fraction. In: Fleischer, S., and Packer, L. (eds.) Methods Enzymol. 31, 445-452, Academic Press, New York.
87. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
88. Benuck, M. (1974) Isolation and determination of N-Acetyl-L-aspartic acid and related compounds in brain. In: Mark, N., and Rodnight, R. (eds) Research Methods in Neurochemistry 2, pp 361-376, Plenum Press, New York, London.

89. Cohen, P.P. (1976) Evolutionary and comparative aspects of urea biosynthesis. In: Grisolia, S., Báguena, R., and Mayor, F., (eds.) The Urea Cycle, pp 21-38, John Wiley & Sons, Inc., New York.

90. Auditore, J.V., and Wade, L. (1973) Isolation of N-acetylglutamine, pyroglutamic acid and the butyl ester of pyroglutamic acid from human brain. J. Neurochem 21, 335-343.

91. Sáez, R., Burgal, M., Renau-Piqueras, J., Marqués, A., and Guerri, C. (1991) Evolution of several cytoskeletal proteins of astrocytes in primary culture: effect of prenatal alcohol exposure. Neurochem. Res. 16, 737-747.

92. Peeling, J., and Sutherland, G. (1992) High-resolution ¹H NMR spectroscopy studies of extracts of human cerebral neoplasms. Magn. Reson. Med. 24, 123-136.

93. Wakabayashi, Y., Iwashima, A., Yamada, E., and Yamada, R.H. (1991) Enzymological evidence for the indispensability of small intestine in the synthesis of arginine from glutamate. II N-acetylglutamate synthase. Arch. Biochem. Biophys. 152 9-14.

94. Gade, W., and Brown, J.L. (1981) Purification, characterization and possible function of α -N-acylamino acid hydrolase from bovine liver. Biochim. Biophys. Acta 662, 86-93.

95. Endo, Y. (1978) Deacetylation and deformylation of N-acyl amino acids by kidney acylases. FEBS Lett. 95, 281-283.

96. Kördel, W., and Schneider, F. (1977) Renal aminoacylase, a zinc enzyme. Z. Naturforsch. 32c, 342-344.

97. Tuchman, M., and Holzknecht, R.A. (1990) N-Acetylglutamate content in liver and gut of normal and fasted mice, normal human livers, and livers of individuals with carbamyl phosphate synthetase or ornithine trans-carbonylase deficiency. Pediatr. Res. 27, 408-412.

98. Penefsky, H.S. (1977) Reversible binding of P_i by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 252, 2891-2899.

4 .HALLAZGO DE LA MUTACION SPF-ASH EN PACIENTES
CON DEFICIENCIA DE ORNITINA TRANSCARBAMILASA
DE SEVERIDAD MODERADA

4.1 INTRODUCCION

De los 5 errores clásicos del ciclo de la urea, la deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTC, E.C. 2.1.3.3) es el más frecuente [1]. La OTC cataliza el segundo paso del ciclo, la formación de citrulina a partir de carbamil fosfato y de ornitina. El enzima se encuentra en la matriz mitocondrial de los hepatocitos y de la mucosa intestinal [1]. El gen que codifica este enzima es nuclear, localizándose en el brazo corto del cromosoma X (Fig. 4.1), en la banda Xp 21.1, próximo a los genes de la distrofia muscular de Duchenne-Becker, hipoplasia adrenal, retinitis pigmentosa, glicerol quinasa y enfermedad granulomatosa crónica entre otros [2]. El gen ha sido clonado y secuenciado, abarcando un total de 73 kb. Contiene 10 exones y 9 intrones de tamaños comprendidos entre 54 y 154 pb para los exones, y 80 pb y 21.7 kb para los intrones (Fig. 4.2) [3,4].

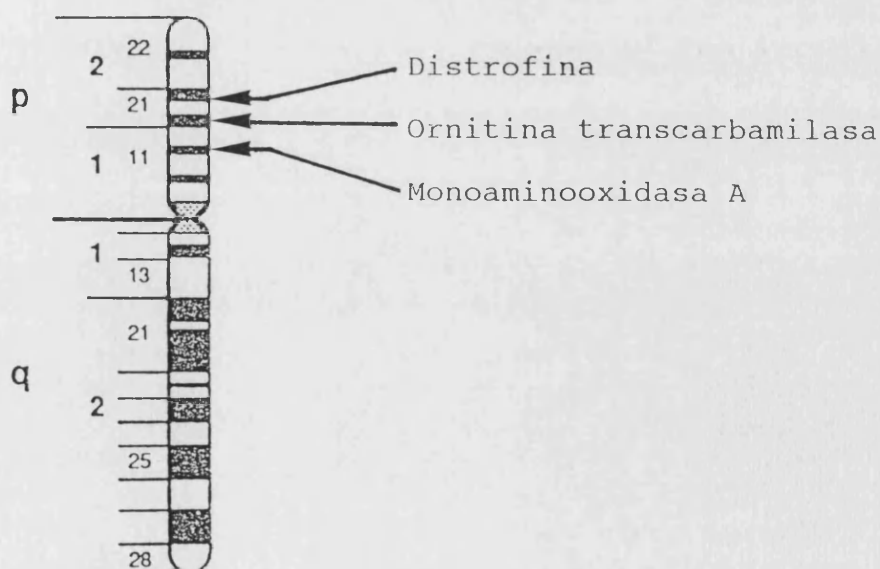


Figura 4.1. Localización del gen de la OTC en el cromosoma X.

A partir de este gen se produce en el hombre un ARNm de 1849 bases, que se traduce en una proteína (preOTC) de 354 aminoácidos. Este precursor contiene una secuencia líder de 32 aminoácidos, con 8 aminoácidos básicos y ninguno ácido, de los que la arginina 23 se ha demostrado esencial para la incorporación a la matriz mitocondrial [5,6]. Esta secuencia líder es cortada en la mitocondria, resultando un polipéptido enzimático maduro de 36 kDa. El enzima funcionalmente activo en la matriz mitocondrial es un homotrímero formado a partir de este polipéptido de 36 kDa.

Al ser una enfermedad ligada al cromosoma X, la deficiencia de OTC se transmite maternalmente, una fracción importante de los casos resulta de una mutación "de novo" (57% de los casos [7]), y, como consecuencia del fenómeno de la lionización, las hembras heterocigotas pueden presentar grados variables de la deficiencia dependiendo del nivel de expresión del cromosoma mutado en hígado [1,8], por lo que el espectro clínico en las hembras es muy amplio, desde formas asintomáticas hasta formas muy graves. En los varones, hemizigotos, y por tanto enfermos obligatorios, existe una forma temprana que de no ser diagnosticada y tratada inmediatamente conduce al deterioro mental rápido y la muerte del enfermo, y otra forma más leve, de comienzo más tardío, que es el resultado de una actividad enzimática residual sustancial.

La deficiencia de OTC es heterogénea desde el punto de vista bioquímico. Briand y cols. [9] identificaron 5 clases

de defecto enzimático en humanos. Entre los pacientes con síntomas neonatales de la enfermedad, un grupo (37.5% de todos los casos) no presentó actividad enzimática, debido a falta de proteína, y otro grupo (12.5%) exhibió cantidad aproximadamente normal de enzima no activo. Entre los pacientes con síntomas tardíos de la enfermedad, un grupo (18.8% del total) lo formaron pacientes con una reducción en la cantidad de enzima y en su actividad, siendo ambas reducciones paralelas, y detectándose una actividad residual sustancial. Los pacientes de 4º grupo (18.8%) exhibieron valores de K_m anormalmente altos. El último grupo (12.4%) lo constituyeron pacientes cuyo pH óptimo es 9.5, más alto del normal (pH 8) y la actividad a pH neutro está reducida, siendo la cantidad de enzima normal o algo elevada.

Como ilustra la figura 4.2, y de acuerdo con lo esperado a partir de la heterogeneidad enzimática de la deficiencia, se han descrito ya 40 mutaciones en el gen, de las que el 20% son deleciones, y el resto mutaciones puntuales asociadas a patología [10]. De este último conjunto de mutaciones, algunas introducen un codón de terminación (19%), o cambian la pauta de lectura al perder una base (6.3%), con lo que aparece una terminación prematura y se genera una proteína anormalmente corta. Se han descrito algunas mutaciones en la zona de unión exón-intrón. Entre ellas, sólo se ha descrito una mutación exónica en un sitio dador para el procesamiento del ARNm (3.1%) [11].

Las demás mutaciones en la zona de unión exón-intrón, son

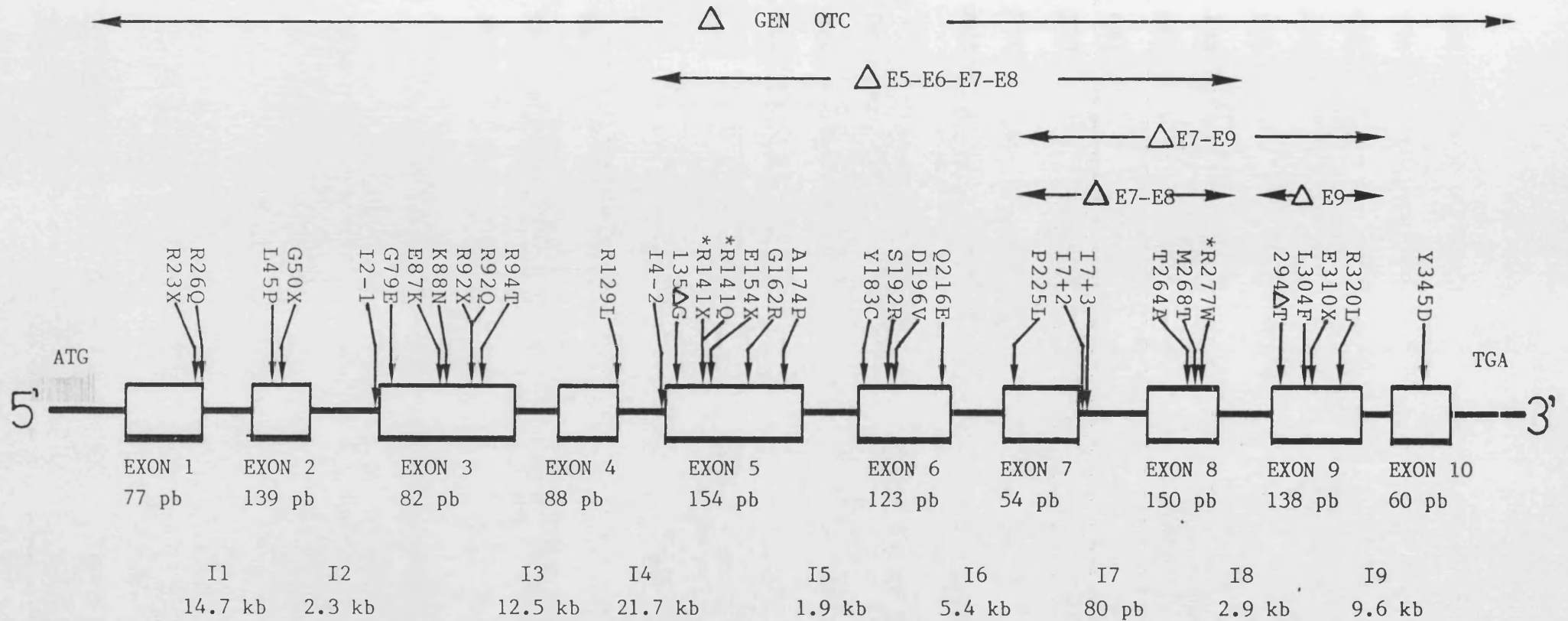


Figura 4.2. Estructura y mutaciones descritas del gen de la OTC. El Δ indica deleciones. Los números precedidos del signo + o - indican la posición de la mutación en el intrón (I) determinado, en el sitio dador (+) o aceptor (-) para el procesamiento del ARN. El asterisco en una mutación indica que se han descrito 2 mutaciones en el ADN idénticas en el mismo codón.

intrónicas, afectando a los sitios dadores (6.3%) o aceptores (6.3%) para el procesamiento del ARNm [10]. Una característica importante es que, a diferencia de lo que sucede en otras enfermedades congénitas, tales como la fibrosis quística [7], no hay una mutación más frecuente que las demás en el gen de la OTC, habiéndose descrito hasta ahora sólomente 2 mutaciones, en distintas bases, en el aminoácido 92; 2 mutaciones en la misma base en el aminoácido 277; y 4 mutaciones en el aminoácido 141, afectando a dos bases distintas (Fig. 4.2). Nuestro trabajo, que describe dos mutaciones idénticas en pacientes no relacionados, constituye, por ello, un hallazgo infrecuente y de interés. De hecho, la mutación descrita aquí es idéntica a la descrita previamente en una cepa de ratón deficiente en ornitina transcarbamilasa.

