

ESTUDI COMPARATIU DE L'AMINOGRAMA PLASMÀTIC EN RATES TRACTADES A TEMPS CURTS I PROLONGATS AMB SULFONILUREES

Comunicació presentada el dia 31 de gener de 1978
a les I Jornades d'Endocrinologia de la S.C.B.

per

ANDREU PALOU,* MARIA ÀLEMANY * i EMILIO HERRERA

Càtedra de Fisiologia General, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Treball realitzat en part, mitjançant una subvenció
de la «Comisión Asesora para la Investigación Científica y Técnica»
de la Presidència del Govern

INTRODUCCIÓ

Els materials que afecten l'alliberament d'insulina també afecten els nivells d'aminoàcids, així la ingestió d'aliments glucídics abaixa els nivells d'aminoàcids circulants al plasma^{7, 16, 21} a causa d'una major utilització de la glucosa¹ o també a canvis induïts per la càrrega glucídica als nivells circulants d'insulina¹⁹. Tant en humans com en animals experimentals, l'administració d'insulina exògena comporta una reducció en els nivells d'aminoàcids plasmàtics^{5, 16, 17}; l'efecte és menys marcat en els aminoàcids no essencials.

La majoria d'estudis amb sulfonilurees s'han enfocat preferentment a observar els efectes aguts de llur administració, mentre els efectes crònics no han estat gaire estudiats, tot i que aquesta situació és més pròxima a la que es troba als humans en els quals s'utilitzen les sulfonilurees de manera terapèutica. La qüestió és més interessant, car s'han observat variacions en la resposta a les sulfonilurees sota diverses situacions experimentals, com la reducció del efecte insulino tròpic d'aquestes drogues en el dejuni^{10, 11}, efecte que no ha estat sempre observat²³; i tam-

* Adreça actual: Càtedra de Bioquímica, Facultat de Ciències, Universitat de la Ciutat de Mallorca.

bé, que els efectes insulinoatròpic i hipoglucèmic de les sulfonilurees es redueixen considerablement després d'un tractament perllongat^{6, 25}, mentre els efectes de les sulfonilurees administrades crònicament sobre els nivells individuals d'aminoàcids plasmàtics no havien estat estudiats.

En aquest treball, s'han estudiat la tolbutamida, una sulfonilurea típica, i la glibenclamida i la glipentida, dues sulfonilurees d'efecte hipoglucèmic molt potent, de les anomenades de la segona generació¹⁸; observant llur efecte sobre els nivells plasmàtics d'aminoàcids de la rata, a temps diferents de tractament.

MATERIALS I MÈTODES

S'utilitzaren rates femelles verges, de la soca Wistar, amb un pes mitjà en començar el tractament de 140 a 150 g. Els animals foren alimentats amb pinso de rata i aigua corrent; visqueren en gàbies metabòliques metàl·liques individuals dins d'una sala d'animals amb temperatura (23 ± 2 °C) controlada, i un cicle d'il·luminació de 12 hores de llum i 12 de fosc.

Les drogues s'administraren durant 27 dies dos cops cada dia: a la mitja hora i a les vuit hores del començament del cicle de llum, respectivament. Les drogues foren administrades en tots els casos mitjançant una sonda gàstrica de plàstic; eren suspeses en carboximetilcel·lulosa al 0,5 % contenint un 0,15 % del detergent Tween 80, a les concentracions següents: 100 mg/kg de pes corporal per a la tolbutamida i 5 mg/kg de pes corporal per a la glibenclamida i la glipentida. Aquestes dosis, administrades en tractament agut, produeixen un mateix efecte hipoglucèmic¹⁵.

S'obtingueren mostres de sang els dies 0, 3 i 27 del tractament. Les mostres s'obtenien fent sangrar els animals des de la punta de la cua, cada dia abans de la primera administració quotidiana de la droga, tot just començant el cicle de llum. La sang era recollida en plaques excavades de porcellana heparinitzades. Els plasmes van ser separats per centrifugació, i petites mostres van ser desproteïnitzades amb acetona freda en tubs capil·lars². Els aminoàcids individuals a les mostres van ser derivats amb densil-clorur C¹⁴ (clorur de 1-dimetilamino-5-sulfonil-naftalè), cromatografiats en plaques de poliamida i quantificats per contacte de la radioactivitat³.

