

# **Efecto de la hipervitaminosis D sobre los niveles de ácidos nucleicos y las fosfatasas alcalinas de hígados y riñones de ratas normales y adrenalectomizadas**

GUSTAVO E. RIVERA, LUISA MARÍA RAMÍREZ  
Y JORGE E. MARTENS C.

Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de los Andes.  
Mérída - Venezuela

## **RESUMEN**

Se determinaron los ácidos nucleicos y las fosfatasas alcalinas de hígados y riñones de ratas "Sprague Dawley" de 200 a 300 g, escogidas al azar. En un grupo se produjo hipervitaminosis D, en otro fueron adrenalectomizadas y en un tercero se estudió la acción de ambas variables. Los ácidos nucleicos se obtuvieron por el método de Schneider, colectándose los sobrenadantes con sus componentes solubles en ácido tricloroacético orcinol positivos y las fracciones precipitadas junto a las proteínas. El ácido desoxirribonucleico (ADN) se valoró según Stumpf, el ácido ribonucleico (ARN) mediante la reacción del orcinol y las fosfatasas alcalinas por el método de Bodansky.

De acuerdo a las condiciones experimentales los resultados fueron los siguientes: la hipervitaminosis D provocó un descenso ponderal de los hígados; hubo un incremento de los componentes solubles en tricloroacético, un descenso del ARN y un ascenso del ADN; la relación ARN/ADN disminuyó ligeramente. En los riñones sólo se observó una disminución del peso de los componentes solubles en tricloroacético orcinol positivos. Hubo inhibición de las fosfatasas alcalinas tanto en hígados como en riñones. La adrenalectomía produjo en hígados un descenso del ARN, de los componentes solubles orcinol positivos y de la relación ARN/ADN; las fosfatasas alcalinas mostraron un ligero incremento. Los riñones aumentaron de peso junto a una caída de los componentes solubles y de las fosfatasas alcalinas. En las ratas adrenalectomizadas e hipervitaminósicas se observó descenso

ponderal del hígado, aumento del ARN, de los compuestos solubles en tricloroacético y de la relación ARN/ADN. No se inhibió la actividad de las fosfatasa alcalinas. En Riñones: disminuyó el peso; aumentaron el ARN, los componentes solubles orcinol positivos, el ADN, la relación ARN/ADN y la actividad de las fosfatasa alcalinas.

Estos experimentos sugieren que la concomitancia de la adrenalectomía con la hipervitaminosis provoca un significativo incremento de la actividad metabólica hepática y renal, según lo observado en los cocientes ARN/ADN. Es posible una participación de las suprarrenales en estos efectos. También es factible que la vitamina D favorezca la síntesis de los ácidos nucleicos tanto en hígado como en riñones en las ratas adrenalectomizadas. Se discutieron posibles mecanismos de acción.

## INTRODUCCION

En trabajos de Díaz y cols. (1), Martens y cols. (2), se demostró una inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina (monoester ortofosfóricofosfohidrolasa, E. C. 3.1.3.2) en los homogenatos y en las fracciones nucleares de hígados, riñones e intestinos de ratas con hipervitaminosis D. De Luca y cols. (3) comprobaron "in vitro" que el metabolismo de las mitocondrias aisladas de riñones de ratas se inhiben con la adición de vitamina D, constatándose también por métodos histoquímicos, en cortes de riñones, que las deshidrogenasas con coenzimas NAD y NADP, tales como la diaforasa y la deshidrogenasa isocítrica son inhibidas precozmente. Se observó en otras investigaciones que la aconitasa purificada es inhibida "in vitro" por concentraciones elevadas de ergocalciferol (4). Estas inhibiciones enzimáticas implican una depresión del ciclo de Krebs a nivel del citrato, obteniéndose un incremento de dicho metabolito en los tejidos y líquidos biológicos (5, 6). Estos trabajos sugieren que la inhibición podría obedecer a cambios físico-químicos ocurridos en el medio celular, posiblemente debido a una baja del pH por un aumento del citrato o bien radicar a nivel de los ácidos nucleicos, en un bloqueo del mecanismo de la síntesis de esos enzimas.

Es posible, por otra parte, suponer que exista una influencia de las suprarrenales en la hipervitaminosis D, a través de los glucocorticoides, ya que se ha demostrado que la vitamina se acumula en dicha glándula, según observaciones de Raoul y Gounelle (7), al describir un incremento de la absorción ultravioleta por un material acumulado cuando se administra la vitamina y también un importante aumento del mismo ma-

terial cuando se administra un suplemento vitamínico. Estos hallazgos fueron adicionalmente confirmados (8). Se obtuvieron evidencias adicionales al bloquear las suprarrenales con o-p'-D.D.D. [(2 clorofenil) - 1 - (4 clorofenil), 2, 2 - dicloroetano], demostrándose una inhibición de la absorción del calcio por la vitamina D (9). Posiblemente, los tratamientos prolongados con vitamina D produzcan manifestaciones que obedezcan a una insuficiencia suprarrenal, ya que la hidrocortisona previene la disminución de la actividad de la fosfatasa en hígados y riñones de ratas hipervitaminósicas (10), tal vez por inducción de la síntesis enzimática. En este aspecto López y cols. (11) comprobaron un incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina en homogenatos de hígados y riñones de ratas tratadas con dosis masivas de vitamina D<sub>3</sub>.

Otros trabajos permiten suponer la existencia de un efecto directo sobre el metabolismo de las nucleoproteínas al comprobarse que la ingestión de grandes dosis de ergosterina irradiada provoca la formación de adenomas gástricos en conejos, los cuales pueden invadir toda la mucosa gástrica (12). Seeger (13) demostró también que la vitamina D es un estimulante del crecimiento de las células del carcinoma ascítico de Ehrlich. Además, se ha descrito que la vitamina D<sub>2</sub> provoca una hipertrofia de la musculatura lisa arteriolar en riñones de perros, proporcional a la dosis empleada (14).

En el presente trabajo se investigó el efecto de la hipervitaminosis D sobre los ácidos nucleicos de homogenatos de hígados y riñones de ratas, en comparación con la respuesta de la fosfatasa alcalina, como asimismo el efecto de la vitamina en las ratas adrenalectomizadas para precisar el papel jugado por la glándula en la hipervitaminosis D, en relación a los órganos nombrados.

