ENZIMS DEL METABOLISME DEL GLICOGEN A LA MEDUL·LA ADRENAL D'ANIMALS SOTMESOS A DEJUNI

Comunicació presentada el dia 22 de maig de 1980

per

MARIA ROSA DE SAGARRA, ANNA MILLARUELO i MARIA TERESA MIRAS-PORTUGAL

Instituto de Enzimología del C.S.I.C., Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules cromafins de la medul·la adrenal tenen el mateix origen que les neurones i, com les neurones adrenèrgiques, sintetitzen i alliberen catecolamines. Atès que és un teixit homogeni, resulta molt adequat per a estudis metabòlics, car no presenta la interferència del teixit glial. Un aspecte interessant de l'emmagatzematge de catecolamines dins el grànul cromafí és que no solament hom les troba a una concentració de 0,55 M, sinó que també hom troba ATP 0,15 M —la concentració més elevada que es coneix a un orgànul cel·lular. La funció d'aquest ATP és molt discutida, i el fet de trobar-se en una relació constant amb les catecolamines (1/4) ha portat a suposar-hi una funció neutralitzadora del pH. En la funció exocitòtica de la cèl·lula cromafí s'alliberen alhora catecolamines i ATP, aquest últim en una quantitat que representa diàriament uns 2 mg/g de teixit. No es coneix la importància relativa de la via de recuperació de les purines i de la seva síntesi *de novo*. Com a conseqüència d'això, el teixit cromafí té de sintetitzar una altra molècula complexa, com és la d'ATP, a més de sintetitzar les catecolamines i una sèrie de proteïnes, tant les contingudes dins el grànul cromafí com les de la membrana d'aquest, que tenen un elevat recanvi [1, 2]. Tot això fa que la cèl·lula cromafí adrenal sigui metabòlicament molt activa. Però encara no sabem d'on treu l'energia necessària per a mantenir les seves

funcions metabòliques. Per analogia amb el sistema nerviós, hom pot pensar que el metabolisme glucídic té un paper molt important en la resposta a les necessitats energètiques de la cèl·lula. Hem començat aquest estudi per l'exploració del metabolisme del glicogen.

MATERIALS I MÈTODES

Per a l'obtenció de glàndules adrenals hem d'agrair la col·laboració de Giresa, S. A., Colmenar Viejo (Madrid). Les glàndules provenien d'animals sotmesos a dejuni durant 16-48 hores. Les destinades a la determinació de la quantitat de glicogen i d'activitats enzimàtiques eren introduïdes en nitrogen líquid immediatament després d'ésser extirpades.

Per aïllar cèlules cromafins, es feien immediatament després d'extirpades uns talls al còrtex i es perfundien a partir de la vena amb un medi que contenia NaCl 118 mM, KCl 5,4 mM, $MgSO_4$ 0,8 mM, NaH_2PO_4 0,8 mM, $NaHCO_3$ 25,0 mM i glucosa 5,0 mM, pH 7,4, a fi d'eliminar la sang continguda dins la glàndula. Es guardaven les mostres dins el mateix medi en un bany de gel fins l'arribada al laboratori (aproximadament 30-60 minuts). Allí se separava el còrtex de la medul·la i es connectava a un aparell de perfusió, on es perfundia amb el mateix medi a 47 °C, saturant-lo amb una barreja de O_2/CO_2 (95/5 %), i que després era incubat en un bany amb agitació a 37 °C durant 30 minuts. Finalment, el material resultant era filtrat i el residu es rentava dues vegades amb medi sense glucosa però amb calci 1,3 mM; se centrifugava 5 minuts a $90 \times g$.

Les incubacions es realitzaven amb el mateix medi utilitzant concentracions variables de glucosa i en presència d'un 4 % d'albúmina de sèrum boví, a 37 °C i en atmosfera de O_2/CO_2 (95/5 %).

