



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO CROMATOGRAFICO DE LOS AMINO-
ACIDOS DEL HIGADO DE LA RATA NORMAL
Y DE LA RATA EN HIPO E HIPERGLUCEMIA**

T E S I S
QUE PARA OPTAR AL TITULO DE
B I O L O G O
PRESENTA LA SEÑORITA
BERTHA GLORIA ORTEGA CORONA

MEXICO, D. F.
1 9 6 0

1 1 2 0



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Agradezco muy especialmente
al Sr. Dr. D. Roberto Llamas
el haberme permitido realizar
este trabajo en el laboratorio
de Bioquímica del Instituto de
Biología, y su valiosa coopera-
ción en el desarrollo del mismo.*

*Con mi más sincera admiración
y agradecimiento al Sr. Dr.
D. Guillermo Massieu.*

A mis Maestros

*A la Memoria de mi Padre
A mi adorada Madre*

*A mi hermana Carmela con
todo cariño.*

A mis hermanos

Al Sr. M. F. Bárcenas

Al Sr. L. Villarreal

C A P I T U L O S

I.—INTRODUCCION.

II.—MATERIALES Y METODOS.

III.—RESULTADOS.

IV.—DISCUSION.

V.—CONCLUSIONES.

VI.—REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

CAPITULO I

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Se ha comprobado que en el tejido hepático de diversos animales existen cantidades elevadas de aminoácidos libres, especialmente de los ácidos glutámico y aspártico, glutamina y alanina, que toman parte activa en su metabolismo (2, 5, 6, 10). Los aminoácidos mencionados pueden transaminarse y desaminarse oxidativamente y en el caso especial del ácido glutámico se puede transformar en glutamina por adición de amoníaco (21). El mantenimiento de los niveles normales de los aminoácidos libres del hígado esta sujeto a mecanismos complejos, en donde juegan un papel importante varios sistemas enzimáticos.

Se ha demostrado que diversas condiciones experimentales pueden afectar las concentraciones de los aminoácidos libres del hígado, como por ejemplo el ayuno (30, 36), el ejercicio (32), la cantidad de la proteína ingerida (36) y la hipoglucemia insulínica (5, 6, 10).

En relación al efecto de la insulina sobre los niveles de las sustancias mencionadas existen discrepancias en la literatura científica ya que mientras Dawson (10) encontró que en el coma hipoglucémico insulínico bajan las concentraciones del ácido glutámico y glutamina libres, Castro (5, 6) en condiciones experimentales similares encontró elevación del ácido glutámico, del ácido aspártico y de otros aminoácidos.

Luck y colaboradores (11, 14, 19) encontraron que la adrenalina tiene un efecto depresor de la aminoacidemia similar al descrito en el caso de la insulina. En ambos ca-

Los dicho efecto es reflejo de lo que sucede en los tejidos (18). Luck y colaboradores (19) emitieron la hipótesis de que la acción de la insulina (hipoaminoacidemia) podría ser indirecta y más bien un resultado de la estimulación al sistema adreno-hipofisario, de tal manera que la adrenalina sería en realidad la responsable de la baja de aminoácidos circulantes, ya que la insulina no tiene efecto en el animal adrenalectomizado y en cambio la adrenalina si lo tiene en este tipo de animal (14).

El propósito del presente trabajo fue por un lado resolver la discrepancia entre los datos de Dawson y Castro y por otro investigar si la adrenalina tiene efectos sobre los niveles de algunos aminoácidos libres del hígado, en especial sobre los ácidos glutámico y aspártico, glutamina y alanina. Una indicación adicional de que esta hormona altera algunas reacciones que vinculan el metabolismo de los carbohidratos con el de los aminoácidos, son las observaciones de Villano y Tritto (31) de que eleva los niveles de algunos intermediarios del ciclo de Krebs en la sangre, las de Highman y colaboradores (15) referentes a su efecto sobre algunas transaminasas séricas y las de Craig (8) relativas a su acción incrementadora de los niveles de cetoácidos y ácido láctico en hígado perfundido.

