

ENZIMAS DEL CICLO DE LA UREA EN EL CEREBRO DE RATAS NORMALES Y CIRROTICAS

(Urea cycle enzymes in the brain of normal and cirrhotic rats)

GUILLERMO UGARTE, ONOFRE GONZÁLEZ y MARÍA EUGENIA PINO

Cátedra "A" de Medicina, Universidad de Chile.

Hospital San Francisco de Borja, Santiago, Chile.

Recibido para su publicación el 23 de Noviembre de 1966.

RESUMEN

Se estudió la síntesis de urea, las enzimas del ciclo de la urea y la síntesis de citrulina a partir del ácido carbamilaspartico y de ornitina en el cerebro de ratas normales y cirróticas.

No se observó síntesis de urea a partir de NH_3 ni actividad de carbamifosfato-sintetasa ni ornitincarbamiltransferasa. Sólo se observó actividad de arginino-sintetasa y de L-arginino-ureo-hidrolasa.

La actividad del sistema arginino-sintetasa fue muy baja con un promedio de $0,21 \pm 0,06$ μmoles de urea por hora y gramo de cerebro.

La actividad argininosuccinato-liasa fue de $1,47 \pm 0,14$ $\mu\text{moles/g/hora}$ en el encéfalo de rata normal y $1,50 \pm 0,097$ $\mu\text{moles/g/hora}$ en el de las ratas cirróticas.

La actividad L-arginino-ureo-hidrolasa en las ratas normales fue de $36,2 \pm 1,82$ $\mu\text{moles/g/hora}$. Las ratas cirróticas se diferenciaron de las ratas normales sólo en una actividad arginásica, significativamente más alta con un promedio de $49,8 \pm 2,4$ micromoles de urea g/hora (peso húmedo) ($p < 0,01$).

En ausencia de ornitincarbamil-transferasa no se demostró síntesis de citrulina a partir de carbamilaspartato y ornitina.

INTRODUCCIÓN

El hallazgo frecuente de hiperamonemia en pacientes en coma hepático ha estimulado el estudio del metabolismo del amonio en el cerebro de individuos con insuficiencia hepática (1, 2, 3).

En los mamíferos el amonio desaparece a través del ciclo de la urea o por formación de ácido glutámico a partir de α -cetoglutarato, catalizada por L-glutamico-deshidrogenasa, o por síntesis de glutamina.

El primero de estos mecanismos es la vía principal del metabolismo del amonio en el hígado, la que se ha encontrado alterada en pacientes en coma hepático endógeno (28). En cambio en el cerebro, el amonio sigue principalmente la vía de in-

corporación en el sistema ácido glutámico-glutamina (4, 5, 6).

Sin embargo, en 1959 Sporn *et al.* (7) han comunicado que en el cerebro de rata se produce urea a partir de arginina ^{15}N . Diversos autores han comunicado actividad de algunas de las enzimas del ciclo de la urea en el cerebro de diversos mamíferos (8, 9, 10, 11).

Por otra parte Gendrangolo (12) y Della Pietra (13) han sugerido que la transferencia directa de grupos amino desde aminoácidos a intermedios del ciclo de la urea en el hígado puede ser otra vía de síntesis de urea. Así Della Pietra (14, 15, 16) ha observado síntesis de citrulina y de urea a partir de ácido carbamilaspartico y ornitina en extractos de polvos acéticos de hígado.

Considerando la importancia que puede tener en la patogenia del coma hepático la inactivación del amonio en el cerebro, a través de la síntesis de urea, se

Abreviaciones usadas:

ATP: Adenosintrifosfato.

CTB: Bromuro de hexadecilcetilamonio.

OCT: Ornitina carbamiltransferasa.

ha estudiado en homogeneizados de encefalo de ratas normales y cirróticas la síntesis neta de urea a partir de amonio, bicarbonato y ATP, la síntesis directa de citrulina por el camino señalado y las siguientes enzimas del ciclo ureogénico de Krebs-Henseleit, carbamilsulfato sintetasa (2.7.2.2.EC), L-ornitina carbamil-transferasa (2.1.3.3.EC), sistema arginino-sintetasa. L argininosuccinatoarginina-liasa (4.3.2.1.EC), L. arginina-urea-hidrolasa (3.5.3.1.EC).