## MATERIAL Y METODO

Se utilizaron 154 ratas machos Sprague Dawley entre 200 y 300 g de peso, del Bioterio de la Escuela de Medicina de la Universidad de Los Andes, siendo distribuidas en 4 grupos, escogiéndose al azar las componentes de cada uno. Se ubicaron en jaulas apropiadas en lotes de 5 a 6. El grupo A estuvo constituido por 42 ratas, que sirvieron de testigos. Se les inyectó 1 ml de suero fisiológico en días alternos. Fueron some-

tidas a observación durante 1 mes, con alimentación balanceada sintética (Ratarina Protinal, que contiene 43% de glúcidos, 16% de prótidos y 5% de lípidos). La alimentación fue suplementada con vitaminas y minerales. Se les administró agua *ad libitum*. El grupo B, de 52 ratas, fue tratado con inyecciones intraperitoneales de 0.125 mg de Vit. D<sub>3</sub> hidrosoluble Wander, contenida en 1 ml de suero fisiológico, en días alternos durante 1 mes hasta alcanzar una dosis acumulativa de 2 mg (80.000 U.I.). Las ratas del grupo C, en número de 40, fueron adrenalectomizadas por vía dorsal (15) y se mantuvieron en jaulas individuales para evitar el "stress" de grupo durante un lapso similar al de las series anteriores y a la temperatura ambiente. El agua de bebida se reemplazó por una solución de NaCl al 0.9% y glucosa al 4.7% *ad libitum*. La alimentación fue igual a la de los grupos anteriores. El grupo D, constituido por 20 ratas a las cuales se les inyectó por vía extraperitoneal, después de una semana de adrenalectomizadas, 1 ml de vitamina D<sub>3</sub> hidrosoluble en la concentración de 0.125 mg, diluida en suero fisiológico, en días alternos hasta completar 1 mes de tratamiento, o sea 2 mg en total. La bebida y la alimentación fueron similares al grupo anterior.

Las ratas de los distintos grupos se sacrificaron al mes, por decapitación, efectuándose el sangramiento por algunos minutos. Inmediatamente se obtuvieron los hígados y riñones, que fueron lavados en suero fisiológico frío y posteriormente pesados. Los homogenatos se prepararon al 20% con agua destilada fría según la técnica de Potter y Elvehjem (16) y los ácidos nucleicos se obtuvieron por el método de Schneider (17), omitiéndose la etapa de separación de la fracción lípida, ya que no se valoró el fósforo (18). Se conservaron además fracciones sobrenadantes de la precipitación con TCA al 10%, en las cuales se realizó también la reacción del orcinol, por cuanto no dio la reacción de Dische-Stumpf. La determinación cuantitativa del ácido desoxirribonucleico se hizo según la técnica de Stumpf (19), que emplea la reacción de Dische (20) con cisteína y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 70%. En el proceso de extracción de los ácidos nucleicos se prolongó la etapa de hidrólisis a 2 horas, puesto que se demostró que en ese lapso era completa, alcanzándose el máximo de coloración con la reacción de Dische-Stumpf. Lo mismo se hizo con el ADN y ARN altamente polimerizados, que sirvieron para preparar los patro-

nes. En las curvas de calibración se utilizaron ADN SERVA, de bajo peso molecular, obtenido del esperma de arenque, y ARN SERVA, de bajo peso molecular, extraído de levadura, los cuales fueron previamente hidrolizados. La reacción de Dische-Stumpf se leyó en el espectrofotómetro Zeiss PMQ II en 490 m $\mu$ , con una abertura de 0.02 mm. El ARN fue valorado mediante la reacción del orcinol (21) y se leyó en el mismo instrumento en 660 m $\mu$ , con abertura de 0.08 mm. Al efectuarse los cálculos para las concentraciones de ARN se sustrajo como corrección a cada uno de los valores obtenidos 12.5%, por cuanto existe ADN en las fracciones hidrolizadas en TCA que también da positiva la reacción del orcinol en el mismo porcentaje (18). Los resultados se expresaron en mg por 100 g de tejido fresco. También se determinó el cociente ARN pp TCA/ADN, llamado índice de maduración (22, 23, 24), el cual indicaría el grado de actividad metabólica y de mitosis.

Se estimó innecesario referir los resultados a peso seco, por cuanto las diferencias al deshidratar muestras de hígados y riñones de las diversas series experimentales no fueron significativas. Tal vez, la única ventaja hubiese sido evidenciar más las variaciones constatadas.

Se emplearon las siguientes abreviaturas: ARN pp TCA (ácido ribonucleico polimerizado precipitado con ácido tricloroacético al 10% junto con las proteínas. Incluiría al ARN ribosómico, mensajero y nucleolar).

Comp. Sol. en TCA (compuestos solubles en TCA orcinol positivos). Nucleótidos y demás compuestos depolimerizados de bajo peso molecular, solubles en TCA al 10% frío que dan positiva la reacción del orcinol.

TCA (ácido tricloroacético).

Complementariamente se valoró la actividad de la fosfatasa alcalina (monoester ortofosfórico fosfohidrolasa, E. C. 3.1.3.2.) de los homogenatos mediante la técnica de Bodansky (25) y sus resultados se expresaron en mg de fósforo inorgánico liberado por 100 g de tejido fresco.

Se determinaron los errores tipos y la significación estadística entre la diferencia de los promedios por el cálculo t de Student (26-28).

## RESULTADOS

Los efectos de la hipervitaminosis D y de la adrenalectomía más hipervitaminosis D sobre el tenor de ácidos nucleicos de hígados y riñones se muestran en los Cuadros 1 y 2, como asimismo las variaciones ponderales de dichos órganos.