Existen dos cepas de ratón con deficiencia en OTC [12-14]. La cepa que corresponde a nuestros casos humanos se ha designado "sparse-fur/abnormal skin and hair" (spf-ash). Este ratón posee una reducción tanto en la cantidad de proteína y actividad enzimática, como en la cantidad de ARNm ($\approx 10\%$ de los controles). La mutación es un cambio de G a A en la última base del exón 4 y trae como consecuencia 2 tipos de ARNs tras el procesamiento. Un ARNm bien procesado contiene un cambio de la Arg 129 por una His y se produce a un nivel del 5% de los niveles normales; el otro ARNm producto de un sitio críptico dador para el procesamiento, situado 48 bases dentro del intrón 4, produce un mensajero más largo que es traducido en un 5% del nivel esperado y produce un polipéptido

que no puede ensamblarse en el trímero y por tanto carece de actividad enzimática [14]. La otra cepa mutante, denominada sparse-fur (spf), posee una mutación en una única base del exón 4 que produce un cambio de la His 117 por una Asn. Estos ratones producen cantidades normales o algo más elevadas de lo normal de OTC con un pH óptimo desplazado hacia la parte básica, lo que resulta en una baja actividad ($\approx 10\%$) a pH neutro. Estos ratones muestran una elevación de amonio plasmático, aciduria orótica, crecimiento retrasado y un metabolismo anormal del pelo.

El diagnóstico se basa en el cuadro clínico, y en las determinaciones de amonio y citrulina en el plasma y de orotato urinario. Como ya se discutió en capítulos anteriores, un déficit de actividad OTC, se traduce en acumulación de carbamil fosfato en la mitocondria hepática, escape de este metabolito al citosol y su utilización en una síntesis excesiva de orotato, que escapa y aparece concentrado en la orina. La identificación de portadoras se ha basado clásicamente en las determinaciones de amonio y glutamina en el plasma y de orotato urinario después de una sobrecarga de proteína o alanina [15,16] o, más recientemente en la medida de orotidina y orotato urinario después de la administración de una única dosis de alopurinol [17]. Este último compuesto es transformado in vivo en oxipurinol por la xantina oxidasa, y el ribonucleótido del oxipurinol inhibe a la orotidina 5'-fosfato decarboxilasa por lo que se acumula orotidina monofosfato y su precursor orotato. Asimismo la orotato fosforibosiltransferasa debe estar inhibida al

reducir el contenido intracelular de fosforibosil pirofosfato [18], lo que lleva a la acumulación de orotidina y orotato generados y su aparición en la orina, aún sin sobrecarga nitrogenada. El amplio rango de actividad OTC en el hígado de portadoras heterocigotas limita la sensibilidad de estas técnicas [19].

El uso de ADN ha facilitado el diagnóstico de portadoras y ha abierto una nueva puerta para el diagnóstico prenatal [20-23]. Las técnicas usadas para establecer el patrón hereditario de la mutación en familias cuya madre había sido diagnosticada como portadora por los métodos bioquímicos ha sido, y aún es en muchos casos, el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) [22,24-29]. Para este gen se han detectado 4 puntos intragénicos de restricción polimórfica, 2 para la enzima de restricción Msp I (bandas polimórficas de 6.6/6.2; y 5.1/4.4 kb, respectivamente), 1 para Bam HI (18/5.2 kb), y otro para Taq I (3.7/3.6 kb). El análisis se basa en la digestión del ADN con estas enzimas y la detección de las bandas polimórficas después de un Southern blot e hibridación con una sonda de ADNc para la OTC [22,24-29]. Sin embargo, este estudio es laborioso y con frecuencia el patrón de RFLP no es informativo por ser la madre homocigota para los polimorfismos de restricción. La alta frecuencia de nuevas mutaciones impide utilizar este método para establecer si la madre de un enfermo es o no portadora, pero si puede excluir que hermanas del enfermo sean portadoras. Por otra parte esta técnica puede permitir detectar grandes inserciones y/o

delecciones en el gen [24,29].

La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [30], el análisis de polimorfismos conformacionales de simple cadena (SSCP) [31], y la secuenciación directa de productos de PCR [32], han simplificado considerablemente la identificación de mutaciones. La figura 4.2 ilustra las mutaciones descritas hasta ahora para este gen, la mayoría de ellas combinando SSCPs y secuenciación. Aunque el ARN para OTC no es accesible en tejidos periféricos, pueden amplificarse los exones y secuencias intrónicas flanqueantes del gen de la OTC a partir de ADN genómico, y analizarse lo amplificado para buscar la mutación. Este tipo de análisis está sustituyendo en buena medida al de ligamiento para RFLPs, y ya se han identificado, usando esta técnica, casi la mitad de las mutaciones descritas (Fig. 4.2). Es esta metodología la que ha conducido a los resultados del presente estudio. La identificación de mutaciones en enfermos permite luego identificar portadoras y realizar el análisis prenatal. Además, la información obtenida, puede servir para correlacionar la naturaleza y localización de la mutación con el grado de deficiencia. Esta información no es sólo de interés clínico o genético, pues también puede darnos información de gran valor para localizar funciones en el enzima, particularmente si se resuelve la estructura tridimensional de la OTC humana.

Los dos casos humanos descritos aquí han sido los primeros detectados al introducir en nuestro laboratorio las

técnicas de análisis de ADN a los enfermos de OTC que habíamos diagnosticado previamente mediante ensayos plasmáticos, urinarios y* enzimáticos.

*Nota al pie: Ya hemos identificado dos mutaciones adicionales no descritas hasta la fecha, ambas en hembras enfermas y no relacionadas. Una constituye el cambio de la isoleucina 159 por treonina y la otra el cambio de la alanina 209 por valina.

4.2 MATERIAL

4.2.1 Instrumentos

Las electroforesis en geles de agarosa se realizaron en cubetas de Owl Scientific Plastics, Ins., de diversos tamaños. La visualización de los geles teñidos con bromuro de etidio se realizó con un transiluminador Chromato Vue modelo TF-20. Se usaron los sistemas de electroforesis vertical, para electroforesis de poliacrilamida, Mini-Protean II y Protean II XL (Bio Rad Laboratories, Madrid) que permiten usar geles de tamaños 9 x 6.5 o 17.5 x 14.5 cm (anchura x longitud), respectivamente. El aparato de electroforesis para secuenciación de ADN fue de Kodak modelo IBI. Se usaron las fuentes de alimentación LKB modelo 2103 o Pharmacia LKB modelo ECPS 3000/150. Se usó una cetrífuga refrigerada Sorvall RC-5B con rotores SS-34 y GSA; centrífugas clínicas IEC o Selecta; y microcentrífuga Eppendorf modelo 5415. El homogeneizador utilizado fue un Potter-Elvehjem con émbolos de teflón. Se usó un termociclador Geneamp 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwald, Conn.) y tubos para el termociclador Microamp de 0.2 ml de la misma casa. Para el secado de geles de secuenciación se usó un secador Savant SGD 4050; las películas usadas para la autorradiografía del gel fueron X-Omat de Kodak. El revelado de la película se realizó con un revelador automático modelo CURIX 60 de Agfa. La medida de radiactividad se realizó en un contador de centelleo líquido LKB 1211-Rackbeta.

4.2.2 Compuestos radiactivos

El [^{35}S]dATP α S (>1000 Ci/mmol) estabilizado para su conservación a 4°C en una solución coloreada (Redivue), y el Na $_2$ $^{14}\text{CO}_3$ (55 mCi/mmol) se obtuvieron de Amersham International, Madrid. La L-[2,3- ^3H]Ornitina (55 Ci/mmol) se obtuvo de New England Nuclear, Boston, Mass. Como las preparaciones comerciales de [^3H]ornitina contienen impurezas que coeluyen con la citrulina en el sistema cromatográfico usado aquí, el aminoácido marcado fue purificado por absorción a una columna de 0.1-ml de AG50W-X8 (H $^+$, 200-400 de tamaño de malla; de Bio-Rad, Madrid) preparada en una jeringuilla de tuberculina, seguido de lavados sucesivos con 0.5 ml de HCl 10 mM y 2 ml de piridina al 10%. La ornitina purificada se eluyó con 0.8 ml de HCl 6 N. Después de la evaporación del HCl a presión reducida sobre NaOH y P $_2$ O $_5$, la ornitina fue disuelta en HCl 10 mM y conservada a 4°C hasta su uso (<1 mes).

4.2.3 Oligonucleótidos y sondas

Los oligonucleótidos usados para la amplificación de los exones del gen de la OTC (Tabla 4.1), fueron sintetizados por Pharmacia Biotech (Barcelona), Gomensoro Biotech (Madrid) o por British Bio-technology Products (Abingdon, Inglaterra). Los oligonucleótidos usados para la amplificación de los microsátélites del gen de la distrofina y del gen de la monoaminoxidasa A (Tabla 4.2), fueron proporcionados generosamente por el Servicio de Genética del Hospital La Fe.

Una sonda de ADNc de la OTC completa de rata fue proporcionada por el Dr. J. Hernández Yago, de este mismo Instituto. Este clon, denominado pICU1552, lleva el ADNc entero de OTC de rata clonado en pSP64 entre los sitios de restricción Xba I y Sma I [33].

4.2.4 Enzimas

Los enzimas de restricción y modificación empleados aquí fueron de Boehringer Mannheim, Promega Biotech, Amersham International, Pharmacia, o New England Bio Labs y se usaron siguiendo las instrucciones del fabricante excepto para la enzima Msp I, la cuál se usó para las digestiones de ADN genómico a temperatura ambiente durante toda la noche. La ADN polimerasa termoresistente usada fue Dynazyme de Thermus brockianus y se obtuvo de Finnzymes OY, Espoo, Finland. La ornitina transcarbamilasa (Streptococcus faecalis), piruvato quinasa (músculo de conejo, tipo III, libre de sales) y la argininosuccinato liasa (riñón de cerdo, tipo II) fueron de Sigma; la arginasa (hígado de buey) fue de Boehringer. Otros reactivos de grado biología molecular o de grado analítico se obtuvieron de Sigma, Boehringer o Merck.

4.2.5 Soluciones

Las soluciones utilizadas más frecuentemente fueron:

-TE 1X: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM a los pHs de 7.5 o 8.0.

-TBE 1X: Tris-borato 90 mM, EDTA 2.5 mM, pH 8.0.

-SSC 1X: NaCl 0.15 M, Citrato sódico 15 mM, pH 7.0.

-Tampón de carga para electroforesis en gel de agarosa (concentración final): glicerol 10% (v/v), EDTA 5 mM, azul de bromofenol 0.05%, cianol de xileno 0.05%.

La concentración de estas soluciones usada en los distintos experimentos, se indicará en el texto mediante la abreviatura de la solución seguida por un factor multiplicador (5X, 10X, etc) para indicar la concentración.

4.3 METODOS

4.3.1 Marcado de la sonda con digoxigenina

El ADN plasmídico se obtuvo mediante las técnicas habituales [34] y se purificó usando el kit de QUIAGEN (Plasmid Midi Kit), basado en la lisis alcalina de las bacterias, neutralización con tampón acetato potásico pH 5.5, precipitación del cromosoma bacteriano y purificación adicional del ADN plasmídico mediante adsorción a una resina de intercambio aniónico, seguido de elución con sal. El plásmido se precipita de la solución de elución con 0.7 volúmenes de isopropanol, se lava con etanol frío (-20°C) al 70%, se seca a vacío y se resuspende en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0 (tampón TE). Aproximadamente 8 µg (concentración determinada a partir de la absorbancia a 260 nm) del plásmido pICU1552 se digirieron con las enzimas de restricción Sac I y Xba I para separar el ADNc de la OTC de rata del resto del vector (plásmido pSP64). Después, se realizó una electroforesis preparativa en gel de agarosa al 0.7%, se cortó la banda correspondiente al ADNc de la OTC (identificada por su tamaño, 1700 pb), se electroeluyó (tampón TBE 0.2X) y se purificó mediante extracción con fenol y precipitación con etanol absoluto y acetato amónico [34]. Se utilizó aproximadamente 1 µg de este ADNc para el marcado con digoxigenina-11-dUTP mediante iniciación al azar (random priming), usando el kit y las instrucciones de Boehringer Mannheim. Esta técnica se basa en la hibridación al azar de hexanucleótidos al DNA recién desnaturalizado y síntesis

catalizada por el fragmento Klenow de la polimerasa (tipo I) de cadenas complementarias al ADNc a partir de los hexanucleótidos unidos, en las que se incorpora el desoxinucleótido marcado con digoxigenina. Se ha usado la sonda marcada sin purificar para las hibridaciones, ya que hemos observado que de esta forma obtenemos una mayor sensibilidad sin aumento del ruido de fondo.