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudiaron las enzimas del ciclo de la urea en el cerebro de 10 ratas normales y de 10 ratas con cirrosis avanzada del hígado de origen alimentario. La cirrosis se obtuvo manteniéndolas con la dieta descrita por Hoffbauer *et al.* (18) (Tabla I) durante 17-20 semanas. En todas ellas se comprobó histológicamente la cirrosis. Las características morfológicas de las alteraciones hepáticas producidas en nuestro experimento han sido descritas anteriormente (27). Las ratas testigos recibieron la dieta normal del laboratorio * y no presentaron alteraciones histológicas del hígado (27).

Las ratas fueron muertas por traumatismo craneano. Los cerebros se extrajeron inmediatamente y se mantuvieron en el congelador a -20°C hasta la iniciación de los análisis enzimáticos. Todas las determinaciones se hicieron dentro de las 24 horas, salvo la de arginasa que se determinó antes de 5 días. Se sabe que todas las enzimas del ciclo de la urea son estables cuando se conservan los órganos en frío por un período de hasta una semana (8, 19, 28).

Para la preparación de homogeneizados, se utilizó una solución de CTB. al 0,1% en agua usando la proporción de 1 g de cerebro por 9 ml de CTB 0,1%. La solución de CTB no debe mantenerse helada, debido a su poca solubilidad a bajas temperaturas. La homogeneización se efectuaba en homogeneizador Virtis a 16.000 r.p.m. durante 2 minutos. No es necesario remover previamente las meninges. El homogeneizado se vertía en tubos de centrífuga helados y se centrifugaba a 3.500 x g durante 20 minutos a 2°C. El sobrenadante obtenido (S1) se mantenía en hielo hasta su uso. La capa de materia grasa que se forma en la superficie se extraía con la ayuda de una pipeta fina. Al residuo se agregaba la misma cantidad de CTB al 0,1% y se procedía como en la vez anterior (S2).

* Dieta de los testigos:
Composición: harina de pescado 8%; leche descremada 3%; levadura seca 1%; sal común 1%; harina nevada (harina de segunda) 5%; harina de maíz 40%; harina de trigo y avena (trigo entero molido por partes iguales) 42%.

Todas las mediciones enzimáticas en los grupos de ratas normales y cirróticas se efectuaban a los pocos instantes de preparado el homogeneizado.

Preparación de polvos acetónicos de cerebro: Se utilizaba cerebro de rata obtenido recién muerto el animal y se seguía el método de Ratner (20) para la preparación de polvos acetónicos. En algunos experimentos se utilizó cerebro de vacuno, desprovisto de meninges, obtenido dentro de las dos horas que siguen a la muerte del animal. Los polvos acetónicos de hígado se obtenían de igual manera. El material seco se almacenaba en desecador sobre sílica gel, manteniendo la presión reducida y en el congelador a -18°C.

Preparación de L-ornitina carbamiltransferasa (OCT) de hígado: Se siguió la técnica de Burnett y Cohen (30). Para su uso en la determinación de carbamatoquinasa no se estimó necesario una purificación más allá del fraccionamiento con sulfato de amonio, colectándose la fracción que precipita con sal 2,0 - 2,5 M en 0,0020 M buffer Tris-HCl pH 8,0. La actividad específica en estas condiciones fue de 80,2 μ moles por mg de proteína y por hora. La OCT se almacenaba en congelador, en varios tubos a -18°C. La enzima se manifestó estable durante dos meses.

La hidroxilapatita necesaria para la preparación se elaboraba de acuerdo con la técnica de Tiselius *et al.* (31).

Preparación de carbamil D-L aspártico: Se utilizó la técnica de Umbreit (32). El ácido carbamil aspártico obtenido en forma impura como producto de la reacción entre cianato de potasio y ácido aspártico, en medio fuertemente alcalino, se lavó con partes iguales de agua y etanol absoluto a la temperatura de 3°C para eliminar de esta manera los restos de álcali, cianato y ácido aspártico. El carbamil D-L-aspártico preparado no se disuelve

TABLA I

Composición de la dieta cirrótica

Ingredientes	por ciento
Caseína (exenta de vitamina)	8,00
Grasa	37,95
Sacarosa	48,38
Mezcla de sales *	4,00
L-cistina (Merck)	0,62
Mezcla de vitaminas **	1,00
A.D.T. *** (en aceite)	0,05

* Mezcla de sales: Lactato calcio . 5 H₂O, 39,15%; CaH₂PO₄ . 2H₂O; 14,60%; CaCO₃, 5,28%; H₂PO₄, NaH₂PO₄, 2H₂O, NaCl, MgSO₄, FeSO₄, MnSO₄, 2H₂O, ZnSO₄ . 7H₂O, CuSO₄ . 5 H₂O, KI.