L'agrupament dels aminoàcids es va fer d'acord amb llurs propietats fisiològiques i estructurals²². Al grup d'aminoàcids gluconeogenètics pertanyen l'alanina, el glutamat+glutamina, l'aspartat+asparagina, la glicina, la serina i la treonina; al d'iminoàcids pertanyen la prolina i la hi-

droxiprolina; al dels aminoàcids de cadena ramificada pertanyen la valina i la leucina+isoleucina; al grup d'aminoàcids bàsics pertanyen la histidina, l'arginina, la citrullina i la lisina; al grup de sulfurats: la taurina, la cisteïna i la metionina+ornitina (tot i que l'ornitina és un aminoàcid bàsic, però la separació cromatogràfica no és prou resolutive); finalment, al grup d'aminoàcids aromàtics pertanyen la tirosina, la fenilalanina i el triptòfan.

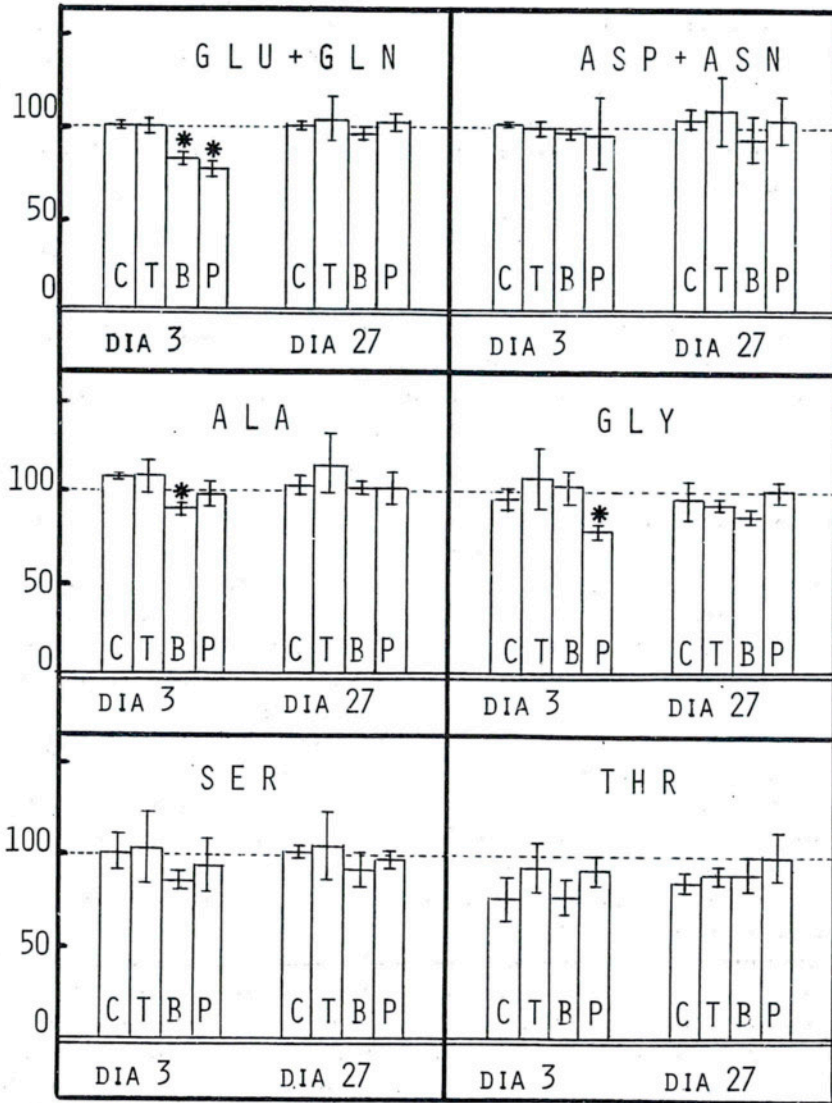
RESULTATS

En el gràfic 1 hom pot veure els resultats comparats entre els nivells individuals dels aminoàcids gluconeogenètics en rates sotmeses a una administració perllongada de sulfonilurees, obtinguts als dies 3 i 27 del tractament. Pot observar-se que els nivells de glutamat+glutamina al dia 3 de tractament en les rates