Los datos que se presentan aquí se obtuvieron utilizando ratas, *Rattus rattus norvegicus* variedad *albina*, como animal de experimentación y el análisis de los aminoácidos se realizó por separación cromatográfica cuantitativa en papel filtro.

CAPITULO II
MATERIALES Y METODOS

PARTE EXPERIMENTAL

En este estudio se utilizaron 39 ratas machos cuyo peso varió entre 130-150 g., procedentes de la colonia de la División de Investigación Biológica (Industria Química Farmacéutica Nacional), que se mantuvieron en la granja del Instituto de Biología durante 10 a 15 días con dieta uniforme "*ad libitum*" (Purina Laboratory Chow), antes de llevar a cabo los experimentos.

Preparación del tejido.—Experimentos preliminares mostraron que la preparación del tejido, previamente al análisis de los aminoácidos, tiene una influencia considerable sobre la estabilidad de estas sustancias. Algunos de los autores que han realizado análisis de aminoácidos libres en hígado (1, 2, 5, 6) no especifican como preparan el tejido ni que precauciones toman. De los autores consultados únicamente Dawson señala que los órganos de los animales fueron congelados con aire líquido. En nuestro caso no se disponía de aire líquido y se ensayó una mezcla de acetona-hielo seco a una temperatura aproximada de -70°C , en el seno de la cual se congelaron los hígados inmediatamente después de su extracción, manteniéndolos en inmersión durante 2 minutos. El tiempo transcurrido entre la disección del órgano y la congelación fue de 30 segundos aproximadamente. Como el paso previo a la extracción de los aminoácidos fue su homogeneización con alcohol al 80%, la medición de la cantidad conveniente de hígado se hizo estando todavía éste congelado. El procedimiento des-

crito se comparó con otro en donde no se congeló el tejido, habiendo pesado en este caso la cantidad conveniente del órgano tal como se obtuvo de la disección, después de limpiarlo de sangre contaminante. En este caso el tiempo invertido entre la disección y su homogeneización en alcohol fue de aproximadamente entre 3 y 4 minutos.

Los dos procedimientos mencionados se compararon en un lote de 12 ratas, en 6 de las cuales se utilizó el procedimiento de congelación con acetona-hielo seco y en las otras 6 el método que no utiliza congelación.

Método de extracción de los aminoácidos.—Como se mencionó antes el primer paso consistió en una homogeneización del tejido con 12 a 15 volúmenes de alcohol al 80%, con lo cual se precipitan las proteínas; posteriormente se centrifuga el precipitado y se lava con dos porciones de 1 a 2 ml. de alcohol al 80%. Generalmente se utilizaron 2 g. de tejido. Los pasos siguientes corresponden al procedimiento de Awapara (1) y consisten en agregar al extracto alcohólico 3 volúmenes de cloroformo, agitarlo por espacio de 15 minutos y centrifugarlo finalmente a 2000 r.p.m. por 15 minutos. Con este procedimiento se eliminan los lípidos del extracto y se separa el extracto acuoso que contienen los aminoácidos, el cual puede concentrarse 5 ó 10 veces según convenga para el análisis posterior.

Experimentos con insulina.—Se utilizó un grupo de 16 ratas que a su vez se subdividió en dos subgrupos, cada uno de ocho animales. Las ratas se sometieron a un ayuno previo de 12 a 16 horas al término del cual se inyectó por vía subcutánea a cada rata del primer subgrupo con una solución de insulina simple Lilly de manera que recibiese 20 unidades por kilogramo de peso. A cada uno de los animales del segundo subgrupo se les inyectó el mismo volumen de agua destilada. Cuando aparecieron síntomas francos de coma hipoglucémico e inclusive convulsiones, los animales del grupo de los tratados con insulina se sacrificaron por decapitación, recogiendo en ese momento una

muestra de sangre en un tubo conteniendo oxalato de sodio. Paralelamente se sacrificaron los testigos en la misma forma y también se obtuvieron las muestras de sangre correspondientes.