** Mezcla vitaminas: tiamina, 0,3125%; riboflavina, 0,05%; piridoxina, 0,03125%; pantotenato calcio, 0,125%; menadiona USP, 0,03125%.

*** En aceite: 6,25 mg Vitamina A (20.000 U/g aceite). 0,78125 mg Vitamina D (400.000 U/g aceite). 25,0 mg de dl-a-tocoferol. 17,96875 mg de aceite de maní para 50 mg de solución.

TABLA II
Síntesis de urea por cerebro de ratas normales

Rata	Urea en el cerebro (µmoles/g)	
	Antes de incubar	Después de incubar
1	4,25	4,18
2	4,16	4,15
3	3,75	3,80
4	3,75	3,75
5 *	3,00	2,95
6 *	2,80	2,90

0,5 ml homogeneizado de cerebro al 10% en CTB (S₁/S₂ partes iguales) se incuban con 0,5 ml de mezcla: 50 micromoles buffer Tris-HCl pH 8; 20 micromoles KHCO₃; 10 micromoles NH₄Cl, 10 micromoles MgCl₂, 5 micromoles ATP pH 7,35, 5 micromoles Ornitina HCl, 5 micromoles ácido N-acetil D-L glutámico. Tiempo de incubación 30 minutos a 38°C.

* Sin ornitina.

fácilmente en esta mezcla. Se recristalizaba dos veces en agua caliente, enfriando rápidamente para evitar la formación de hidantoina-5-acético. El producto se lavaba finalmente con etanol absoluto y se secaba sobre sílica gel. No se encontró residuo de ácido aspártico en el producto resultante.

El ácido carbamilaspartico preparado no da reacción coloreada con el reactivo para la urea, pero sí con el que se empleaba en la determinación de citrulina.

Medio de incubación.

1. *Síntesis neta de urea*: La síntesis de urea a partir de amonio y bicarbonato se estudió en un sistema compuesto de 0,5 ml de homogeneizado de cerebro de rata (partes iguales de fracciones S₁ y S₂ según Brown y Cohen, 19) y 0,5 ml de sustrato compuesto de 50 µmoles buffer Tris-HCl pH 8; 20 µmoles KHCO₃; 10 µmole NH₄Cl, 10 µmole MgCl₂; 5 µmole ATP, pH 7,35; 5 µmole ornitina HCl; 5 µmole N-acetil D-L-glutámico, volumen total 1,0 ml. Se incubó a 38° durante 30 minutos. La reacción se detuvo agregando 4 ml de ácido perclórico 0,8 M (Tabla II).

2. *Carbamil fosfato sintetasa*: Se sigue la técnica de Jones *et al.* (9). Inmediatamente antes del experimento se prepara una solución que contiene 50 µmole Tris-HCl pH 8,0; 20 µmole de bicarbonato de potasio; 10 µmole de cloruro de amonio; 10 µmole de cloruro de magnesio; 5 µmole L-ornitina-HCl; 5 µmole de ATP pH 7,35; 5 µmole de N-acetil D-L glutámico; 113 unidades fracción sulfato de amonio 2,0 - 2,5 M de OCT de hígado de vacuno; ureasa 3 mg por tubo. Se usan 0,45 ml de esta mezcla. El volumen total del incubado fue de 1,5 ml. La reacción se detuvo con 4 ml de ácido perclórico 0,8 M.

La actividad carbamil fosfato sintetasa se determinó preincubando 20 minutos con ureasa (suspensión buffer Tris-HCl pH 8,0 0,020 M) agregando luego la mezcla de sustratos, se

incuba por 30 minutos adicionales a 38°C. La actividad se obtuvo de la diferencia entre la citrulina formada en el tubo incubado 30 minutos con el testigo correspondiente al instante de adicionar la mezcla de sustrato.

En algunos casos se estudió paralelamente la actividad carbamilfosfato-sintetasa de los homogeneizados con el método descrito por Brown y Cohen (19).