tractades tant amb glibenclamida (B) com amb glipentida (P) són significativament més baixos que no els controls corresponents, tractats només amb el medi de dilució de les drogues. No s'observa aquest efecte en les rates tractades amb tolbutamida (T). Als 27 dies ja no s'observa cap mena de diferència entre les rates tractades amb sulfonilurees i llurs controls. La situació en l'aspartat+asparagina és diferent, ja que aquí no s'observa cap diferència entre els grups, ni tampoc respecte dels valors inicials. El mateix pot aplicar-se als valors de treonina i fins i tot als de serina, tot i que sembla que els animals tractats amb glibenclamida mostren una tendència, manifesta significativament en el cas de l'alanina, a repetir la troballa, observada al glutamat+glutamina al dia 3 de tractament amb glibenclamida. La glicina no mostra aquest efecte, però sí hi ha un descens significatiu al dia 3 en els animals tractats amb glipentida.

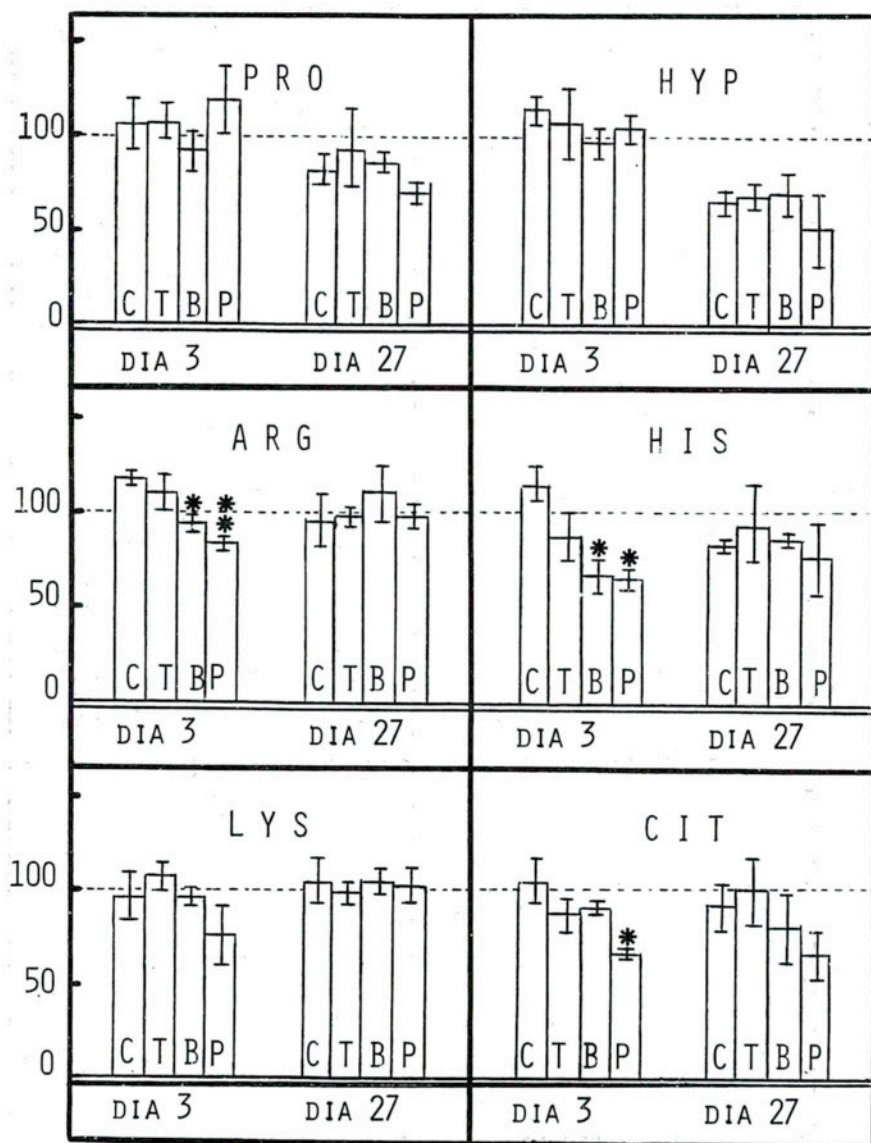
En tots els casos s'ha observat que al dia 27 dels diversos tractaments s'han anul·lat totes les diferències trobades el dia 3.

