

FACTORES QUE AFECTAN LA APARICION Y DESARROLLO DE LA  
ACTIVIDAD DE LA ACETIL CoA CARBOXILASA HEPATICA:  
CONCENTRACION DE BIOTINA

Elena Ryder\*

RESUMEN

Con el propósito de buscar los factores responsables de la estimulación de la síntesis de la acetil CoA carboxilasa hepática que se observa después del nacimiento, se determinó la concentración de biotina libre en la fracción soluble de homogeneizados de hígado de pollo, durante el período evolutivo. Se encontró que la concentración de biotina decae significativamente con el desarrollo del animal y aunque sigue un curso inverso a la aparición de la actividad de la acetil CoA carboxilasa, no parece tener ningún efecto sobre la síntesis de la proteína enzimática. Si los animales son sobrecargados de biotina después del nacimiento, no muestran ninguna diferencia con los controles, en actividad ni en concentración de enzima, lo que se puso de manifiesto por estudios inmunológicos.

INTRODUCCION

La aparición de la actividad lipogénica observada en el hígado de pollos, una vez que el animal nace, se acompaña de un aumento en la actividad de la acetil CoA carboxilasa (1,17) y de la citrato liasa (9,10). Este incremento se debe, probablemente, a un aumento en la velocidad de síntesis de estas enzimas (12, 18, 20) tal como ha sido demostrado para la enzima málica (19).

---

*Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Venezuela (Subvención S1-0229) y por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia.*

\* Instituto de Investigación Clínica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151, Maracaibo, Venezuela.

Goodridge (11, 13) ha estudiado varios factores que podrían representar estímulos para este aumento de la actividad lipogénica, tales como la concentración de ácidos grasos libres, derivados acil CoA y el alfa-glicero-fosfato, pero solo ha encontrado una relación parcial. Recientemente (14), en hepatocitos aislados, encuentra que la concentración de citrato se puede correlacionar positivamente con la síntesis de los ácidos grasos, a través de la activación de la carboxilasa formada probablemente, en las primeras horas que siguen al nacimiento (18).

En nuestro intento de buscar el ó los estímulos inductores para la síntesis inicial de la apoenzima en el momento del nacimiento del animal, nos encontramos que Birnbaum en 1969 (3) describió un mecanismo que él llamó "represión por coenzima", observado en bacterias tales como el *Lactobacillus plantarum*, las cuales requieren biotina para su crecimiento. Este autor encontró que si se hacían crecer estas bacterias en un medio de cultivo con biotina en exceso, presentaban una menor cantidad de acetil CoA carboxilasa que las que crecían en un medio deficiente en biotina, aunque toda la existente estaba principalmente en forma de holoenzima activa. Más aún, Nimmanit y Lakshmanan, en 1971 (16) reportan haber encontrado un fenómeno similar de represión por biotina, de la acetil CoA carboxilasa de tejido adiposo de rata.

Se tiene conocimiento también de efectos positivos de estimulación de síntesis *de novo* de proteínas, que ejerce la biotina (7, 8).

Sabiendo de la gran concentración de biotina que existe en la yema del huevo (unos 500  $\mu\text{g/g}$  de yema (5), de donde se nutre el embrión, y basados en estos experimentos previos de represión por coenzima, quisimos saber si en el hígado de embriones de pollo existía una elevada concentración de biotina, y si se observaba una variación notable en sus niveles durante el período neonatal, que pudiera involucrar a esta coenzima como responsable de un proceso de inhibición de síntesis de la apoenzima.

## MATERIAL Y METODO

Se usaron huevos embrionados y pollos procedentes de una incubadora de la localidad.

Determinamos la concentración de d(+)-biotina libre en la fracción soluble de hígado de pollo, que resulta después de centrifugar un homogeneizado en buffer fosfato-bicarbonato (4) a 50.000 x g por 90 minutos. Se midió durante el período embrionario, época en la cual no existe prácticamente actividad enzimática; durante el período neonatal,

cuando hace su aparición la apoenzima, aunque no completamente activa (18), y a los 7 días de evolución, cuando la actividad enzimática está en franco ascenso hacia sus máximos niveles.

Para la determinación de biotina se usó el método microbiológico de Wright y Skeggs (21) usando *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) y medio de ensayo comercial de DIFCO Laboratories (Detroit, Michigan, USA).

