EFECTE DEL DEJUNI DE 24 HORES SOBRE ELS ENZIMS RELACIONATS AMB EL METABOLISME NITROGENAT I DEL GLICOGEN EN EL FETGE I MÚSCUL DE LA RATA

Comunicació presentada el dia 22 de maig de 1980

per

ANDREU PALOU, XAVIER REMESAR, LLUÍS AROLA i MARIÀ ALEMANY

Fisiologia General, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
Bioquímica, Facultat de Ciències, Universitat de Ciutat de Mallorca
i
Bioquímica, Facultat de Química de Tarragona, Universitat de Barcelona.

INTRODUCCIÓ

El dejuni és una situació fisiològica en la qual l'organisme ha d'adaptar-se a la manca d'aliment exogen mitjançant la mobilització de les seves reserves de glicogen, greixos i proteïnes. La utilització progressiva dels greixos i proteïnes permet substituir una part de les necessitats energètiques amb substrats diferents de la glucosa (CAHILL, 1970), cosa que permet utilitzar les disponibilitats de glucosa i glicogen per a cobrir el mínim indispensable de funcionament del teixit nerviós, eritròcits, etc. (RUDERMAN, 1975). La mobilització del glicogen és molt ràpida immediatament després de començar el dejuni (PHAN *et al.*, 1974) i minva després progressivament amb l'increment de la utilització de materials energètics no glucídics (FELIG *et al.*, 1969). Aquesta situació coincideix amb nivells mínims de les reserves glucídiques tant al fetge com al múscul.

Aquesta situació està directament relacionada amb un descens dels nivells plasmàtics de glucosa provocat pel dejuni (RUDERMAN, 1975) i un alliberament creixent i important d'aminoàcids des dels teixits perifèrics, especialment el múscul (FELIG *et al.*, 1969; AIKAWA *et al.*, 1973). En el dejuni de curta durada hom ha calculat que l'alanina alliberada pel múscul constitueix pràcticament una quarta part del total de substrats gluconeogenètics utilitzats pel fetge (FELIG *et al.*, 1969).

Quant a la regulació d'aquests processos, el dejuni provoca un descens en l'activitat de la glicogenfosforilasa del fetge (FREEDLAND, 1969; TAN i NUTTALL, 1975), que es complementa pel descens de la relació de la glicogensintetasa activa (I) envers l'activitat total (VOYLES *et al.*, 1973). Aquesta situació es corregeix a la rata quan el dejuni és superior a les 12 hores (HUE *et al.*, 1975). L'activitat de l'alaninatransaminasa en el fetge no mostra canvis amb un dejuni de 24 hores (KARL *et al.*, 1976) tot i que en períodes de dejuni més llargs l'activitat s'incrementa molt (SWICK *et al.*, 1965; KARL *et al.*, 1976). L'activitat de la serinadeshidratasa en el fetge, un altre enzim important en el procés gluconeogenètic, s'incrementa per efecte del dejuni (GOSWAMI i CHATAGNER, 1966).

La relació entre el fetge —i el llit esplàncnic— per un costat i els teixits perifèrics —com el múscul— per l'altre, tenen una gran importància en el dejuni a causa que entre ells hi ha un flux continuat de substrats gluconeogenètics (FELIG *et al.*, 1965; AIKAWA *et al.*, 1973). A fi de clarificar una mica més aquesta situació, hem intentat donar aquí una idea panoràmica del que passa en aquestes dues parts amb un dejuni de durada relativament curta —24 hores— pel que fa als nivells i situació d'activitat dels enzims del glicogen i la mobilització d'alanina i serina, tot lligant els resultats amb els nivells d'aminoàcids i glucosa al plasma i el glicogen al fetge i múscul.