En el Cuadro N<sup>o</sup> 1, correspondiente a hígados, se observó en el grupo que las ratas sometidas a un mes de tratamiento con Vit. D<sub>3</sub> en dosis de 0.125 mg en días alternos variaron significativamente sus pesos, ya que de un promedio de  $14.77 \pm 0.43$  g descendió a  $9.05 \pm 0.39$  g. Respecto a los ácidos nucleicos se comprobó un incremento significativo de los componentes solubles en TCA orcinol positivos, ya que, de  $294.70 \pm 22.49$  mg por 100 g de tejido fresco en los testigos, ascendió a  $397.20 \pm 29.50$  mg. El ARN pp TCA descendió de  $509.50 \pm 18.42$  mg a  $462.95 \pm 10.34$  mg, disminución que es significativa. El ADN, en cambio, se incrementó significativamente a  $533.33 \pm 4.90$  mg por 100 g de tejido fresco. El valor de p fue  $<0.001$ . El índice ARN pp TCA/ADN alcanzó un valor de 0.86 comparado con 1.04 de los testigos, lo que implicaría, en hígado, un descenso de la actividad del metabolismo hepático (22). En el grupo de las ratas adrenalectomizadas (grupo C) no hubo diferencia significativa en cuanto a los pesos; en cambio, descendieron el ARN y los componentes solubles en TCA. Este último disminuyó significativamente de  $294.70 \pm 22.49$  a  $157.62 \pm 11.20$  mg por 100 g de tejido fresco, con un valor de  $p < 0.001$ , mientras que el primero descendió de  $509.50 \pm 18.42$  a  $342.50 \pm 17.02$  mg por 100 g con  $p < 0.001$ . El ADN no experimentó variaciones significativas y el índice de ARN pp TCA/ADN bajó más de 50%, alcanzando un valor de 0.47, lo cual sugiere una importante depresión metabólica. En las ratas adrenalectomizadas tratadas con vitamina D<sub>3</sub> a razón de 0.125 mg en días alternos, hasta completar 1 mes (grupo D), se observó un descenso significativo del peso, similar al encontrado en la hipervitaminosis D aislada. En cambio, el tenor de ARN pp TCA subió a  $695.23 \pm 23.98$  mg por 100 g con un valor de  $p < 0.001$  y el tenor de los componentes solubles en TCA fue de  $290.00 \pm 20.15$  mg. El ADN no experimentó variaciones significativas y el índice de maduración alcanzó un valor de 1.40, lo que correspondería a un incremento de 34.61% sobre la actividad metabólica normal.

CUADRO Nº 1

EFFECTO DE LA HIPERVITAMINOSIS D, ADRENALECTOMIA Y ADRENALECTOMIA MAS HIPERVITAMINOSIS SOBRE LOS ACIDOS NUCLEICOS DE HIGADOS DE RATAS

CONDICION EXPERIMENTAL	Nº ANIMALES	PESO DE HIGADOS g	mg/100 g de tejido fresco			ARN pp TCA/ADN
			Comp.Sol.TCA.	ARN pp TCA	ADN	
A) TESTIGOS (*) 1 mes	42	14.77 ± 0.43	294.70 ± 22.49	509.50 ± 18.42	488.62 ± 5.98	1.04
B) HIPERVITAMINOSIS D 0.125 mg en días alternos 1 mes	52	9.05 ± 0.39 ↓ t = 9.86 p = < 0.001	397.20 ± 29.50 ↑ t = 2.76 p = < 0.02	462.95 ± 10.34 ↓ t = 2.20 p = < 0.05	533.33 ± 4.90 ↑ t = 6.17 p = < 0.001	0.86
C) ADRENALECTOMIAS 1 mes	40	15.40 ± 0.47 t = 0.10 p = < 0.9	157.62 ± 11.20 ↓ t = 5.44 p = < 0.001	342.50 ± 17.02 ↓ t = 6.66 p = < 0.001	474.73 ± 7.10 t = 1.70 p = < 0.15	0.47
D) ADRENALECTOMIAS + HIPERVIT.D 0.125 mg en días alternos 1 mes	20	8.51 ± 0.40 ↓ t = 10.79 p = < 0.001	290.00 ± 20.15 t = 0.82 p = < 0.5	695.23 ± 23.98 ↑ t = 6.14 p = < 0.001	496.35 ± 8.40 t = 0.74 p = < 0.5	1.40

(\*) Los testigos recibieron 1 ml de suero fisiológico en días alternos, intraperitoneal. Los resultados se expresan como medias ± sus errores estándar. "t" indica la diferencia significativa respecto a testigos y "p" la probabilidad según Student. Comp. Sol. TCA: componentes solubles en ácido tricloroacético frío después de precipitar las proteínas y ácidos nucleicos que dan positiva la reacción del orcinol. ARN pp TCA: ácido ribonucleico precipitado por TCA. ADN: ácido desoxirribonucleico.

CUADRO N° 2

CONCENTRACION DE ACIDOS NUCLEICOS DE RIÑONES DE RATAS EN HIPERVITAMINOSIS D,  
ADRENALECTOMIA Y ADRENALECTOMIA MAS HIPERVITAMINOSIS D

CONDICION EXPERIMENTAL	N° ANIMALES	PESO DE RIÑONES g	mg/100 g de tejido fresco			ARN pp TCA/ADN
			COMP.SOL. TCA.	ARN pp TCA	ADN	
A) TESTIGOS 1 mes	42	2.48 ± 0.04	100.50 ± 4.69	226.03 ± 9.98	331.35 ± 4.09	0.68
B) HIPERVITAMINOSIS D 0.125 mg en días al ternos. 1 mes	52	2.16 ± 0.04 ↓ t = 5.66 p = < 0.001	77.79 ± 5.74 ↓ t = 3.06 p = < 0.01	250.28 ± 9.53 t = 1.63 p = < 0.20	336.67 ± 5.06 t = 0.81 p = < 0.5	0.74
C) ADRENALECTOMIAS 1 mes	40	2.89 ± 0.07 ↑ t = 5.12 p = < 0.001	61.19 ± 2.86 ↓ t = 7.16 p = < 0.001	219.45 ± 12.31 t = 0.54 p = < 0.6	322.50 ± 4.61 t = 1.43 p = < 0.2	0.68
D) ADRENALECTOMIA + HIPER VIT. D. 0.125 mg en días alter nos. 1 mes.	20	2.04 ± 0.08 ↓ t = 4.91 p = < 0.001	160.00 ± 4.62 ↑ t = 47.22 p = < 0.001	396.84 ± 31.06 ↑ t = 5.18 p = < 0.001	382.68 ± 6.34 ↑ t = 6.80 p = < 0.001	1.03

Abreviaturas y expresión de resultados similares a Cuadro N° 1.

