

ALGUNOS ASPECTOS DEL METABOLISMO DE UREA
Y AMONIACO*

DRES. GUILLERMO SOBERÓN
Q.F.B. GUSTAVO FLORES
JAIME MORA
JESÚS TORRES

AMONIACO y urea son dos compuestos de extraordinaria importancia en el metabolismo nitrogenado. En unión de ácido úrico constituyen la principal forma de eliminación del nitrógeno proveniente del catabolismo de proteínas, y ácidos nucleicos.

Existen especies animales como los invertebrados que excretan principalmente amoniaco y por tanto llamados amonotéticos, otras como las aves y reptiles que eliminan primordialmente ácido úrico y que se les llama uricotéticos y por último otras como los mamíferos en que la mayor parte de la excreción del nitrógeno se hace en forma de urea y en consecuencia se les designa como ureotéticos. Por supuesto que estos últimos eliminan las 3 formas pero en ellos el ácido úrico o su producto de oxidación alantoina se originan a partir de la degradación de las bases púricas.

En el mamífero, el amoniaco debe considerarse no solamente como un producto de excreción que es eliminado por el riñón sino también como un compuesto intermedio de gran importancia en metabolismo ya que participa en la síntesis de otras sustancias fundamentales. (Figura 1).

Los principales caminos que se siguen para la producción y utilización del amoniaco en el mamífero son los siguientes:

A. Producción de amoniaco.

- 1) La desaminación oxidativa de los D-aminoácidos.
- 2) La desaminación oxidativa de los L-aminoácidos.

* Trabajo de ingreso leído en la sesión ordinaria del 29 de julio de 1959.

Es por demás interesante mencionar en relación con las dos vías anteriores la aparente paradoja biológica que existe ya que los compuestos naturales son los L-aminoácidos y las enzimas responsables de su oxidación tienen tan poca actividad que no explicarían la conversión del grupo amino de los aminoácidos en amoníaco libre a la velocidad que normalmente se observa, en cambio la D-oxidasa de los aminoácidos, enzima que cataliza la oxidación de los D-amino-

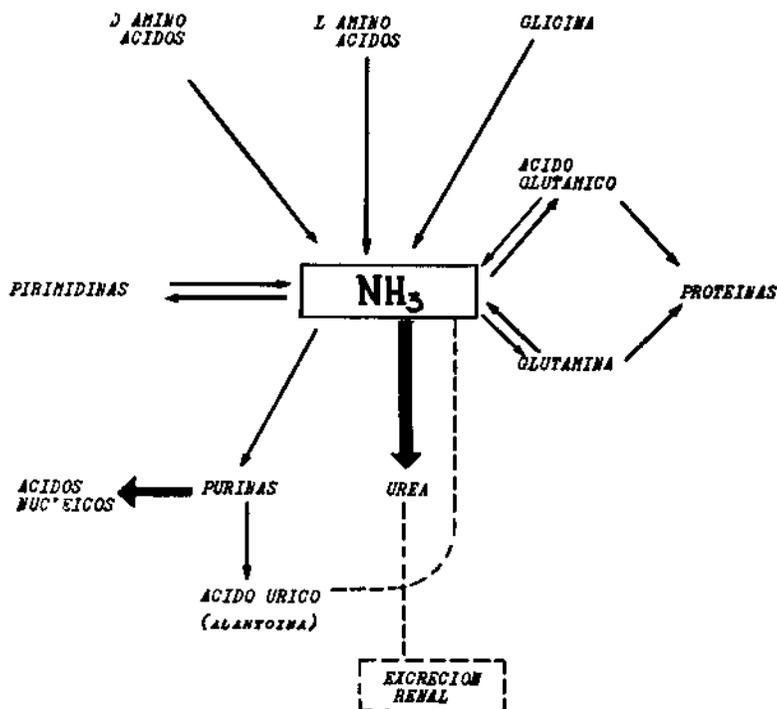


FIG. 1. Vías metabólicas que producen y que utilizan amoníaco. Solamente la deshidrogenasa glutámica cataliza la reacción en ambos sentidos, en las otras reacciones señaladas con doble flecha existe una enzima para la síntesis y otra para el catabolismo.

ácidos (que no existen normalmente en la naturaleza formados por sistemas animales) tiene una actividad mucho mayor y está ampliamente distribuída.

- 3) La desaminación oxidativa de la glicina.
- 4) La desaminación oxidativa del ácido glutámico.
- 5) La hidrólisis de la glutamina.

La hidrólisis de la glutamina produce amoníaco libre, que en el riñón se combina con el ion hidrógeno para formar ion amonio, mecanismo que juega un papel relevante en el control del equilibrio ácido básico. En esta forma la cantidad de amonio excretada es función del pH de la orina; se ha informado que la acidosis y la alcalosis provocan un aumento en la actividad de glutami-

nasa de algunas especies animales hallazgo que no ha sido plenamente confirmado.

6) El catabolismo de las pirimidinas.

B. Utilización de amoniaco.

1) Debe citarse en primer lugar a la deshidrogenasa glutámica, mencionada anteriormente (4 en los caminos de producción), vía metabólica de gran trascendencia, pues en contraste con las otras vías de producción es reversible, de modo que el ácido alfa ceto glutárico producto de la reacción oxidativa puede fijar amoniaco al mismo tiempo que se reduce para dar ácido glutámico, proceso que es llamado aminación reductiva.

Además la deshidrogenasa glutámica es el camino indicado que se sigue para la conversión del grupo amino de los aminoácidos en amoniaco libre. Efectivamente, ya que como se ha explicado con anterioridad la L-oxidasa de los aminoácidos, tiene una actividad limitada no es posible la conversión directa del grupo amino en amoniaco lo que sucede es que el amigeno es cedido al ácido alfa ceto glutárico por el proceso de transaminación para formar ácido glutámico que ya es capaz de desaminarse oxidativamente. La suma de los dos procesos transaminación más desaminación oxidativa del glutámico se le ha llamado transdeaminación oxidativa. La secuencia de las dos reacciones en sentido inverso es la manera en que amoniaco puede formar el grupo amino de los aminoácidos y se le llama transreaminación reductiva. Esta es también la vía que siguen los vegetales para la fijación de nitrógeno.

2) La síntesis de glutamina.

De gran importancia también porque proporciona un mecanismo mediante el cual es posible disponer de grandes cantidades de amoniaco libre, lo cual será objeto de comentario especial más adelante.

3) La síntesis de purinas.

El ácido úrico que en el hombre y los primates es el principal producto del catabolismo de las purinas es excretado en la orina; no obstante, se ha indicado que quizá el ácido úrico no sea un producto final del catabolismo de las purinas sino que una parte de él puede ser transformada en otros productos.

4) La síntesis de las pirimidinas.

La incorporación de amoniaco en el esqueleto de las purinas y de las pirimidinas es la vía de incorporación del compuesto en ácidos nucleicos y la vía inversa de la deshidrogenasa glutámica (aminación reductiva) y la síntesis de glutamina son los caminos para la integración del amoniaco en proteínas, efectivamente, se ha descrito que glutamina se utiliza de manera importante para la síntesis de la molécula proteica.

5) La síntesis de la urea que será analizada en mayor detalle.