Por otra parte se amplificó y marcó con digoxigenina el exón 1 de la OTC humana mediante PCR y se usó como sonda para detectar el polimorfismo 5.1/4.4 de la enzima MspI. Para ello se procedió de igual forma que se describe en el apartado de amplificación de ADN por PCR (ver más adelante) excepto en que se omitieron los dNTPs y se sustituyó por la mezcla de marcado con digoxigenina-dUTP (DIG-dUTP; Boehringer). La concentración final de los dNTPs en este caso fue de 100 μM para dATP, dCTP y dGTP; 65 μM para dTTP y 35 μM para DIG-dUTP.

4.3.2 Obtención de ADN genómico humano y detección de fragmentos de restricción polimórfica (RFLP)

Se obtuvo el ADN de leucocitos de sangre periférica mediante digestión exhaustiva con proteinasa K en presencia de SDS, y posterior extracción del ADN con fenol (mediante tubos con una barrera de silicagel, tubos SST de 10 x 1.6 cm, Becton Dickinson, Meylan Cedex, Francia) y precipitación con etanol [35]. Entre 10 y 20 μg de ADN se digirieron con 50-70 unidades de Msp I o de Bam HI a temperatura ambiente o 37°C

respectivamente. El ADN digerido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a voltaje constante (≈ 1.5 V/cm de gel) durante toda la noche. A continuación, el gel se sometió a depurinación (10 min en HCl 0.25 N), desnaturalización (2 x 15 min en NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M), y neutralización (2 x 15 min en Tris-HCl 1 M, NaCl 1.5 M, pH 7.5), y se transfirió el ADN por capilaridad a membranas de nylon Nytran-N (Scheicher & Schuell) [34,36], usando como tampón de transferencia acetato amónico 1 M. El ADN se fijó covalentemente a la membrana mediante irradiación con luz ultravioleta usando el instrumento para entrecruzamiento (Stratalinker, de Stratagene) y se prehibridó a continuación o se guardó bajo vacío en un desecador hasta su uso.

La membrana de nylon se prehibridó con una solución (10-15 ml por 50 cm² de membrana) que contenía: SSC 5X (NaCl 0.75 M, citrato sódico 0.075 M), reactivo de bloqueo al 1% (p/v) (Boehringer), N-lauroilsarcosina al 0.1% (p/v), y SDS al 0.02% (p/v), durante 3-4 h en un baño de agua a 62°C, en bolsitas de plástico selladas. A continuación se hibridó la membrana con esta misma solución renovada (2-3 ml por 50 cm² de membrana), conteniendo entre 50-70 ng/ml de sonda marcada recién desnaturalizada (10 min a 100°C, y enfriamiento rápido en un baño de hielo fundente). La membrana se hibridó a 62°C (sonda de rata) o a 68°C (exón 1 humano amplificado y marcado con digoxigenina por PCR), durante toda la noche. Finalizada la hibridación, la membrana se lavó inicialmente 2 veces (5 min cada una) con una solución que contenía SSC 2X y SDS al 0.1% a temperatura ambiente, y después otras dos veces (15

min cada una) con SSC 0.5X y SDS al 0.1% a 55°C o 65°C, dependiendo de la homología de la sonda, para eliminar la sonda débilmente unida. El filtro se incubó con el anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) y, tras dos lavados, se desarrolló el color al incubar el filtro con los sustratos del enzima (azul de nitrotetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato).

4.3.3 Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los 10 exones del gen de la OTC y los microsátélites DYS-II y DYS-MSA del gen de la distrofina y MAOA del gen de la monoaminoxidasa A de los pacientes y familiares se amplificaron in vitro por PCR [30] usando ADN polimerasa termoresistente (Dynazyme) y pares de oligonucleótidos sintéticos (ver Tablas 4.1 y 4.2) complementarios a las cadenas sentido y antisentido y que definen los extremos de las regiones a amplificar.

Las condiciones de amplificación usadas fueron: 5 min de desnaturalización a 95°C, seguido de 35-40 ciclos de 3 pasos de 0.5 min a 95°C, 0.5 min a 50-55°C, y 0.5 min de polimerización a 72°C. Al final de los 35-40 ciclos, los tubos se incubaron a 72°C durante 5 min. La mezcla de reacción consistió en Tris-HCl 10 mM (pH 8.8 a 25°C), MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM, Triton X-100 al 0.1%, 200 µM de cada dNTP, 25-50 pmoles de cada oligonucleótido, 0.5-1 µg de ADN genómico y 2 U de polimerasa Dynazyme, en un volumen final de

TABLA 4.1. Pares de oligonucleótidos usados para la amplificación de los exones del gen de la OTC humana. Los oligonucleótidos se numeran con el número de exón y las letras m (mensaje) o c (complementario). Los números entre paréntesis indican la posición del primer nucleótido del oligonucleótido con respecto al comienzo (números negativos) o al final (números positivos) de la secuencia de cada exón que es traducida a proteína. Los oligonucleótidos se escogieron de: 1m, 1c, 9m, 9c y 10m [22]; 2m, 3m, 3c, 5m y 5c [23]; 2c [42]; 10c [53]; y 4m, 4c, 6m, 6c, 7m, 7c, 8m y 8c, de una comunicación personal del Dr. R.J. Plante, University of Minnesota Medical School, Minneapolis.

OLIGONUCLEOTIDO	TAMANO DEL	
	PRODUCTO PCR	EXON
	(pares de bases)	
1m (-105)5'tcactgcaactgaacacatttcttag	217	77
1c (+35)5'cctaaatcaaaccgaagtctctgacc		
2m (-14)5'atctctttttacaggtgtggacaacc	171	139
2c (+18)5'agagaaaatgttacatacc		
3m (-23)5'ctattcttgtccttgattta	131	82
3c (+26)5'aagtgtgaatttggcagtgga		
4m (-87)5'gttgagatgatggccaattc	226	88
4c (+51)5'tatccatcagattctgaaat		
5m (-22)5'tctttttcttggtttaccac	196	154
5c (+20)5'agacaaataaataaaccaac		
6m (-23)5'ctccttcatcccgtgcctttt	167	123
6c (+21)5'caaggcaaaaagtttcct		
7m (-33)5'cctaaataagatttaattc	120	54
7c (+33)5'aggcaataatagctttacat		
8m (-22)5'ccagcgtgtttatgtatgct	195	150
8c (+23)5'cctgagagagcatcaatttg		
9m (-22)5'ggtcttatccccatctcttt	182	138
9c (+22)5'ccattccttgtttcttgctt		
10m (-10)5'gtgtcatcaggctgtcatggtgct	97	60
10c (+27)5'gcttctttcttgacaagtaacacaac		

TABLA 4.2. Pares de oligonucleótidos usados para la amplificación de los microsatélites MAOA (repetición CA) del gen de la monoaminooxidasa A [54], y DYS-MSA (repetición TG) [55] y DYS-II (repetición CA) [56] del gen de la distrofina. Estos oligonucleótidos fueron una generosa donación del Departamento de Genética del Hospital La Fe. Se indica en la tabla el rango de tamaños de los productos de PCR de los distintos alelos de estos microsatélites; al tratarse de repeticiones (CA)_n o (TG)_n, el tamaño de los alelos aumenta de 2 en 2 pares de bases. La m o c indican la hebra mensaje o complementaria, respectivamente.

OLIGONUCLEOTIDO	TAMANO DE LOS ALELOS
	(pares de bases)
<u>Gen de la Monoaminooxidasa A</u>	
Microsatélite MAOA	
m 5'agagactagacaagttgcac	112-126
c 5'cactatcttgtagctcact	
<u>Gen de la distrofina</u>	
Microsatélite DYS-MSA	
m 5'atcccatcctgttctatattt	74-88; 56 y 58
c 5'actggcatgcattatatttgt	
Microsatélite DYS-II	
m 5'tcttgatatatagggattatatttgtgtttgttatac	214-228
c 5'attatgaaactataaggaataactcatttagc	

50 μ l. La reacción se llevó a cabo en tubos de 0.2 ml (tubos Microamp, Perkin-Elmer) usando un termociclador Geneamp 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). El resultado de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y el producto restante se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.3.4 Polimorfismos conformacionales de simple cadena (SSCP)

La técnica de SSCP se realizó normalmente en un aparato de electroforesis vertical Mini-Protean II (Bio Rad). La confirmación de los patrones se obtuvo con un sistema Protean II XL (también de Bio Rad). 3 μ l de la mezcla de reacción de amplificación conteniendo el exón amplificado, se añadieron a 17 μ l de una solución que contenía: formamida al 75%, NaOH 10 mM, SDS al 0.01%, EDTA 3 mM, glicerol al 6.25%, azul de bromofenol al 0.03% y cianol de xileno al 0.03%. Se calentó la mezcla 10 min a $95-100^{\circ}\text{C}$ y se enfrió rápidamente en un baño de hielo-sal a -8°C . Aproximadamente 3 min después se aplicaron las muestras al gel. Se usaron geles de entre el 11 y 17% de poliacrilamida, conteniendo glicerol al 5-10% en TBE 1X (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2.5 mM, pH 8.0). La electroforesis se realizó a 150-300 V en TBE 1X. Las muestras se aplicaron al gel estando siempre el tampón de electroforesis a $0-4^{\circ}\text{C}$ al comienzo de la electroforesis. Con el aparato XL se usó refrigeración por agua del grifo durante toda la electroforesis. La electroforesis duró 2-3 horas para los minigeles y 6-12 horas para los geles grandes hasta que el cianol de xileno hubiese salido del gel o estuviese

próximo.

La tinción de plata usada en este trabajo consistió en una fijación de 10-15 min en etanol al 10%, 3 min de oxidación con ácido nítrico al 1%, lavado con agua 2 veces durante 30 seg cada vez, 20 min en solución de nitrato de plata de 2 g/litro, 2 lavados con agua de 30 seg de duración y revelado de color con una solución que contenía carbonato sódico anhidro (29.6 g/litro) y formaldehído (540 μ l de formaldehído al 37%/litro). La reacción de color se detuvo con ácido acético al 10%.

4.3.5 Secuenciación directa de fragmentos de PCR de doble cadena

Hemos secuenciado los fragmentos de PCR sin clonado previo. El ADN obtenido tras la amplificación se purificó con el kit GENECLEAN II (Bio 101, Inc.), siguiendo las intrucciones del fabricante, para eliminar nucleótidos, oligonucleótidos, enzima y tampón. El ADN de doble cadena, eluido en agua, se usó como molde para las reacciones de la SEQUENASE Version 2.0 (USB), tal como describe Tsai y cols. [37] y Casanova y cols. [32].

Cada exón se secuenció en las direcciones directa y reversa, usando los oligonucleótidos sentido y antisentido utilizados para amplificar el exón. Para la reacción de hibridación mezclamos en un tubo eppendorf de 0.5 ml, 2 μ l de tampón sequenasa 5X (Tris-HCl 200 mM pH 7.5, MgCl₂ 100 mM,

NaCl 250 mM), 1.5 μ l del oligonucleótido (0.1 mg/ml), 1 μ l de dimetil sulfóxido (para evitar estructuras secundarias del ADN) y 5.5 μ l de ADN de doble cadena (entre 0.4 y 1.5 μ g). Esta mezcla se incubó a 95°C durante 5 min, para desnaturalizar el ADN, y tras este tiempo se enfrió rápidamente en un baño de hielo seco-alcohol (-70°C) hasta usarlo para la reacción de síntesis.

A los 10 μ l de la mezcla de hibridación se le añadió 6.5 μ l de una solución que contenía 1 μ l de dithiothreitol 0.1 M, 0.5 μ l de 35 SdATP (10 μ Ci/ μ l; 1000 Ci/mmol), 2 μ l de una mezcla de nucleótidos diluída (dGTP 1.5 μ M, dCTP 1.5 μ M, dTTP 1.5 μ M), 1 μ l de solución de manganeso (MnCl₂ 0.1 M, isocitrato sódico 0.15 M), 0.25 μ l de Sequenasa y 1.75 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Esta reacción se incubó 1-2 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo la reacción de síntesis es lenta ya que la concentración de nucleótidos está muy por debajo del K_m para la enzima, incorporándose dATP marcado. Transcurrido este tiempo se añaden 3.5 μ l de esta solución a cada uno de los tubos de terminación G, A, T, y C. Estos tubos de terminación contienen todos ellos 2.5 μ l de una solución que contenía dNTPs 80 μ M, NaCl 50 mM y 8 μ M de cada dideoxinucleótido (ddGTP, ddATP, ddTTP y ddCTP) en los tubos G, A, T, y C, respectivamente. Durante esta reacción la enzima sintetiza con mayor rapidez y además incorpora los ddNTPs deteniendo la elongación de la cadena. Esta terminación es más eficaz si se usa la solución de manganeso, como hemos hecho aquí, y esto es particularmente importante para fragmentos de ADN de alrededor de 200 pb.