3. *Ornitinacarbamil-transferasa*: El medio de incubación contiene 10 µmole de L-ornitina - HCl; 10 µmole de carbamilfosfato de Litio; 90 µmole buffer glicerato de sodio pH 8,0 ó 50 µmole de buffer Tris-HCl pH 8,0; suspensión de ureasa en buffer Tris-HCl pH 8,0, 0,020 M. 3 mg por tubo. El volumen total de incubado fue 1,5 ml. La reacción se detuvo con 4 ml de ácido perclórico 0,8 M. La determinación se realizó preincubando 20 minutos con ureasa buffer Tris y ornitina, al cabo de este tiempo se agregaba el carbamilfosfato de litio y se incubó nuevamente durante 30 minutos. La actividad se obtuvo por la diferencia de la cantidad de citrulina formada en el tubo incubado 30 minutos y el testigo correspondiente al instante de agregar el carbamilfosfato. A este resultado se resta el valor de la actividad no enzimática. Para este objeto se incluían dos tubos que contenían sólo sustrato procesado según las condiciones anteriores.

4. *Sistema arginino sintetasa*: La medición se realizó en presencia de un exceso de arginasa, para convertir la arginina formada en urea. El medio de incubación contiene según Brown y Cohen (19): 5 µmole de L-citrulina pH 7; 5 µmole de L-aspartico pH 7; 5 µmole ATP pH 7,35; 5 µmole de sulfato de magnesio; arginasa hepática de bovino 0,6 mg por tubo; 50 µmole de fosfato de potasio pH 7,3. Se probó la actividad del extracto S₁. Se incubó 1,5 ml durante 1 hora a 38°C. La reacción se detuvo con 2 ml de ácido perclórico 2 N. La actividad se expresó en micromoles de urea formada por hora y gramo de cerebro (peso húmedo).

5. *L-argininosuccinato-argininaliasa*: El medio de incubación contenía ácido argininosuccínico libre preparado según Ratner (34) de su sal de bario, utilizando en la incubación aproximadamente 4 µmole; 50 µmole buffer fosfato de potasio pH 7,3; arginasa hepática de bovino 0,6 mg por tubo. El volumen total del incubado fue de 1,5 ml. La incubación se mantuvo durante 40 minutos a 38°C. Se detuvo la reacción con 2 ml de ácido perclórico 2N.

6. *L-arginina-urea hidrolasa*: Se ha utilizado el método de Greenberg (21) con algunas modificaciones relativas al volumen de incubado y a la determinación de urea, que se realizó en este trabajo por una adaptación de la técnica de Cruz-Coke *et al.* (29).

El medio de incubación contiene 425 µmoles de L-arginina-HCl pH 9,5; 0,05 ml sulfato de Mn-maleato 0,1 M pH 7. Volumen de incubado 1,5 ml. La enzima se prueba sobre la porción de sobrenadante S₁ y S₂ en una mezcla 1/1. La determinación se realiza preincubando 30 minutos a 38°C con la mezcla sulfato de Mn-maleato. Al cabo de este tiem-

po se agrega la arginina, prolongándose la incubación 30 minutos. La reacción se detiene con 1 ml de ácido perclórico 2N. La actividad se establece por diferencia en la urea formada entre un tubo incubado 30 minutos y un tubo detenido al instante de agregar la arginina.

7. *La síntesis de citrulina a partir de carbamilaspartato y ornitina* se estudió en homogeneizado de encéfalo y en polvos acetónicos de hígado y cerebro de rata y buey según el método de Della Pietra (14, 15).

8. *La urea* se determinó mediante el método de Archibald (29) y la citrulina por el método de Archibald y Ratner (20).

9. *Las proteínas* se analizaron por el método de Biuret (35).

Todas las determinaciones se efectuaron en duplicado aceptándose una variación no superior al 5% en cada duplicado.

RESULTADOS

1. *Síntesis neta de urea.* Los resultados obtenidos con respecto a la síntesis neta de urea que aparecen en la Tabla II muestran que no se observó síntesis de urea a partir de amonio, bicarbonato y ATP en experimentos con homogeneizados de cerebro.

2. *Carbamilfosfato sintetasa:* En ninguno de los experimentos realizados por el método de Brown y Cohen se pudo detectar actividad de esta enzima en el cerebro. En cambio usando el método de Jones (9) se encontró una actividad baja, pero discutible que no se observó cuando se repitió el procedimiento agregando ureasa al medio.

3. *Ornitincarbamil-transferasa:* Tampoco se encontró actividad de esta enzima en ningún experimento con homogeneizados ni con polvos acetónicos de cerebro.

4. *Sistema arginino-sintetasa:* La media de 10 determinaciones realizadas en ratas normales fue de $0,21 \pm 0,06$ μ moles de urea por hora y gramo de cerebro, peso húmedo; para las ratas cirróticas el valor correspondiente fue $0,19 \pm 0,05$ μ moles.