Per a determinar la quantitat de glicogen en les glàndules, aquest polisacàrid era aïllat, hidrolitzat i valorat amb el mètode de l'antrona [3-5] o bé utilitzant hexokinasa i glucosa-6-fosfat deshidrogenasa [6]. La glicogen sintetasa era valorada radiomètricament mitjançant la incorporació de glucosa a glicogen [7, 8]. La glicogen fosforilasa era valorada en sentit invers a la seva funció fisiològica, determinant el fosfat alliberat [9]. Les proteïnes van ésser determinades amb el mètode de Bradford [10]. Per a la determinació de la incorporació de ^{14}C-glucosa al glicogen, les cèl·lules aïllades eren incubades amb 10^6 dpm/2×10^6 cèl·lules. El glicogen era purificat [11], i es recomptà després la seva radioactivitat en un recomptador de centelleig líquid. Per determinar l'alliberació de CO_2 a partir de glucosa-6-^{14}C, les cèl·lules eren incubades en tubs tancats que contenien 350.000 dpm/2×10^6 cèl·lules. El CO_2 produït era captat amb hiamina després d'acidificar la barreja.

TAULA 1. — Contingut en glicogen de la medulla adrenal

Espècie	Antrona	HK + G-6-P — DH
	µmols glucosa/g teixit fresc	
Bou	2,95±1,58 (8)*	2,28±0,97 (8)
Porc	2,50±0,96 (8)	2,52±0,86 (8)
Be	0,55±0,05 (6)	0,23±0,08 (6)

* Resultats: mitjana ± D.S.

El glicogen es va determinar segons els mètodes indicats, en homogenats de medulla adrenal sencera (vegeu «Materials i mètodes»).

TAULA 2. — Activitats de la glicogen sintetasa i de la glicogen fosforilasa en medulla adrenal de bou

Glicogen sintetasa (U/g)		Glicogen fosforilasa (U/g)	
— G-6-P	0,081±0,011 (4)*	Forma *a*	1,98±0,25 (4)
+ G-6-P	0,451±0,066 (4)	Total	3,27±0,15 (4)
% — G-6-P	18	% forma *a*	61

* Resultats: mitjana ± D.S.

Les activitats es van determinar a 30° C en sobrenedants de 10.000×g. Una unitat (U) és un µmol de glucosa incorporada per minut.

RESULTATS

Els nivells de glicogen en medulla suprarenal varien segons les espècies, com hom pot observar a la taula 1. Els valors més elevats corresponen al bou. El porc presenta nivells de glicogen molt similars als del bou. El be, al contrari, presenta valors significativament inferiors. En totes les espècies, les dispersions són considerables, com hom pot comprovar en observar les elevades desviacions estàndard que arriben a ésser més de la meitat del valor mitjà en el cas del bou.

Les activitats de la fosforilasa *a* i de la total i el percentatge de la primera, que és la forma activa, respecte a la total, són presentades a la taula 2. La dispersió dels valors de fosforilasa *a* i total és petita, fet que indica que les activitats d'aquests enzims són molt similars en diferents individus de l'espècie animal estudiada.

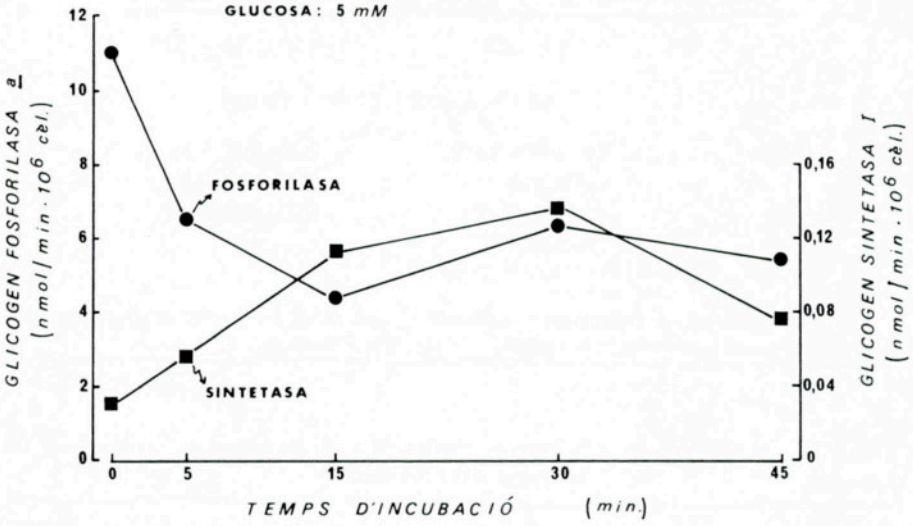


FIG. 1. — Variació dels nivells d'activitat de la fosforilasa i de la sintetasa en cèl·lules cromafins aïllades. Les activitats totals de la glicogen sintetasa i de la fosforilasa són, respectivament, de 2,67 i 19,8 nmols d'equivalents de glucosa per minut i milió de cèl·lules.