MATERIALS I MÈTODES

En els experiments es van utilitzar rates Wistar de 190 ± 10 g de pes. Els animals van ésser mantinguts sota condicions tipus (AROLA *et al.*, 1978) d'alimentació, temperatura i il·luminació. Al grup experimental li va ésser retirat l'aliment 24 hores abans del sacrifici, cosa que no es va fer amb el grup control. Tots els animals van ésser sacrificats amb guillotina a la mateixa hora del seu cicle circadià (ISHIKAWA i SHIMAZU, 1976), i la sang fou recollida en gots heparinitzats. Immediatament després de sacrificar els animals se'n va extreure bocins de fetge i de múscul, i ràpidament congelats amb nitrogen líquid, van ser utilitzats per purificar (GOOD *et al.*, 1933) i valorar posteriorment el glicogen mitjançant la seva hidròlisi fins a glucosa (HUGGETT i NIXON, 1957). La glucosa plasmàtica va ser mesurada amb un mètode enzimàtic (HUGGETT i NIXON, 1957), després de desproteïnitzar el plasma (SOMOGYI, 1945). L'alanina i la serina van ser determinades a partir d'aquest plasma, desproteïnitzat amb acetona (AROLA *et al.*, 1977) i utilitzant un mètode radioquímic molt sensible (AROLA *et al.*, 1976).

Els teixits van ésser dissecats i homogeneïtzats de la manera descrita prèviament (AROLA *et al.*, 1978). Es féu servir els homogenats crus per a

la determinació de proteïna total (LOWRY *et al.*, 1951) i de les activitats enzimàtiques: glicogensintetasa (THOMAS *et al.*, 1968) —la forma D en presència de glucosa-6-fosfat 6,6 mM—; glicogenfosforilasa (FISCHER i KREBS, 1964) —la forma b en presència d'AMP 100 mM—; la formació de fosfat es detectà colorimètricament (FISKE i SUBBAROW, 1925); alanina-transaminasa (BERGMEYER i BERNT, 1974); serinadeshidratasa (SUDA i NAKAGAWA, 1970) i l'α-amilasa (CLARK, 1964).

En totes les activitats enzimàtiques hom ha utilitzat les velocitats inicials extrapolades a partir de les dades experimentals. Totes les activitats han estat expressades en nkatals per gram de proteïna, per a facilitar les comparacions entre situacions i els diversos teixits.

RESULTATS

Els nivells de glicogen al fetge i al múscul es presenten a la taula 1. Els nivells inicials del fetge són cinc cops més grans que els del múscul —per gram de teixit—, però a les 24 hores de dejuni els nivells són molt

TAULA 1.— Efecte de 24 hores de dejuni sobre les reserves de glicogen al múscul i fetge de rata

	Control		Dejuni
Glicogen al fetge (μM glucosa/g)	245±23	*	40±8
Glucosa alliberada (mM/kg de rata)			9,56
Glicogen al múscul (μM glucosa/g)	44±9		17±6
Glucosa alliberada (mM/kg de rata)			11,61

* $p<0,05$. Diferències entre dejunes i controls.

TAULA 2. — Efecte de 24 hores de dejuni sobre les concentracions plasmàtiques de glucosa, lactat, serina i alanina

	Control		Dejuni
Glucosa	8,72±0,17	*	5,65±0,18
Lactat	3,30±0,12	*	1,60±0,07
Serina	0,38±0,03	*	0,23±0,01
Alanina	0,66±0,03	*	0,43±0,03

Les concentracions plasmàtiques s'expressen en mmols/litre.

* $p<0,05$. Diferències entre dejunes i controls.

més baixos en ambdós teixits, essent les diferències menys marcades. Cal remarcar que la contribució del fetge i del múscul —pel que fa referència a restes glucosil— és molt similar, i tots dos contribueixen a l'economia total de l'organisme. A la taula 2 hom pot observar que el dejuni origina un marcat descens dels nivells plasmàtics de glucosa, descens que és més pronunciat encara en el cas del lactat. El descens dels nivells de serina i alanina és prou important, però no tant marcat com en el cas del lactat.