5. *L-argininosuccinato-arginina-liasa:* La actividad de la argininosuccinasa fue baja, tanto en ratas normales como cirróticas, en relación con los valores publicados por otros autores. En el grupo normal la actividad media fue de $1,47 \pm 0,14$ y en el cirrótico de $1,50 \pm 0,10$ μ moles urea/hora/g cerebro, peso húmedo (Tabla III).

6. *L-arginina-urea-hidrolasa:* La actividad arginásica cerebral en ratas normales

TABLA III

Actividad argininosuccinato-liasa en ratas normales y cirróticas (expresada en μ mole de urea por hora)

Actividad específica			
Por g cerebro húmedo		Por mg proteína	
Normales	Cirróticas	Normales	Cirróticas
1,8	1,6	0,043	0,064
1,3	1,8	0,092	0,094
1,2	1,4	0,032	0,044
2,0	1,2	0,098	0,052
1,4	1,3	0,051	0,042
1,1	1,7	0,037	0,090
*1,47±	1,50±	0,059±	0,064±
0,14	0,097	0,012	0,001

* Media aritmética \pm su error típico.

fue de $36,2 \pm 1,82$ micromoles urea/hora/g cerebro peso húmedo (actividad específica $1,52 \pm 0,07$ micromoles urea/hora/mg proteína). En ratas cirróticas la actividad arginásica fue de $49,8 \pm 2,4$ micromoles urea/hora/g (actividad específica micromoles urea/hora/mg proteína $1,85 \pm 0,24$). La diferencia de actividad arginásica cerebral de ratas normales y cirróticas fue estadísticamente significativa (Tabla IV).

7. *Síntesis de citrulina a partir de ácido*

TABLA IV

Actividad específica de L-argininurea-hidrolasa cerebral en ratas normales y cirróticas (expresada en μ mole de urea por hora)

Actividad específica			
Por g cerebro húmedo		Por mg proteína	
Normales	Cirróticas	Normales	Cirróticas
49	58	1,5	1,9
31	54	1,7	2,0
30	63	1,1	2,4
33	48	1,4	1,5
37	56	1,7	2,1
33	48	1,7	1,8
40	45	1,5	1,7
36	40	1,4	1,7
37	42	1,7	1,7
	44		1,7
*36,2±	49,8±	1,52±	1,85±
1,82	2,4	0,07	0,24

* Media aritmética \pm su error típico.