Para la medida de la actividad enzimática se aplicó el método de incorporación de bicarbonato- $C^{14}$  en malonil CoA (15). Como con el homogeneizado en buffer fosfato bicarbonato no se obtienen velocidades lineales, se prefirió la fracción del citosol que precipita al 25% de saturación con sulfato de amonio, previamente dializada contra buffer fosfato de potasio 0,01 M, pH 7, la que si demostró una buena linearidad.

Las proteínas se determinaron según el método de Lowry (2), usando albúmina bovina cristalina (Calbiochem, California, USA) como standard.

Para la obtención del antisuero específico, se usó como antígeno una preparación enzimática homogénea aislada a partir de hígado de pollos según el método de Gregolin y colaboradores (15). La preparación fue diluída en buffer fosfato de potasio 0,05 M, pH 7 y previa diálisis para eliminar el sulfato de amonio, mezclada con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (DIFCO) hasta que se obtuvo una emulsión espesa. Esta emulsión fue inyectada a conejos, por vía subcutánea, en múltiples sitios. Las inyecciones (0,6 mg de proteína, por vez, por conejo) se repitieron 3 veces con intervalos de una semana. Los conejos se sangraron semanalmente después de la última inyección y los sueros con alto título de anticuerpo fueron conservados a  $-20^{\circ}C$ , usándose sin purificación posterior. Se utilizaron como controles, sueros de conejos no tratados y conservados también a  $-20^{\circ}C$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se practicó la determinación de biotina libre debido a que esta forma sería la más accesible para cualquier efecto inductivo o de represión. Se ha encontrado que son las cifras de biotina libre las que están sometidas a cambios notables según el estado de ingesta vitamínica del animal (8). En las deficiencias de biotina las cifras que más se ven alteradas son los niveles de biotina en las fracciones citosólica y microsomal (6) ya que a nivel del núcleo celular permanecen casi inalterables; además, el 77% de la biotina en los microsomas está en forma libre.

Los resultados indican (Tabla 1) que en embriones, los niveles de biotina son de 32,5 mug/g de tejido fresco. Durante el período neonatal, cuando aún no se han alimentado, bajan a 20,47 mug/g de hígado, lo que representa una caída significativa ( $p < 0,01$ ). A los siete días, las cifras son todavía más bajas, aún cuando el animal está recibiendo una dieta normal, lo que demuestra un curso inverso a la aparición de la actividad enzimática (17) ( $p < 0,05$  en relación al período neonatal y  $p < 0,001$  en relación al período embrionario).

| T A B L A 1   |                                      |                        |                         |                         |
|---|--------------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| CONCENTRACION DE BIOTINA LIBRE EN LA FRACCION SOLUBLE DE HIGADOS DE POLLO |                                      |                        |                         |                         |
|   | Determinaciones<br>(No. de animales) | g<br>hígado            | mg proteína<br>g hígado | mug biotina<br>g hígado |
| Embriones   | 12<br>(52)                           | 0,58<br>( $\pm 0,12$ ) | 57,63<br>( $\pm 22,3$ ) | 32,5<br>( $\pm 11,9$ )  |
| Neonatal*   | 12<br>(26)                           | 0,91<br>( $\pm 0,22$ ) | 51,98<br>( $\pm 15,4$ ) | 20,47<br>( $\pm 5,9$ )  |
| 7 días  | 11<br>(23)                           | 2,32<br>( $\pm 0,68$ ) | 56,56<br>( $\pm 7,7$ )  | 13,84<br>( $\pm 6,1$ )  |

\* 24-48 horas después del nacimiento, en ayunas.

Esto nos indica la existencia de una correlación negativa ( $r = -0,8$ ) entre estos hallazgos y sugiere que la caída de la concentración de biotina, estimularía la síntesis de la apoenzima, o sea que estaríamos en presencia de una derepresión.

En experimentos subsiguientes, quisimos ver si sobrecargando al animal con biotina, tan pronto éste nace, para lograr conservar niveles altos en el hígado y evitar la caída normal, traería como consecuencia una inhibición de la actividad enzimática, por represión de la síntesis de la apoenzima.

Para ello inyectamos 25 ug de d(+)-biotina (Hoffman La Roche, Nutley, N.J.) en cloruro de sodio 0,15 M, por vía intraperitoneal, diariamente durante 7 días, al cabo de los cuales se sacrificaron los animales. El grupo control recibió solamente inyecciones de solución salina. Ambos grupos recibían la misma dieta de Pollarina 2A (Protinal, Maracaibo, Venezuela) y agua ad libitum.