Al gràfic 2 es presenten les dades corresponents als iminoàcids i als aminoàcids bàsics. Ací s'aprecia que tant en la prolina com en l'hidroxi-prolina no s'observen diferències envers els controls corresponents, tot i que al dia 27 hom pot veure una forta baixada en les concentracions en tots els grups, àdhuc als controls, tant de prolina com d'hidroxi-prolina, respecte els valors inicials, sent més marcat l'efecte sobre l'hidroxi-prolina.

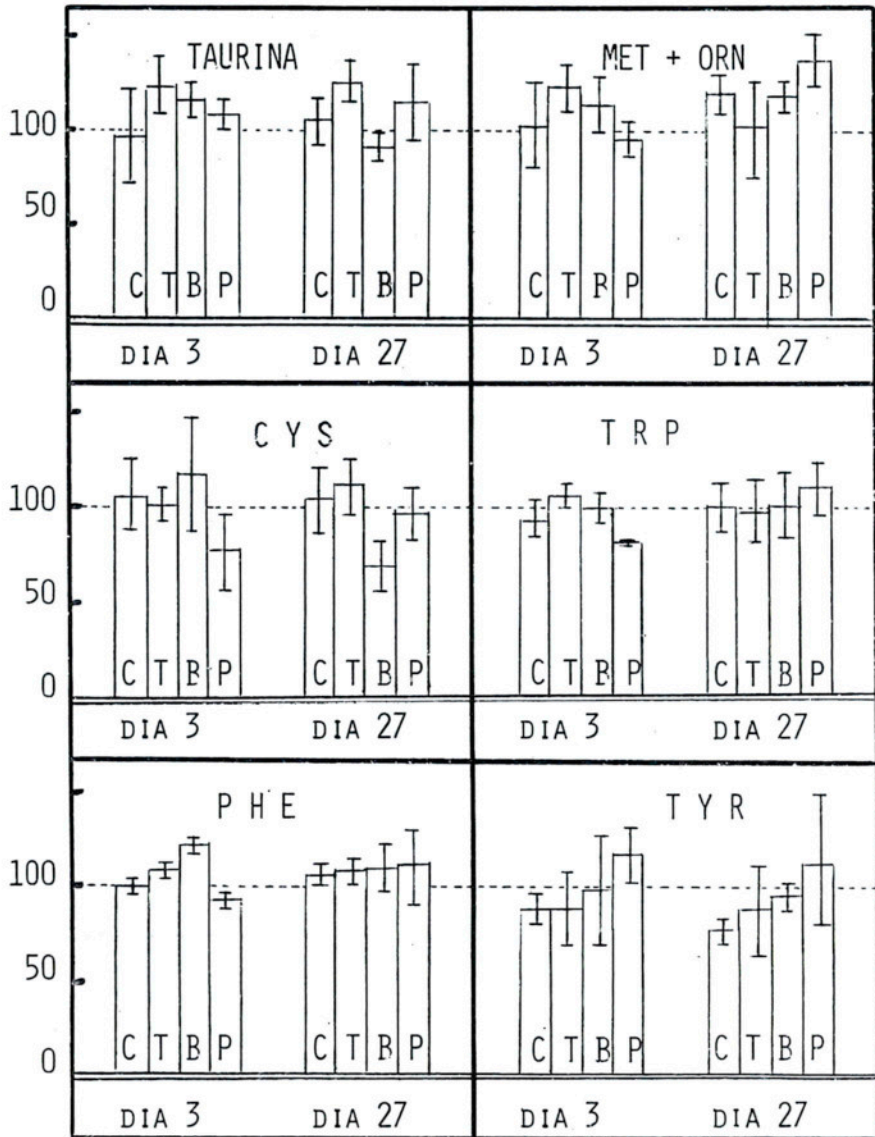
Dels aminoàcids bàsics cal remarcar l'efecte de la glipentida sobre els nivells, als 3 dies, de tots els aminoàcids d'aquest grup, sent la baixada significativa per l'arginina, l'histidina i la citrullina. El mateix pot dir-se de la glibenclamida, que dona lloc a diferències significatives envers els controls tant per a l'arginina com per a la histidina. Aquestes diferències