En el Cuadro N<sup>o</sup> 2 se expresaron las modificaciones ocurridas en los homogenatos de riñones. Se observó en el grupo B que la hipervitaminosis D provocó una disminución significativa del peso y de los componentes solubles en TCA, que descendieron de  $100.50 \pm 4.69$  a  $77.79 \pm 5.74$  mg con un valor de  $p < 0.01$ . Las otras determinaciones no experimentaron cambios significativos. En las ratas adrenalectomizadas, grupo C, se constató un incremento del peso de  $2.48 \pm 0.04$  a  $2.89 \pm 0.07$  siendo  $p < 0.001$ . Los componentes solubles en TCA al 10% descendieron a  $61.19 \pm 2.86$  y el valor de  $p$  fue  $< 0.001$ . No hubo variaciones del ARN pp TCA, del ADN y del índice ARN pp TCA/ADN. En el grupo D, correspondiente a las ratas adrenalectomizadas más hipervitaminosis D<sub>3</sub> se pudo apreciar que los pesos descendieron a  $2.04 \pm 0.08$  g. Los ácidos ARN pp TCA y ADN ascendieron significativamente: el primero a  $396.84 \pm 31.06$  y el segundo a  $382.68 \pm 6.34$  mg por 100 g de tejido fresco, siendo respectivamente los valores normales de  $228.03 \pm 0.98$  y  $331.35 \pm 4.09$  mg; para ambos casos el valor  $p$  fue  $< 0.001$  y el índice de maduración se incrementó a 1.03, o sea 51.47%. Los componentes solubles experimentaron un aumento significativo.

La Fig. 1 muestra las variaciones porcentuales de los ácidos nucleicos en las diversas series, así como los cambios ponderales de hígado y riñones. Da una información de lo que podría considerarse como patrones de efectos en los experimentos realizados. En la hipervitaminosis D (grupo 1) se observaron en hígados y riñones descensos significativos de los pesos  $-38.72\%$  en hígados y  $-12.77\%$  en riñones, referidos a los valores normales. En cambio, las variaciones correspondientes a los ácidos nucleicos son opuestas, ya que en el hígado los componentes solubles en TCA ascendieron  $34.78\%$ , mientras que en riñón disminuyeron  $22.59\%$ . En hígado disminuyó el ARN pp TCA en  $9.13\%$  y en riñón ascendió  $9.75\%$ . El ADN subió en hígado  $9.15\%$  y en riñón  $1.60\%$ . El patrón de variaciones es diferente en lo que respecta a los ácidos nucleicos, sugiriendo que los cambios en la hipervitaminosis D son menos manifiestos en riñón que en hígado. En las ratas adrenalectomizadas (grupo 2) de la Fig. 1 el patrón de variaciones es similar en hígados y en riñones, siendo sus diferencias de tipo cuantitativo, lo que permitiría suponer que su efecto sobre los ácidos nucleicos se realice a través de meca-

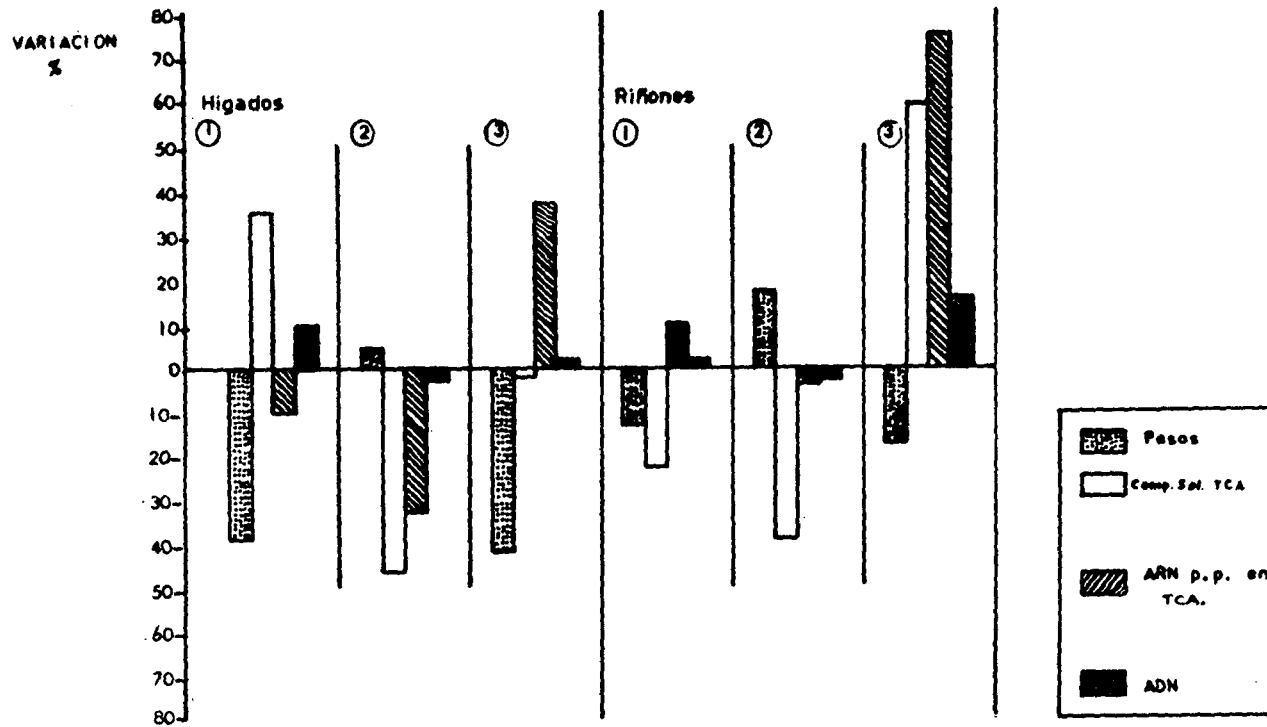


Fig. 1.—Variación porcentual de los pesos y de las concentraciones de los ácidos nucleicos de hígados y riñones de ratas con hipervitaminosis D, adrenalectomizadas y adrenalectomizadas más Vit. D. Los resultados corresponden a valoraciones realizadas (1) al mes de tratamiento con 0.125 mg de Vit. D en días alternos, (2) al mes de la adrenalectomía y (3) al mes de tratamiento con Vit. D<sub>3</sub> de las adrenalectomizadas.