Los tubos de terminación se incubaron 2-3 min a 37°C y luego se paró la reacción con 4 μ l de una solución que contiene formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0.05% y cianol de xileno al 0.05%. Los tubos de reacción los guardamos entonces a -20°C hasta su uso. Las muestras se calentaron 2-3 min a 90°C y se aplicaron al gel de secuenciación (aparato IBI de Kodak). Dicho gel (42 x 36 x 0.04 cm) contenía poliacrilamida al 6-8%, urea 7-8 M en TBE 1X. La electroforesis se corrió a un voltaje de 2000 V durante unas 3-4 horas y tras finalizar se secó el gel a vacío a 80°C sobre papel de filtro Whatman durante más de 1 h (secador de geles Savant SGD 4050). Se procedió a autorradiografiar el gel seco utilizando una película Kodak X-Omat en un cassette Kodak X-Omatic Regular durante 12-36 horas a temperatura ambiente. El film se reveló automáticamente en un sistema Agfa.

4.3.6 Otros ensayos

El test del alopurinol se realizó como describen Hauser y cols. [17], excepto por que la recogida de orina de 24 h se llevó a cabo en 3 períodos de 8 h en lugar de 4 períodos de 6 h, a partir de la administración oral de 300 mg de alopurinol (Ziloric). Para la determinación de orotato y orotidina, se usó un sistema cromatográfico de Millipore-Waters: una bomba modelo 520, un inyector manual U6K, un detector de ultravioleta modelo 481, una columna de intercambio aniónico Partisil 10 SAX (250 x 4.6 mm) y un registrador Servogor 210.



A 4 ml de orina se le añadió 2 nmoles de ácido 2-nitrobenzoico, se inyectó la muestra en el sistema cromatográfico (fase móvil: ácido fórmico 0.8 M en metanol al 35%, pH 2.8) y se registró la absorbancia a 275 nm. La excreción de orotato y orotidina en hembras normales coincidió con lo publicado en la descripción del test [17].

Las actividades carbamil fosfato sintetasa (CPS) y OTC se ensayaron en homogeneizados (1/20 en agua) de biopsias de yeyuno con las mezclas de reacción de Nuzum y Snodgrass [38] modificadas para incluir $H^{14}CO_3^-$ (500 cpm/nmol; preparado por la adición de una traza de $Na_2^{14}CO_3$ a $KHCO_3$ no marcado) en el ensayo de CPS y de [3H]ornitina (500 cpm/nmol) en el ensayo de OTC. La reacción de la CPS se llevó a cabo en 0.15 ml durante 15 min a 37°C y se paró con 1 ml de $HClO_4$ 1 M que contenía citrulina 1 mM. El $H^{14}CO_3^-$ no marcado se eliminó burbujeando 10 min con CO_2 , y se determinó la radiactividad en la solución, correspondiente principalmente a [^{14}C -carbamil]citrulina. Los resultados se corrigieron para la radiactividad encontrada en incubaciones idénticas en las cuales se omitió el activador esencial de la CPS I, el N-acetil-L-glutamato. La reacción de la OTC se realizó en 75 μ l a 37°C y se paró después de 10 min con 15 μ l de $HClO_4$ 3 M que contenía citrulina 1 mM. La mezcla se aplicó a una columna de 0.2-ml de AG50W-X8 preparada en una jeringuilla se tuberculina y, tras lavar la columna con 0.4 ml de HCl 10 mM, la [3H]citrulina fue eluida con 2 ml de piridina al 10%. Los resultados se corrigieron para la radiactividad encontrada en idénticas incubaciones sin carbamil fosfato. Los valores de

K_m de la OTC para ornitina y carbamil fosfato se determinaron en un tampón maleato 0.1 M pH 7.5, variando la concentración de ornitina entre 0.1 y 2.5 mM en presencia de carbamil fosfato 5 mM, y variando el carbamil fosfato entre 0.1 y 3 mM en presencia de ornitina 2.5 mM. Cuando fue posible, el K_m para la ornitina se determinó también en un tampón trietanolamina 0.3 M pH 8.5.

La proteína se determinó en homogeneizados de tejido mediante la técnica de Lowry, usando albumina bovina como estandard [39].

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Historias clínicas*

Familia A (Fig. 4.3). Ambos padres (I1 y I2) son de origen vasco, poseen buena salud, y no presentan ningun síntoma de deficiencia de OTC. De los miembros de la segunda generación, 2 varones (II2 y II3) fallecieron en coma con un diagnóstico de "encefalitis", que retrospectivamente, es consistente con un coma hiperamoniémico no diagnosticado.

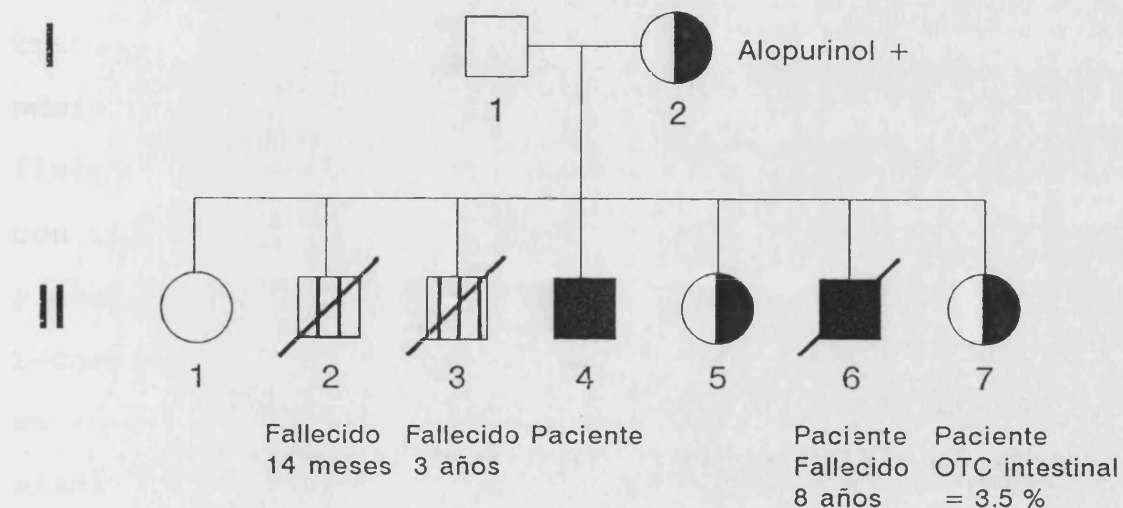


Figura 4.3. Pedigree de la Familia A. II2 y II3 fallecieron antes del diagnóstico. Las barras indican presunción de deficiencia de OTC.

NOTA*: Ambas familias fueron remitidas por el Dr. Pablo Sanjurjo del Dpto. de Pediatría, Hospital de Cruces. El diagnóstico clínico y tratamiento de los enfermos se deben al Dr. Pablo Sanjurjo. La historia clínica se ha basado en sus datos. Nosotros hemos establecido el diagnóstico de certeza sobre la base de las determinaciones enzimáticas y de orotato y de aminoácidos urinarios. También somos responsables de la realización de la prueba del alopurinol.

El varón II4 fue diagnosticado de deficiencia de OTC a la edad de tres años y medio, durante una crisis de hiperamoniemia provocada por una infección intercurrente. El diagnóstico se basó en el cuadro clínico y en la elevada hiperamoniemia, muy elevada aciduria orótica, y baja citrulina plasmática, sin anormalidades específicas en los niveles plasmáticos o urinarios de aminoácidos. El paciente fue tratado con restricción proteica, suplementación de arginina y terapia de mantenimiento. En la actualidad tiene 17 años y sólo ha experimentado 2 crisis hiperamoniémicas adicionales que han necesitado hospitalización y un tratamiento enérgico con restricción proteica y administración de arginina y benzoato sódico. Su desarrollo físico y mental es normal y en la actualidad sólo es tratado con una moderada ingesta de proteínas (<1 g proteína/kg/día), y arginina (0.2 g/kg/día). Se le da asimismo un suplemento de L-carnitina (40 mg/kg/día), ya que se ha descrito deficiencia en carnitina en pacientes con déficit de OTC [40,41]. Otro miembro varón de la familia, II6, nacido aproximadamente 6 años después que II4, fue diagnosticado de deficiencia en OTC en base a la excreción de orotato, niveles de citrulina, y por su respuesta a un incremento en la ingesta proteica (nivel de amonio y excreción de orotato). II6 experimentó su primera crisis hiperamoniémica a los 4 años de edad, recuperándose rápidamente con el tratamiento. Hasta los 8 años de edad sólo tuvo otra crisis que requirió hospitalización. Su desarrollo físico y mental fue normal con la misma terapia de mantenimiento que su hermano II4. A los 8 años de edad sufrió una nueva crisis que no revertió a pesar

de todos los esfuerzos terapéuticos. De las 3 hembras de la segunda generación, sólo II7 (que en la actualidad tiene 7 años de edad), ha tenido manifestaciones de deficiencia de OTC. Ella ha tenido hasta ahora 2 crisis leves de hiperamoniemia, la primera cuando contaba con sólo 6 meses de edad. Estos episodios fueron rápida y satisfactoriamente tratados y ahora lleva la misma terapia de mantenimiento que su hermano II4. Su desarrollo físico y mental es normal. Fue diagnosticada como deficiente parcial de OTC en base a la excreción de orotato, niveles plasmáticos de aminoácidos y ensayo de la actividad OTC en una biopsia de yeyuno. El estado de portadora de su madre (I2) fue confirmado mediante el test del alopurinol.

Familia B (Fig. 4.4). El paciente (II3), un varón de aproximadamente 4 años de edad, desarrolló 4-5 días después de nacer síntomas y signos compatibles con hiperamoniemia (dificultades de alimentación, vómitos, somnolencia, EEG lento y difuso). Se le encontró un amonio plasmático de 350 $\mu\text{g}/\text{dl}$, asociado con elevada excreción de ácido orótico y baja citrulina plasmática. El paciente fue tratado satisfactoriamente y en la actualidad se encuentra bajo moderada ingesta proteica y suplementación de arginina, y ha padecido hasta la fecha 2 crisis hiperamoniémicas adicionales que se han superado con el tratamiento. Su desarrollo físico y mental es normal. En la actualidad está siendo considerado para realizarle un transplante hepático. El diagnóstico como deficiente de OTC se confirmó mediante ensayo de la actividad OTC en una biopsia de yeyuno. Los padres y las 2 hermanas

(por parte de madre) del paciente poseen buena salud. Su madre resultó negativa en un test de alopurinol para identificación de heterozigotas.

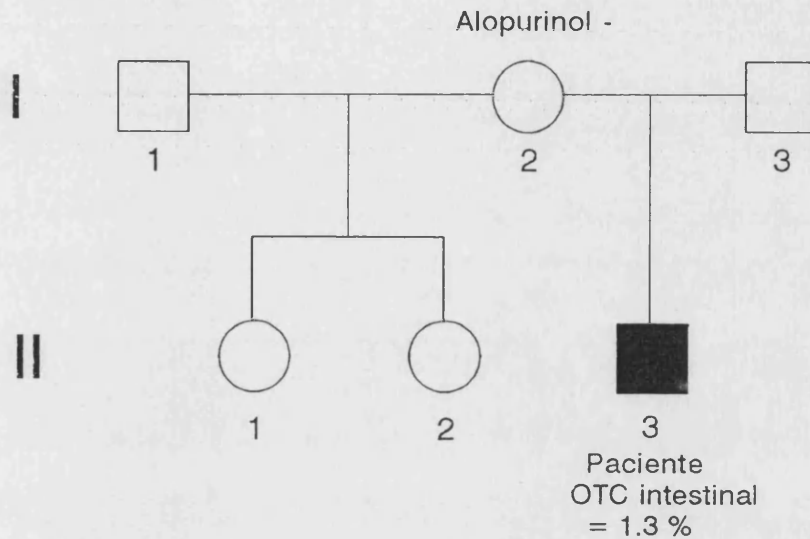


Figura 4.4. Pedigree de la Familia B.

4.4.2 Actividad Ornitina transcarbamilasa

Los miembros de las familias se designarán por una letra que identifique a la familia (A o B) seguido de un número que identifique a la generación (I o II) y por el número que identifique a la persona (1-7 en la familia A; 1-3 en la familia B). La Tabla 4.3 muestra los resultados de los ensayos enzimáticos de la CPS y la OTC en la mucosa yeyunal de la paciente (AII7) de la familia A y del paciente varón (BII3) de la familia B. La actividad CPS fue normal en ambos

TABLA 4.3. Actividades CPS, OTC y K_m para OTC en biopsias de yeyuno.

PACIENTE	ACTIVIDAD		K_m (mM)		
	CPS	OTC	Ornitina		Carbamil fosfato
	$\mu\text{mol/h/mg prot}$		pH 7.5	pH 8.5	
AII7	0.17	0.45	0.22	0.15	1.5 ^a
B (II3)	0.23	0.17	--	--	--
Normal ^b	0.15 ± 0.07	13.0 ± 3.5	0.51 ± 0.08	0.27 ^c	0.40 ± 0.04

^aValor aproximado estimado para un ensayo de 3 puntos.