Este proceso metabólico, que es de extraordinario interés en metabolismo intermedio, está formado por un sistema multienzimático, es decir, se encadenan varias reacciones enzimáticas en forma tal que el producto de una reacción es

substrato de la siguiente: además una vez que se han completado las diversas reacciones que intervienen en la síntesis de la urea se restituye el compuesto que inició el proceso, es decir, la urea se sintetiza en un ciclo que ha sido llamado Ciclo de Krebs-Henseleit en recuerdo de los investigadores que lo integraron al reunir resultados de sus investigaciones y de las de otros autores. Aunque en

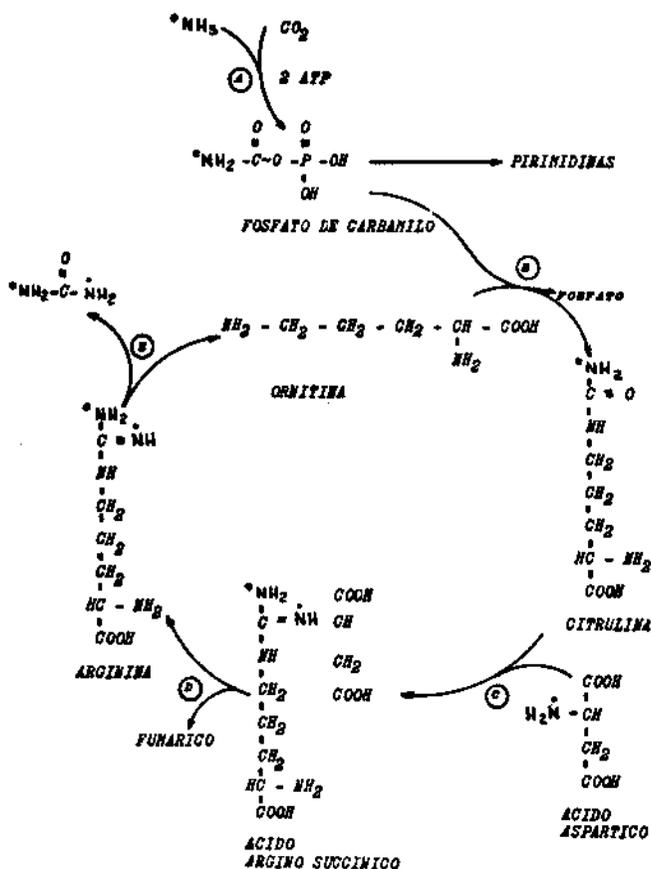


FIG. 2. Ciclo metabólico de la síntesis de la úrea. Indica el nitrógeno de la úrea que proviene del amoniaco y el que tiene su origen en ácido aspártico.

la actualidad el conocimiento de este proceso metabólico es por supuesto más amplio y preciso de como fue concebido por Krebs y Henseleit sigue conociéndose de esta manera. Es más común su designación como ciclo de la urea, lo que en rigor no es muy preciso en el sentido de que la urea no forma parte del ciclo sino que más bien es producto colateral del mismo; es por esto que algunos autores sugieren que mejor se le llame ciclo de la ornitina.

Las reacciones enzimáticas que forman el ciclo de la urea se han esquematizado en la figura 2.

a) Utilización de amoniaco libre y de anhídrido carbónico para la síntesis del fosfato de carbamilo.

El fosfato de carbamilo formado puede seguir dos caminos metabólicos, la síntesis de pirimidinas cuando es transferido al ácido aspártico o la síntesis de la urea de acuerdo con la reacción que se describe a continuación.

b) Transferencia del fosfato de carbamilo a la ornitina para dar citrulina y ácido fosfórico.

c) Adición del ácido aspártico a la citrulina para dar el ácido arginino succínico, que también requiere energía (ATP).

d) Separación del compuesto anterior en arginina y en ácido fumárico.

e) Hidrólisis de la arginina para dar urea y nuevamente ornitina que fue el compuesto que inició el ciclo.

En la figura 2 se puede apreciar cómo uno de los nitrógenos de la urea tiene su origen en la poza metabólica del amoniaco y el otro proviene del ácido aspártico.

Es un hecho conocido que el amoniaco es una sustancia tóxica. Se encuentra en muy baja concentración en los líquidos del organismo y hay poca tolerancia para su elevación, pues con niveles por encima de lo normal aparecen síntomas neurológicos característicos, tanto en el hombre como en el animal de experimentación. Esto implica necesariamente que las vías metabólicas mencionadas con anterioridad que son responsables de la depuración del amoniaco tienen que ser eficientes pues de otro modo si existe perturbación en los mecanismos encargados de fijar o eliminar el amoniaco habrá un aumento en la concentración del metabolito, aunque por otra parte este efecto también podría lograrse si hay un aumento en su producción.

La participación que la intoxicación por amoniaco pueda tener en la etiología del coma hepático ha sido ampliamente discutida. Efectivamente se sabe que muchos enfermos con insuficiencia hepática aguda y crónica presentan hiperamonemia. La causa de esta perturbación no se debe solamente a una incapacidad funcional del órgano que falla en su cometido de fijar amoniaco libre en la síntesis de urea o de glutamina sino también a que se establecen vías colaterales en la corriente sanguínea que pasa a través del hígado de modo que al no haber contacto entre el amoniaco presente en sangre y el hepatocito, el compuesto nitrogenado se sustrae a la acción de las enzimas presentes en la celdilla hepática.

La Dra. Sherlock ha ideado una prueba de tolerancia al amoniaco en la que la dosificación del metabolito se hace en sangre obtenida por cateterismo de las venas suprahepáticas: esta prueba proporciona información en relación a cuál componente está involucrado en la falta de depuración, deficiencia de los mecanismos responsables de la fijación o bien existencia de vías colaterales que hacen que la sangre no se ponga en contacto con la celdilla hepática.

Por lo demás, se ha establecido que el amoniaco en sangre está frecuentemente elevado en el coma hepático, pero no siempre, es decir, hay enfermos que con altos niveles de amonicemia no presentan síntomas neurológicos y otros que están en coma o precoma con concentraciones normales, a mayor abundamiento, trastornos neurológicos similares se han producido mediante la administración

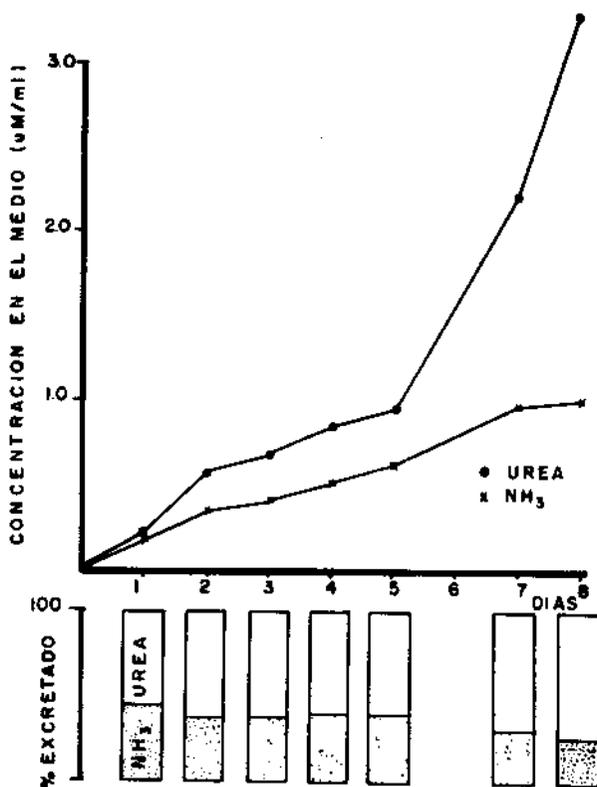


FIG. 3. Excreción de úrea y amoniaco en un ajolote de 64 g. de peso. El animal se colocó en un litro de agua destilada. Las barras indican la cantidad relativa de los compuestos que es excretada, se toma el 100% como la suma de úrea más amoniaco.

de metionina sin que se altere la amonicemia, de modo que se ha invocado que las cifras de amonio circulante pudieran ser más bien un índice de los trastornos neurológicos de la misma manera que la uremia lo es de la insuficiencia renal.

El amoniaco es pues una sustancia tóxica aunque su intervención en el coma hepático es materia de debate.

Las discrepancias señaladas anteriormente pudieran deberse a otros factores. Se ha dicho por ejemplo que hay mejor correlación del estado neurológico con la amonicemia en sangre arterial y también con la captación de amoniaco por

los tejidos, fundamentalmente por el cerebro, determinada por las diferencias en concentración en la sangre arterial y en la sangre venosa; la medida de la concentración de oxígeno en sangre de carótidos y en sangre de yugular también enseña que el consumo de oxígeno está disminuído en sujetos con elevada captación de amoniaco por el encéfalo, se ha sugerido entonces, que el amoniaco se combine con el ácido alfa ceto glutárico (reaminación reductiva, proceso inverso de la deshidrogenasa glutámica, 4 en la figura 1), de modo que lo deriva a otras vías diferentes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos que juega un papel fundamental en las oxidaciones biológicas las que al realizarse proporcionan la energía necesaria para la célula cerebral.