nismos parecidos. En hígados hubo una tendencia, aunque no significativa, al aumento del peso, mientras que en los riñones el incremento fue significativo (16.52%). Los componentes solubles en TCA y el ARN pp TCA descendieron significativamente en el hígado, 46.51% y 32.77%, respectivamente, mientras que en los riñones sólo fue significativa la disminución de los componentes solubles (39.11%). Los ADN variaron en porcentajes de 2.84% en hígado y 2.67% en riñones, que no fueron significativos, como ya se describió. La tendencia general es hacia la disminución de todas las fracciones. Respecto a las ratas adrenalectomizadas hipervitaminósicas (grupo 3), el patrón de variaciones también fue en el mismo sentido: los hígados y riñones acusaron un descenso significativo del peso en 42.38% y 17.61%, respectivamente. Las fracciones ARN pp TCA se incrementaron 36.45% en hígado y 74.02% en riñones, significativamente. Los componentes solubles no variaron en los hígados, mientras que en riñones ascendieron 59.20%. El ADN aumentó en riñones 15.49%.

Las comparaciones de las concentraciones de los ácidos nucleicos y de la actividad de la fosfatasa alcalina en hígados y riñones en la hipervitaminosis D (figuras 2 y 3) coincidió con un patrón diferente en el comportamiento de los ácidos nucleicos: un incremento de los componentes solubles en hígados y una disminución en los homogenatos de riñones; en cambio, el ARN pp TCA descendió en hígado y se incrementó ligeramente en riñones. En relación al ADN se observó solamente un incremento significativo en hígado. En las adrenalectomías, a una disminución del ARN y los componentes solubles correspondió un ascenso de las fosfatasas alcalinas hepáticas, mientras que en los riñones hubo solamente una disminución de los componentes solubles en TCA, coincidente con una depresión significativa de la actividad de la fosfatasa. Finalmente, las ratas adrenalectomizadas tratadas con Vit. D<sub>3</sub> en dosis tóxicas mostraron una prevención de la caída de la actividad de la fosfatasa en hígado, concomitante con un aumento del ARN pp TCA y un importante incremento del índice de maduración (1.40 en contraposición a 1.04 de los testigos). En los riñones, al incremento del ARN pp TCA y del ADN correspondió el mayor ascenso observado en la fosfatasa, coincidente también con un aumento del cociente ARN pp TCA/ADN y de los componentes solubles en TCA.

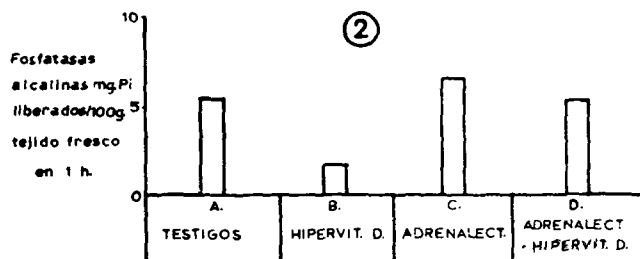
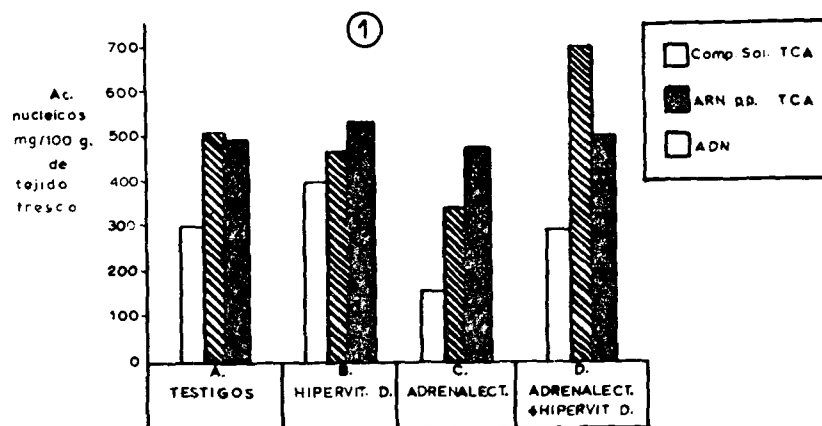


Fig. 2.—Comparación entre las concentraciones de A. nucleicos y las actividades de las fosfatasa alcalinas de hígados de ratas con hipervitaminosis D, adrenalectomizadas y adrenalectomizadas más Vit. D. Los experimentos fueron desarrollados en 1 mes. En B (1) y (2) se produjo la hipervitaminosis D mediante inyección intraperitoneal de 0.125 mg de Vit. D<sub>3</sub> hidrosoluble en días alternos (total 2 mg). En D se inició el tratamiento (0.125 mg en días alternos) después de 1 semana de adrenalectomizadas. Abreviaturas: Comp. Sol. TCA (componentes solubles en TCA Orcinol positivos). ARN p. p. TCA (ácido ribonucleico precipitado por ácido tricloroacético). ADN (ácido desoxirribonucleico).

