EFECTE DEL DEJUNI DE 24 HORES SOBRE ELS ENZIMS DEL METABOLISME DELS AMINOÀCIDS AL FETGE I MÚSCUL DE LA RATA

Comunicació presentada el dia 22 de maig de 1980

per

LLUÍS AROLA, ANDREU PALOU, XAVIER REMESAR i MARIÀ ALEMANY

Bioquímica. Facultat de Química. Universitat de Barcelona (Dependències de Tarragona). Tarragona

Bioquímica. Facultat de Ciències. Universitat de Ciutat de Mallorca. Ciutat de Mallorca (Balears)

Fisiologia General. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Barcelona

INTRODUCCIÓ

Els aminoàcids tenen, sens dubte, un paper molt important dins l'homeòstasi energètica del mamífer en situació postprandial [1, 2, 3], tot i que encara cal aclarir molts punts del seu alliberament i utilització principalment entre el múscul per un costat i el fetge i els altres òrgans esplàncnics per l'altre. A les 12 hores de dejuni el múscul ja manifesta un balanç nitrogenat negatiu [4, 5], com a resultat d'un alliberament d'aminoàcids a la sang des d'on són capturats pel fetge que els utilitza per a la gluconeogènesi i per a la producció d'energia; el nitrogen amínic és destinat a la formació d'urea [2, 3, 5]. En aquest sentit, les proteïnes dels teixits perifèrics i també del fetge serveixen de reserva flotant per al subministrament d'esquelets hidrocarbonats d'aminoàcids per al seu consum energètic en moments de penúria energètica.

Els canvis produïts pel dejuni més o menys breu a l'aminograma plasmàtic han estat descrits sovint a la bibliografia [6, 7, 8], encara que són les alteracions en les activitats dels enzims del catabolisme nitrogenat a un costat i l'altre d'aquest sistema de transport els que donen la pauta d'utilització energètica dels aminoàcids. Els nivells hepàtics d'algunes

transaminases [9, 10, 11] han estat estudiats i mostren una certa tendència a augmentar la capacitat degradativa d'aminoàcids amb el dejuni. La funció d'altres enzims clau en el mecanisme de transport i utilització dels aminoàcids en el dejuni breu, fisiològic, no ha estat, però, suficientment estudiada.

En aquest sentit, i de cara a completar la informació sobre el tema, hem estudiat els nivells de l'apartat transaminasa (E.C. 2.6.1.1), la tirosina transaminasa (E.C. 2.6.1.5), l'arginasa (E.C. 3.5.3.1), la glutamat deshidrogenasa (E.C. 1.4.1.3), la glutamina sintetasa (EC. 6.3.1.2) i l'adenilat desaminasa (E.C. 3.4.5.6) al fetge i al múscul estriat, tot correlacionantlos amb els nivells plasmàtics d'urea i aminoàcids essencials i no essencials en rates alimentades i dejunes durant 24 hores.

MATERIALS I MÈTODES

Van utilitzar-se rates femelles de la soca Wistar mantingudes sota condicions degudament controlades [12] amb accés lliure a l'aigua i al menjar habitual. Un grup de vuit animals va ésser utilitzat com a control i un altre grup va ésser sotmès a un dejuni de 24 hores tot eliminant l'aliment (però no l'aigua) de les gàbies.

Els animals van ésser decapitats sota condicions controlades [12] en començar un cicle d'il·luminació. La sang va recollir-se en tubs capil·lars heparinitzats per a la separació del plasma, el qual va ésser desproteïnitzat amb acetona [13] o utilitzat per a la determinació enzimàtica d'urea [14]. Els aminoàcids individuals van ésser determinats a partir de l'extracte desproteïnitzat amb un mètode radioquímic molt sensible [15].