^bExcepto donde se indica, n=3. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar

^cDeterminado en una biopsia normal.

casos. El varón mostró una actividad muy pequeña pero detectable, que representa un 1.3% de la actividad en controles. En la paciente hembra, la actividad representó un 3.5% de los controles, indicando que en este caso el cromosoma X materno con el gen de la OTC mutado fue expresado preferentemente sobre el cromosoma normal, al menos en yeyuno. Este debe ser el caso en el hígado ya que esta hembra presenta síntomas similares a los observados en los varones de esta familia.

Los valores de K_m para ornitina en la paciente AII7 fueron similares a los encontrados en una mucosa de yeyuno normal. El K_m para carbamil fosfato no pudo ser determinado con precisión debido a la limitación de la muestra disponible. El valor estimado es del mismo orden de magnitud, aunque algo mayor, que el valor en una mucosa normal. La actividad a pH 8.5 fue cerca de un 25% más alta que a pH 7.5, de acuerdo con los resultados de Briand y cols. [9] para el hígado humano. Estos resultados excluyen que la baja actividad en la paciente AII7 sea debida a la presencia de una cantidad normal de una forma enzimática con una V_{max} normal y unos valores de K_m aumentados o con una actividad anormalmente baja a pH 7.5 y una actividad normal a pH 8.5, como se describió anteriormente en algunos pacientes con deficiencia de OTC [9]. Puesto que AII7 es una hembra, no podemos saber si la actividad residual es debida a una OTC codificada por el gen normal o mutado. La actividad OTC tan baja en la mucosa yeyunal del paciente BII3 y la pequeña cantidad disponible de tejido, impidieron la estimación de

los valores de K_m para los sustratos de la OTC. Una estimación grosera de la actividad a pH 8.5 indicó que fue del mismo orden que la actividad a pH 7.5, excluyendo que la deficiencia fuese debida a la presencia de una OTC con un pH óptimo anormalmente alto.

4.4.3 Análisis de la herencia de los RFLP en la familia A

Los southern blots después de la digestión de ADN genómico con MspI, BamHI y TaqI excluyeron que el paciente varón AII4 poseyera una gran delección en su gen de la OTC. El análisis de los RFLP para estas enzimas resultó no informativo para la madre (una portadora obligatoria de la deficiencia de OTC, confirmada por la prueba del alopurinol). La madre resultó homocigota para los polimorfismos de 6.2 kb y también para el de 5.1 kb para la enzima Msp I, y para el de 18 kb para la enzima BamHI, lo que significa que la madre posee el haplotipo E (basado en la clasificación de Grompe y col. [22]). En la figura 4.5 se reproducen manualmente las bandas de los blots para las enzimas Msp I y Bam HI. No presentamos los blots originales porque la debilidad de las bandas impidió su reproducción fotográfica.

El polimorfismo descrito en el exón 2 [4] (AAA o AGA, codón 46, correspondiendo a K46R) fue también no informativo en esta familia. El análisis consiste en la amplificación por PCR del exón 2 con el oligonucleótido OTC2m': gtgaccttct-cactttaa junto con el OTC2c descrito en la Tabla 1 como describe Petty y col. [42], y digestión del producto

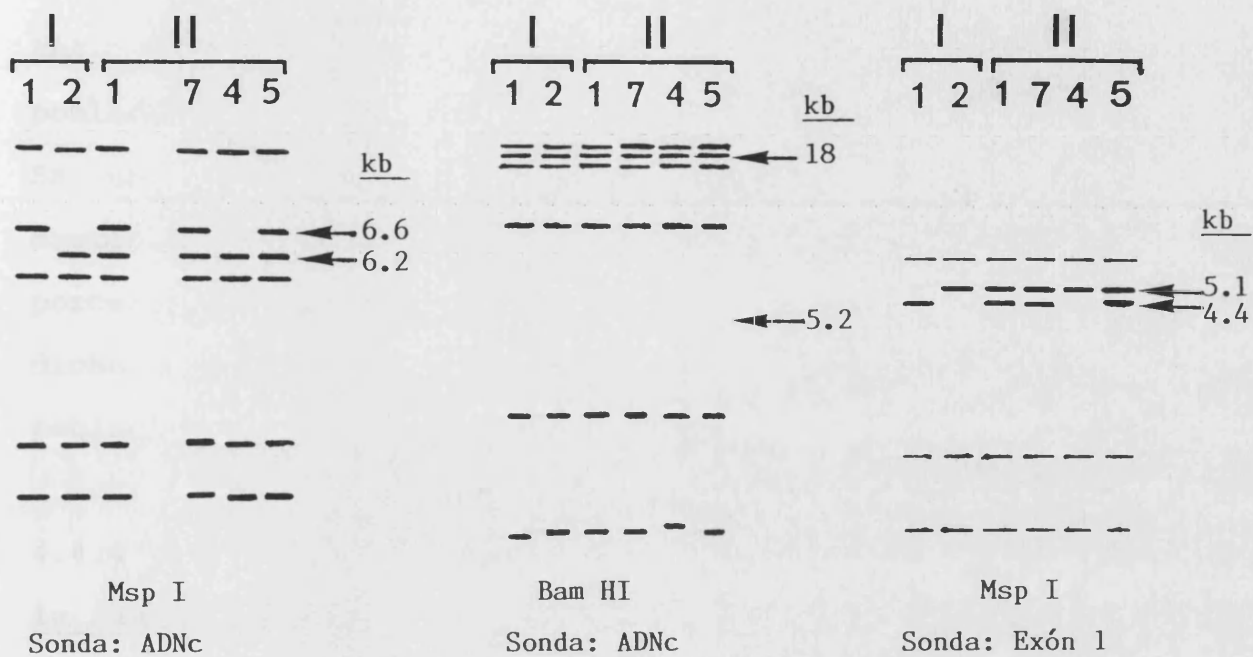


Figura 4.5 Representación manual de las bandas reveladas en los southern blots de la familia A usando las enzimas de restricción Msp I y Bam HI. En cada caso se indica la posición de las bandas polimórficas y de la sonda utilizada. I y II indican la generación y 1-7 indican el miembro de la familia.

amplificado con la enzima de restricción DraI. Como Dra I reconoce la secuencia TTTAAA, sólo cortará los fragmentos que posean la secuencia AAA en el codón 46 y no los que posean la posibilidad alternativa AGA. Esta digestión mostró que todos los miembros de la familia A poseen la secuencia más común AAA. Los autores describieron unas frecuencias en la población americana del 68% para AAA y del 32% para AGA [42]. En un estudio hecho por nosotros sobre un total de 34 cromosomas de personas no relacionadas, obtuvimos unos porcentajes del 85.3% para AAA y 14.7% para AGA por lo que dicho polimorfismo es relativamente poco útil para la población española.

4.4.4 Análisis de microsatélites cercanos al gen de la OTC en la familia A

Amplificamos por PCR los microsatélites DYS-II y DYS-MSA del gen de la distrofina y MAOA del gen de la monoaminoxidasa A, que distan un 15% de recombinación distal y un 10% de recombinación proximal, respectivamente, del gen de la OTC [43,44]. Los distintos alelos amplificados se separaron en una electroforesis de poliacrilamida al 15% y se visualizaron mediante tinción de plata. El microsatélite DYS-MSA no resultó informativo ya que la madre fue homocigota. Sin embargo para MAOA la madre (AI2) fue heterocigota, poseyendo el padre (AI1) el alelo inferior de la madre. Como el varón afectado AII4 recibió de su madre el alelo inferior, en esta familia la mutación debía ir ligada al cromosoma X materno que lleva ese alelo. Las hijas AII5 y AII7 fueron homocigotas

para el alelo inferior, por lo que ambas son portadoras de la mutación. La hija asintomática AIII1 fue heterocigota, heredando el alelo superior de su madre, por lo que, de no haber ocurrido recombinación, no es portadora de la enfermedad. El análisis del microsatélite DYS-II confirmó esta misma forma de transmisión (Fig. 4.6). La madre (AI2) fue heterocigota, poseyendo el padre (AI1) el alelo superior de la madre. El hijo varón AIII4 recibió el alelo inferior de su madre al igual que las hijas AIII5 y AIII7, siendo ambas, por tanto, portadoras de la mutación. La hija AIII1 fue homocigota para el alelo superior, quedando excluida de llevar la mutación, que se transmite ligada al alelo inferior materno (Fig. 4.6).

MICROSATELITE DYS-II

FAMILIA A

II I2 III II7 II4 II5

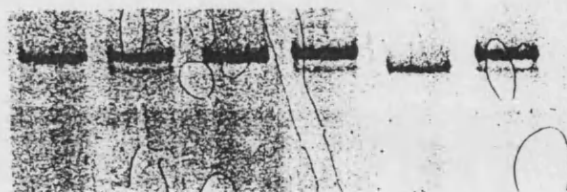


Figura 4.6 Microsatélite DYS-II en la familia A.

El hecho de que los resultados obtenidos con 2 microsatélites distintos, uno distal y otro proximal al gen de la OTC, coincidan, da mayor validez a nuestra hipótesis, ya que la posibilidad de una doble recombinación está muy disminuida.

4.4.5 Análisis de los SSCP

Los 10 exones del gen de la OTC fueron amplificados mediante PCR en todos los miembros de la familia A y en el padre y el paciente de la familia B usando los pares de oligonucleótidos mostrados en la Tabla 4.1. Una electroforesis de agarosa demostró en todos los casos productos de tamaño esperado, excluyendo grandes deleciones en algún exón. El análisis de los SSCP de estos productos demostró en el padre y el paciente de ambas familias, un idéntico patrón de migración para todos los exones, con la excepción del exón 4 (Fig. 4.7).

Con el exón 4 (Fig. 4.7) un retraso de una banda de simple cadena se observó en los pacientes varones de las familias A y B. En la familia A, la madre, la paciente hembra (AII7) y una hermana asintomática (AII5) presentaron un patrón híbrido, consistente con heterocigosis, mientras que la otra hermana asintomática (AIII1) mostró un patrón idéntico al del padre y al control, excluyendo en principio que ella (AIII1) fuese portadora del defecto. Por otra parte, la forma de transmisión del defecto que se deduce tras el análisis de los SSCP en la familia A, coincide con la obtenida mediante el análisis de los microsatélites. En la familia B, todos los miembros excepto el paciente, mostraron un SSCP normal para el exón 4 (Fig. 4.7), como era de esperar si la mutación en este exón está presente exclusivamente en el paciente. Este resultado es consistente con el resultado negativo de la madre en el test del alopurinol.

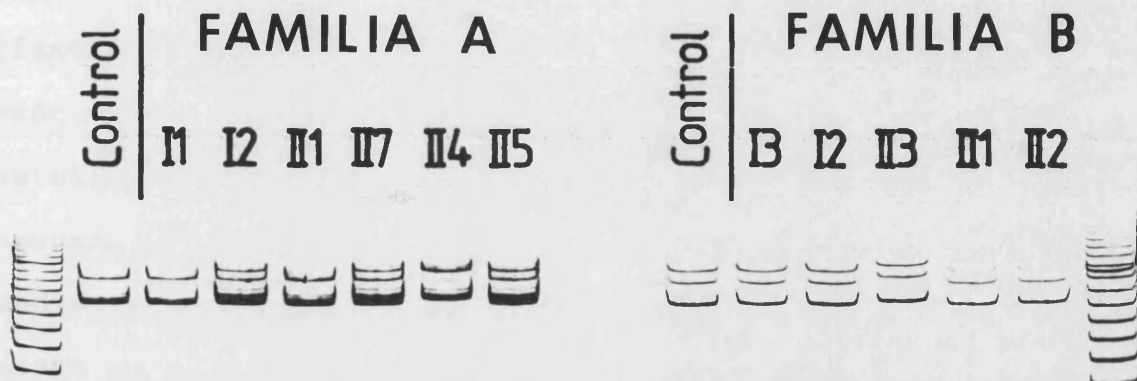


Figura 4.7. SSCP del exón 4 en las dos familias. El control es el exón 4 amplificado de una hembra sana no relacionada. Las carreras de la izquierda y la derecha del gel muestran la migración del marcador de pesos moleculares de doble cadena (100 Base Pair Ladder, de Pharmacia). El gel usado fue del 11 % (familia A) o del 13.5 % (familia B) en poliacrilamida.

4.4.6 Secuenciación directa del exón 4 amplificado por PCR

La secuenciación directa del exón 4 tras amplificarlo por PCR, usando los mismos oligonucleótidos que en la amplificación, demostró que en el paciente AII4 (Fig. 4.8) (familia A) el cambio de una G por una A en el extremo 3' del exón. La secuenciación del exón 4 en el padre y la hermana asintomática AIII que poseía un SSCP normal, demostró la secuencia correcta en esta posición (G), mientras que la madre tuvo A y G (en aproximadamente igual cantidad) en esta misma posición (Fig. 4.8). Estos resultados están de acuerdo con el patrón de SSCP, y confirman que la madre es portadora de la mutación, y que la hermana AIII no lo es. La mutación cambia el codón CGG a CAG en el extremo 3' del exón 4 de la OTC, lo cuál cambia la arginina-129 por histidina. Interesantemente esta misma mutación es la que poseen los ratones sparse-fur/ash [14] (ver Introducción). Esta mutación no ha sido descrita en humanos hasta la fecha.