TAULA 3. — Constants cinètiques de la glicogen sintetasa

Constant	(—) Glucosa-6-P	(+) Glucosa-6-P
K_m UDP-glucosa (mM)	1,00	0,50
V_{max} ($\mu mols \times h^{-1} \times g^{-1}$)	12	16

Valors trobats en medulla adrenal bovina sencera.

Els valors de la glicogen sintetasa de medulla adrenal, en presència i absència de glucosa-6-fosfat, es poden veure a la taula 2. Com en el cas de la fosforilasa, la dispersió de les activitats de glicogen sintetasa en les formes total i independent de la glucosa-6-fosfat és molt petita.

Els paràmetres cinètics de la glicogen sintetasa de medulla adrenal estan representats a la taula 3. La K_m per a l'UDP-glucosa en absència de glucosa-6-fosfat és de 1 mM, i de 0,57 mM en la seva presència. Les V_{max} són més elevades en presència de glucosa-6-fosfat que en la seva absència.

Com hom pot observar a les figures 1 i 2, la glicogen fosforilasa, present en un 40-60 % de forma activa en cèl·lules acabades d'aïllar, als

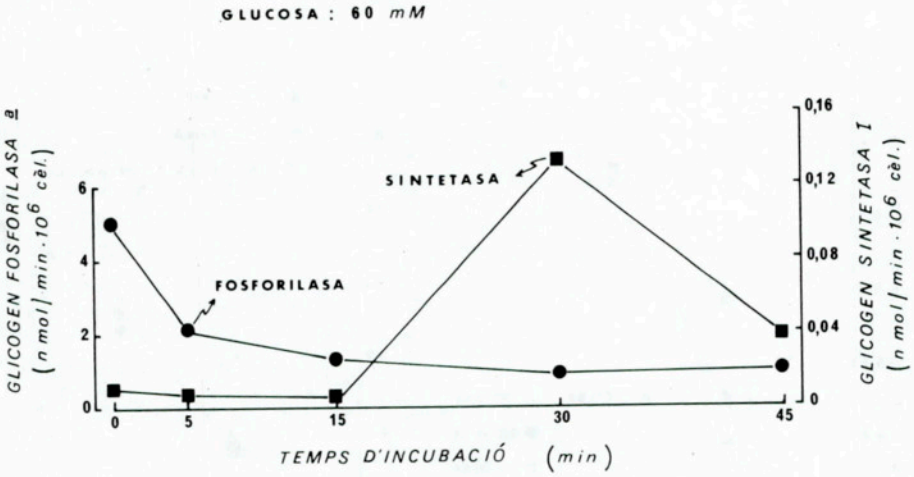
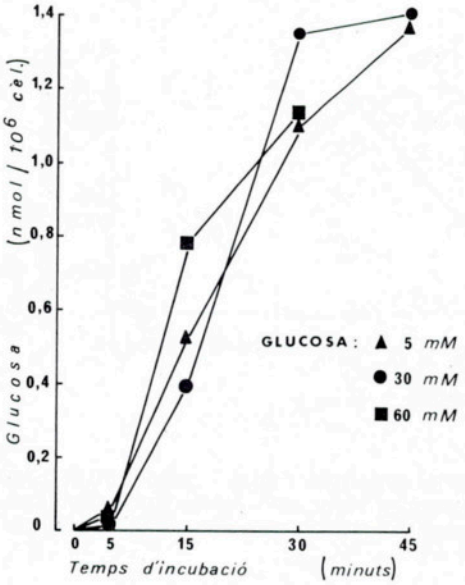


FIG. 2. — Variació dels nivells d'activitat de la fosforilasa i de la sintetasa en cèl·lules cromafins aïllades. Les activitats de la glicogen sintetasa i de la fosforilasa són, respectivament, d'1,02 i 15,3 nmols d'equivalents de glucosa per minut i milió de cèl·lules.