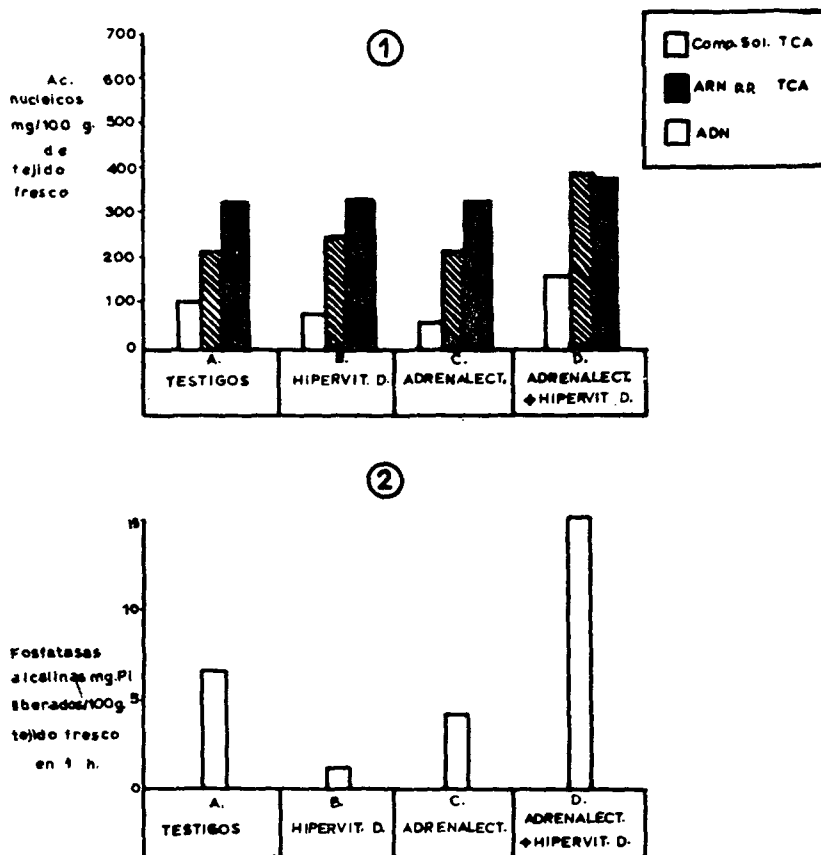


Fig. 3.—Comparación entre las concentraciones de A. nucleicos y las actividades de las fosfatasa alcalinas de riñones de ratas con hipervitaminosis D, adrenalectomizadas y adrenalectomizadas más Vit. D. Los experimentos fueron desarrollados en 1 mes. En B (1) y (2) se produjo la hipervitaminosis D mediante inyección intraperitoneal de 0.125 mg de Vit. D<sub>3</sub> hidrosoluble en días alternos (total 22 mg). En D se inició el tratamiento (0.125 mg por dosis) después de 1 semana de adrenalectomizadas. Abreviaturas: Comp. Sol. TCA (componentes solubles en TCA Orcinol positivos). ARN p. p. TCA (ácido ribonucleico precipitado por ácido tricloroacético). ADN (ácido desoxirribonucleico).

## DISCUSION

La concordancia entre el descenso de la actividad de la fosfatasa renal y hepática en las ratas con hipervitaminosis D con la disminución del ARN pp TCA sugiere una depresión de la utilización de nucleótidos para la síntesis de los ARN involucrados en la biosíntesis proteica.

A pesar de lo postulado por White (29), en estudios "in vitro" y en ausencia de glucosa, de que sustancias con actividad de vitamina D son agentes efectivos en la protección de los lisosomas hepáticos, al igual que el cortisol, creemos que pueda existir un incremento de la actividad de la ribonucleasa ácida, debido a una caída del pH del medio por la acumulación de citrato y aminoácidos, los cuales permeabilizarían los lisosomas, liberando sus enzimas, afectando de esta manera el grado de polimerización del ácido ribonucleico (6, 30). En el efecto observado podría descartarse la acción de los glucocorticoides, ya que éstos estimulan más bien la síntesis del ARN (31, 32, 33, 35, 36). Sin embargo, MacLeod y cols. (37) informaron un aumento de la actividad de la ribonucleasa ácida, bajo la influencia de los corticoides sobre el linfocarcinoma del ratón, lo cual podría interpretarse como síntesis *ex novo* del enzima, antes que su liberación por partículas intracelulares.

No puede desecharse la idea de que el efecto de la vitamina D sobre los ácidos nucleicos sea indirecto, a través de la depresión de las funciones respiratorias mitocondriales (3), implicando una disminución de las reservas de moléculas ricas en energía, indispensables para la síntesis del ARN y las proteínas. Es también factible pensar que la menor ingestión de alimentos en el grupo de ratas con hipervitaminosis D sea otro factor importante en la disminución del ARN, ya que ha sido demostrado por Frayssinet (22) la reducción por ayuno del ARN citoplasmático y nuclear.

Sobre el incremento de los componentes solubles en TCA orcinol positivos de hígados, correspondientes a la fracción sobrenadante después de precipitar las proteínas con ácido TCA frío, no se pudo establecer una hipótesis porque se ignoran sus constituyentes. Sin embargo, el resultado negativo de la reacción de Dische en los mismos excluiría la existencia de nucleótidos provenientes del ADN, lo que hace posible que

el aumento obedezca a una depolimerización del ARN o bien se deba a una disminución en la utilización de nucleótidos para su síntesis, lo cual está por demostrarse, lo mismo que la actividad de la ribonucleasa. En cuanto al comportamiento de la misma fracción en los riñones no podemos agregar nada nuevo, por lo dicho anteriormente. En relación a este último órgano, llamó la atención la aparente refractariedad del contenido de ácidos nucleicos frente a las variaciones de factores que afectan profundamente el metabolismo. En hígado, en base al índice ARN/ADN que está por debajo de lo normal, se puede sugerir, tal como se describe en los experimentos de Frayssinet (22), con ratas en ayuno y en carencia proteica, que existiría una función hepática deprimida cuando el índice está bajo, correspondiendo a una verdadera involución, coincidente con la importante pérdida de peso del órgano. Para el riñón, las modificaciones de los ácidos nucleicos fueron mínimas y el descenso del peso no fue tan pronunciado. Observamos solamente la elevación de la actividad de la fosfatasa alcalina. En hígado, en cambio, en experimentos aún no concluidos, los resultados preliminares demuestran un descenso significativo del glucógeno hepático, que hablaría a favor de la primera suposición. Es posibles, además, postular un agotamiento suprarrenal concomitante, el cual afectaría al órgano produciéndose una depresión de la gluconeogénesis por disminución del aprovechamiento de los aminoácidos, lo cual constituye una base para próximas investigaciones.