De los dos polimorfismos descritos para este exón [3,4], el codón 101 es TTT, que codifica para fenilalanina (el codón alternativo es TTA, que codifica para leucina), en todos los miembros secuenciados de esta familia; y el codón 111 es CTT, que codifica para leucina (alternativamente CCT, que codifica para prolina). Para averiguar la frecuencia del polimorfismo del codón 101 en la población española (para estimar su viabilidad como marcador genético), digerimos el exón 4 amplificado de 27 cromosomas de personas no relacionadas del

EXON 4

Sentido

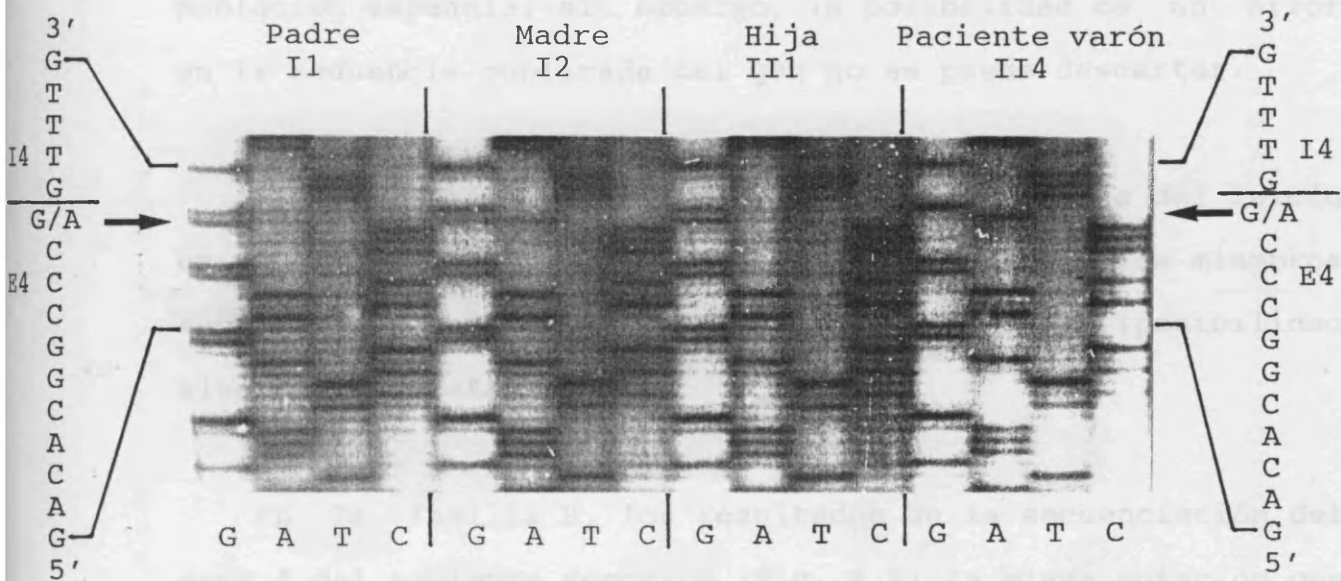


Figura 4.8. Secuenciación de DNA del exón 4 amplificado por PCR del padre (AI1), madre (AI2), una hermana no afectada (AIII1) y del paciente varón que sobrevive (AIII4) de la familia A. La flecha indica la posición de la mutación. La unión del exón 4 (E4) con el intrón 4 (I4) se indica con una línea horizontal.

territorio español con la enzima Dde I. Esta enzima reconoce la secuencia CTNAG, por lo que cortaría el ADN del exón 4 sólo en aquellas personas que poseyeran el triplete TTA. El resultado fue inesperado ya que en todos los casos no se produjo digestión, lo cual está de acuerdo con la posesión de la secuencia TTT en ese codón. A falta de un estudio poblacional mayor, este polimorfismo no sirve para la población española; sin embargo, la posibilidad de un error en la secuencia publicada del gen no se puede descartar.

El polimorfismo descrito en el intrón 3 cerca del inicio en 5' del exón 4 [45] resultó ser en todos los miembros secuenciados de la familia A la secuencia T₁₀A (posibilidad alternativa, T₉AA).

En la familia B, los resultados de la secuenciación del exón 4 del paciente demostró (Fig. 4.9) la misma mutación que en la familia A (el cambio de la G por una A en el extremo 3' del exón). La secuenciación del exón 4 de la madre demostró la secuencia normal (G) en esa posición, confirmando que la mutación del paciente aparece "de novo". En cuanto a los polimorfismos, tanto la madre como el paciente poseen los mismos alelos en los codones 101 y 111 que en la familia A. Sin embargo, el polimorfismo del intrón 3 [45], adopta en esta familia la posibilidad alternativa T₉AA, para la cuál la madre es homocigota.

4.4.7 Digestión del exón 4 con NspI

La mutación observada en las familias A y B causa la pérdida del único sitio de restricción para NspI situado en la unión del exón 4 con el intrón 4. Como la amplificación de este exón con los oligonucleótidos utilizados en este trabajo genera un producto de 214 pb que contiene 51 pb del intrón 4, el corte con NspI genera un fragmento de 53 pb, y así la

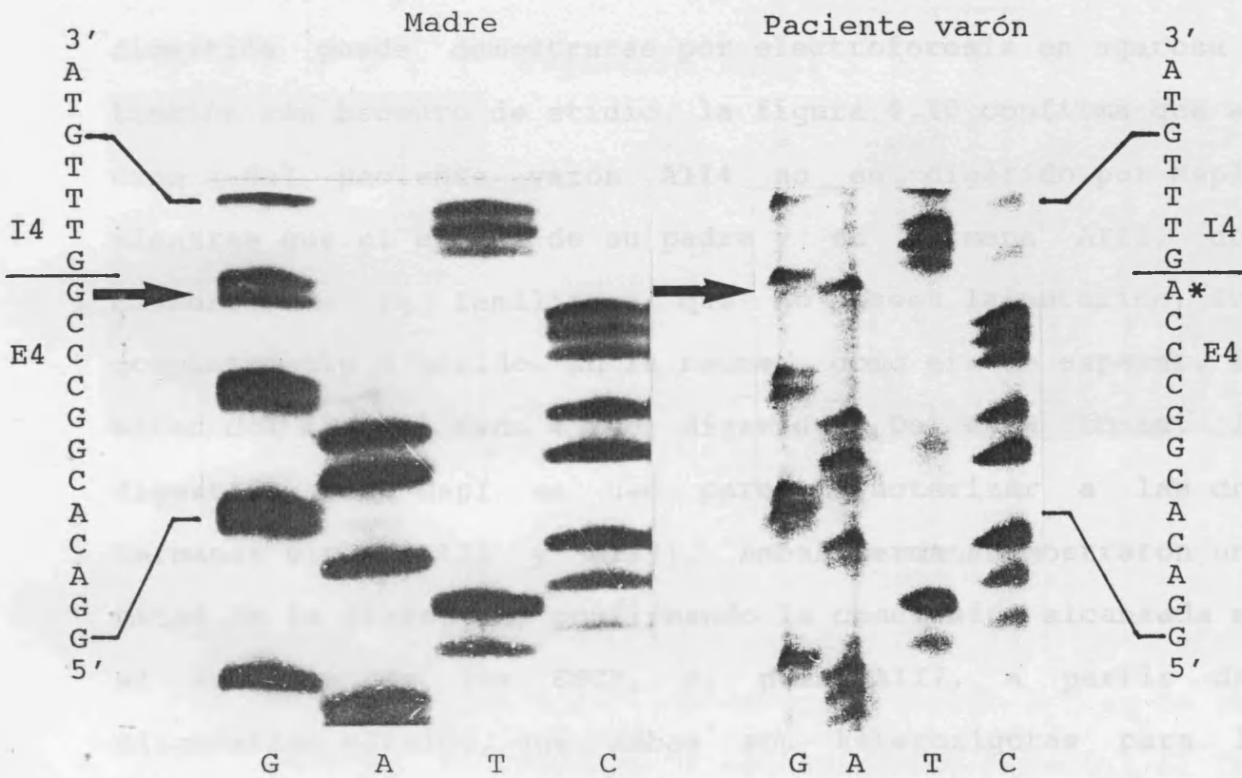


Figura 4.9. Secuenciación de DNA del exón 4 amplificado por PCR de la madre (BI2) y del paciente varón (BII3) de la familia B. La flecha indica la posición de la mutación. La unión del exón 4 (E4) con el intrón 4 (I4) se indica con una línea horizontal. La mutación se indica también con un asterisco en la secuencia del exón 4 del enfermo.

4.4.7 Digestión del exón 4 con MspI

La mutación observada en las familias A y B causa la pérdida del único sitio de restricción para MspI situado en la unión del exón4-intrón4. Como la amplificación de este exón con los oligonucleótidos utilizados en este trabajo genera un producto de 226-pb que contiene 51-pb del intrón 4, el corte con MspI elimina un fragmento de 53-pb, y así la digestión puede demostrarse por electroforesis en agarosa y tinción con bromuro de etidio. la figura 4.10 confirma que el exón 4 del paciente varón AII4 no es digerido por MspI, mientras que el exón 4 de su padre y su hermana AIII, dos miembros de la familia A que no poseen la mutación, fue completamente digerido. En la madre, como era de esperar, la mitad del ADN del exón 4 fue digerido. De esta forma, la digestión con MspI se usó para caracterizar a las dos hermanas vivas (AII5 y AII7). Ambas hermanas mostraron una mitad de la digestión, confirmando la conclusión alcanzada en el análisis de los SSCP, y, para AII7, a partir del diagnóstico clínico, que ambas son heterocigotas para la mutación.

En la familia B, la digestión del exón 4 con MspI confirmó la conclusión del análisis de los SSCP que sólo el paciente varón posee la mutación: excepto en el paciente, cuyo ADN no se digirió, el ADN de todos los miembros de la familia fue completamente digerido, excluyendo a las hembras de esta familia de ser portadoras.

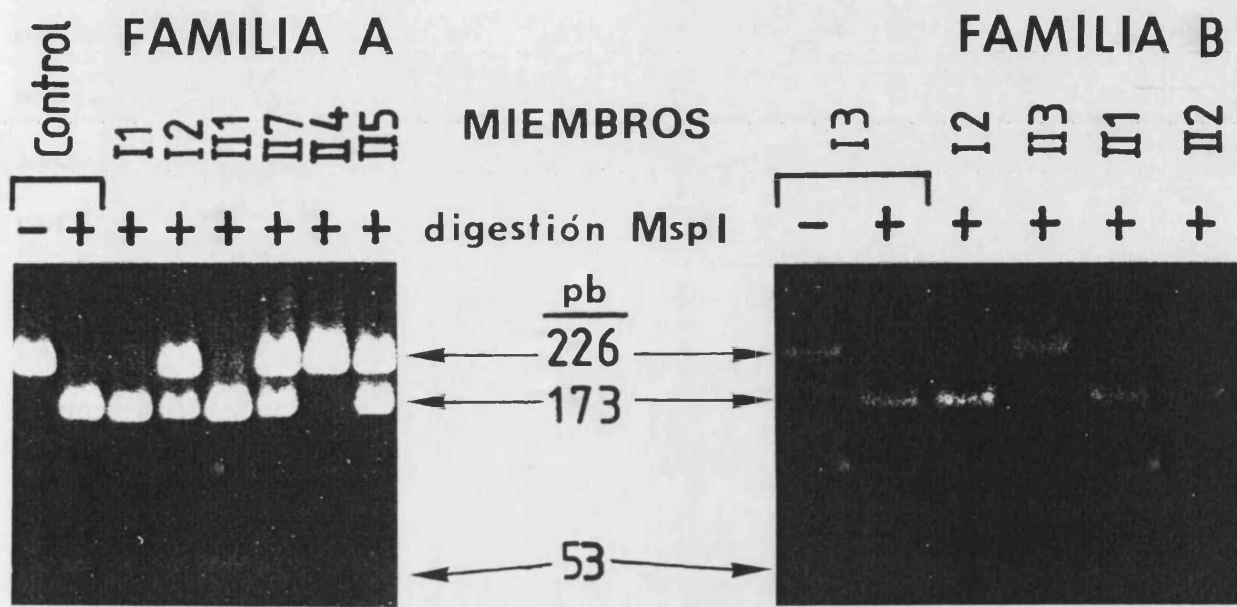


Figura 4.10. Digestión con MspI del exón 4 amplificado en todos los miembros vivos de las dos familias. La digestión fue llevada a cabo a 37°C durante 2 h usando 2-3 µg de DNA y 20 U de MspI, en tampón L 1X (Boehringer Mannheim). Al final de la digestión se realizó una electroforesis de agarosa al 2 % y se revelaron los productos de la digestión con bromuro de etidio.