15 minuts d'incubació ha disminuït la seva activitat a un 10-20 % de forma *a*, mantenint-se aquest valor durant els 45 minuts que dura l'experiment. Al contrari, l'activitat de la glicogen sintetasa, en la seva forma independent de glucosa-6-fosfat, és pràcticament inexistent al principi de la incubació (1 % de la total), augmentant la seva activitat. El percentatge d'augment és superior (fins a un 12 %) en incubar amb glucosa 60 mM que en fer-ho amb glucosa 5 mM (fins a un 5 %).

Paral·lelament als canvis en l'estat dels enzims, hem seguit la incorporació de glucosa-^{14}C al glicogen. La velocitat d'incorporació és pràcticament idèntica en presència de concentracions de glucosa de 5, 30 i 60 mM (fig. 3). La glutamina, que en el fetge augmenta la síntesi de glicogen [13], no té efecte sobre les cèl·lules cromafins. Tampoc té efecte la presència d'insulina dins el medi d'incubació (fig. 4).

Com a paràmetre de viabilitat cel·lular ha estat estudiada la linealitat del consum de glucosa durant la incubació, i s'ha valorat l'alliberament de $^{14}CO_2$ a partir de glucosa-6-^{14}C. El resultat es pot veure a la figura 5, i demostra que l'oxidació de glucosa és lineal durant tot el temps que duren els experiments. Paral·lelament, el lactat i el piruvat formats durant les incubacions han estat mesurats i s'ha observat el fet sorprenent que hi ha una glicòlisi anaeròbia molt intensa i lineal durant una hora d'incubació (fig. 6).



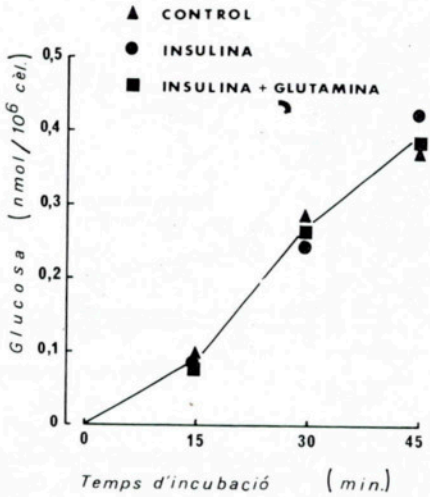


FIG. 3. — Incorporació de glucosa^{14}-C a glicogen en cèl·lules cromafins aïllades.

FIG. 4. — Incorporació de glucosa-^{14}C a glicogen en cèl·lules cromafins aïllades. El medi d'incubació contenia glucosa 30 mM i $2{,}5 \times 10^6$ dpm/ml.

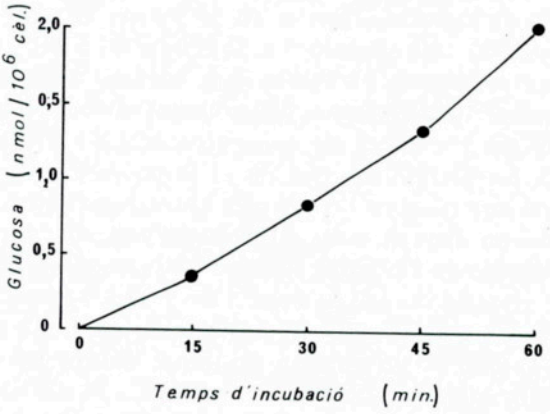


FIG. 5. — Oxidació de glucosa-6^{14}C. El medi d'incubació contenia glucosa 10 mM i 875.000 dpm/ml.