Moments després de sacrificar els animals, es van separar mostres del fetge i del múscul estriat de la pota, les quals van ésser homogeneïtzades en tampó de Krebs-Ringer bicarbonat; s'hi utilitzà un homogeneïtzador mecànic tipus Potter-Elvejhem [16]. L'extracte, filtrat amb una mitja de niló i convenientment diluït, va ésser utilitzat directament per a mesurar les activitats enzimàtiques i per a la determinació del seu contingut en proteïna [17, 18].

L'aspartat transaminasa va valorar-se segons el mètode de Karmen [19] seguint les condicions recentment descrites per BERMEYER i BERNT [20]. La tirosina transaminasa va mesurar-se amb el mètode de Diamondstone [21], modificat i adaptat per GRANNER i TOMKINS [22]. La glutamat deshidrogenasa va ésser mesurada espectrofotomètricament amb el mètode d'Schmidt [23] utilitzant NADH com a coenzim, car és el que dóna una màxima activitat al fetge [23, 24]. La glutamina sintetasa ha estat determinada fent servir, bàsicament, les condicions de reacció descrites per MECKE [25] seguint la formació de γ-glutamilhidroxamat (amb un reactiu

fèrric [26]) a partir de glutamina i hidroxilamina [27, 28]. L'arginasa va mesurar-se amb el mètode d'Schimke [29], i es valorà la urea formada amb el mètode d'Oginski [30]. L'activitat de l'adenilat desaminasa va determinar-se seguint les condicions d'incubació descrites per OGASAWARA *et al.* [31] sota una elevada concentració d'ió potassi [32] i mesurant l'amoníac format amb el mètode de l'indofenol [33, 34]. Els resultats han estat expressats en microkatals per gram de proteïna a fi d'uniformitzar i fer comparables les dades dels diversos enzims.

RESULTATS

A la taula 1 hom pot comprovar els efectes d'un dejuni de 24 hores sobre el pes corporal i sobre la urea i els aminoàcids plasmàtics de la rata. En tots els casos hem observat una disminució estadísticament significativa dels valors dels animals dejuns en relació als que presenten els animals controls. El descens dels nivells d'urea és superior al 40 %, mentre que els dels aminoàcids són de l'ordre del 10 % tant per als essencials com per als no essencials.

A la taula 2 hem representat l'efecte del dejuni de 24 hores sobre les activitats enzimàtiques relacionades amb el metabolisme dels aminoàcids al fetge i múscul de rates alimentades i dejunes, expressades per unitat de pes de proteïna. Hom pot observar que no s'aprecien canvis significatius —sota aquesta expressió— al múscul (excepte l'augment de la glutamina sintetasa), mentre que al fetge els canvis són notables; així, hem observat un increment de l'activitat aspartat transaminasa acom-

TAULA 1. — Pesos corporals i concentracions plasmàtiques combinades d'urea, aminoàcids essencials, no essencials i totals a la rata control i sotmesa a 24 hores de dejuni

Paràmetre	Rates control		Rates dejunes
Pes corporal (g)	183±3	*	162±4
Urea (mM)	10,2±0,5	*	6,3±0,6
Aminoàcids:			
— essencials (mM)	1,59±0,03	*	1,38±0,07
— no essencials (mM)	4,15±0,12	*	3,68±0,13
— totals (mM)	5,73±0,11	*	5,25±0,12

Les dades corresponen a la mitjana ± E.T. de vuit animals per grup.

* $p<0,05$ entre controls i dejunts.

TAULA 2. — Activitats enzimàtiques relacionades amb el metabolisme dels aminoàcids al fetge y al múscul de rates control i sotmeses a 24 hores de dejuni

Enzim	Fetge		Múscul	
	Alimentades	Dejunes	Alimentades	Dejunes
Asp-transaminasa	9,6±0,5	12,1±0,4 *	9,5±0,7	10,2±0,5
Tyr-transaminasa	0,29±0,03	0,15±0,01 *	0,021±0,001	0,018±0,001
Arginasa	116±10	82±9 *	no detectable	no detectable
AMP-desaminasa	0,37±0,03	0,23±0,02 *	33,7±3,2	38,4±2,0
Glu-deshidrogenasa	12,0±0,7	10,2±0,5	0,37±0,04	0,27±0,03
Gln-sintetasa	0,12±0,01	0,07±0,01 *	0,017±0,001	0,023±0,002 *

Les dades corresponen a la mitjana ± E.T. de vuit animals per grup.
Tots els valors estan expressats en microkatals per gram de proteïna al teixit.