En cuanto a las ratas adrenalectomizadas en las que se observó una intensa depresión del ARN hepático con un cociente ARN/ADN de 0.47, se comprobó, sin embargo, un incremento significativo de las fosfatasas alcalinas sobre lo normal. Probablemente este incremento obedezca al efecto descrito por Korner (38), quien explica el estímulo paradójico de la síntesis proteica hepática post-adrenalectomía como debido a un retardo de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos, lo cual implicaría la presencia de grandes cantidades de los mismos, que favorecerían la estabilidad de los microsomas y del ARN mensajero. En este aspecto Ittel y cols. (39) demuestran que en la adrenalectomía hay una mayor incorporación del  $^{32}\text{PO}_4^{-3}$  en la fracción nucleolar y en el ARN del hígado de rata, dando apoyo a lo expuesto anteriormente, aun cuando estas observaciones parecerían contradictorias al te-

nerse en cuenta las numerosas observaciones en el sentido de una mayor biosíntesis del ARN mensajero por los glucocorticoides (39, 40). En los riñones, en cambio, si bien el patrón de variaciones de peso y concentración de ácidos nucleicos es parecido a las fracciones hepáticas, la estabilidad del ARN pp TCA y del ADN correspondió a un notable incremento del peso, junto a una caída de los componentes solubles en TCA; sin embargo, hubo un descenso de la actividad de la fosfatasa, tal como se observa en la Fig. 3.

En los hígados de las ratas adrenalectomizadas más hipervitaminosis D, el patrón de ácidos nucleicos y el índice de maduración sugieren una intensa actividad metabólica, posiblemente con estímulo de la biosíntesis proteica, que impediría la depresión de las fosfatasas alcalinas. En los riñones sucedió algo semejante, ya que se elevó significativamente dicha actividad. Creemos también factible que la hipervitaminosis D haya significado una potenciación del efecto sobre la biosíntesis proteica descrito para la adrenalectomía, en hígado, ya que la hipervitaminosis D induce, tal como fue demostrado por Chiántera y cols. (30), un significativo incremento de los aminoácidos en la sangre y una mayor excreción urinaria, lo que correspondió a un significativo aumento de los ARN y ADN con una elevación del índice de maduración.

Actualmente no se está en condiciones de aportar nuevos datos a la presente discusión. Esperamos que los resultados que se obtengan de los experimentos en marcha, referente a la naturaleza de los componentes solubles en TCA orcinol positivos y a las diferentes actividades de la ribonucleasa y ARN polimerasas contribuyan a aclarar en parte el problema. También tenemos presente que las profundas modificaciones iónicas determinadas por la adrenalectomía y la hipervitaminosis D puedan tener influencia sobre el tenor de ácidos nucleicos y la síntesis proteica, ya que se ha demostrado que el aumento de la fuerza iónica ejerce un efecto estimulante de la biosíntesis del ARN por la ARN polimerasa, Weiss (41).

## SUMMARY

## Effect of hypervitaminosis D on kidney and liver levels of nucleic acids and alkaline phosphatase in normal and adrenalectomized rats

Both nucleic acids and alkaline phosphatase were determined in liver and kidney of Sprague Dawley rats weighing 200 to 300 g each. They were chosen at random from one lot subjected to hypervitaminosis D, and from another group where all rats had been adrenalectomized. In a third lot the effect of both variables was studied.

The N. A. were determined by Schneider's method, where the supernatant containing components soluble in trichloroacetic acid and giving positive orcinol test were collected, and the fractions were coprecipitated with protein. DNA was determined by Stumpf's technique, and RNA by the orcinol reaction. Bodansky's method was used for alkaline phosphatase.

Under the conditions of the experiment the results are as follows: 1) Hypervitaminosis D caused a decrease in liver weight, there was an increase in the soluble components in trichloroacetic acid; a decrease in RNA and an increase in DNA. The RNA/DNA ratio diminished slightly. In kidneys there was observed only a slight decrease in the soluble components, with positive orcinol test. There was some inhibition in the alkaline phosphatase both in liver and in kidneys. 2) Adrenalectomy produced a decrease in RNA in liver, a decrease in the soluble components positive to orcinol, and in the RNA/DNA ratio. The alkaline phosphatase showed a slight increase. The kidneys showed an increment in weight, together with a fall in the soluble components and in alkaline phosphatase. 3) In the adrenalectomized & hypervitaminosis rats there was observed a weight decrease in liver, an increase in RNA, an increase in soluble components and an increase in the RNA/DNA ratio as well. The alkaline phosphatase showed no inhibition. Kidneys diminished in weight, the RNA was increased, the soluble components, orcinol positive, also increased, as well as the DNA and the RNA/DNA ratio; the activity of alkaline phosphatase also increased.

These experiments suggest that both adrenalectomy and hypervitaminosis D give rise to a significant increment in the hepatic and renal metabolic activity, according to the observed RNA/DNA ratio. Participation of the suprarenals in these effects is very possible. It is also feasible that vitamin D enhances the nucleic acids synthesis in liver as well as in kidneys, in adrenalectomized rats. Possible mechanism of action were discussed.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Díaz, H., J. E. Martens, N. López & G. Vivas.—Actividad fosfatásica alcalina en riñones, hígados, plasma y orina de ratas con hipervitaminosis D. AsoVAC, XIV Convención Anual. 1964. No publicado.
- (2) Martens, J. E., N. López, H. Díaz de Paz, R. González & G. Vivas.—Estudio comparativo bio e histoquímico sobre la actividad fosfatásica alcalina en hígado, riñones e intestinos de ratas con hipervitaminosis D. AsoVAC, XV Convención Anual. 1965. No publicado.