Recientemente se han mencionado otros factores que parecen tener una influencia definitiva en la toxicidad por amoniaco. Warren demostró que la acción tóxica estaba en relación con el tipo de sal de amonio administrada, siendo más nocivas aquéllas que en solución tienden a cambiar el medio hacia el lado alcalino y en efecto, en estos casos se observó modificación del pH sanguíneo. Stabenau, Warren y Rall han demostrado esta influencia del pH de una manera más directa ya que estudiaron la distribución de amoniaco en sangre, líquido céfalo raquídeo, cerebro y músculo en sujetos experimentales en quienes se había inducido acidosis y alcalosis. Encontraron una relación directa entre la difusión de amoniaco en líquido céfalo raquídeo y la magnitud y dirección del gradiente en pH entre sangre y líquido céfalo raquídeo, en la alcalosis metabólica o respiratoria aumenta dos o tres veces la concentración de amoniaco en los tejidos en comparación a los valores encontrados en los sujetos controles, en cambio disminuyó por debajo de éstos en aquellos en quienes se indujo acidosis metabólica o respiratoria.

El efecto observado pudiera deberse al hecho de que en medio alcalino se forma más amoniaco que ion amonio siendo la primera especie la que difunde o bien a un efecto directo de la concentración de iones hidrógeno sobre la barrera sangre-líquido céfalo raquídeo.

Esto implica necesariamente que la acidosis podría ser de efectos benéficos en aquellos enfermos que presentan insuficiencia hepática con hiperamonicemia y trastornos neurológicos.

El conocimiento de los diversos compuestos que participan en las vías metabólicas que fijan amoniaco ha hecho que algunos de ellos hayan sido empleados con éxito para depurar la sangre de elevadas concentraciones de amoniaco; en el hombre se han empleado fundamentalmente arginina, ácido glutámico y la combinación de ambos, el glutamato de arginina.

Ahora bien, si se toma en consideración que el amoniaco es una substancia tóxica, que existe normalmente en concentraciones bajas, que la administración de diversos metabolitos que participan en los sistemas enzimáticos que fijan amoniaco es efectiva para disminuir la hiperamonicemia, se hace necesario el conocer cuál es la importancia relativa de las vías metabólicas enumeradas con anterior-

ridad, en lo que se refiere a su capacidad de transformar amoniaco en compuestos que ya no son tóxicos o que pueden ser eliminados.

A este respecto es muy ilustrativo el trabajo de Duda y Handler quienes administran a ratas amoniaco con N^{15} a fin de determinar en qué productos se fija el isótopo. Sus resultados demuestran que en concentraciones fisiológicas de amoniaco en sangre la síntesis de glutamina es el proceso favorecido ya que la

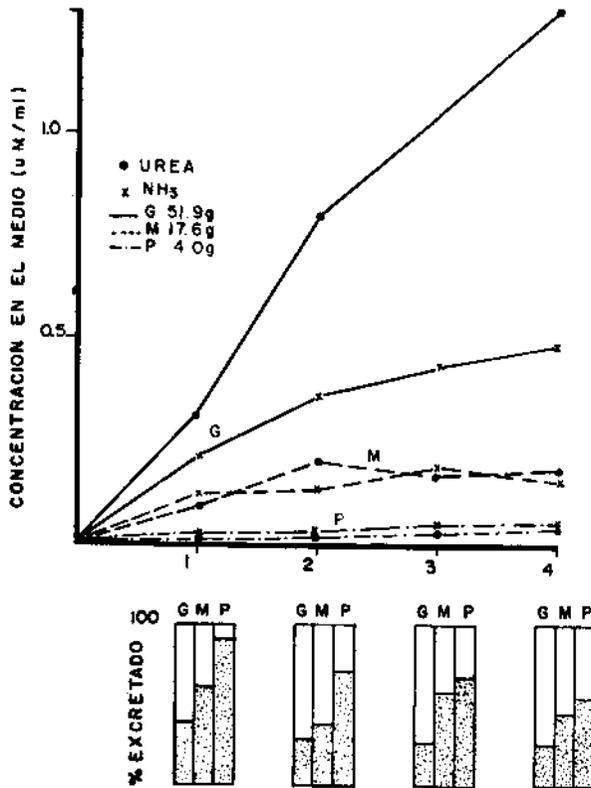


Fig. 4. Variación en la excreción de urea y de amoniaco en relación al peso del ajolote. Los animales grandes (G) y mediano (M) fueron colocados en 1 litro de agua destilada, el pequeño (P) en 100 ml., los valores de este último se presentan como si se hubiera colocado en 1 litro de agua destilada (dividida por 10) para fines de comparación. Las otras indicaciones son las mismas que las de la figura 3.

concentración del nitrógeno pesado es siete veces mayor en glutamina que en urea y ácido glutámico. Observaron también que la administración de amoniaco en cantidades necesarias para producir niveles mayores al experimento o sea hiperamoniemia llegó a saturar el sistema de la síntesis de glutamina; en cambio la síntesis de urea prosiguió en forma ascendente con una ligera disminución en su velocidad.

En el departamento de bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición hemos iniciado la investigación del comportamiento de las enzimas que participan en la síntesis de urea y de la glutamina, la deshidrogenasa glutámica y la glutaminasa en diversas condiciones fisiológicas y patológicas.

En este trabajo queremos presentar solamente, y a manera de información preliminar, algunos hallazgos que nos han parecido de interés concernientes a ciertos aspectos del metabolismo de urea y amoniaco en el ajolote (*Siredon mexicanum*, Shaw), batracio que tiene la peculiaridad biológica de que no alcanza su metamorfosis hasta el estado adulto sino que permanece durante toda su vida como larva y en este estadio se reproduce.

El interés de usar el ajolote como sujeto de experimentación se originó en los hallazgos de Cohen y Brown, quienes demostraron que el renacuajo durante la etapa inicial de su desarrollo es puramente amonotélico o sea que excreta solamente amoniaco y que al llegar a cierto grado de madurez empieza a excretar urea lo que se debe, naturalmente, a que se inicia la actividad de las enzimas correspondientes, lo cual comprobaron experimentalmente.

Este cambio en el patrón metabólico acontece en forma muy rápida, de modo que es extraordinariamente difícil el conocer cuáles son los factores que lo condicionan; en cambio, el ajolote que tiene la característica de que permanece en estado larvario durante varios años, presenta el atractivo de que de existir esta transformación de amonotélico en ureotélico o sea que excreta urea, proporcionaría un sistema biológico muy apropiado para el estudio de diversos factores sobre las enzimas del ciclo de la urea.

Esta sucesión de amonotélico a ureotélico tiene también su contraparte en el mamífero si bien en grado cuantitativo y no cualitativo, efectivamente McCance y colaboradores encontraron que el animal recién nacido (humano, perro y cerdo) excretan proporcionalmente más amoniaco y ácido úrico que urea en relación a lo que se ve en el adulto. Aunque los autores interpretan la observación como debida a que en esa edad el anabolismo predomina sobre el catabolismo se puede también pensar que la síntesis de la urea no está aún completamente desarrollada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ajolotes fueron obtenidos en los canales de Xochimilco, D. F., llevados al laboratorio en donde se dejaron varios días en un recipiente grande de vidrio con agua de la llave a fin de que se adaptaran a las condiciones del nuevo medio ambiente ya que algunos de ellos mueren del primero al tercer día de su captura; fueron alimentados con fragmentos de corazón e hígado de rata que no aceptaron de inmediato.

El peso de los animales fluctuó dentro de ciertos límites, no obstante, ya que como se verá en resultados las diferencias de peso son importantes, se distribu-

yeron los animales de acuerdo con 3 pesos diferentes: grandes, de 55 a 65 g.; medianos, de 16 a 23 g. y pequeños de 3 a 6 g.

Para obtener los patrones de excreción se colocaron los ajolotes en recipientes individuales en un volumen de 1 litro de agua destilada para los grandes y medianos y de 100 ml. para los pequeños.