Les activitats enzimàtiques al fetge i el múscul de rates alimentades i dejunes es presenten a la taula 3. Hom pot observar que en el fetge no varia pràcticament l'activitat de la glicogensintetasa, tot i que l'activitat total —I+D— disminueix amb el dejuni i fa que la relació I/I+D augmenti. L'activitat del a glicogenfosforilasa activa (a) al fetge disminueix considerablement amb el dejuni, mentre que l'activitat total (a+b) varia en una proporció més petita i fa disminuir la relació a/a+b. L'activitat de l'amilasa pràcticament no s'afecta per acció del dejuni; l'activitat de l'alaninatransaminasa disminueix lleugerament amb el dejuni i la de la serinadeshidratasa augmenta de manera prou important.

En el múscul, la glicogensintetasa I disminueix molt amb el dejuni, mentre que l'activitat total (I+D) pràcticament no varia. La relació entre ambdues formes descendeix llavors significativament. L'activitat de la glicogenfosforilasa a+b baixa molt per efecte del dejuni, contràriament al que passa en el cas de les amilases, les quals augmenten la seva activitat quasi bé tres vegades. L'activitat de l'alaninatransaminasa augmenta lleugerament amb el dejuni. Pel que fa referència a l'activitat de la serinadeshidratasa, no s'han observat nivells apreciables en cap de les dues situacions experimentals.

Discussió

El dejuni provoca un descens en els nivells plasmàtics de glucosa (Herrera i Freinkel, 1968) que és compensat en part per acció de la glicogenòlisi hepàtica i per l'aportació de substrats gluconeogenètics des dels teixits perifèrics (Blackshear *et al.*, 1974). Aquesta acció provoca un fort descens dels nivells de glicogen del fetge, i també del múscul, car aquest pot alliberar les restes glucosil en forma de fragments de tres carbonis: lactat i alanina fonamentalment (Felig, 1973). La importància de la contribució del glicogen muscular és considerable (Sudgen *et al.*, 1976) tot i que en aquest cas no hi ha un efecte tan directe com en el cas del fetge.

En el fetge, el procés gluconeogenètic està fortament augmentat en relació a la glucòlisi (Freminet, 1976), de manera que hom pot trobar

TAULA 3. — Activitats enzimàtiques al fetge i múscul de rates, control i rates sotmeses a 24 hores de dejuni

Enzim	Fetge control		Fetge dejuni	Múscul control		Múscul dejuni
Glicogensintetasa I	51,1±6,8		48,9±6,3	114±12	*	60±11,8
Glicogensintetasa I+D	204±34		137±32	203±6		195±56
Relació I/I+D	0,25±0,04		0,36±0,05	0,56±0,02	*	0,31±0,09
Glicogenfosforilasa a	294±21	*	101±16	—		—
Glicogenfosforilasa a+b	417±31		285±58	8624±329	*	3071±347
Relació a/a+b	0,70±0,04	*	0,36±0,07	—		—
Amilasa	784±189		642±47	113±33	*	323±71
Serinadeshidratasa	805±116	*	1763±326	10		10
Alaninatransaminasa	2368±211		2458±126	500±24		659±70

Les activitats dels enzims s'expressen en nkatals/g de proteïna.

*: $p<0,05$. Diferències entre dejunes i controls.

un increment en el flux de materials gluconeogenètics des dels teixits perifèrics cap al llit esplàcnic (AIKAWA *et al.*, 1973), tot i que els nivells plasmàtics de glucosa no han variat excessivament, a causa de la tendència homeostàtica de manteniment de llurs nivells, en un moment en què hi ha un consum més accentuat per part del fetge i un alliberament més intens de materials per part del múscul, com pot ser el cas de l'alanina. En alguns casos, el consum és molt més marcat que l'alliberament, com és el cas del lactat en situació de repòs, car el cicle de Cori funciona intensament durant el dejuni (SCHIMMEL i NOBIL, 1970).