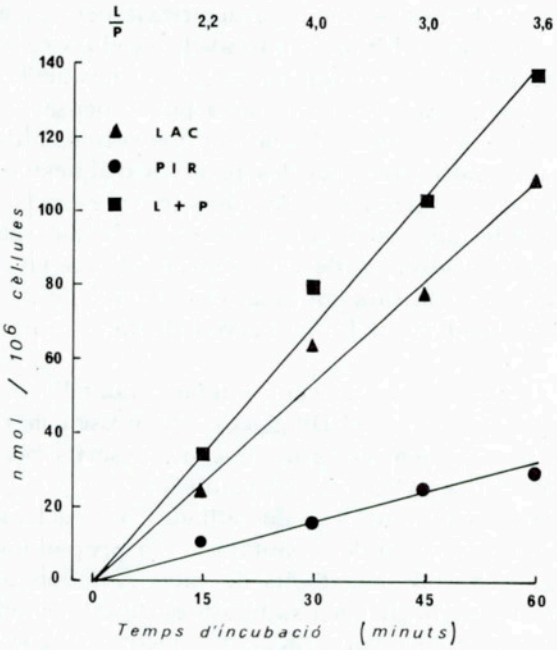


FIG. 6. — Producció de lactat i piruvat en cèl·lules cromafins aïllades. La concentració de glucosa al medi d'incubació era 10 mM. El lactat i el piruvat es varen determinar amb mètodes enzimàtics en alíquotes que s'acidificaven per a deturar la reacció.

DISCUSSIÓ

Partint dels resultats de nivells de glicogen de la medul·la adrenal, hom pot observar la influència de l'espècie animal sobre els nivells d'aquest polisacàrid de reserva. L'elevada dispersió en els nivells de glicogen de medul·la adrenal, tant en bou com en porc i en be, és deguda fonamentalment a la variació individual. Els nivells de glicogen trobats a la medul·la adrenal de bou són significativament inferiors als descrits per al fetge i el múscul de rata i ratolí [14], que, d'altra banda, són teixits caracteritzats pel seu elevat metabolisme del glicogen. Els nivells trobats aquí també són lleugerament inferiors als trobats a les glàndules adrenals senceres de rates alimentades *ad libitum*, però són similars als descrits per al cervell de rata i ratolí [14-18]. Aquest fet ens recorda l'origen neural comú de la medul·la adrenal i el cervell, fet que permet pensar en un cert paral·lelisme respecte al metabolisme del glicogen.

L'activitat de la fosforilasa total de la medul·la adrenal de bou és un

50 % superior a la descrita per al cervell de ratolí i és aproximadament 1/3 de la del fetge de rata —òrgan caracteritzat pel seu actiu i intens metabolisme del glicogen. L'activitat total de la glicogen sintetasa és 2 a 3 vegades superior a la de cervell de ratolí [15, 19]. Les activitats trobades aquí són suficientment elevades com per a poder pensar que els baixos nivells de glicogen a la medulla adrenal del bou sotmès a dejuni podrien ésser deguts a una mobilització de les reserves d'aquest polisacàrid.

L'activitat de la glicogen sintetasa total (en presència de glucosa-6-fosfat) de la medulla adrenal és quasi bé un 50 % més elevada que la trobada en glàndules adrenals de rata senceres [20]. És també inferior a la trobada al cervell de la rata sotmesa a un dejuni de 24 hores [18], però és lleugerament més alta que la del cervell de ratolí alimentat normalment [15, 17, 19].

En l'estudi cinètic de la glicogen sintetasa, hom ha pogut observar que els valors de K_m per a l'UDP-glucosa en presència i absència de glucosa-6-fosfat són del mateix ordre que els descrits per al múscul i el fetge de la rata [21] i per al cervell de ratolí [17].

Quant als experiments amb cèl·lules aïllades, la inactivació de la glicogen fosforilasa i l'activació de la sintetasa són proporcionalment similars a les descrites per als hepatòcits de rates sotmeses a dejuni [22]. La inactivació posterior de la glicogen sintetasa és difícil d'explicar, sobretot tenint en compte que la incorporació de glucosa al glicogen és pràcticament lineal durant tota la incubació. De totes maneres, tractant-se d'un experiment radiomètric, aquesta incorporació pot ésser la conseqüència d'un equilibri entre la síntesi i la degradació del glicogen; també els nivells intracel·lulars de glucosa-6-fosfat podrien atènyer un nivell suficient per a activar la forma D de la glicogen sintetasa. Aquesta possibilitat pot ésser reforçada per la gran velocitat de la glicòlisi anaeròbia observada. Cal assenyalar que la incorporació de glucosa al glicogen ja és saturada a una concentració de glucosa 5 mM en el medi extern.

La incorporació de glucosa al glicogen no és afectada ni per la insulina —característica comuna amb els altres teixits neutrals— ni per la glutamina, cosa que marca una diferència amb el metabolisme hepàtic [13].