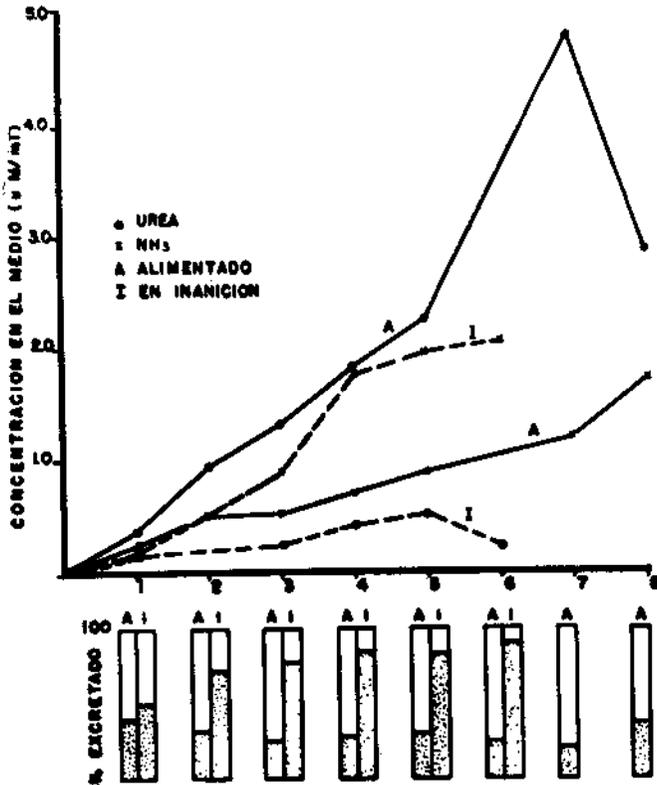


Fig. 5. Variación en la excreción de úrea y amoníaco en el ajolote sometido a inanición durante 28 días. Mismas indicaciones que en la figura 3.

Se determinó urea por el método de la isonitroso-propiofenona y amoníaco con el reactivo de Nessler.

Los animales en los que se hizo determinación de actividad enzimática, fueron sacrificados por decapitación, se extrajo el hígado con rapidez y se separó con cuidado la vesícula biliar, se colocó inmediatamente el hígado en solución de cloruro de potasio isotónico frío para lavarlo y en el cuarto frío se homogeneizó un fragmento ($\frac{3}{4}$ partes) en una solución de bromuro de cetil-trimetil amonio al 0.1% en una proporción de 1 g. de tejido más 9 ml. de líquido de homogeneización; otro fragmento ($\frac{1}{4}$ parte) se homogeneizó en cloruro de potasio isotónico en la misma proporción.

Se usó un homogeneizador de Potter-Elvehjem, las maniobras se efectuaron en el cuarto frío. Los homogeneizados se sometieron en centrifuga refrigerada a 2,000 veces la aceleración de la gravedad para sedimentar los núcleos. Ninguna de las actividades enzimáticas estudiadas disminuyen al separar la fracción nuclear.

Los hígados de los animales pequeños fluctuaron de 60 a 90 mg. de modo que fué necesario homogeneizar cuatro juntos para poder reunir suficiente material para el ensayo de la actividad enzimática.

En el sobrenadante del homogeneizado de bromuro de cetil-trimetil-amonio se determinaron las siguientes enzimas; carbamil fosfato sintetasa; carbamil fosfato ornitina transcarbamilasa, la enzima de adición que forma el arginino succinato y la que lo desdobra se determinaron como una sola actividad llamada arginino-sintetasa, arginasa y deshidrogenasa glutámica. En el sobrenadante del homogeneizado de cloruro de potasio se determinaron glutamina sintetasa y glutaminasa.

Para la carbamil fosfato sintetasa, ornitina y transcarbamilasa arginino sintetasa, glutamina sintetasa y glutaminasa, se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima necesaria para formar una micromola de producto en un minuto; en la arginasa el tiempo considerado es de 30 segundos. Para la deshidrogenasa glutámica se define la unidad como la cantidad de enzima que se requiere para producir un cambio en densidad óptica de 0.001 a 340 $m\mu$ por minuto.

La actividad enzimática se expresa como actividad específica, unidades arbitrarias de actividad por miligramo de proteína. Esta se determinó por el método de Lowry.⁵⁸

Para todas las enzimas, se establecieron las condiciones óptimas de curva de progreso, pH, temperatura, concentración de enzima y de sustrato en los dos homogeneizados descritos.

Se determinó actividad de ureasa en el medio de incubación de algunos ajolotes en un sistema formado por lo siguiente: líquido de incubación, 4.9 ml.; de buffer acetato pH, 6.0; 400 micromolas; urea, 100 micromolas; volumen final, 5.0 ml; tiempo de incubación, 2 horas; temperatura, 37°C. La reacción se detuvo al añadir la mezcla sulfúrico-fosfórico que se usa para la determinación de urea o el reactivo de Nessler requerido para la cuantificación del amoniaco. Muestras "tiempos cero" se obtuvieron al agregar los reactivos mencionados antes de añadir la fuente de enzima.

Todas las determinaciones fueron hechas por duplicado que no discreparon más del 2%.

Además de ajolotes se usaron ratas con fines de comparación. Estas fueron de la cepa Wistar, machos de 150 a 200 g. de peso alimentadas con dieta comercial (Purina Chow). Los métodos seguidos en rata fueron los mismos que se han descrito para el ajolote.

RESULTADOS

Debe hacerse notar que el número de animales estudiados no es lo suficientemente grande para permitir hacer tratamiento estadístico de los datos, de modo que se presentan solamente observaciones individuales que son representativas de las tendencias observadas.

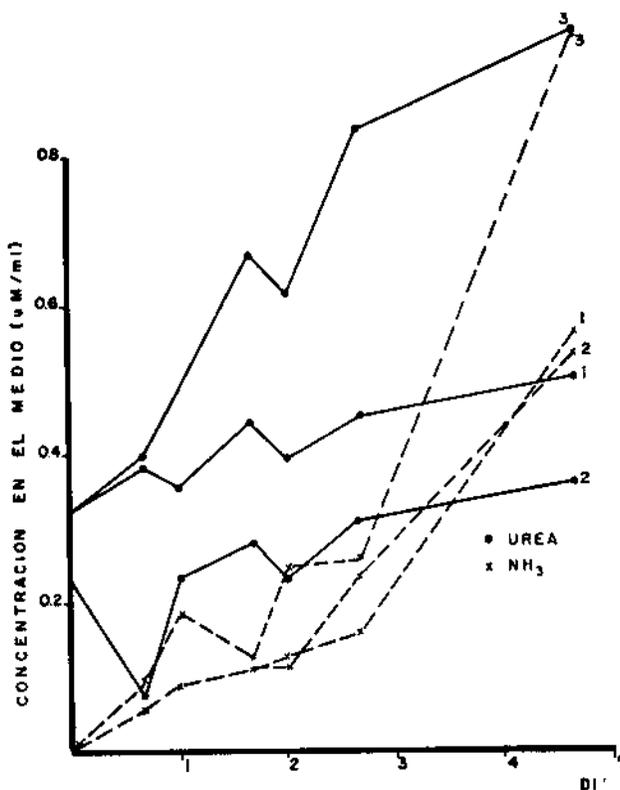


FIG. 6. Excreción de úrea y amoníaco en ajolotes colocados en un medio que contiene úrea desde el principio del experimento.

En la figura 3 se presenta la eliminación de urea y amoníaco observada en un animal de los más grandes que se pudieron capturar (64 g.). Es aparente que el nitrógeno es eliminado en mayor proporción en forma de urea que de amoníaco, lo cual se puede apreciar mejor en la parte inferior de la gráfica que presenta el porcentaje de amoníaco y de urea que se acumulan en el medio de incubación, la urea representa del 55 al 75% de la suma de los dos componentes.