Inmediatamente después del sacrificio de los animales se extrajo el hígado y se congeló en mezcla de acetona-hielo seco tal como se ha descrito antes. Los extractos libres de proteínas y de lípidos se obtuvieron de acuerdo con la técnica de Awapara (1) descrita también arriba.

Experimentos con adrenalina.—Se utilizó un grupo de 11 ratas sin someterlas a ayuno previo que se subdividió a su vez en dos subgrupos, uno de 6 animales y otro de 5. A las ratas del primer subgrupo se les inyectó por vía subcutánea con 0.13 a 0.15 ml. de una solución de adrenalina conteniendo 1 mg./ml., (dosis correspondiente a 1 mg./Kg.), preparada en el momento de utilizarse y ajustada a un pH de 3 aproximadamente. A los animales del grupo testigo se les inyectó volúmenes similares de una solución al 0.9% de NaCl ajustada a un pH de 3 por adición de HCl.

Los animales tratados con adrenalina se sacrificaron entre 1 $\frac{3}{4}$ y 2 horas y al mismo termino se fueron sacrificando los animales testigos.

El sacrificio de los animales se hizo por decapitación como en el caso de los experimentos con insulina y se obtuvieron asimismo muestras de sangre para el análisis de la glucemia.

Cabe hacer notar que los animales tratados con adrenalina no mostraron signos de choque a pesar de lo elevado de la dosis y sólo se manifestó en ellos una ligera depresión.

Análisis de los aminoácidos libres.—En los extractos libres de proteínas y de lípidos se hizo una separación de los aminoácidos por cromatografía bi-dimensional en papel filtro Whatman No. 1, utilizando como primer solvente fenol al 80% y como segundo solvente butanol-ácido acético-agua (4: 1: 1). El fenol que se utilizó fue el reactivo químicamen-

te puro que se redestiló a presión reducida junto con polvo de zinc de acuerdo con lo recomendado por Williams y Kirby (33). Después de haber corrido las muestras en fenol, el exceso de éste se eliminó por aereación a temperatura ordinaria entre 36 y 48 horas y el mismo procedimiento se siguió una vez que corrieron en el segundo solvente.

La localización de los aminoácidos en el cromatograma se hizo mediante la aplicación de una solución de ninhidrina al 0.05% en butanol saturado con agua y comparando las posiciones de estas sustancias por medio de su R_f con las que se localizaron en cromatogramas patrón. Para asegurarse de la posición de los aminoácidos que nos interesaba cuantificar se hicieron pruebas de recuperación añadiendo cantidades conocidas de estos extractos de hígado y comprobando si había la intensificación proporcional del color desarrollado con ninhidrina en las posiciones correspondientes.

La cuantificación de los aminoácidos en el cromatograma se realizó siguiendo en lo general la técnica de Naf-talin (23) con ligeras modificaciones.

En este procedimiento se recorta la zona en donde se encuentre el aminoácido que se desea estimar, con el margen adecuado, se reduce a fragmentos pequeños y se identifica el color por medio de una solución concentrada de ninhidrina. El compuesto colorido se extrae con solución de acetona al 75%, leyéndose finalmente a 570 ó 600 μm . en el fotocolorímetro adecuado. Los valores obtenidos se comparan con los de las curvas patrón. La descripción detallada del método es la siguiente:

- 1.—Revelar el cromatograma mediante solución débil de ninhidrina al 0.05% en butanol saturado con agua, calentando a 80°C durante 5 minutos.
- 2.—Recortar la zona ocupada por el aminoácido con el margen conveniente.
- 3.—Reducir a fragmentos pequeños el papel filtro, pa-

sarlos a un tubo de ensaye y agregar 0.05 ml. de una solución de ninhidrina al 5% en butanol saturado con buffer de fosfatos 0.1 M de pH 7.