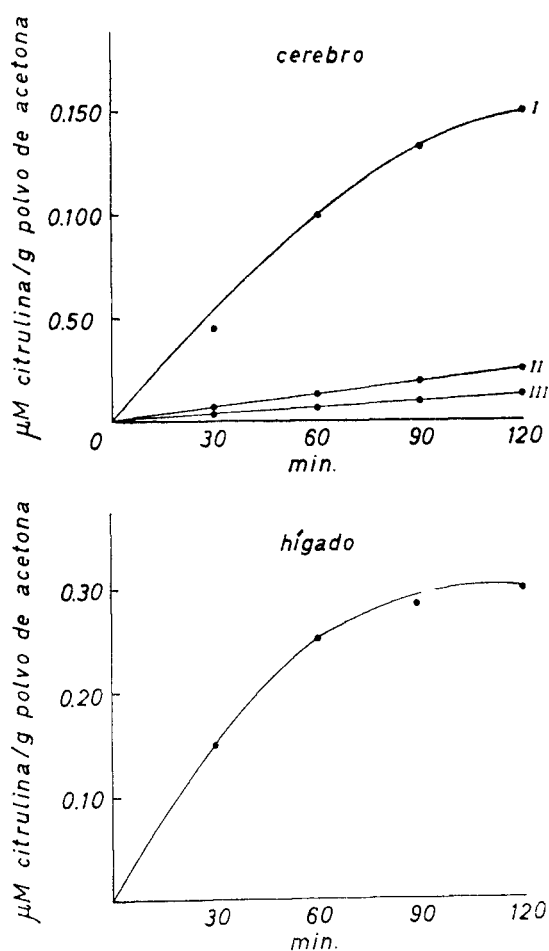


Fig. 1: Comparación de la síntesis de citrulina a partir de carbamil-aspartato y ornitina en polvos acetónicos de cerebro antes y después de agregar ornitincarbamiltransferasa (OCT), con la síntesis de citrulina en polvos acetónicos hepáticos sin adición de OCT. Extracto de polvo de acetona de cerebro o hígado, preparado extrayendo con buffer fosfato de potasio 0,050 M pH 7,4; en la proporción de 1 g de polvo de acetona por 20 ml de buffer. Se preincuba 20 minutos con ureasa (suspensión en 0,020 M buffer de fosfato de potasio pH 7,4), 3 mg por tubo. Al cabo de este tiempo se agrega una mezcla que contiene: 50 micromoles de carbamil D-L aspártico pH 7,3; 25 micromoles de L-ornitina-HCl y 203 unidades de OCT, hígado de vacuno, preparado según Burnett y Cohen (30). Volumen de incubado 2,5 ml. La reacción se detiene con 4 ml de ácido perclórico 0,8 M. Cerebro: I substrato + polvo acetónico de cerebro + OCT. II substrato + polvo acetónico de cerebro, sin OCT. III substrato solo. Hígado: substrato + polvo acetónico. La síntesis de citrulina a partir de carbamilaspartato y ornitina se observa sólo en homogeneizados hepáticos. También en homogeneizados de cerebro a los cuales se agrega OCT previamente.

carbamilaspartato y ornitina: Della Pietra y colaboradores han encontrado que el

polvo acetónico de hígado sería capaz de realizar esta síntesis.

Estudiamos esta reacción con polvos acetónicos de hígado y comprobamos síntesis de citrulina (Fig. 1). En cambio, en 10 experimentos con polvos acetónicos de cerebro de rata y buey no obtuvimos síntesis en ausencia de OCT. Cuando esta enzima se agregó al medio de incubación, se observó síntesis y la reacción se desarrolló como en el hígado (Fig. 1).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que el cerebro de las ratas es incapaz de inactivar amonio a través de la síntesis de urea. Esta posibilidad fue sugerida por Chalmers (2), basado en los trabajos de Sporn *et al.* (7) quienes demostraron liberación de urea in vivo por el encéfalo de ratas a las cuales se les administraba arginina ^{15}N .

En nuestro estudio no hemos conseguido reconocer síntesis de urea a partir de NH_3 , CO_2 y ATP ni pesquisar actividad de carbamilfosfosintetasa ni de ornitincarbamil-transferasa.

Jones *et al.* han demostrado una pequeña actividad de carbamilfosfato-sintetasa en homogeneizados de cerebro de rata. Obtuvimos resultados similares empleando el método preconizado por ellos, pero parece que la actividad de esta enzima que así se observaría constituye un artificio de técnica causado por la urea endógena presente en el homogeneizado, la cual da una reacción cromógena con el reactivo para la citrulina, que provoca lecturas elevadas de los blancos. Apoya esta hipótesis el hecho de que después de agregar ureasa al medio de incubación no se registró actividad carbamilfosfosintetasa y que tampoco se pudo reconocerla con el método de Brown y Cohen. Nuestras determinaciones sólo han demostrado la presencia de arginasa, de argininsuccinato-liasa y del sistema arginino-sintetasa. La actividad del sistema arginino-sintetasa fue muy baja y difícil de medir, lo cual sugiere que aún si hubiera en el encéfalo síntesis de ornitina y carbamilfosfosintetasa, esta etapa sería limitante en la síntesis de urea.

La actividad arginásica de los homogeneizados de encéfalo de rata es importante y fácil de medir y ello explica la libe-

TABLA V

Enzimas del ciclo ureogénico en el cerebro de ratas normales y cirróticas. Las actividades se expresan en μ moles de urea/hora/g tejido húmedo

Enzimas	Normales	Cirróticas
Carbamilfosfato sintetasa	0	0
L-ornitina carbamil-transferasa	0	0
Sistema arginino-sintetasa	0,21 \pm 0,07	0,19 \pm 0,05
Arginino-succinato-liasa	1,47 \pm 0,14	1,50 \pm 0,097
L-arginina-urea hidrolasa	37,04 \pm 2,32	49,64 \pm 2,32

ración in vivo de urea a partir de Arginina- 15 N observado por Sporn *et al.* (7).

La única diferencia encontrada entre las ratas normales y las ratas con cirrosis avanzada fue un aumento significativo de la actividad arginásica en los homogeneizados de cerebro de estas últimas (Tabla V). No disponemos de informaciones que permitan explicar este aumento de la arginasa en el cerebro de las ratas enfermas.