Se estudió entonces el tipo de eliminación nitrogenada de animales más peque-

ños y se corroboró efectivamente, como puede verse en la figura 4 que los animales más pequeños excretan mayor proporción de amoníaco que los adultos. Es necesario aclarar que las curvas de excreción del animal pequeño fueron obtenidas en una concentración diez veces mayor (se colocaron en 100 ml. de agua destilada) pero para poder comparar mejor los valores representados en la proyección se han ajustado como si se hubiera colocado el ajolote en un litro de agua destilada que fué lo que se hizo con los animales, mediano y grande. El

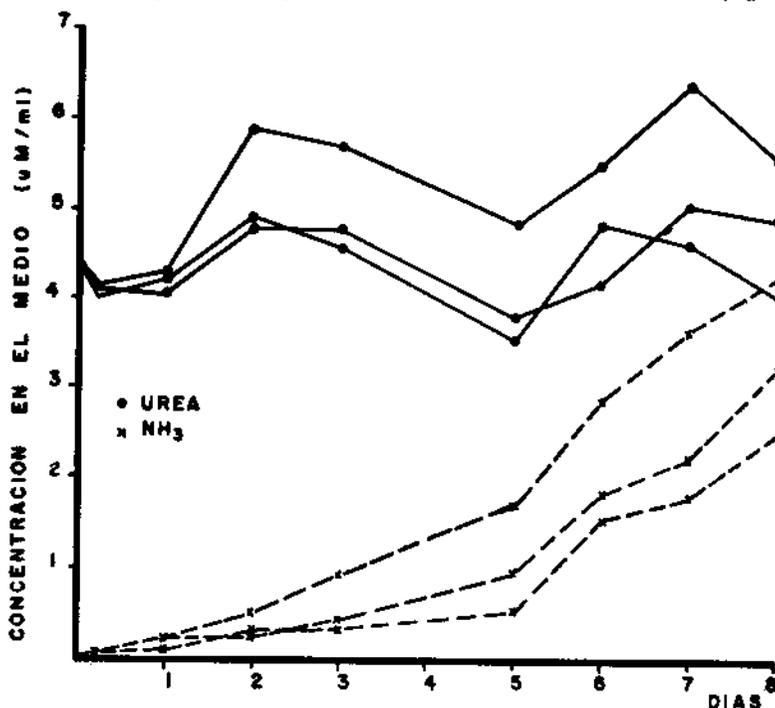


FIG. 7. Excreción de úrea y amoníaco en ajolotes colocados en un medio que contiene úrea desde el principio del experimento. La concentración inicial de este compuesto, es 18 veces mayor que la que se presenta en el experimento de la figura 6.

animal de tamaño mediano excreta del 40 al 60% y el pequeño del 10 al 45% de urea, como en el caso anterior el 100% corresponde a la suma de urea y amoníaco.

La inanición tiene una influencia definida sobre el tipo de excreción nitrogenada. La figura 5 muestra las curvas de eliminación de urea y amoníaco antes y después de un período de 28 días de inanición; las primeras (A) enseñan que se elimina más urea que amoníaco con era de suponerse (60 a 80%), peso del animal 58 g.), en cambio después del período en que no recibió alimento se eliminó amoníaco en mayor proporción (70 a 90%). En esta misma figura aparece otro hecho interesante que repitió con frecuencia en otros experimentos: hay

un descenso marcado con la concentración de urea en el medio del séptimo al octavo día, esto significa necesariamente que la urea es consumida y no solamente que ha cesado de ser excretada; se investigó entonces la presencia de actividad ureásica en el medio por posible contaminación bacteriana y aunque se demostró que efectivamente existe muy discreta actividad, ésta no explicaría de ninguna manera la magnitud del descenso observado y por otra parte cada molécula de urea hidrolizada por la enzima produce dos moléculas de amoníaco, el aumento

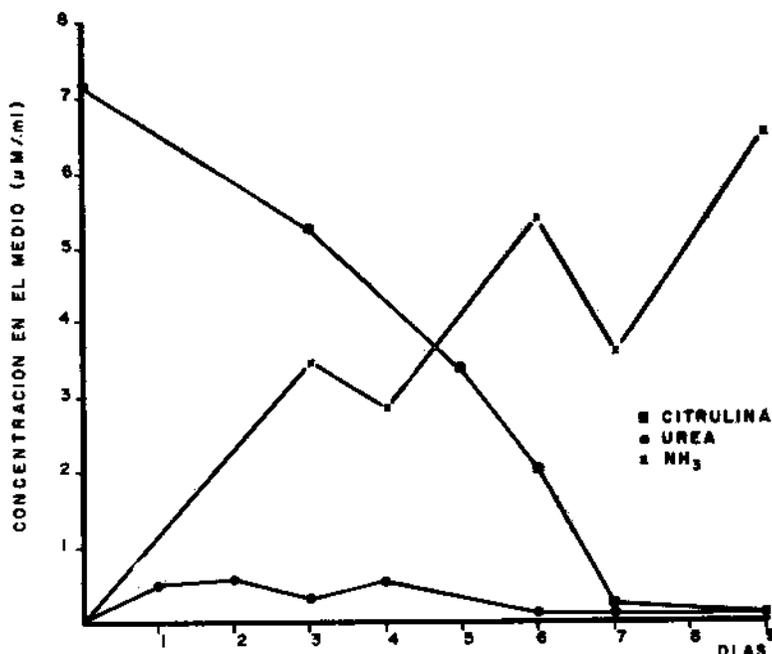


FIG. 8. Excreción de úrea y amoníaco en un ajolote colocado en un medio de incubación que contenía citrulina desde el principio del experimento.

en la concentración de este compuesto tampoco corresponde a la cantidad de urea que fué consumida.

Para comprobar la observación anterior se colocaron los ajolotes en un medio de incubación que contenía urea desde un principio a una concentración similar a aquellas a las que se observó previamente se iniciaba la desaparición del compuesto. La figura 6 muestra el resultado obtenido en tres ajolotes sometidos a las condiciones descritas y se ve que solamente en uno de ellos (el número 3) apareció el descenso inicial que fué importante, en los tres por lo demás existen algunos descensos menos marcados.

Cuando los animales se colocan en un medio con una concentración inicial de urea mucho mayor, dieciocho veces la del experimento anterior, el descenso inmediato apareció desde un principio en los tres y también otros descensos

subsecuentes, como en los casos anteriores la actividad de ureasa encontrada no explicaría la magnitud del descenso ni se observa elevación concomitante del amoníaco (figura 7).

Ya que de acuerdo con lo que se ha mostrado anteriormente, al parecer existe cierta diferencia en los productos nitrogenados que son excretados por el ajolote grande (55-65 g.) y el pequeño (3-6 g.) se decidió explorar la actividad de las vías metabólicas relacionadas en forma principal a la producción o a la fijación de amoníaco, a saber: la deshidrogenasa glutámica, la glutamina sin-

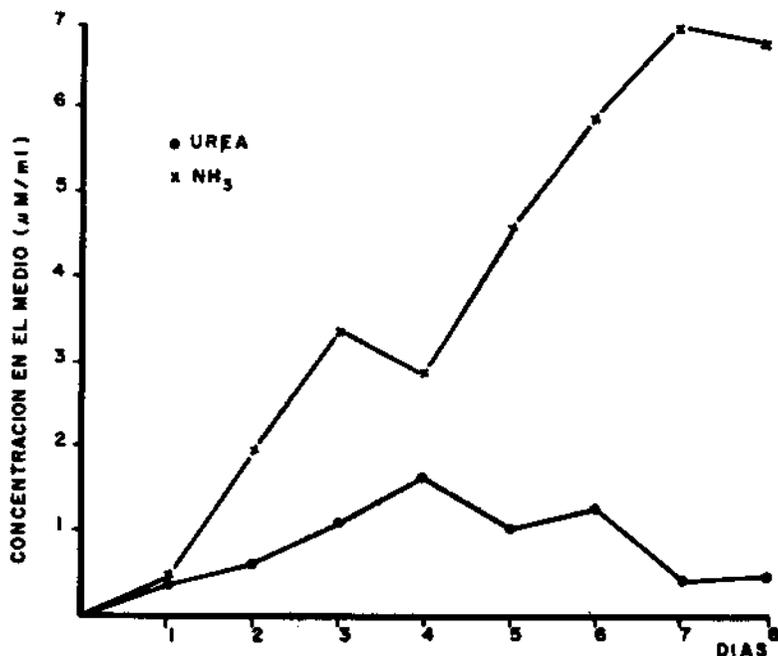


FIG. 9. Excreción de úrea y amoníaco en un ajolote colocado en un medio de incubación que contenía arginina desde el principio del experimento.

tetasa, la glutaminasa y las del ciclo de la urea, carbamil fosfato sintetasa, ornitina transcarbamilasa, arginino sintetasa y arginasa.

Pareció interesante además estudiar estas mismas actividades cuando el ajolote estaba colocado en un medio de incubación que contenía alguno de los metabolitos que ha probado su eficacia en el humano para disminuir la hiperamonemia.