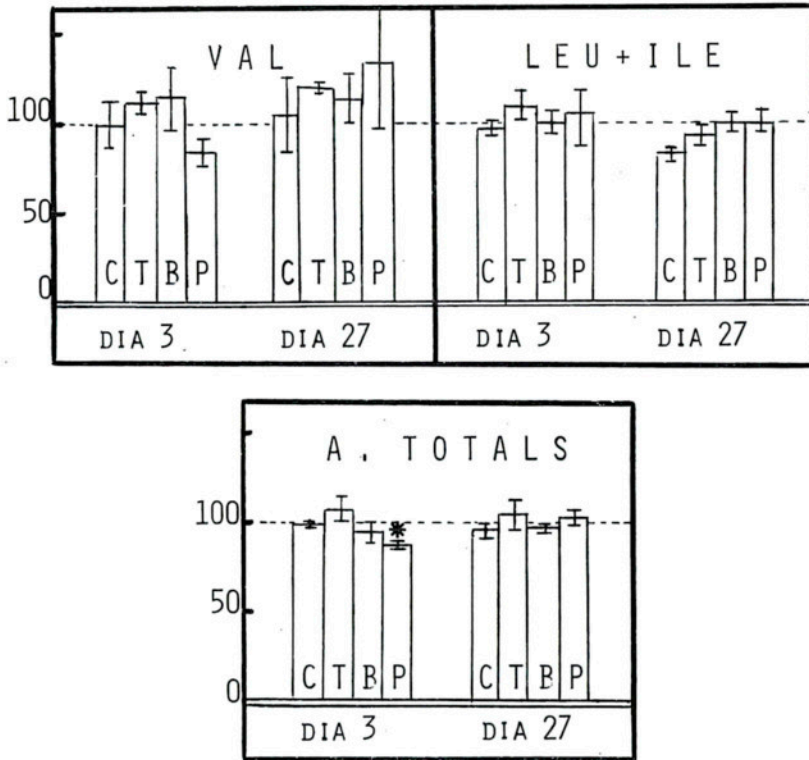
GRÀFIC 1.— Nivells individuals d'aminoàcids gluconeogenètics al plasma de rates tractades amb tolbutamida (T), glibenclamida (B) o glipentida (P) i als controls (C), els dies 3 i 27 del tractament. Les concentracions dels aminoàcids són expressades en percentatges de les dades obtingudes en els animals a l'inici del tractament, moments abans de l'administració de la primera dosi de droga (línia de punts). Les dades són mitjana \pm e.t. de 3-7 animals *= $p < 0,05$ envers C; **= $p < 0,01$ envers C. Els controls reben el medi sense droga. Aquests animals eren estudiats al mateix temps i en les mateixes condicions que les rates tractades.



GRÀFIC 2.— Nivells individuals d'iminoàcids i aminoàcids bàsics al plasma de rates tractades amb sulfonilurees i controls. Els signes convencionals són els mateixos que els del gràfic 1.



GRÀFIC 3. — Nivells individuals dels aminoàcids aromàtics i sulfurats al plasma de rates tractades amb sulfonilurees i controls. Els signes convencionals són els mateixos que els del gràfic 1.