- (3) De Luca, H. F. & H. Steenbock.—An “in vitro” effect of vitamin D on citrate oxidation by kidney mitochondria. *Science*, N. Y., 126: 258, 1957.
- (4) Bruchman, E. E.—Action of ergosterol irradiation products on aconitate hydratase (aconitase). *Hoppe Selier's Z. physiol. Chem.* 327: 27-34, 1962.
- (5) Carlsson, A. & G. Hollunger.—The effect of Vitamin D in the citric acid metabolism. *Asta Physiol. Scand.* 31: 317-333, 1954.
- (6) Scarpelli, D. G., G. Tremblay & A.G.E. Pearse.—A comparative cytochemical and cytologic study of vitamin D induced nephrocalcinosis. *Am. J. Path.* 36: 331-363, 1960.
- (7) Raoul, Y. & J. C. Gounelle.—Localization surrénalienne initiale de la vitamine D<sub>3</sub> après injection intraveineuse chez le rat. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris*, 247: 161-163, 1958.
- (8) Quaterman, J.—A reaction of the adrenals to vitamin D. *Biochim. Biophys. Acta*, 97: 128-133, 1965.
- (9) Sallis, J. D. & E. S. Holdsworth.—Calcium metabolism in relation to vitamin D and adrenal function in the chick. *Am. J. Physiol.*, 203: 506-5122, 1962.
- (10) Díaz de Paz, H., N. López, M. Spinetti-Berti & J. E. Martens.—Actividad fosfatásica alcalina y Pi en homogeneizados de hígado y riñones de ratas con hipervitaminosis D, tratadas simultaneamente con hidrocortisona. AsoVAC. XVII Convención Anual. 1967. No publicado.
- (11) López, N., J. E. Martens, H. Díaz de Paz & G. Vivas.—Comportamiento de la actividad fosfatásica en hígado, riñones, plasma y orina de ratas tratadas con hidrocortisona. AsoVAC. XIV Convención Anual. 1964. No publicado.
- (12) Collazo, J. A., B. Varela & P. Rubino.—Tumores en el estómago del conejo en hipervitaminosis D. *Arch. Soc. Biol. Montevideo*, 1: 183-210, 1929.
- (13) Seeger, P. G.—Vergleichende mikrochemische Untersuchungen über den Vitamingehalt von normalen Exsudatzellen und den Tumorzellen des Ehrlichschen Ascitescarcinoms der Maus. *Z. f. mikr. ant. Forsch.* 48: 639-645, 1940.
- (14) Goormaghtigh, N. & H. Handovsky.—Effect of vitamin D<sub>2</sub> (calciferol) on the dog. *Arch. Path.* 26: 1144-1182, 1938.
- (15) Zarrow, M. X., J. M. Jochim & L. J. McCarthy.—“Experimental Endocrinology”. New York. Academic Press. 1964. p. 194.
- (16) Potter, V. R. & C. A. Elvehjem.—A modified method for the study of tissue oxidations. *J. Biol. Chem.* 114: 495-504, 1936
- (17) Schneider, W. C.—Phosphorus compounds in animal tissues. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 161: 293-303, 1945.
- (18) Plaza de los Reyes, M.—Metabolismo de los ácidos nucleicos. Universidad de Chile. Santiago de Chile. Imprenta Universitaria. 1955. p. 28.
- (19) Stumpf, P. K.—A colorimetric method for the determination of desoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 169: 367-371, 1947.

- (20) Dische, Z.—Some new characteristic color tests for thymonucleic acid and a microchemical method for determining the same in animal organs by mean of these tests. *Mikrochemie*, 8: 4-32, 1930. z
- (21) Mejbaum, W.—Estimation of small amounts of pentose especially in derivatives of adenylic acid. *Hoppe Seiler's. Z. physiol. Chem.* 258: 117-120, 1939.
- (22) Frayssinet, C.—In: *Protein Metabolism. Influence of growth hormone, anabolic steroids and nutrition in health and disease.* Berlin. Springer-Verlag. 1962. p. 164.
- (23) Voegtlin, R., P. Metais & M. Conrad.—Des acides nucléiques de la moelle osseuse hematopoiétique. *Presse Medical.* 58: 1349-1351, 1950.
- (24) Bressler, R. & B. Wittels.—The effects of thyroxine on lipid and carbohydrate metabolism in the hearth. 45: 1326-1333, 1966.
- (25) Bodansky, A.—Phosphatase studies; determinations of serum phosphatase. Factors influencing accuracy of determinations. *J. Biol. Chem.*, 101: 93-104, 1933.
- (26) Bradford Hill, A.—“Principios de Estadística Médica”. 2ª edición. Buenos Aires. Editorial El Ateneo. 1958. p. 116.
- (27) De Shelley Hernández, R.—“La Estadística aplicada a las Ciencias Biológicas”. 2ª edición. Caracas. Editorial Grafos, C. A. 1959, p. 308.
- (28) Ruiz, T. & R. Ibáñez.—“Métodos Biológicos de Valoraciones de Medicamentos”. Madrid. Editorial Alhambra, S. A. 1965, p. 511.
- (29) White, A.—In: Weissmann G., L. Thomas. *Effects of corticosteroids. Recent Progress in Hormone Research.* New York. Academic Press. 20: 242, 1964.
- (30) Chiántera, F. & J. E. Martens.—Aminoaciduria en ratas con hipervitaminosis D. AsoVAC. XV Convención Anual. 1965. No publicado.
- (31) Feigelson, M., P. R. Gross & P. Feigelson.—Early effects of cortisone on nucleic acid and protein metabolism on rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 55: 495-504, 1962.
- (32) Wicks, W. D., D. L. Greenman & F. T. Kenney.—Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones. *J. Biol. Chem.*, 240: 4414-4419, 1965.
- (33) Greenman, D. L., W. D. Wicks & F. T. Kenney.—Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones. *J. Biol. Chem.*, 240: 4420-4426, 1965.
- (34) Barnabei, O. & I. Sereni.—Cortisol-induced increased of tyrosine Ketoglutarate transaminase in the isolated perfused rat liver and its relations to ribonucleic acid synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 91: 239-247, 1964.
- (35) Drews, J. & K. Bondy.—Effect of cortisol on nuclear RNA synthesis in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N. Y.)*, 122: 847-850, 1966.
- (36) Kenney, F. T. & F. J. Kull.—Hydrocortisone-stimulated synthesis of nuclear RNA in enzyme induction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 50: 493-499, 1963.
- (37) McLeod, R.—In: Weissmann G., L. Thomas. *Effects of corticosteroids. Recent Progress in Hormone Research.* New York. Academic Press. 20: 244, 1964.
- (38) Korner, A.—In: *Metabolic Effects of Adrenal Hormones.* Ciba Found N° 6. London. Churchill L.T.D. 1960, p. 38.

- (39) Ittel, M. E., M. Wintherith & P. Mandel.—Localisation des synthésis des RNA nucléaires du foie de rat. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 49: 13-23, 1967.
- (40) Lang, N. & C. E. Sekeris.—Zum Wirkungsmechanismus der Hormone. Einfluß von Cortisol auf den Ribonucleinsäure und Protein stoffwechsel in Ratter leber. *Hoppe-Seiler's Z. physio. Chem.* 339: 238-248, 1964.
- (41) Weiss, S. B.—Enzymic incorporation of ribonucleoside triphosphates into the interpolynucleotide linkages of ribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 46: 1020-1030, 1960.