4.5 DISCUSION

La mutación en el exón 4 (familias A y B) descrita en este trabajo, un cambio de la G terminal por una A, corresponde al cambio de la arginina por una histidina en la posición 129 (R129H) en la secuencia de aminoácidos de la enzima [4]. Sin embargo, debemos esperar, dada la localización del nucleótido en la unión exón-intrón, que sea perjudicial para el procesamiento del transcrito [46]. De hecho, el ratón spf-ash, una cepa de ratones deficientes en OTC, posee exactamente la misma mutación, y muestra una reducción del 95% en la eficiencia del procesamiento en esta unión exón-intrón [14]. Dado que la frecuencia de los diferentes nucleótidos en el último nucleótido de un exón es virtualmente idéntica en roedores y primates [46], el cambio de nucleótido observado en este trabajo debe tener consecuencias similares sobre el procesamiento del ARN en el hombre y el ratón.

Las propiedades cinéticas y la dependencia del pH de la OTC del ratón mutante R129H son similares a las del enzima normal [47]. La estabilidad del enzima mutante en el tejido también aparece inalterada [14]. En el ratón spf-ash hay aproximadamente un 4% de actividad residual del enzima en el hígado y un 7% en el intestino delgado [48]. Nosotros encontramos en el paciente varón BII3 y en la paciente heterocigota AII7, actividades intestinales que representan el 1.3 y 3.5%, respectivamente, de la actividad normal. Aunque la magnitud de estas actividades son del mismo orden

que en el ratón spf-ash, las actividades humanas son más bajas. Dada la alta homología entre la OTC humana y la murina (97% de identidad en la secuencia madura, con la conservación de la arg129 y aminoácidos cercanos; véase [3 y 13]; valores de K_m y dependencia con respecto al pH similares, véase [9]), no parece verdad que la mutación arg129his pueda cambiar las propiedades catalíticas o la estabilidad del enzima humano. De hecho, la similaridad de las actividades a los pHs 7.5 y 8.5 en los dos pacientes y los datos cinéticos obtenidos en la paciente AII7, son consistentes con la normalidad catalítica del enzima humano R129H. Así, como es el caso de los ratones spf-ash que poseen la misma mutación, nuestros pacientes poseen una menor cantidad de OTC mutante con propiedades normales, y la menor actividad en los pacientes humanos que en los ratones sugiere que la mutación G a A en el extremo del exón 4 disminuye la eficiencia del procesamiento en los humanos incluso más que en el ratón.

En los spf-ash, además de la menor cantidad (cerca del 5% del normal) del ARNm de la pOTC normalmente procesado, está presente una cantidad igual de ARNm incorrectamente procesado que contiene 48 bases extra del intrón 4, como resultado de un procesamiento ineficiente en un sitio dador críptico para el procesamiento, 48 bases dentro del intrón 4 [14]. Este ARNm más largo es traducido a una OTC mutante que lleva un cambio R129Q más 16 aminoácidos insertados. Este polipéptido es transportado dentro de la mitocondria y procesado normalmente, pero no puede ensamblarse para formar el trímero activo y es degradado con una corta $t_{1/2}$ [14]. Debido a las

diferencias en la secuencia del intrón 4 entre el hombre y el ratón, el sitio dador críptico para el procesamiento (GG:GTTAGT) usado por el ratón spf-ash no existe en los humanos [46]. La secuencia humana correspondiente GGATAAAT contiene, con la misma pauta de lectura, un codón de terminación TAA. Por tanto, la OTC alargada que contiene 16 aminoácidos extra en los ratones spf-ash no debe ser sintetizada en los pacientes humanos, y otras formas alargadas del enzima que pudieran resultar de otros sitios dadores crípticos para el procesamiento hacia el extremo 3' del intrón, están excluidos por la existencia de un codón de terminación.

La deficiencia de OTC de los pacientes estudiados aquí se caracteriza por un curso clínico relativamente leve. Sólo un paciente experimentó una hiperamoniemia neonatal y episodios posteriores de hiperamoniemia no han sido frecuentes y en general fueron controlados tempranamente. La administración crónica de benzoato sódico o fenilbutirato no ha sido necesaria, y además los pacientes que sobreviven muestran un desarrollo normal. No obstante, el historial de los pacientes de la familia A, demuestra que la deficiencia representa un serio riesgo para la vida, poniendo de manifiesto la importancia de un diagnóstico temprano, establecimiento rápido de medidas de mantenimiento para prevenir las crisis hiperamoniémicas, y rápido tratamiento de las crisis si llegan a presentarse. El riesgo que conlleva la enfermedad justifica el diagnóstico prenatal, el cuál se presenta muy simple en ambas familias mediante la digestión con MspI del

exón 4 amplificado con los oligonucleótidos descritos aquí.

Una actividad residual de un 1.3% de la normal es suficiente para justificar la relativa levedad de la enfermedad ya que esta actividad es comparable a la de la argininosuccinato sintetasa, la enzima que cataliza el siguiente paso y que posee la menor actividad del ciclo de la urea [38]. La baja actividad que poseen estos pacientes puede incluso ser más reducida en hígado debido a una inapropiada suplementación de arginina [49], lo que justifica la suplementación crónica de arginina en estos pacientes [1], y la determinación de orotato urinario para monitorizar el efecto de la suplementación. No obstante, para una ingestión de proteína diaria de 1 g/kg de peso corporal, y asumiendo una hidrólisis de urea del 30% por la flora intestinal, la cantidad de síntesis diaria de urea es aproximadamente 420 mmoles para un hombre de 60 kg, o, si la síntesis se realiza a velocidad constante durante todo el día, de 17.5 mmol/h. Si en el paciente varón la actividad OTC es el 1.3% de la normal, la actividad en el hígado es del orden de 0.1 mmol/h/g de hígado, y por tanto, 175 g de hígado deben ser suficientes para poder alcanzar la velocidad requerida de síntesis de urea, si las concentraciones de sustratos son las requeridas. De hecho, el carbamil fosfato puede alcanzar en la mitocondria concentraciones saturantes en ausencia de hiperamoniemia (demostrado en ratones que recibían dietas sin arginina [49] y en este mismo trabajo). De igual forma, se esperan altos niveles de carbamil fosfato en los pacientes, como demuestra la alta excreción de orotato. Por tanto, si el

suministro de ornitina es suficiente, la actividad OTC en estos pacientes excede considerablemente el requerimiento basal de síntesis de urea, y, de hecho, parece ser capaz de poder con velocidades de hasta 8 veces la velocidad basal, las cuales pueden encontrarse después de comidas ricas en proteína o bajo prolongado ayuno.

Una mutación G a T en el mismo nucleótido que en nuestros pacientes fue descrita recientemente en un chico [11]. Esta mutación codifica para un polipéptido de OTC con un cambio R129L, el cuál, en principio, es un cambio más drástico que la sustitución R129H descrita aquí. La actividad OTC hepática en este chico fue un 5.5-20% de la normal, sugiriendo que esta mutación es menos perjudicial para el procesamiento que la mutación de G a A. Aunque el paciente ha vivido más de 6 años, su desarrollo mental ha sido considerablemente retardado y tuvo parálisis espásticas moderadamente severas. Las alteraciones neurológicas sugieren hiperamonemia frecuente, posiblemente reflejando propiedades cinéticas desfavorables del enzima mutante. Así, nuestros pacientes pueden haber sido afortunados en cuanto a la sustitución del aminoácido, ya que cambios menos conservados pueden haber sido más deletéreos. De hecho, en 20 de las 22 secuencias de OTC de diferentes fuentes incluidas en la base de datos Swiss-Prot (release 28), existe un residuo R o K en la posición correspondiente al residuo 129 de la OTC humana, sugiriendo un papel importante para un residuo cargado positivamente en esta localización. La comparación con la aspartato transcarbamilasa [50], enzima homólogo a la OTC,

sugiere que el residuo 129 de la OTC humana es parte de una alfa-hélice implicada en las interacciones con la subunidad catalítica cercana en el trímero [51]. Así, cambios en la carga o en la hidrofobicidad en esta región pueden tener importantes consecuencias en las interacciones entre subunidades en el trímero de OTC, lo cuál puede afectar indirectamente a las propiedades catalíticas de la OTC. Después de todo, la OTC catabólica (una OTC que se encuentra en bacterias) es ineficiente en la síntesis de citrulina y forma dodecámeros, mientras la enzima anabólica de la misma bacteria, la cuál se usa sobretodo para la síntesis de citrulina, es trimérica [52].

4.6 REFERENCIAS

1. Brusilow, S.W., and Horwich, A.L. (1989) Urea cycle enzymes. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., and Valle D (eds) The metabolic basis of inherited disease, 6th edn. McGraw-Hill, New York, pp 629-663.
2. Lindgren, V., de Martinville, B., Horwich, A.L., Rosenberg, L.E., and Francke, U. (1984) Human ornithine transcarbamylase locus mapped to band Xp21.1 near Duchenne muscular dystrophy locus. Science 226, 698-700.
3. Horwich, A.L., Fenton, W., Williams, K.R., Kalousek, F., Kraus, J.P., Doolittle, R.F., Koningsberg, W., and Rosenberg, L.E. (1984) Structure and expression of a complementary DNA for the nuclear coded precursor of human mitochondrial ornithine transcarbamylase. Science 224, 1068-1074.
4. Hata, A., Tsuzuki, T., Shimada, K., Takiguchi, M., Mori, M., and Matsuda, I. (1988) Structure of the human ornithine transcarbamylase gene. J. Biochem. 103, 302-308.
5. Horwich, A.L., Kalousek, F., Mellman, I., and Rosenberg, L.E. (1985) A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein. EMBO J. 4, 1129-1135.
6. Horwich, A.L., Kalousek, F., Fenton, W., Pollock, R.A., and Rosenberg, L.E. (1986) Targeting of pre-ornithine transcarbamylase to mitochondria: definition of critical regions and residues in the leader peptide. Cell 44, 451-459.
7. Mc Kusick, V.A. (1992) Mendelian inheritance in man, tenth edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
8. Tuchman, M. (1992) The clinical, biochemical, and molecular spectrum of ornithine transcarbamylase deficiency. J. Lab. Clin. Med. 120, 836-850.
9. Briand, P., Francois, B., Rabier, D., and Cathelineau, L. (1982) Ornithine transcarbamylase deficiencies in human males: kinetic and immunochemical classification. Biochim. Biophys. Acta. 704, 100-106.

10. Tuchman, M. (1993) Mutations and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase gene. Human Mutation 2, 174-178.
11. Strautnieks, S., and Malcolm, S. (1993) Novel mutation affecting a splice site in exon 4 of the ornithine carbamoyltransferase gene. Hum. Mol. Genet. 2, 1963-1964.
12. DeMars, R., LeVan, S.L., Trend, B.L., and Russell, L.B. (1976) Abnormal ornithine carbamoyltransferase in mice having the sparse-fur mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1693-1697.
13. Veres, G., Gibbs, R.A., Scherer, S.E., and Caskey, C.T. (1987) The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. Science 237, 415-417.
14. Hodges, P.E., and Rosenberg, L.E. (1989) The spf-ash mouse: a missense mutation in the ornithine transcarbamylase gene also causes aberrant mRNA splicing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4142-4146.
15. Short, E.M., Conn, H.O., Snodgrass, P.J., Campbell, A.G.M., and Rosenberg, L.E. (1973) Evidence for X-linked dominant inheritance of ornithine transcarbamylase deficiency. N. Engl. J. Med. 288, 7-12.
16. Hokanson, J.T., O'Brien, W.E., Idemoto, J., and Schafer, I.A. (1978) Carrier detection in ornithine transcarbamylase deficiency. J. Pediatr. 93, 75-78.
17. Hauser, E.R., Finkelstein, J.E., Valle, D., and Brusilow, S.W. (1990) Allopurinol-induced orotidinuria. A test for mutations at the ornithine carbamoyltransferase locus in women. N. Engl. J. Med. 322, 1641-1645.
18. Beardmore, T.D., and Kelley, W.N. (1971) Mechanism of allopurinol-mediated inhibition of pyrimidine biosynthesis. J. Lab. Clin. Med. 78, 696-700.
19. Becroft, D.M.O., Barry, D.M.J., Webster, D.R., and Simmonds, H.A. (1984) Failure of protein loading tests to identify heterozygosity for ornithine carbamoyltransferase deficiency. J. Inher. Metab. Dis. 7, 157-159.