Es posible que la presencia de arginasa en el encéfalo intervenga en la regulación del metabolismo de la arginina en el cerebro impidiendo la formación excesiva de ácido guanidoacético y guanidobutírico. Estos compuestos, que son inhibidores de la transmisión neuronal y que han sido aislados en el encéfalo, se forman por transamidación de la arginina (22, 23, 25). La arginina que interviene en este proceso puede provenir de la dieta, de su biosíntesis en el hígado u originarse en el cerebro a partir de citrulina. Debe considerarse que en la rata cirrótica la dieta hipoproteica empleada hace difícil pensar que el aumento de arginasa encontrada en el cerebro haya sido inducido sólo por la arginina de la dieta.

En apoyo de la posibilidad que la arginina se origine en el cerebro a partir de citrulina o sea aportada por el hígado, están las deficiencias enzimáticas hepáticas en el ciclo de la urea descritas en el coma hepático endógeno y el aumento de citrulina en la sangre descrito en este síndrome (24, 28).

No hemos observado en el cerebro de ratas la formación de citrulina por trans-

carbamilación directa de la ornitina por el ácido carbamilaspartico descrita por autores italianos en el hígado. En cambio, hemos comprobado que esta reacción ocurre en presencia de polvos acetónicos de hígado de rata y vacuno.

Estos hechos sugieren que la síntesis de citrulina comunicada por esta vía en el hígado por Della Pietra *et al.*, no sea una transcarbamilación directa, sino la resultante de dos fases en las que intervienen respectivamente la aspartilcarbamil-transferasa y la ornitincarbamil-transferasa, enzimas que existen en el hígado, mientras que la última falta en el cerebro (15, 33). Estas fases son las siguientes:

1. Carbamil aspártico + Pi \rightarrow Aspártico + Carbamil-P
2. Carbamil-P + Ornitina \rightarrow Citrulina + Pi

Crokaert y Baroen empleando substratos radiactivos y otras técnicas de determinación (cromatográficas y radiocromatográficas) no han conseguido verificar la formación de citrulina a partir de carbamilaspartico y ornitina en presencia de homogeneizados de hígados (34). Ellos atribuyen esta discrepancia con los resultados de Della Pietra a la inespecificidad de los métodos colorimétricos de análisis de la citrulina, los cuales dan reacción coloreada también con urea y alantoina. Por lo tanto, la aparente formación de citrulina que se observaría en esta experiencia en polvos acetónicos de hígado y de cerebro adicionados de OTC podría corresponder a un artificio de técnica.

En todo caso, estos resultados demostrarían que en el cerebro de rata no operarían los mecanismos de formación de citrulina propuestos para la formación de urea.

Los resultados discutidos permiten concluir que el cerebro de la rata no sería capaz de sintetizar urea a través del ciclo ureogénico y sólo es posible observar en él liberación de urea a partir de citrulina o de arginina. Estos resultados concuerdan con los comunicados por Englert (27), quien no consiguió observar síntesis de urea en el cerebro de perros en coma hepático.

SUMMARY

Formation of urea from arginine- 15 N has been demonstrated in vivo in normal rat brain by Sporn *et al.* In this study net

synthesis of urea from ammonia, the level of urea cycle enzymes and alternate pathways of urea synthesis suggested by Italian workers have been investigated in the brain of normal and cirrhotic rats.

Advanced dietary cirrhosis histologically proven was produced in rats with the method described by Hoffbauer *et al.* (Table I).

Synthesis of urea from NH_3 was not demonstrated and no activity of carbamylphosphate synthetase and ornithine carbamyltransferase was detected (Table II).

A low argininesynthetase activity averaging 0.21 ± 0.06 micromoles of urea per hour and gram of brain (wet weight) was found. A slightly higher activity of argininosuccinase (mean: 1.47 ± 0.14 in normal rats brain and 1.50 ± 0.10 micromoles of urea per hour and gram wet weight in cirrhotic rat brain) was recorded (Table III).

Cirrhotic rats differed from normals only in a significantly higher L-arginine ureohydrolase activity averaging 49.8 ± 2.4 micromoles of urea per hour and gram of brain (wet weight), (Table IV), against 36.2 ± 1.82 in normal rats ($p < 0.001$).

No synthesis of citrulline in the brain through the reaction of carbamylaspartate and ornithine in the absence of ornithine carbamyltransferase was observed. (Fig. 1).

Our results suggest that urea synthesis in the brain of normal and cirrhotic rats is only possible from citrulline and specially from arginine. A higher arginine-ureohydrolase activity in the brain of cirrhotic rats was shown.