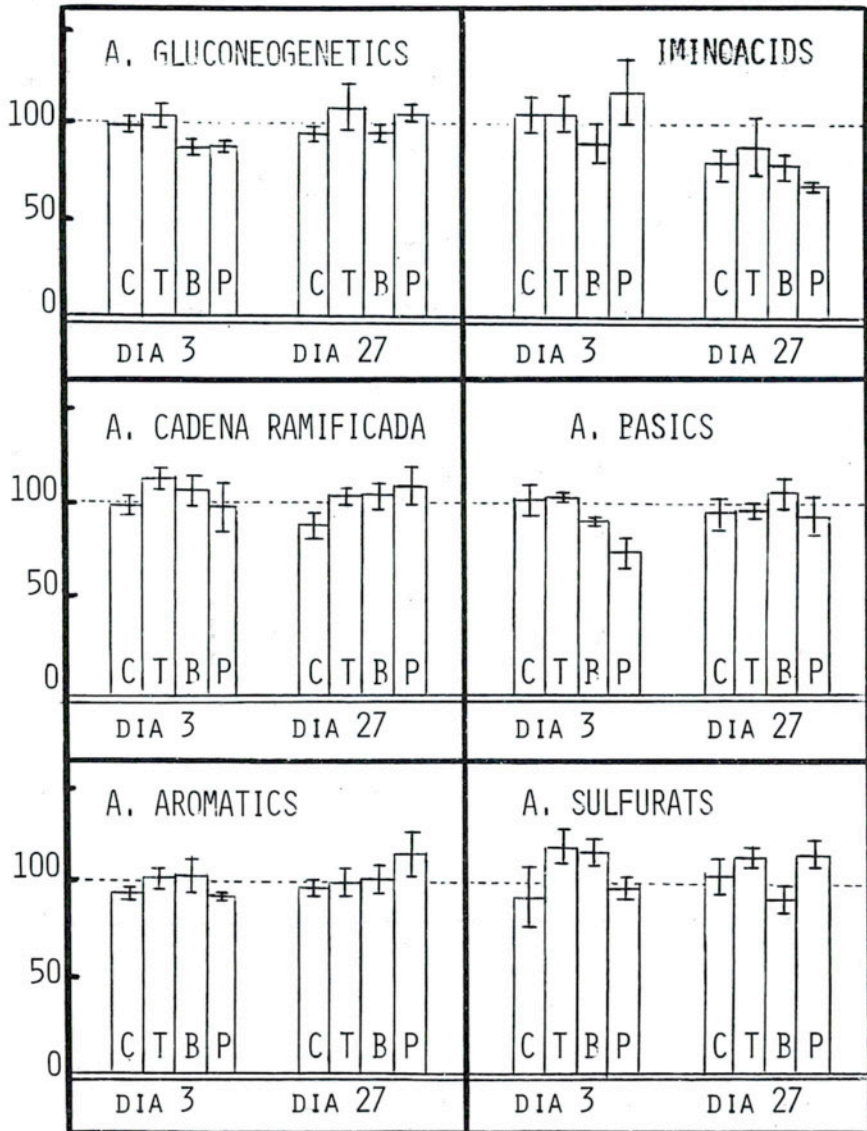


GRÀFIC 4.— Nivells individuals dels aminoàcids de cadena ramificada i aminoàcids totals, al plasma de rates tractades amb sulfonilurees i controls. Els signes convencionals són els mateixos que els del gràfic 1.

han desaparegut pràcticament als 27 dies de tractament, i s'ha observat només una certa desviació d'aquesta tendència en el cas de la citrullina, tot i que les diferències no són significatives.

Al gràfic 3 hom pot veure els valors corresponents als aminoàcids sulfurats i aromàtics. A primer cop d'ull no s'observen en cap cas diferències significatives en cap grup envers els controls, apreciand-se sols una lleugera tendència a donar valors més baixos de fenilalanina, cisteïna i triptòfan al dia 3 a les rates tractades amb glipentida.

Al gràfic 4 s'observen els valors obtinguts pels aminoàcids de cadena ramificada, així com pel valor combinat total de concentració d'aminoàcids plasmàtics. En el cas dels aminoàcids de cadena ramificada no s'observen diferències significatives, tot i que al dia 3 la concentració de valina als animals tractats amb glipentida sembla que mostri una certa



GRÀFIC 5.— Nivells de grups d'aminoàcids al plasma de rates tractades amb sulfonil-urees i controls. Els signes convencionals són els mateixos que els del gràfic 1.

tendència a donar valors més baixos. Aquesta tendència es manifesta significativa en el cas dels aminoàcids totals, com a conseqüència de la combinació de les tendències ja esmentades dels aminoàcids individuals.

Finalment, al gràfic 5 es presenta un resum dels valors combinats dels grups d'aminoàcids. No s'observen diferències estadísticament fermes, encara que en el cas dels aminoàcids gluconeogenètics hom pot observar una reducció dels nivells al dia 3, tant per efecte de la glibenclamida com de la glipentida, diferència que queda anul·lada al dia 27 del tractament. La mateixa cosa pot dir-se dels aminoàcids bàsics.