* $p<0,05$ entre controls i dejuns.

panyada d'un descens en les activitats de la tirosina transaminasa, arginasa, adenilat desaminasa i glutamina sintetasa; no s'observaren canvis significatius en la glutamat deshidrogenasa hepàtica.

Discussió

La funció de les transaminases al fetge, quant a la reorganització del nitrogen amínic, és ben coneguda, especialment pel que fa a l'aspartat transaminasa, que també intervé en el transport d'oxalacetat a través de la membrana mitocondrial. L'activitat específica d'aquest enzim és del mateix ordre al fetge i al múscul [35], i passa a una situació diferent després de 24 hores de dejuni, amb uns nivells més elevats al fetge. Si tenim en compte, però [36], que la grandària del múscul de la rata és unes 9-10 vegades més gran que el del fetge, arribaríem a conclusions diferents [16]. En qualsevol cas, al fetge hi ha un augment del 85 % i al múscul de sols un 25 %, indicant la funció reguladora de l'enzim a ambdós teixits com a equilibradora dels nivells d'aspartat i de glutamat. La tirosina transaminasa, en canvi, té un paper molt secundari com a subministrador de substrats energètics; el descens que mostra l'enzim hepàtic està d'acord amb altres autors [37, 38] i amb la necessitat de conservar el nitrogen amínic, especialment el dels aminoàcids essencials o semiessencials com la tirosina. Malgrat això, els aminoàcids essencials mostren un descens significatiu al plasma, ja que el descens en la seva utilització no és suficient per a contrarestar la manca d'ingrés de proteïnes en la dieta. Al múscul, els nivells de tirosina transaminasa són molt baixos i tenen escàs significat fisiològic, car aquesta activitat pot ser deguda a la mateixa aspartat transaminasa, que actua, sembla ésser, també sobre la tirosina [39]. Una manca de significació similar es pot atribuir a l'arginasa muscular, indetectable amb el mètode utilitzat. L'activitat de l'arginasa hepàtica, però, és enorme (20 mkatals/kg de teixit) i excedeix considerablement els nivells limitants per al funcionament del cicle de la urea. Amb el dejuni sofreix un fort descens [40] relacionat amb la necessitat de conservar nitrogen amínic [5] que dóna lloc a un fort descens als nivells circulants d'urea en disminuir l'activitat de la ruta de síntesi [41].

No hem observat canvis importants en l'activitat de la glutamat deshidrogenasa amb el dejuni, d'acord amb altres autors [10], cosa que pot ésser interpretada com una conseqüència de la funció fisiològica d'aquest enzim, més proper a la síntesi de glutamat que a la seva degradació [42] i que fa que no tingui sentit una variació de la seva activitat amb el dejuni, com hem comprovat aquí; aquest comportament remarca encara més que el glutamat no és catabolitzat via aquest enzim, sinó mitjançant la seva transaminació [43].

L'adenilat desaminasa té una funció molt important al múscul com a productor d'amoníac en situacions catabòliques, la qual cosa sembla que serveix per a neutralitzar l'acidosi que la glucòlisi produeix [32]. Com que el funcionament del cicle del purin-nucleòtid està relacionat amb la glucòlisi [44] i aquesta ho està encara més fortament amb l'activitat muscular en lloc d'estar-ho amb el dejuni, no observem canvis importants en l'activitat de l'enzim muscular. Al fetge, però, el descens de l'activitat adenilat desaminasa cal interpretar-lo com un sistema d'estalvi de nitrogen amínic, que així no es mineralitza [1] —d'acord també amb la manca de canvis de la glutamat deshidrogenasa discutida anteriorment.