El fetge en estat de dejuni augmenta la seva capacitat de captació d'aminoàcids (AIKAWA *et al.*, 1973), així com la seva utilització, tot i que els nivells d'alaninatransaminasa no s'incrementen de manera evident, cosa que ens fa suposar que els nivells basals d'activitat d'aquest enzim deuen ésser suficients per a fer front a una situació fortament gluconeogenètica, com és el cas del dejuni de curta durada (METZGER, 1973). El cas de la serinadeshidratasa és més clar, puix que aquí l'enzim possibilita la degradació de quantitats de serina molt més grans (JOST *et al.*, 1968), com a conseqüència de la producció de l'enzim per diversos agents metabòlics i hormonals (PESTAÑA, 1969; SUDA i NAKAGAWA, 1970). Ambdós enzims estan fortament relacionats amb el subministrament de substrats de tres carbonis —piruvat— per a la gluconeogènesi hepàtica, la qual cosa contribueix al sosteniment dels valors normals de glucosa al plasma (FELIG, 1973).

Al múscul, l'activitat de l'alaninatransaminasa mostra un lleuger increment que està d'acord amb l'augment de l'alliberament d'aminoàcids, especialment gluconeogenètics, en estat de dejuni (AIKAWA *et al.*, 1973), entre els quals podem trobar l'alanina.

Quant al metabolisme del glicogen, és important destacar que hi ha un fort descens dels nivells de glicogen hepàtic en condicions en què l'activitat degradativa principal —l'acció de la glicogenfosforilasa— està sensiblement minvada, especialment el que pertoca a la forma activa (a) (FREEDLAND, 1967; TAN i NUTTALL, 1975). D'altra banda, el descens de l'activitat de la glicogensintetasa total no és probable que hagi afectat negativament el balanç de glicogen, atès que l'activitat de la forma activa (I), es manté pràcticament inalterada, cosa que hauria de contribuir a incrementar els nivells de glicogen, especialment quan l'activitat degradativa disminueix. L'altre enzim que intervé en aquest equilibri és l'amilasa, l'activitat de la qual dins del metabolisme del glicogen va essent considerada amb més interès (HAMMERTON i MESSER, 1973), tot i que, en aquest cas i per efecte del dejuni, mostri un descens en la seva activitat. Cal assenyalar aquí que els nivells dels enzims estudiats corresponen al final del període de dejuni, i no són versemblantment els que han provocat un descens tan marcat en els nivells de glicogen, sinó més bé en

són una conseqüència, ja que l'equilibri està decantat cap a la síntesi més que cap a la degradació, a fi de protegir els primordis inicials de glicogen necessaris per a refer altre cop el glicogen en condicions d'alimentació. És en aquest sentit que cal interpretar les dades i no lligant el descens dels nivells de glicogen als dels enzims.

En el múscul ens trobem en una situació en què les reserves de glicogen no estan tan exhaurides com les del fetge, cosa que fa que les activitats enzimàtiques que trobem sí que tinguin una relació més marcada amb els nivells de glicogen disponible. Així, no s'han trobat variacions en el costat de la síntesi, mentre que s'ha observat un fort descens en el cas de la glicogenfosforilasa, que està compensat, en part, per l'augment de l'activitat de l'amilasa, fet que pot fer suposar que aquesta amilasa deu ser la principal responsable de la glicogenòlisi muscular, a causa del fort descens en l'activitat degradativa de la fosforilasa.

Així, podem extreure d'aquestes dades la idea que hi ha una intensificació del transport de substrats gluconeogenètics cap al fetge en períodes de dejuni, amb la conseqüent activació dels cicles de Cori i de la glucosa-alanina. Aquest augment en el transport de substrats cap al fetge es relaciona amb un buidament dels dipòsits hepàtics de glicogen, amb el subsegüent descens en l'activitat degradadora de la glicogenfosforilasa junt amb un cert equilibri en l'activitat de la glicogensintetasa.

BIBLIOGRAFIA

AROLA, Ll., PALOU, A., HERRERA, E. i ALEMANY, M. — «Biochimie», 58, 1.221 (1976).

AROLA, Ll., HERRERA, E. i ALEMANY, M. — «Anal. Biochem.», 82, 236 (1977).

AROLA, Ll., PALOU, A., REMESAR, X., HERRERA, E. i ALEMANY, M. — «Rev. Esp. Fisiol.», 34, 345 (1978).