DISCUSSIÓ

L'efecte més consistent de les sulfonilurees sobre els nivells d'aminoàcids plasmàtics que hem observat és un descens significatiu d'alguns aminoàcids, com l'alanina, el glutamat+glutamina, la glicina, l'arginina, la histidina i la citrullina, trobat al tercer dia del tractament, per efecte de les sulfonilurees de la segona generació, i que no s'observa en el tractament amb tolbutamida. Val a dir que la glibenclamida i la glipentida tenen un efecte hipoglucemiant més fort que la tolbutamida en tractament crònic⁶, però llurs efectes hipoglucemians van desapareixent amb el temps de tractament⁶; així no és estrany que llur efecte sobre els nivells d'aminoàcids també desaparegui amb el tractament perllongat.

L'efecte de les sulfonilurees sobre els nivells individuals dels aminoàcids plasmàtics pot ser degut en part a l'acció insulinoatròpica de les sulfonilurees²⁰, donat que la insulina afecta la dinàmica de la circulació, captació i alliberament dels aminoàcids^{1, 19}, però la seva acció és més complexa, car s'ha demostrat l'acció de les sulfonilurees sobre la transaminació dels aminoàcids⁴, és a dir, sobre el seu catabolisme, així com sobre la biosíntesi de proteïnes^{8, 14}. També s'ha descrit que les sulfonilurees inhibeixen la gluconeogènesi hepàtica⁹, cosa que podria afectar també l'equilibri entre la captació i utilització dels aminoàcids plasmàtics per llur efecte conservador de la glucosa, i també perquè part dels aminoàcids és utilitzada correntment per a la gluconeogènesi.

Cal destacar, de tota manera, que amb la possible excepció de l'arginina, els aminoàcids més afectats pel tractament amb glibenclamida o glipentida són precisament els que menys són afectats per la insulina¹², així s'ha indicat que els nivells d'alanina són pràcticament insensibles als canvis en insulínemia¹²; mentre els aminoàcids de cadena ramificada, descrits com a més sensibles a l'insulina^{13, 24}, en el nostre cas no s'afecten pràcticament per les sulfonilurees. Aquestes consideracions semblen indicar que els efectes de les sulfonilurees en les nostres condicions s'han

d'atribuir principalment a llurs efectes extra-pancreàtics, en lloc de a llur acció insulinoatròpica.

D'altra banda, els resultats que es presenten en aquest treball estan en plena concordança amb els d'altres autors⁶ en el sentit que l'efecte hipoglucèmic (i en el nostre cas, hipoaaminoacèmic) de les sulfonilurees va perdent efectivitat amb la perllongació del tractament crònic.