20. Spence, J.E., Maddalena, A., O'Brien, W.E., Fernbach, S.D., Batshaw, M.L., Leonard, C.O., and Beaudet, A.L. (1989) Prenatal diagnosis and heterozygote detection by DNA analysis in ornithine transcarbamylase deficiency. J. Pediatr. 114, 582-588.
21. Carstens, R.P., Fenton, W.A., and Rosenberg, L.R. (1991) Identification of RNA splicing errors resulting in human ornithine transcarbamylase deficiency. Am. J. Hum. Genet. 48, 1105-1114.
22. Grompe, M., Caskey, C.T., and Fenwick, R.G. (1991) Improved molecular diagnostics for ornithine transcarbamylase deficiency. Am. J. Hum. Genet. 48, 212-222.
23. Suess, P.S., Tsai, M.Y., Holzkecht, R.A., Horowitz, M., and Tuchman, M. (1992) Screening for gene deletions and known mutations in 13 patients with ornithine transcarbamylase deficiency. Biochem. Med. Metab. Biol. 47, 250-259.
24. Rozen, R., Fox, J., Fenton, W.A., Horwich, A.L., and Rosenberg, L.E. (1985). Gene deletion and restriction fragment length polymorphisms at the human ornithine transcarbamylase locus. Nature 313, 815-817.
25. Nussbaum, R.L., Boggs, B.A., Beaudet, A.L., Doyle, S., Potter, J.L., and O'Brien, W.E. (1986) New mutation and prenatal diagnosis in ornithine transcarbamylase deficiency. Am. J. Hum. Genet. 38, 149-158.
26. Pelet, A., Toumas, E., Rabier, D., Kaplan, J., Kamoun, P., Frezal, J., Saudubray, J.M., and Munnich, A. (1988) Contribution au conseil génétique dans le déficit en ornithine carbamyltransférase. Ann. Biol. Clin. 46, 455-459.
27. Fox JE, Hack AM, Fenton WA, Golbus, M.S., Winter, S., Kalousek, F., Rozen, R., Brusilow, S.W., and Rosenberg, L.E. (1986) Prenatal diagnosis of ornithine transcarbamylase deficiency with use of DNA polymorphisms. N. Engl. J. Med. 315, 1205-1208.
28. Grompe, M., Jones, S.N., and Caskey, C.T. (1990) Molecular detection and correction of ornithine transcarbamylase deficiency. Trends in Genetics 6, 335-339.

29. Slomski, R., Braulke, I., Behrend, C., Schröder, E., Colombo, J.P., and Reiss, J. (1992) Ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency in a female patient with a de novo deletion of the paternal X chromosome. Hum. Genet. 89, 632-634.

30. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491.

31. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2766-2770.

32. Casanova, J.L., Pannetier, C., Jaulin, C., and Kourilsky, P. (1990) Optimal conditions for directly sequencing double-stranded PCR products with Sequenase. Nucleic Acids Res. 18, 4028.

33. Nguyen, M., Argan, C., Lusty, C.J., and Shore, G.C. (1986) Import and processing of hybrid proteins by mammalian mitochondria in vitro. J. Biol. Chem. 261, 800-805.

34. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

35. Moreno, R.F., Booth, F.R., Hung, I.H., and Tilzer, L.L. (1989) Efficient DNA isolation within a single gel barrier tube. Nucleic Acids Res. 17, 8393.

36. Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

37. Tsai, M.Y., Holzkecht, R.A., and Tuchman, M. (1993) Single-strand conformational polymorphism and direct sequencing applied to carrier testing in families with ornithine transcarbamylase deficiency. Hum. Genet. 91, 321-325.

38. Nuzum, C.T., and Snodgrass, P.J. (1976) Multiple assays of the five urea-cycle enzymes in human liver homogenates. In: Grisolia, S., Báguena, R., and Mayor,

F. (eds.), The urea cycle, 325-349, Wiley and Sons, New York.

39. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
40. Ohtani, Y., Ohyanagi, K., Yamamoto, S., and Matsuda, I. (1988) Secondary carnitine deficiency in hyperammonemic attacks of ornithine transcarbamylase deficiency. J. Pediatr. 112, 409-414.
41. Mayatepek, E., Kurczynski, T.W., Hoppel, C.L., and Gunning, W.T. (1991) Carnitine deficiency associated with ornithine transcarbamylase deficiency. Pediatr. Neurol. 7, 196-199.
42. Petty, E.M., Carstens, R., and Bale, A.E. (1991) Ornithine transcarbamylase polymorphism detected by PCR introduction of Dra I site. Nucleic Acids Res. 19, 690.
43. Keats, B., Ott, J., and Conneally, M (1989) Report of the committee on linkage and gene order. Cytogenet. Cell. Genet. 51, 459-502.
44. Davies, K.E., Mandel, J.L., Monaco, A.P., Nussbaum, R.L., and Willard, H.F. (1991) Report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome. Cytogenet. Cell. Genet. 58, 853-966.
45. Matsuura, T., Hoshida, R., Setoyama, C., Shimada, K., Hase, Y., Yanagawa, T., Kajita, M., and Matsuda, I. (1993) Four novel gene mutations in five Japanese male patients with neonatal or late onset OTC deficiency: application of PCR-single-strand conformation polymorphisms for all exons and adjacent introns. Hum. Genet. 92, 49-56.
46. Saphiro, M.B., and Senapathy, P. (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: statistics and functional implications in gene expression. Nucleic Acids Res. 15, 7155-7174.
47. Rosenberg, L.E., Kalousek, F., and Orsulak, M. (1983) Biogenesis of ornithine transcarbamylase in spf^{ash} mutant mice: two cytoplasmic precursors, one mitochondrial enzyme. Science 222, 426-428.

48. Dubois, N., Cavard, C., Chase, J.F., Kamoun, P., and Briand, P. (1988) Compared expression levels of ornithine transcarbamylase and carbamylphosphate synthetase in liver and small intestine of normal and mutant mice. Biochim. Biophys. Acta. 950, 321-328.
49. Alonso, E., and Rubio, V. (1989) Orotic aciduria due to arginine deprivation: changes in the levels of carbamoyl phosphate and other urea cycle intermediates in mouse liver. J. Nutr. 119, 1188-1195.
50. Houghton, J.E., Bencini, D.A., O'Donovan, G.A., and Wild, J.R. (1984) Protein differentiation: a comparison of aspartate transcarbamoylase and ornithine transcarbamoylase from Escherichia coli K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4864-4868.
51. Honzatko, R.B., Crawford, J.L., Monaco, H.L., Ladner, J.E., Edwards, B.F.P., Evans, D.R., Warren, S.G., Wiley, D.C., Ladner, R.C., and Lipscomb, W.N. (1982) Crystal and molecular structures of native and CTP-liganded aspartate carbamoyltransferase from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 160, 219-263.
52. Marcq, S., Diaz-Ruano, A., Charlier, P., Dideberg, O., Tricot, C., Piérard, A., and Stalon, V. (1991) Molecular size and symmetry of Pseudomonas aeruginosa catabolic ornithine carbamoyltransferase. J. Mol. Biol. 220, 9-12.
53. Grompe, M., Muzny, D.M., and Caskey, C.T. (1989) Scanning detection of mutations in human ornithine transcarbamoylase by chemical mismatch cleavage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5888-5892.
54. Black, G.C.M., Chen, Z.Y., Craig, I.W., and Powell, J.F. (1991) Dinucleotide repeat polymorphism at the MAOA locus. Nucleic Acids Res. 19, 689.
55. Oudet, C., Heilig, R., Hanauer, A., and Mandel, J.L. (1991) Nonradiative assay for a new microsatellite polymorphisms at the 5' end of dystrophin gene, and estimation of intragenic recombination. Am. J. Hum. Genet. 49, 311-319.
56. Feener, C.A., Boyce, F.M., and Kunkel, L.M. (1991) Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA: application to the 5' region of the dystrophin gene. Am. J. Hum. Genet. 48, 621-627.

5. CONCLUSIONES

1. La aciduria orótica inducida por aminoácidos se debe a la síntesis excesiva de orotato por el hígado.

2. La acumulación de orotato se debe a acumulación hepática transitoria de carbamil fosfato. La síntesis y acumulación de orotato se satura para niveles de carbamil fosfato superiores a 50 nmol/g de hígado.

3. El carbamil fosfato acumulado se sintetiza por la carbamil fosfato sintetasa mitocondrial (ureotélica), y llega a alcanzar en la matriz mitocondrial concentraciones de hasta 3 mM.

4. La acumulación de carbamil fosfato se debe a activación inicial de su síntesis por aumento en los niveles hepáticos de amonio y acetilglutamato (sustrato y activador de la carbamil fosfato sintetasa), y a limitaciones en su utilización por la ornitina transcarbamilasa, como consecuencia de la existencia de bajos niveles de ornitina.

5. La administración de ornitina eleva los niveles hepáticos de este aminoácido, activando la utilización del carbamil fosfato y evitando su acumulación, y la acumulación de de orotato y de amonio. Este último efecto indica que la administración de ornitina libera de inhibición la carbamil fosfato sintetasa.

6. La acumulación temprana de carbamil fosfato inducida por la administración de alanina se debe a inhibición "in

vivo" de la ornitina transcarbamilasa provocada por este aminoácido. Por tanto, la desproporción entre los niveles de ornitina y de otros aminoácidos puede limitar la eficacia del ciclo por inhibir la transcarbamilasa.

7. Excepto en la rana, encontramos N-acetil-L-glutamato en el cerebro de todos los vertebrados examinados, incluyendo el pollo, que no sintetiza arginina o urea, lo que confirma que, en el cerebro, el acetilglutamato no está relacionado con la síntesis de arginina o urea.

8. Con la excepción del hígado, en todos los animales y tejidos examinados, incluyendo tumores endocraneales humanos y cerebros de rata a lo largo del desarrollo pre y postnatal, solo se ha encontrado acetilglutamato si coexistían niveles sustanciales, normalmente mucho mayores, de N-acetil-L-aspartato.

9. La actividad de síntesis cerebral de acetilglutamato tiene las características del enzima que sintetiza acetilaspártato y se distribuye entre sustancia blanca y gris de forma similar a los niveles de acetilaspártato y acetilglutamato.

10. Existe en el cerebro actividad deacilasa de acetilglutamato con características de aminoacilasa tipo I.

11. El acetilglutamato se sintetiza en el cerebro por el mismo enzima y a una velocidad mucho menor que el

acetilaspártato, y se degrada por la aminoacilasa tipo I, mientras que el acetilaspártato se deacila por otro enzima, la aspartoacilasa, que exhibe menor actividad y diferente distribución y especificidad. El acetilglutamato se sintetiza en el cerebro y en el hígado por enzimas diferentes y se degrada en ambos órganos por aminoacilasas similares o idénticas.

12. Hemos encontrado en enfermos con déficit de ornitina transcarbamilasa (un déficit ligado al cromosoma X) de dos familias diferentes, el reemplazo por adenina de la guanina terminal del exón 4 del gen para este enzima.

13. Esta mutación se describe ahora por primera vez en el hombre, pero se ha encontrado previamente en el ratón spf-ash (un modelo de déficit moderado de ornitina transcarbamilasa), y causa a) el reemplazo de la arginina 129 por histidina, sin efecto sobre la actividad; y b) el procesamiento ineficaz del pre-mARN, generándose sólo una pequeña fracción de mARN de longitud normal.

14. Hemos demostrado mediante técnicas de SSCP, secuenciación directa o digestión del exón 4 con Msp I, que en una familia la madre y dos de las tres hijas son portadoras de la deficiencia. En la otra familia la mutación apareció "de novo" en el varón afectado.



Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. MIGUEL ANGEL GARCIA PEREZ

la calificación de APTO CUM LAUDE por Unanimidad

Valencia, a 29 de Septiembre de 1974

Santiago Jurdic
El Presidente

El Secretario,

L. Cabo



1. La aciduria orótica inducida por aminoácidos se debe a la síntesis excesiva de orotato por el hígado.

2. La acumulación de orotato se debe a acumulación hepática transitoria de carbamil fosfato. La síntesis y acumulación de orotato se satura para niveles de carbamil fosfato superiores a 50 nmol/g de hígado.

3. El carbamil fosfato acumulado se sintetiza por la carbamil fosfato sintetasa mitocondrial (ureotélica), y llega a alcanzar en la matriz mitocondrial concentraciones de hasta 3 mM.

4. La acumulación de carbamil fosfato se debe a activación inicial de su síntesis por aumento en los niveles hepáticos de amonio y acetilglutamato (sustrato y activador de la carbamil fosfato sintetasa), y a limitaciones en su utilización por la ornitina transcarbamilasa, como consecuencia de la existencia de bajos niveles de ornitina.

5. La administración de ornitina eleva los niveles hepáticos de este aminoácido, activando la utilización del carbamil fosfato y evitando su acumulación, y la acumulación de de orotato y de amonio. Este último efecto indica que la administración de ornitina libera de inhibición la carbamil fosfato sintetasa.

6. La acumulación temprana de carbamil fosfato inducida por la administración de alanina se debe a inhibición "in