Se encontró que, manteniendo los niveles de biotina altos durante los primeros siete días después de nacido el animal, no se observó ningún cambio en la actividad enzimática en relación a los controles, ya sea expresada por miligramo de proteína o por gramo de tejido fresco (Tabla 2). Si la biotina estaba actuando como un represor, al mantener sus niveles igual a los que se encuentran durante el período embrionario, se esperaba que la actividad enzimática no se incrementara.

| T A B L A 2   |                                      |                 |                          |                  |                   |
|---|--------------------------------------|-----------------|--------------------------|------------------|-------------------|
| ACTIVIDAD DE ACETIL CoA CARBOXILASA EN POLLOS DE 7 DIAS SATURADOS CON BIOTINA DESDE SU NACIMIENTO |                                      |                 |                          |                  |                   |
|   | Determinaciones<br>(No. de animales) | g<br>hígado     | mg proteína.<br>g hígado | mU*<br>mg        | mU<br>g hígado    |
| CONTROL   | 11<br>(23)                           | 2,32<br>(±0,68) | 56,56<br>(±7,7)          | 39,22<br>(±17,2) | 207,78<br>(±73,8) |
| BIOTINA   | 10<br>(19)                           | 2,2<br>(±0,44)  | 48,44<br>(±7,3)          | 38,57<br>(±16,1) | 172,60<br>(±94,9) |

\* mumoles de malonil CoA formados/min/mg de proteína precipitada del citosol a 25% saturación con sulfato de amonio.

Se observó sin embargo, una diferencia significativa en la concentración total de las proteínas precipitables al 25% de saturación con sulfato de amonio, por gramo de tejido hepático. Esto nos llevó a hacer estudios inmunológicos usando suero anti-acetil CoA carboxilasa. Para estos experimentos se usó la fracción soluble obtenida a partir de homogeneizados de hígado en buffer fosfato de potasio 0,1M pH 7, condiciones que revelaron también una buena linearidad en la medida de la actividad enzimática.

Se encontró (Tabla 3) que la cantidad de antisuero requerida para inhibir una misma cantidad de unidades de actividad enzimática es igual en ambos casos, indicando que no sólo la actividad específica es similar sino que la misma cantidad de proteínas precipitable por el anticuerpo se obtiene tanto en los controles como en los animales que están recibiendo las inyecciones de biotina.

Podemos concluir que, aunque la concentración de biotina en el hígado desciende notablemente con el desarrollo y sigue un curso inverso a la aparición de la actividad enzimática, esta coenzima no parece tener una relación directa sobre la síntesis de la proteína enzimática, o sea que el fenómeno de represión por coenzima no parece ser la causa de la escasa actividad enzimática durante el período embrionario.

| T A B L A 3  |  |   |
|--|--|---|
| ACTIVIDAD ENZIMATICA E INHIBICION POR ANTISUERO ESPECIFICO EN HIGADO DE POLLOS DE SIETE DIAS |  |   |
|  | Actividad enzimática<br>(mumoles/min/mg) | Título del antisuero<br>(miliunidades/ul) |
| CONTROL  | 5,02                                     | 1,70                                      |
| BIOTINA<br>(25 ug/día)   | 4,50                                     | 1,73                                      |

Se incubaron alícuotas de fracción soluble obtenida a partir de homogeneizados de hígado en buffer fosfato de potasio 0,1 M, pH 7, que contienen entre 0,3 y 0,4 mU de actividad enzimática, en la mezcla de ensayo (Tris, 60mM;  $Cl_2Mg$ , 8 mM; albúmina bovina, 0,6 mg/ml; glutation, 3 mM; citrato de potasio, 10mM) en presencia de diferentes volúmenes del antisuero específico, por 20 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se midió la actividad residual con la adición de los sustratos ( $KH^{14}CO_3$ , 10 mM,  $1,48 \times 10^5$  cpm/umole; ATP, 1 mM; acetyl CoA, 0,2 mM).

#### AGRADECIMIENTO

Al Dr. M. Daniel Lane y colaboradores de la Escuela de Medicina de la Universidad de Johns Hopkins, Baltimore, USA, por su ayuda en la preparación de la enzima purificada usada en la obtención del antisuero específico. A los técnicos químicos Gilberto Campos y Marco Hernández, por su asistencia técnica. A la Incubadora Vilva, por el generoso suministro de los animales usados en la investigación.

#### Factors affecting the development of acetyl coenzyme A carboxylase in chick liver: biotin concentration.

Ryder E (Instituto de Investigación Clínica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela). Invest Clin 14(3): 98-105, 1973.— Based on previous work on the effect of excess biotin on the presence of acetyl CoA carboxylase in bacteria, and taking into consideration the high concentration of biotin in the yolk, from where the embryo is nourished, we measured the variation of biotin in chick liver during development.