REFERENCIAS

- 1.—DATSUR, D. K. — Intern. Med. 108:136, 1961.
- 2.—CHALMERS, T. C. — New England, J. M. 263:23, 1960.
- 3.—MC DERMOTT, W. V. JR. — New England, J. M. 257:1076, 1957.
- 4.—CHAIN, E. B., CHIOZZOTTO, M., POCHIARI, F., ROSSI, C. y SANDMAN, R. — Proc. Soc. Med. 153:290, 1960.
- 5.—NAVASIO, F., GERRITSEN, T. y WRIGHT, G. J. — J. Neurochem. 7:146, 1961.
- 6.—BERL, S., LAJTHA, A. y WAELSH, H. — J. Neurochem. 7:186, 1961.
- 7.—SPORN, M. B., DINGMAN, W., DEFALCO, A. y DAVIES, R. K. — J. Neurochem. 5:62, 1959.
- 8.—RATNER, S., MOREL, H. y CARVALHO, E. — Arch. Biochem. Biophys. 91:280, 1960.
- 9.—JONES, M. E., ANDERSON, A. D., ANDERSON, C. y HODES, S. — Arch. Biochem. Biophys. 95:499, 1959.
- 10.—TOMLISON, S. y WESTALL, R. C. — Nature 185:235, 1960.
- 11.—WALKER, J. B. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98:7, 1958.
- 12.—GENDRANGOLO, F., PIAZZA, R. y RAMETTA, G. — Giorn. Biochim. 6:337, 1957.
- 13.—GENDRANGOLO, F. — Giorn. Biochim. 7:313, 1958.
- 14.—DELLA PIETRA, G., ROGLIANI, E. y PROCACCINI, S. — Giorn. Biochim. 6:337, 1957.
- 15.—DELLA PIETRA, G., ROGLIANI, E., PROCACCINI, S. y ROGLIANI, C. — Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 33:771, 1957.
- 16.—DELLA PIETRA, G. y DE LORENZO, F. — Giorn. Biochim. 10:468, 1961.
- 17.—COHEN, P. P. y SALACH, H. J. — In Metabolic Pathways. v. 2p. 53. 1961. New York.
- 18.—SAKI, F. J., BARNUM, C. P. y HOFFBAUER, F. W. — Arch. Pathol. 68:171, 1959.
- 19.—BROWN, G. W. y COHEN, P. P. — J. Biol. Chem. 234:1769, 1959.
- 20.—RATNER, S. I. — En "Methods in Enzymology" (Collowick, S., Kaplan, N. O. eds.) v. 12. p. 358. Academic Press. 1955. New York.
- 21.—GREENBERG, D. — En "Methods in Enzymology" (Collowick, S., Kaplan, N. O. eds.) v. 2. p. 368. Academic Press. 1955. New York.
- 22.—WAELSH, H. y LAJTHA, A. — Physiol. Rev. 41:709, 1961.
- 23.—PISANO, J. J. y UDENFRIEND, S. — Fed. Proc. 17:403, 1958.
- 24.—PEARL, D. C. y MC DERMOTT, W. V. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97:440, 1958.
- 25.—EDWARDS, C. y KUFFLER, S. W. — J. Neurochem. 4:1903, 1959.
- 26.—ENGLERT, E. — Gastroenterology 44:482, 1962 (abst.).
- 27.—ITURRIAGA, H., PIZZI, T., UGARTE, G. y LORCA, F. — Biológica 35:33, 1963.
- 28.—UGARTE, G., PINO, M. E., VALENZUELA, J. y LORCA, F. — Gastroenterology 45:182, 1963.
- 29.—CABELLO, J. — La Arginasa Hepática. 1955. Universidad de Chile. Santiago.
- 30.—BURNETT, G. H. y COHEN, P. P. — J. Biol. Chem. 229:337, 1957.
- 31.—TISELIUS, A., HJERTEN, S. y LEVIN, O. — Arch. Biochem. Biophys. 65:132, 1956.
- 32.—UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. y STAUFFER, S. F. — Manometric Techniques, Burgess Publish. Co. Minn. U.S.A. 1967.
- 33.—LOWENSTEIN, J. M. y COHEN, P. P. — J. Biol. Chem. 220:57, 1956.
- 34.—CROKAERT, R. y BAROEN, J. P. — Bull. Soc. Chim. Biol. 46:687, 1965.
- 35.—GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. L. y DAVID, M. M. — J. Biol. Chem. 177:751, 1949.