Se escogieron ornitina y citrulina para ser probadas por separado. Fué por demás extraño ver la eliminación de urea, fué menor que la de amoníaco y además que la urea que había sido excretada al medio prácticamente fué consumida. La citrulina también disminuyó rápidamente de concentración y es de pensarse que lo mismo debe haber sucedido con la arginina dato que no se pudo obtener pues desgraciadamente fueron estropeadas las determinaciones. En ambos

casos el medio de incubación se tornó turbio, por contaminación bacteriana y se pudo demostrar una actividad de ureása mucho mayor que en los animales previamente estudiados lo que explica la desaparición de urea y la mayor producción de amoníaco; en lo que se refiere al consumo de citrulina no es posible



FIG. 10. Actividades enzimáticas estudiadas en hígado de ajolote. La ordenada representa la actividad específica (unidades arbitrarias por mg. de proteína). La letra C se usa para designar los animales que fueron colocados en el medio con citrulina, la letra A para los que fueron colocados en arginina; el número que precede la letra indica el número de días que estuvieron sometidos a las condiciones experimentales descritas hasta que fueron sacrificados.

discernir la fracción de la misma que es tomada por el metabolismo del ajolote y la que corresponde al metabolismo de las bacterias contaminantes (figuras 8 y 9). La contaminación existió en cinco experimentos diferentes, pues citrulina y arginina favorecen la proliferación bacteriana.

En la figura 10 se condensan los resultados observados en las actividades

enzimáticas estudiadas. No están incluídas arginino sintetasa, glutamina sintetasa ni glutaminasa por no haberse obtenido ninguna actividad demostrable con los métodos usados. Como se hicieron determinaciones simultáneas con homogeneizado de hígado de rata y con homogeneizado de riñón de rata se excluye la posibilidad de que la falta de actividad observada en los hígados de ajolote pudiera deberse a algún defecto de procedimiento.

Se puede apreciar que el ajolote pequeño tiene una actividad específica de deshidrogenasa glutámica de la misma magnitud que la de los ajolotes grandes, menor actividad de carbamil fosfato sintetasa y aparentemente más elevada de ornitina transcarbamilasa y de arginasa.

En lo que se refiere a la actividad de las enzimas de los animales colocados en medios de citrulina y de arginina respectivamente, al parecer no hay diferencias importantes en deshidrogenasa glutámica y ornitina transcarbamilasa, si acaso parecen estar elevados los valores de la carbamil fosfato sintetasa correspondiente a los animales sacrificados después del cuarto día en el medio con citrulina. La arginasa en cambio muestra una actividad aumentada tanto en los animales colocados 9 días en citrulina como en aquellos que se colocaron 6 días en arginina.

Debe hacerse notar que los ajolotes que se colocaron 9 días en arginina tienen otra vez la actividad inicial, es decir, la de los animales controles.

Es por demás interesante comparar las actividades específicas de las enzimas estudiadas en el ajolote con las que se encuentran en el hígado de la rata (figura 11). Valores semejantes en las dos especies se encuentran en la carbamil fosfato sintetasa y ornitina transcarbamilasa, quizá un poco más bajos en la rata que en el ajolote para la arginasa y para la deshidrogenasa glutámica. En el hígado de la rata se demostró actividad apreciable de arginino sintetasa y de glutamina sintetasa que no fueron encontradas en el ajolote. En ninguno de los dos se encontró glutaminasa.

COMENTARIO

Cabe insistir que por el corto número de determinaciones los resultados presentados no tienen significación estadística y solamente son quizá representativas de tendencias observadas. Aunque no se encontraron en el ajolote las características deseadas de que en una etapa de su vida fuese amonotélico y como tal permaneciera durante largo tiempo para hacerse después ureotélico se obtuvieron algunos datos referentes a la excreción nitrogenada y a las enzimas que participan en el metabolismo de urea y amoniaco que nos ha parecido de interés informar.

Es probable que ajolotes más pequeños que los estudiados (3-6 g., para el grupo pequeño) excretan puramente amoniaco tal como lo hace el renacuajo, sin embargo esta posibilidad no pudo ser comprobada ya que no fué posible obtener animales suficientemente chicos. Por lo demás, de ser este el caso, el

ajolote en todas formas no tiene el atractivo señalado antes de iniciar la investigación ya que el tamaño del hígado sería un factor limitante, en efecto, para poder tener suficiente material de estudio para las enzimas en el grupo pequeño fué necesario homogeneizar juntos los hígados de cuatro animales.

No obstante, se pudo corroborar que en la misma forma que el mamífero recién nacido, el ajolote pequeño excreta proporcionalmente mayor amoníaco

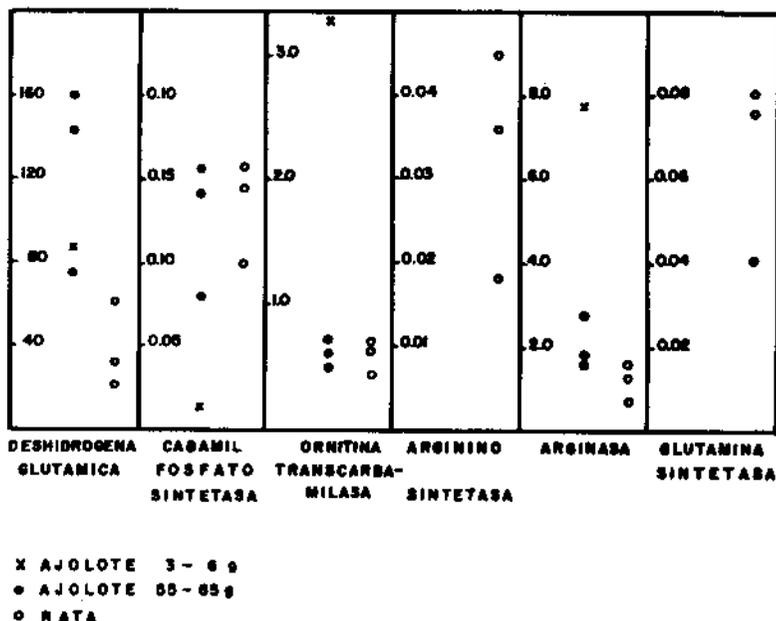


Fig. 11. Comparación de actividades enzimáticas en el hígado del ajolote con las de hígado de rata. La ordenada representa la actividad específica.

que urea. Estos cambios en el patrón de excreción del animal pequeño y del adulto tienen que tener su contraparte en las enzimas que intervienen en las vías metabólicas de urea y de amoníaco, los estudios realizados muestran que el ajolote pequeño tiene una actividad de deshidrogenasa glutámica comparable a la del animal adulto y al parecer más elevada de ornitina transcarbamilasa y de arginasa. En cambio la carbamil fosfato sintetasa está disminuída en el animal pequeño y quizá este hallazgo sea el único que explique la menor producción de urea aunque por otra parte es difícil de aceptar esta situación ya que el producto de esta enzima el fosfato de carbamilo es usado para la síntesis de pirimidinas que está activa en un animal en período de crecimiento es decir en el que el anabolismo predomina sobre el catabolismo.

El hecho de que el ajolote sometido a inanición excreta proporcionalmente mayor cantidad de amoníaco pudiera ser debida en parte a que en estas condiciones se excretan mayor cantidad de productos ácidos.

La arginasa aumentó de actividad tanto en los animales que se colocaron en un medio con arginina como en aquellos que estuvieron en el medio con citrulina, es por demás interesante que el aumento en actividad aparece el 6º día en los primeros y hasta el 9º en los segundos. No se tienen datos respecto a la velocidad a la que es consumida la arginina, la citrulina disminuye rápidamente hasta casi desaparecer al séptimo día, probablemente debido a la baja actividad de arginino sintetasa no se acumulen concentraciones efectivas de arginina que puedan inducir la formación de arginasa; la excreción de urea no es indicadora de la actividad de su síntesis debido a que, como se indicó anteriormente hay gran actividad de ureasa en el medio. En el caso de la arginina la elevación de la arginasa es más temprana por que el inductor se administra en forma directa.