BIBLIOGRAFIA

1. ADIBI, S. A., MORSE, E. L. i AMIN, P. M. — *Role of insulin and glucose in the induction of hypoaminoacidemia in man: Studies in normal juvenile diabetic and insulin patients.* «J. Lab. Clin. Med.», 86: 395-409 (1975).
2. AROLA, LL., HERRERA, E. i ALEMANY, M. — *A new method for deproteinization of small samples of blood plasma for amino acids determination.* «Anal. Biochem.», 92: 236-239 (1977).
3. AROLA, LL., PALOU, A., HERRERA, E. i ALEMANY, M. — *Determination of plasma amino acids in small samples with the use of Dansylchloride.* «Biochimie», 1221-1226 (1976).
4. BENDIT, E. G. — *Inhibition of alanine transaminase by the hypoglycaemic sulphonylurea derivatives.* «Nature», 179: 534-535 (1957).
5. CARLSTEN, A., HALLGREN, B., JAGENBURG, R., SVANBORG, A. i WERKO, L. — *Amino acids and free fatty acids in plasma in diabetes I. The effect of insulin on the arterial levels.* «Acta Med. Scand.», 179: 361-370 (1966).
6. CODINA, J., LASUNCIÓN, M. A. i HERRERA, E. — *Effects of chronic and acute treatment with sulphonylureas on plasma insulin and glucose levels in the rat.* «Diabete Metab.», 4: 47-52 (1978).
7. CROFFORT, O. B., FELTS, P. W. i LACY, W. W. — *Effect of glucose infusion on the individual plasma free amino acids in man.* «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», 117: 11-14 (1964).
8. DE CHATELET, L. R. i McDONALD, H. J. — *Effect of in vivo administration of various oral hypoglycemic agents on hepatic protein synthesis.* «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», 127: 415-418 (1968).
9. DEHMEL, K. M., FRÖHLICH, J., LÖFFLER, G. i WIELAND, O. — *Efecto de la glicodiazina, glibenclamida y glibermurida (Ro. 6.4563) sobre la gluconeogénesis, la cetogénesis y la formación de urea en el hígado perfundido de rata. A: «Nuevas sulfonilureas hipoglucemiantes».* U. C. Dubach i A. Bückert. «Hans Huber Publ.», Bern, 149-155 (1971).
10. FELDMAN, J. M. i LEBOVITZ, H. E. — *Effect of fasting on insulin secretion and action in mice.* «Endocrinology», 86: 313-321 (1970).
11. FELDMAN, J. M. i LEBOVITZ, H. E. — *Role of pancreatic monoamines in the impaired insulin secretion of the fasting state.* «Endocrinology», 92: 1469-1474 (1973).
12. FELIG, P. — *The glucose-alanine cycle.* «Metabolism», 21: 179-207 (1973).
13. FLOYD, J. C., FAJANS, S. S., CONN, J. W., KNOPF, R. F. i RULL, J. — *Stimulation of insulin secretion by amino acids.* «J. Clin. Invest.», 45: 1487-1502 (1966).
14. FULKS, R. M., LI, J. B. i GOLDBERG, A. L. — *Effects of insulin, glucose and amino acids on protein turnover in rat diaphragm.* «J. Biol. Chem.», 250: 290-298 (1975).
15. GARCÍA-RAFANELL, J., LASUNCIÓN, M. A., MORELL, J. i HERRERA, E. — *Comparative hypoglycemic and hypoketonemic effects of tolbutamide and glypentine in the rat.* «Rev. Esp. Fisiol.», 33: 103-108 (1977).
16. HARRIS, M. M. i HARRIS, R. S. — *Effect of insulin hypoglycemic and glucose on various amino acids in blood of mental patients.* «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», 64: 471-476 (1947).

17. LOTSPEICH, W. D. — *The role of insulin in the metabolism of amino acids.* «J. Biol. Chem.», 170: 175-180 (1949).
18. LOUBATIÈRES, A., MARIANI, M. M., RIBES, G. i ALRIC, R. — *Pharmacological comparison between tolbutamide and two second generation hypoglycemic sulphonylureas (glibenclamide and glioxemide).* «Acta Diabetol. Lat.», 10: 261-282 (1973).
19. LUCK, J. M., MORRISON, G. i WILBUR, L. F. — *The effect of insulin on the amino acid content of blood.* «J. Biol. Chem.», 77: 151-156 (1928).
20. MADSEN, J. — *Extrapancreatic and intrapancreatic action of antidiabetic sulphonylureas, a review.* «Acta Med. Scand.», 182: 109-122 (1967).
21. MUNRO, H. N. i THOMSON, W. S. T. — *Influence of glucose on amino acid metabolism.* «Metabolism», 2: 354-361 (1953).
22. PALOU, A., AROLA, LL. i ALEMANY, M. — *Plasma amino acid concentrations in pregnant rats and in 21-day fetuses.* «Biochem. J.», 166: 49-55 (1977).
23. RAMAHANDRIONA, G., DICAMPO-ROUGERIE, CH. i VAGUE, P. — *Effets du glucose et de l'insuline sur la diminution induite par le jeune, de la réponse insulínique en glucose du pancréas du rat perfusé «in vitro».* «C. R. Séanc. Soc. Biol.», 169: 606-610 (1975).
24. ROCHA, D. M., FALOONA, G. F. i UNGER, R. H. — *Glucagon stimulating activity of 20 amino acids in dogs.* «J. Clin. Invest.», 51: 2346-2351 (1972).
25. SODOYEZ, J. C., SODOYEZ-GOFFAUX, F., DUNBAR, J. C. i FOÀ, P. P. — *Reduction in the activity of the pancreatic islets induced in normal rodents by prolonged treatment with derivatives of sulphonylurea.* «Diabetes» 19: 603-609 (1970).