De l'oxidació de la glucosa via cicle dels àcids tricarboxílics, que és lineal tot el temps de duració dels experiments, es desprèn que les cèl·lules presenten una bona viabilitat durant la incubació. El fet que aquesta oxidació sigui relativament baixa, concorda amb l'observació microscòpica d'un sistema mitocondrial molt escàs. Aquesta baixa velocitat d'oxidació ha portat a considerar la possibilitat d'una elevada glicòlisi anaeròbia que, en efecte, és responsable de la síntesi del doble d'enllaços rics en energia que la que correspon a l'obtinguda al cicle dels àcids tricarboxílics, i que és 35 vegades més gran per molècula de glucosa consumida.

Davant aquests resultats, hom pot concloure que per a la cèl·lula cromafí deu ésser important disposar d'una certa reserva de glicogen fàcilment mobilitzable per fer front a les situacions d'emergència.

BIBLIOGRAFIA

1. VIVEROS, O. H., ARQUEROS, L. i KIRSHNER, N. — «Life Sci.», 7, 609-618 (1968).
2. WINKLER, H., SCHNEIDER, F. H., RUFENER, C., NAKANE, P. K. i HORTNAGL, H. — A *Advances in Cytopharmacology*, B. CECCARELLI, F. CLEMENTI i J. MELDOLESI, eds., vol. 2, pp. 127-139, Raven Press, New York (1974).
3. SEIFTER, S., DAYTON, S., NOVIC, B. i MUNTWYLER, E. — «Arch. Biophys. Biochem.», 25, 191 (1950).
4. WALAAS, O. i WALAAS, E. — «J. Biol. Chem.», 187, 769 (1950).
5. GOOD, C. A., KRAMER, H. i SOMOGYI, M. — «J. Biol. Chem.», 100, 485 (1933).
6. BERGMEYER, H. U., BERNT, E., SCHMIDT, F. i STORK, H. — A *Methods of Enzymatic Analysis*, H. U. BERGMEYER, ed., pp. 1.196-1.201, Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, Inc., New York i London (1974).
7. MENDICINO, J., ABOU-ISSA, H., MEDICUS, R. i KRATOWICH, N. — A *Methods in Enzymology*, W. A. WOOD, ed., vol. 42, pp. 375-381, Academic Press, New York, San Francisco, London (1975).
8. THOMAS, J. A., SCHLENDER, K. K. i LARNER, J. — «Anal. Biochem.», 25, 486-499 (1968).
9. STALMANS, W. i HERS, H. G. — «Eur. J. Biochem.», 54, 341-350 (1975).
10. BRADFORD, M. M. — «Anal. Biochem.», 72, 248-254 (1976).
11. HUE, L., BONTEMPS, F. i HERS, H. G. — «Biochem. J.», 152, 105-114 (1975).
12. GANCEDO, J. M. i LAGUNAS, R. — «Plant Science Letters», 1, 193-200 (1973).
13. GOLDEN, S., WALS, P. A., OKAJIMA, F. i KATZ, J. — «Biochem. J.», 182, 727-734 (1979).
14. WILLIAMSON, D. H. i BROSNAN, J. T. — A *Methods of Enzymatic Analysis*, H. U. BERGMEYER, ed., pp. 2.267-2.268, Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, Inc., New York i London (1974).
15. WATANABE, H. i PASSONNEAU, J. V. — «J. Neurochem.», 20, 1.543-1.554 (1973).
16. STRANG, R. H. C. i BACHELARD, H. S. — «J. Neurochem.», 18, 1.067-1.076 (1971).
17. PASSONNEAU, J. V., BRUNNER, E. A., MOLSTAD, C. i PASSONNEAU, R. — «J. Neurochem.», 18, 2.317-2.328 (1971).
18. GOLDBERG, N. D. i O'TOOLE, A. G. — «J. Biol. Chem.», 244, 3.053-3.061 (1969).
19. NAHORSKI, S. R. i ROGERS, K. J. — «J. Neurochem.», 23, 579-587 (1974).
20. PIRAS, M. M., BINDSTEIN, E. i PIRAS, M. M. — «Arch. Biophys. Biochem.», 139, 121-129 (1970).
21. STALMANS, W. i HERS, H. G. — «The Enzymes», 9, 309-361 (1973).
22. HUE, L., BONTEMPS, F. i HERS, H. G. — «Biochem. J.», 152, 105-114 (1975).