El problema de la inducción de arginasa ha sido estudiado en otras especies animales, se sabe que en la rata aumenta cuando se administra una dieta elevada en proteínas y hay también trabajos que indican que la arginina misma no induce la arginasa en la rata normal. En nuestro laboratorio se ha visto que en ratas sometidas a inanición baja la actividad en las primeras 24 horas y luego asciende nuevamente.

Ya que el amoníaco se utiliza para la síntesis de urea en un sistema multi-enzimático ha parecido interesante comparar las actividades relativas de las enzimas participantes en esta síntesis en el ajolote y en la rata; se encontró que son sorprendentemente comparables las de carbamil fosfato sintetasa, ornitina transcarbamilasa y arginasa pero no se encontró actividad demostrable de arginino sintetasa por el método empleado y sí en la rata. Necesariamente tiene que existir esta acción catalítica si hay síntesis de urea a menos que se invoque que esta substancia es producida por otras vías diferentes que la del ciclo de Krebs Henseleit, posibilidad que ya ha sido señalada por algunos autores.⁶²

Nos parece que es necesario conocer cuál es la actividad de las enzimas que participan en una vía metabólica y la manera en que se modifican en diversas condiciones fisiológicas y patológicas para poder aplicar los recursos a nuestro alcance que pudieran utilizarse para corregir, evitar o disminuir aquellas perturbaciones del metabolismo intermedio que se manifiestan como enfermedad.

REFERENCIAS

- Baldwin, E.: *Introduction to Comparative Biochemistry*. 2nd Ed. Cambridge University Press, London, 1940.
- West, E. S. y Todd, W. R.: *Textbok of biochemistry*. 2nd Ed. p. 1135. The MacMillan Company, New York, 1957.
- H. Theorell, en J. B.: *Summer and K. Myrback, The Enzymes*, Chapter 55, Academic Press, New York, 1951.
- Blanchard, M., Green, D. E., Nocito, V. y Ratner, S.: *Journal of Biological Chemistry*. 161, 583, 1945.
- West, E. S. y Todd, W. R.: *Textbook of Biochemistry*. 2nd edition, p. 1058. The MacMillan Company, New York, 1957.
- Ratner, S., Nocito, V. y Green, D. E.: *Journal of Biological Chemistry*. 152, 119. 1944.
- Olsen, J. A. y Anfinsen. C. B.: *Journal of Biological Chemistry* 202. 841. 1953.

- Melster, A.: *Methods of Enzymology*. Edited by Colowick and Kaplan, Academic Press, p. 381, 1955.
- M. C. Otey, S. M. Birnbaum y J. P. Grenstein.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 49, 245, 1954.
- Orloff, J., Berliner, R. W.: *Journal of Clinical Investigation*.
- Davies, B. M. A. y Yudkin, J.: *Biochemical Journal*. 52, 407, 1952.
- Muntwyler, E., Iacobellis, M. y Griffin, G. E.: *American Journal of Physiology*. 184, 83, 1956.
- Rector, C. F. y Orloff, S.: *Journal of Clinical Investigation*. 38, 366, 1959.
- Fritson, P. y Pihl, A.: *Journal of Biological Chemistry*. 226, 223, 1957.
- Braunstein, A. E.: *Advances in enzymology*. 19, 335, 1957.
- Allison, R. M. y Burris, R. H.: *Journal of Biological Chemistry*. 224, 351, 1957.
- Elliot, W. H.: *Journal of Biological Chemistry*. 201, 661, 1953.
- Buchanan, J. M.: *Journal of Biological Chemistry*. 196, 513, 1952.
- Sonne, J. C.: *Journal of Biological Chemistry*. 220, 369, 1956.
- Wyngaarden, J. B. y Stetten, D., Jr.: *Journal of Biological Chemistry*. 203, 9, 1953.
- Wu, R. y W, W.: *Journal of Biological Chemistry*. 223, 195, 1956.
- Le Page, G. A. y Heidelberger, C.: *Journal of Biological Chemistry*. 188, 593, 1951.
- Sinclair, R. y Leslie, I.: *Biochimica et Biophysica Acta*. 32, 58, 1959.
- Krebs, H. A. y Hensenleit, K.: *Zetschrift Brysiological Chemistry*. 210, 33, 1932.
- Jones, M. E., Spector, R. y Limpan F.: *Journal of The American Chemical Society*. 77, 819, 1955.
- Hall, L. M. y Cohen, P. P.: *Federation Proceedings*. 15, 266, 1956.
- Grisolia, S. y Cohen, P. P.: *Journal of Biological Chemistry*. 204, 753, 1953.
- Knivett, V. A.: *Biochemical Journal*. 53, 480, 1954.
- Lowenstein, J. M. y Cohen P. P.: *Journal of Biological Chemistry*. 220, 57, 1956.
- Reichard, P.: *Acta Chemica Scandinavica*. 11, 523, 1957.
- Ratner, S. y Petrack, B.: *Journal of Biological Chemistry*. 200, 175, 1953.
- Greenberg, D. M., Bagot, A. E. y Roholt, O. A.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 62, 446, 1956.
- McDermott, W. V., Jr. y Admas, R. D.: *Journal of Clinical Investigation*. 33, 1, 1954.
- Eiseman, B., Osofsky, H., Roberts, E. y Jelineck, B.: *Journal of Applied Physiology*. 14, 251, 1959.
- Bessman, S. P. y Bessman, A. N.: *Journal of Clinical Investigation*. 34, 622, 1955.
- Sherlock, S.: *British Medical Bulletin*. 13, 136, 1957.
- Sherlock, S., Summerskill, W. H. J., White, L. P. y Phear, E. A.: *Lancet*. 2, 453, 1954.
- Phear, E. A., Sherlock, S. y Summerskill, W. H. J.: *Lancet*. 1, 836, 1955.
- Phear, E. A., Sherlock, S. Rucbner, B. y Summerskill, W. H. J.: *Clinical Science*. 15, 93, 1956.
- Singh, I. D., Barclay, J. A. y Cooke, W. T.: *Lancet*. 1, 1004, 1954.
- Belkin, A. B. y Conn, O. H.: *The New England Journal of Medicine*. 260, 530, 1959.
- Webster, L. T., Jr. y Gauzda, G. J.: *Journal of Clinical Investigation*. 37, 414, 1956.
- Warren, K. S.: *Journal of Clinical Investigation*. 36, 497, 1958.
- Stabenu, J. R., Warren, K. S. y Rall, D. P.: *Journal of Clinical Investigation*. 38, 373, 1959.
- Du Rvisscau, J. P., Greenstein, J. P., Winitz, M. y Birnbaum, S. M.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 64, 342, 1956.
- Fahey, L. J.: *Journal of Clinical Investigation*. 36, 1647, 1957.
- Webster, L. T., Jr. y Davidson, C. S.: *Journal of Clinical Investigation*. 35, 191, 1956.
- Barragán, R.: Pendiente de publicación.
- Duda, G. D. y Handler, P.: *Journal of Biological Chemistry*. 232, 303, 1958.
- Brown, G. y Cohen, P. P.: Comunicación personal.
- Widdowson, E. M., Dickerson, S. W. T. y McCance, R. A.: *Biochemical Journal*. 69, 421, 1958.
- R. M. Archibald: *Journal of Biological Chemistry*. 157, 507, 1945.
- Puchner, G. W.: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 7, 152, 1935.
- Brown, C.: Comunicación personal.
- Strecker, H. J.: *Methods of Enzymology*. Edited by Colowick and Kaplan. Academic Press, Vol. II. p. 220, 1955.
- Varner, J. E. y Webster, G. C.: *Plant Physiology*. 30, 393, 1955.
- Saber y Williams.: *Arch. Biochem. and Biophys.* 65, 21, 1956.

- Meister, P. A.: *Methods in Enzymology*. Edited by Collock and Kaplan. Vol. II, p. 380, 1955.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. S., Farr, A. L. y Randall, R. J.: *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265, 1951.
- Maldstam, J. y Yudkin: *Biochemical Journal*. 51, 681, 1952.
- Knox, W. E., Averbach, J. H. y Lin, C. C. E.: *Physiological Reviews*. 36, 164, 1956.
- Soberón, G. y Sánchez, Q. E.: Pendiente de publicación. Leído en el VII Congreso Latino Americano de Química. México, Abril de 1959.