El múscul és un òrgan alliberador net de glutamina [45], especialment durant el dejuni [46]; el fetge també ho és, però proporcionalment (respecte a tot l'animal) aquesta activitat és relativament poc important [5]. En condicions de dejuni, el múscul incrementa la seva capacitat exportadora de nitrogen amídic en forma de glutamina, com hem observat, mentre que el fetge la disminueix, especialment per manca de reserves energètiques que li permetin reutilitzar un altre cop el nitrogen mineralitzat per altres enzims, i especialment pel fort predomini general dins el llit esplàncnic de les glutaminases per sobre de la síntesi de glutamina en condicions de dejuni [47].

En conjunt, el quadre de canvis indicat està d'acord amb una forta utilització dels aminoàcids generats endògenament a partir de la proteòlisi, més marcada durant el dejuni al fetge i múscul que als altres teixits, i que generen una elevada quantitat d'aminoàcids que són utilitzats fonamentalment al fetge i que li arriben dels teixits perifèrics a través de la sang [5], tot tractant de conservar al màxim el nitrogen amínic dels aminoàcids [1], amb la qual cosa s'arriba al compromís d'utilització i conservació parcials que hom troba en períodes curts de dejuni, com és ara l'estudiat.

BIBLIOGRAFIA

1. CAHILL, G. F., Jr. — «New Eng. J. Med.», 282, 668 (1970).
2. FELIG, P. — «Metabolism», 22, 179 (1973).
3. FELIG, P. — «Am. J. Nutr.», 26, 998 (1973).
4. LONDON, D. R., FOLEY, T. H. i WEBB, C. G. — «Nature», 280, 588 (1965).
5. AIKAWA, T., MATSUTAKA, H., YAMAMOTO, H., OKUDA, T., ISHIKAWA, E., KAWANO, T. i MATSUMURA, E. — «J. Biochem.» (Tokyo), 74, 1.003 (1973).
6. ADIBI, S. A. — «Am. J. Physiol.», 221, 829 (1971).
7. METZGER, B. E., HARE, J. W. i FREINKEL, N. — «J. Clin. Endocrin.», 33, 869 (1971).
8. PALOU, A. — Tesi doctoral. Universitat de Barcelona (1980).
9. METZGER, B. E., AGNOLI, F. S., HARE, J. W. i FREINKEL, N. — «Diabetes», 22, 601, (1973).
10. KARL, I. E., GARBER, A. J. i KIPNIS, D. M. — J. Biol. Chem.», 251, 844 (1976).
11. ROSEN, F., ROBERTS, N. R. i NICHOL, C. A. — «J. Biol. Chem.», 234, 476 (1959).
12. AROLA, Ll., PALOU, A., REMESAR, X., HERRERA, E. i ALEMANY, M. — «Arch. Int. Physiol. Biochem.», en premsa (1980).