AIKAWA, T., MATSUTAKA, H., YAMAMOTO, H., OKUDA, T., ISHIKAWA, E., KAWANO, T. i MATSUMURA, E. — «J. Biochem.», 74, 1.003 (1973).

BERGMEYER, H. U. i BERNT, E. — A: *Methods of enzymatic analysis*. Ed. H. U. Bergmeyer, Academic Press, Nova ork, 2a. ed., 727 (1974).

BLACKSHEAR, P. J., HOLLOWAY, P. A. H. i ALBERTI, K. G. M. M. — «FEBS Letters», 48, 310 (1974).

CAHILL, G. F. — «New England J. Med.», 228, 668 (1970).

CLARCK, J. M. — A: *Experimental biochemistry*. Ed. J. M. Clarck, Freeman, San Francisco & London (1964).

FELIG, P. — «Metabolism», 22, 179 (1973).

FELIG, P., MARLISS, E., OWEN, O. E. i CAHILL, G. F. — «Arch. Int. Med.», 123, 293 (1969).

FISCHER, E. H. i KREBS, E. G. — A: *Methods in Enzymology*. Ed. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, Nova York, 369 (1964).

FISKE, J. i SUBBAROW, G. H. — «J. Biol. Chem.», 66, 375 (1925).

FREEDLAND, R. A. — «J. Nutr.», 91, 489 (1969).

GOOD, C. A., KRAMER, H. i SOMOGYI, M. — «J. Biol. Chem.», 100, 485 (1933).

GOSWAMI, M. F. i CHATAGNER, F. de. — «Experientia», XXII, 370 (1966).

HAMMERTON, K. i MESSER, M. — «Ann. Rev. Biochem.», 45, 167 (1973).

HERRERA, E. i FREINKEL, N. — «Biochim. Biophys. Acta», 170, 244 (1968).

HUE, H. L., BONTEMPS, F. i HERS, H. G. — «Biochem. J.», 152, 105 (1975).

HUGGETT, A. G. i NIXON, D. A. — «Lancet», II, 368 (1957).

ISHIKAWA, K. i SHIMAZU, T. — «Life Sci.», 19, 1873 (1976).

JOST, J. P., HSIE, A. W. i RICKENBERG, H. V. — «Biochem. Biophys. Res. Comm.», 34, 748 (1968).
KARL, I., GARBER, A. J. i KIPNIS, D. M. — «J. Biol. Chem.», 251, 844 (1976).
LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, J., FARR, A. L. i RANDALL, A. J. — «J. Biol. Chem.», 193, 265, 1951.
METZGER, B. E., HARE, J. W. i FREINKEL, N. — «J. Clin. Endocrin.», 33, 869 (1971).
PHAN, T., BACH, A. i MATAIS, P. — «Arch. Int. Physiol. Biochem.», 82, 603 (1974).
PESTAÑA, A. — «Eur. J. Biochem.», 11, 400 (1969).
RUDERMAN, N. B. — «Ann. Rev. Med.», 26, 245 (1975).
SCHIMMEL, R. i NOBIL, J. S. — «Am. Zool.», 16, 661 (1970).
SOMOGYI, M. — «J. Biol. Chem.», 160, 62 (1945).
SUDA, M. i NAKAGAWA, H. — A: *Methods in Enzymology*. Ed. S. P. Colowick i N. O. Kaplan. Academic Press, Nova York, 347 (1970).
SUDGEN, M. C., SHARFLES, S. C. i RANDLE, P. J. — «Biochem. J.», 160, 817 (1976).
SWICK, R. W., BARNSTEIN, P. L. i STANGE, J. L. — «J. Biol. Chem.», 240, 3.334 (1965).
TAN, A. W. J. i NUTTALL, F. Q. — «Biochem. Biophys. Acta.», 410, 45 (1975).
THOMAS, J. A., SCHELENDER, K. K. i LARNER, J. — «Anal. Biochem.», 25, 486 (1968).
VOYLES, N., GUTMAN, R. A., SELAWRY, H., FINK, G., PRENHER, J. C. i REGANT, L. — «Hormone Res. Comm.», 4, 65 (1973).