It was found that although there is a notable decrease in free biotin content in chick liver citosol after hatching, following an inverse course to the appearance of acetyl Coenzyme A carboxylase activity, the coenzyme does not play any role on the synthesis of the enzyme protein. Immunological studies reveal that in animals receiving excess biotin after hatching, the quantity of antibody required to inhibit a given amount of enzyme activity is equal to the control animals, indicative that not only

the specific activity is similar, but the same amount of antibody-precipitable protein is obtained in both cases.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ARINZE JC, MISTRY SP: Hepatic acetyl CoA carboxylase, propionyl CoA carboxylase and pyruvate carboxylase activities during embryonic development and growth in chickens. *Proc Soc Expt Biol Med* 135: 553-556, 1970.
- 2- BAILEY LJ: *Techniques in Protein Chemistry*, 2a edición, Elsevier Publishing Co, Amsterdam, 1967 p 340.
- 3- BIRNBAUM J: Coenzyme repression of acetyl CoA carboxylase by (+)-biotin. *Arch Biochem Biophys* 132: 436-441, 1969.
- 4- BRADY RO, GURIN S: Biosynthesis of fatty acids by cell-free or water soluble enzyme systems. *J Biol Chem* 199: 421-431, 1952.
- 5- BREWER LE, EDWARDS Jr HM: Studies on the biotin requirement of broiler breeders. *Poul Sci* 51: 619-624, 1972.
- 6- DAKSHINAMURTI D, MISTRY SP: Tissue and intracellular distribution of biotin C<sup>14</sup>OOH in rats and chicks. *J Biol Chem* 238: 294-296, 1963.
- 7- DAKSHINAMURTI K, CHEAH-TAN C: Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Arch Biochem Biophys* 127: 17-21, 1968.
- 8- DAKSHINAMURTI K, LITVAK S: Biotin and protein synthesis in rat liver. *J Biol Chem* 245: 5600-5605, 1970.
- 9- FELICOLI RA, GABRIELLI F: The citrate cleavage enzyme activity in chick embryo and chicken liver during development. *Experientia* 23: 1000-1001, 1967.
- 10- GOODRIDGE AG: Citrate-cleavage enzyme, 'malic' enzyme and certain dehydrogenases in embryonic and growing chicks. *Biochem J* 108: 663-666, 1968.
- 11- GOODRIDGE AG: Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes prepared from the livers of neonatal chicks. *J Biol Chem* 248: 1924-1931, 1973.

- 12- GOODRIDGE AG: On the relationship between fatty acid synthesis and the total activities of acetyl Coenzyme A carboxylase and fatty acid synthetase in the liver of prenatal and early postnatal chicks. *J Biol Chem* 248: 1932-1936, 1973.
  - 13- GOODRIDGE AG: Regulation of fatty acid synthesis in the liver of prenatal and early postnatal chicks. Hepatic concentrations of individual free fatty acids and other metabolites. *J Biol Chem* 248: 1939-1945, 1973.
  - 14- GOODRIDGE AG: Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes. Evidence for a physiological role for long chain fatty acyl Coenzyme A and citrate. *J Biol Chem* 248: 4318-4326, 1973.
  - 15- GREGOLIN C, RYDER E, LANE MD: Liver acetyl Coenzyme A carboxylase. I. Isolation and catalytic properties. *J Biol Chem* 243: 4227-4235, 1968.
  - 16- NIMMANNIT S, LAKSHMANAN MR: Control of acetyl CoA carboxylase by biotin in rat liver and epididymal adipose tissue. *Biochem Biophys Res Comm* 44: 1162-1168, 1971.
  - 17- RYDER E: Effect of development on chicken liver acetyl Coenzyme A carboxylase. *Biochem J* 119: 929-930, 1970.
  - 18- RYDER E: The presence of acetyl-Coenzyme A carboxylase apoenzyme in the liver of newly hatched chicks: *Biochem J* 128: 183-185, 1972.
  - 19- SILPANANTA P, GOODRIDGE AG: Synthesis and degradation of malic enzyme in chick liver. *J Biol Chem* 246: 5754-5761, 1971.
  - 20- VOLPE JJ, VAGELOS PR: Saturated fatty acid biosynthesis and its regulation. *Ann Rev Biochem* 42: 21-60, 1973.
  - 21- WRIGHT L, SKEGGS H: Determination of biotin with *L arabinosus*. *Proc Soc Expt Biol Med* 56:95, 1944.
-