ALGUNOS ASPECTOS DEL METABOLISMO DE UREA Y AMONIACO

COMENTARIO AL TRABAJO DEL DR. GUILLERMO SOBERON*

DR. ROBERTO LLAMAS

EN EL TRABAJO que el Dr. Soberón, ha preparado para ingresar a la Academia Nacional de Medicina, se principia por recordar que el amoniaco, la urea y el ácido úrico, constituyen sustancias importantes por ser los productos de eliminación catabólica de proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos. Nos recuerda también que, de acuerdo con su posición en la escala zoológica, los animales se dividen, en relación con estas características metabólicas, en amonotélicos como los invertebrados, uricotélicos como las aves y los reptiles, y ureotélicos como los mamíferos.

Una amplia parte del trabajo se destina a revisar, en forma acuciosa, lo referente a los mecanismos que el organismo de los mamíferos pone en juego para producir y aprovechar el amoniaco, cuerpo que, como señala el autor, no es solamente una substancia de excreción que se elimina por la vía renal, sino que también constituye un compuesto intermedio que interviene en la síntesis de otras substancias de gran importancia metabólica.

Ciertamente la desaminación de los aminoácidos, incluyendo a la glicina y al ácido glutámico, la hidrólisis de la glutamina y la degradación metabólica de las pirimidinas, son fuentes importantes de amoniaco, a las cuales habría que agregar la asparagina, que como es bien sabido, se transforma, mediante la intervención de la asparaginasa, en amoniaco y en ácido aspártico.

Por lo que se refiere a la utilización del amoniaco por el organismo, se mencionan los aspectos más importantes, o sea la síntesis de glutamina y la intervención de ésta en la formación del esqueleto de las purinas, y además, la participación de esa substancia en la síntesis de las pirimidinas, procesos

* Leído en la sesión ordinaria del 29 de julio de 1959.

metabólicos que se efectúan en sentido contrario a los relatados en los mecanismos de producción.

Es evidente que una de las vías metabólicas más importantes seguidas por el amoníaco, es la formación de urea, el principal representante, desde el punto de vista cuantitativo, del nitrógeno no proteico circulante y el principal compuesto de eliminación catabólica de los prótidos.

El Dr. Soberón revisa a continuación las reacciones enzimáticas que constituyen el llamado ciclo de la úrea.

1º Síntesis del fosfato de carbamilo, a expensas del amoníaco libre y del anhídrido carbónico, mediante la intervención del trifosfato de adenosina como donador de fósforo.

2º Transferencia del fosfato de carbamilo a la ornitina con formación de citrulina y de ácido fosfórico.

3º Unión de la citrulina con el ácido aspártico y formación de ácido arginino succínico.

4º Transformación de este ácido en arginina y en ácido fumárico.

5º Hidrólisis de la arginina, con formación de úrea y de ornitina.

El Dr. Soberón menciona después diversos hechos perfectamente establecidos cerca de la toxicidad del amoníaco y de la frecuente elevación de éste en la sangre del paciente en coma hepático; esta circunstancia, de evidente valor clínico, ha despertado el interés para utilizar diversas sustancias capaces de hacer descender las elevaciones anormales de amoníaco en la sangre. Creemos pertinente señalar que la formación de glutámina, como ya lo indicó el Dr. Soberón, es un proceso de la más elevada importancia fisiológica; efectivamente, la cantidad de glutámina en la sangre es considerablemente mayor que la de ácido glutámico, y por la orina no se elimina este ácido, o por lo menos es insignificante dicha eliminación, en cambio la glutámina se excreta en cantidades hasta de 40 mgrs. en 24 hs. En los tejidos normales, incluyendo riñón, hígado y cerebro, la concentración de glutámina es elevada. La combinación del ácido glutámico con el amoníaco para formar glutámina representa, por lo tanto, uno de los más importantes mecanismos para mantener normal el contenido en amoníaco de la sangre y el efecto del glutámato o del ácido glutámico en la prevención de las convulsiones producidas experimentalmente en el perro por el amoníaco, puede deberse a su transformación en glutámina y a la disminución correspondiente del amoníaco en el tejido cerebral. La acción del amoníaco es indiscutible, y además de los factores que parecen explicarla, como la acidosis o la alcalosis, es de recordarse que el aumento de glutámina o sea la disminución de glutámato en la sangre, pudiera privar a los tejidos del trifosfato de adenosina necesario para otras reacciones enzimáticas, o bien interferir con el ciclo del ácido cítrico como se señala en el trabajo de Bessman, citado por el Dr. Soberón.

En la parte experimental se trató de correlacionar la característica amono-

télica de los animales pequeños y la ureotélica de los grandes, con las actividades de las diversas enzimas que intervienen en la síntesis de la úrea y con la deshidrogenasa glutámica, capaz de formar amoniaco a expensas del ácido glutámico con transformación de este ácido alfa-ceto glutámico.

Una circunstancia desfavorable la constituye, efectivamente, el hecho de que los animales pequeños utilizados no eran exclusivamente amonotéticos, sino que también producían úrea; en estas condiciones es de esperarse que la presencia y actividad de las enzimas que intervienen en la producción de amoniaco y en la síntesis de la úrea, tengan solamente diferencias de grado en relación con la vía metabólica predominante. Los resultados de la medición de dichas actividades enzimáticas concuerdan parcialmente con lo lógicamente esperado, efectivamente, la actividad de la deshidrogenasa glutámica (producción de amoniaco) es sensiblemente igual en el animal pequeño, de predominio amonotético, que en el grande, de predominio ureotético. Sin embargo, este hallazgo no impide aceptar que en el animal grande el amoniaco producido, prosiga su transformación metabólica hasta úrea.

En los animales pequeños se encontró disminuída la actividad de la carbamilo fosfato sintetasa, es decir, se forma menor cantidad de fosfato de carbamilo a expensas de amoniaco, anhídrido carbónico y trifosfato de adenosina, y es de aceptarse que si esta reacción inicial del ciclo de la úrea se encuentra comprometida, la síntesis del compuesto será menor, así sea normal la actividad de los sistemas enzimáticos que intervienen posteriormente.

En los animales pequeños se encontró aumento de actividad de la carbamilo fosfato ornitina transcarbamilasa, o sea que existe mayor producción de citrulina. Sorprendentemente no se evidenció actividad arginino sintetasa, que en último término conduce a la formación de arginina y paradójicamente se demostró mayor actividad arginásica en estos mismos animales.

Es difícil interpretar este último hecho, es decir, la no formación de arginina y la existencia de actividad arginásica elevada.

Pero es aún más extraño el no haber encontrado actividad de la arginino-sintetasa en los ajolotes grandes, de predominio ureotético. Es evidente que esto no parece debido a errores de técnica, puesto que con el mismo procedimiento la actividad mencionada pudo ser demostrada en el hígado de rata.

Considero importante una aclaración: la característica amonotética de los ajolotes es mayor en los animales pequeños, pero debe entenderse que este término significa animales de poca edad y con el término animales grandes debe entenderse que se trata de animales de edad mayor, es decir, más evolucionados en su proceso natural de desarrollo; porque puede suceder que los animales de tamaño pequeño sean tan viejos como los animales grandes, dependiendo esto de las diversas condiciones del medio en que se encuentren. Por esta razón, y desde un punto de vista estrictamente experimental, si es que estas dudas que formulo son aceptables, hubiera sido deseable conocer exactamente la edad de

los animales, para lo cual hubiera sido necesario que se reprodujeran en el propio laboratorio.

Para finalizar, quiero comentar el hecho de que la arginasa aumentó la actividad cuando los animales fueron colocados en medio con arginina. Al parecer esto representa un fenómeno adaptativo que se manifiesta después de algún tiempo, al 6º día, pero cabe preguntar si este aumento de actividad no es debido a la arginasa misma o sea al aumento en la concentración del sustrato. Esta objeción no parece importante si se considera que la actividad arginásica no se eleva de inmediato, sino, como ya se ha dicho, hasta el 6º día.

El aumento de la actividad arginásica, cuando el medio se enriquece en citrulina, no es explicable como fenómeno adaptativo y habrá que intentar otra interpretación que por el momento no se puede formular.

He tenido mucho gusto en comentar, así sea brevemente, el interesante trabajo del Dr. Soberón, y me complace en felicitarlo cordialmente por su ingreso a la Academia Nacional de Medicina.