13. AROLA, Ll., HERRERA, E. i ALEMANY, M. — «Anal. Biochem.», 82, 236 (1977).
14. FAWCETT, J. K. i SCOTT, J. E. — «J. Clin. Pathol.», 13, 156 (1960).
15. AROLA, Ll., PALOU, A., HERRERA, E. i ALEMANY, M. — «Biochimie», 58, 1.221 (1976).
16. AROLA, Ll., PALOU, A., REMESAR, X., HERRERA, E. i ALEMANY, M. — «Rev. Esp. Fisiol.», 34, 345 (1978).
17. LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, J., FARR, A. L. i RANDALL, R. J. — «J. Biol. Chem.», 193, 265 (1951).
18. HANG, C. S. i SMITH, L. R. — «Anal. Biochem.», 63, 414 (1975).
19. KARMEN, A. — «J. Clin. Invest.», 34, 131 (1955).
20. BERGMEYER, H. U. i BERNT, E. — A *Methods of enzymatic analysis*. H. U. BERGMEYER, ed., Academic Press, New York, p. 752 (1974).
21. DIAMONDSTONE, H. L. — «Anal. Biochem.», 16, 395 (1966).
22. GARNER, D. K. i TOMKINS, G. M. — A *Methods in Enzymology*. S. P. COLOWICK i N. O. KAPLAN, eds., Academic Press, New York, p. 633 (1970).
23. SCHMIDT, E. — A *Methods of enzymatic analysis*. H. U. BERGMEYER, ed., Academic Press, New York, p. 650 (1974).
24. AROLA, Ll., PALOU, A., REMESAR, X. i ALEMANY, M. — «IRCS Med. Sci.», 7, 364 (1979).
25. MECKE, D. — A *Methods of enzymatic analysis*. H. U. BERGMEYER, ed., Academic Press, New York, p. 1.716 (1974).
26. IQBAL, K. i OTTAWAY, J. H. — «Biochem. J.», 119, 145 (1970).
27. WEBB, J. T. i BROWN, G. W. — «Comp. Biochem. Physiol.», 45, 867 (1967).
28. WOOLFOLK, C. A., SHAPIRO, B. i STADTMAN, E. R. — «Arch. Biochem. Biophys.», 116, 177 (1966).
29. SCHIMKE, R. T. — A *Methods in enzymology*. S. P. COLOWICK i N. O. KAPLAN, eds., Academic Press, New York, 17, 313 (1970).
30. OGINSKY, E. L. — A *Methods in enzymolgoy*. S. P. COLOWICK i N. O. KAPLAN, eds., Academic Press, New York, 3, 92 (1970).
31. OGASAWARA, N., GOTO, H., WATANABE, T., KAWAMURA, Y. i YOSHINO, M. — «FEBS Lett.», 44, 63 (1975).
32. LOWENSTEIN, J. M. — «Physol. Rev.», 52, 382 (1972).
33. BERTHELOT, M. P. E. — «Report. Clin. Appl.», 1, 284 (1859).
34. FAWCETT, J. K. i SCOTT, J. E. — «J. Clin. Pathol.», 13, 156 (1960).
35. ZIMMERMAN, H. J., DUJOUNE, C. A. i LEVY, R. — «Comp. Biochem. Physiol.», 25, 1.081 (1968).
36. AROLA, Ll., HERRERA, E. i ALEMANY, M. — «Rev. Esp. Fisiol.», 35, 215 (1979).
37. LICHTENSTEIN, M. J., POTTER, VAN R. i HARPER, A. E. — «J. Nutr.», 104, 1.356 (1974).
38. SAPICO, V., SHEAR, L. i LITWACK, G. — «J. Biol. Chem.», 249, 2.122 (1974).
39. MILLER, J. E. i LITWACK, G. — «J. Biol. Chem.», 246, 3.234 (1971).
40. FREEDLAND, R. A. i SODIKOFF, C. H. — «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», 109, 394 (1962).
41. KNOX, W. E. i GREENGARD, O. — «Adv. Enzyme Regulat.», 3, 247 (1965).
42. SMITH, E. L., AUSTEN, B. M., BLUMANTHAL, K. M. i NYC, J. F. — A *The enzymes*. P. D. BOYER, ed., Academic Press, New York, 11, 293 (1975).
43. DEHAAN, E. J., TAGER, J. M. i SLATER, E. C. — «Biochim. Biophys. Acta», 131, 1, (1967).
44. WINDER, W. W., TERJUNG, R. L., BALDWIN, K. M. i HOLLOSZY, J. O. — «Am. J. Physiol.», 227, 1.411 (1974).
45. GARBER, A. J., KARL, I. E. i KIPNIS, D. M. — «J. Biol. Chem.», 251, 836 (1976).
46. MARLISS, E. B., AOKI, T. T., POZEFSKI, T., MOST, A. S. i CAHILL, G. F. — «J. Clin. Invest.», 50, 814 (1971).
47. PITTS, R. F., PILKINGTON, L. A., MACLEOD, M. B. i LEAL-PINTO, E. — «J. Clin. Invest.», 51, 557 (1972).