- 4.—Calentar en baño de agua 5 minutos a 55°C y posteriormente 2 minutos más a 83°C.
- 5.—Dejar enfriar 5 a 10 minutos y agregar la cantidad conveniente de acetona al 75% (de 4 a 6.5 ml. según el tipo de fotocolorímetro o espectrofotómetro a 570 μ m que se use) agitar varias veces hasta que se haya extraído todo el compuesto colorido.
- 6.—Eliminar de los tubos el papel filtro y leer en fotocolorímetro o espectrofotómetro a 570 μ m. Se puede leer a 600 μ m.

Los valores de densidad óptica encontrados se comparan con los obtenidos en curvas patrón de los aminoácidos. Estas curvas se desarrollaron en papel tratado en la misma forma que en el caso de las muestras. Con cada lote de éstas se introdujo una curva patrón de cada aminoácido.

Análisis de nitrógeno de aminoácidos totales.—Se estimó en los extractos de hígado por el procedimiento de Frame, Russell y Wilhelmi (12). Este método se basa en la combinación de los grupos de nitrógeno, amínico, con el ácido naftoquinon sulfónico en solución alcalina, formándose compuestos coloridos naranja-rojizos al pasarlos a medio ácido, que se pueden determinar colorimétricamente.

Análisis de la glucemia.—La glucosa sanguínea se estimó en submuestras de sangre oxalatada de 0.1 ml., por la modificación de Nelson (24) al método de Somogyi.

Peso seco del hígado.—En cada muestra se estimó por desecación de una porción representativa a 100 - 110° hasta peso constante.

CAPITULO III

RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados de los experimentos descritos se consignan en las figuras 1 y 2, en las tablas I a VI y en las gráficas 1 y 2.

En la figura 1 se representa esquemáticamente un cromatograma patrón de una mezcla de aminoácidos conocidos, en el sistema fenol al 80% —butanol— ácido acético-agua, por la técnica descendente. En la figura 2 se representa esquemáticamente un cromatograma de aminoácidos libres del hígado de la rata, corrido en el mismo sistema de solventes y revelado con solución de ninhidrina al 0.05% en butanol saturado con agua. Tres de las manchas no fueron identificadas (A, B y C) y no se puso especial empeño en ello por caer fuera del propósito de este trabajo. Del resto de los aminoácidos solamente se estimaron cuantitativamente los ácidos glutámico y aspártico, alanina y glutamina por estar relacionados metabólicamente en forma más estrecha, los Rf de los diferentes aminoácidos estan señalados en las figuras mencionadas.

En la tabla I se consignan las cifras encontradas en los hígados de las ratas cuando se utilizó congelación en acetona-hielo seco en comparación con aquellas que se encontraron cuando no se utilizó dicho procedimiento.

Se puede observar que hay cambios en los niveles del ácido glutámico y la glutamina entre los hígados congelados con acetona-hielo seco y los no congelados. Estas diferencias son significantes en los dos casos.

En las tablas II y III se expresan las concentraciones de los ácidos glutámico y aspártico, alanina y glutamina libres del hígado en mg. por 100 g. de tejido húmedo, en las ratas de los diversos experimentos. Se consigna también la desviación "standard" en cada caso (26).

Para comparar de una manera más objetiva las diferencias entre las concentraciones de los aminoácidos libres en el hígado, de los animales testigo y de los tratados ya sea con insulina o con adrenalina, se presentan también las gráficas 1 y 2. En éstas se expresan los niveles de los aminoácidos en por ciento, de los niveles de los testigos respectivos.

En la tabla II y gráfica 1 se observa que, como consecuencia del coma hipoglucémico insulínico, los niveles de los cuatro aminoácidos analizados disminuyen notablemente hasta un 60% o más en los casos de la glutamina y la alanina. Las diferencias son estadísticamente significantes cuando se aplica la prueba "t" (9). En lo que se refiere a ácido glutámico y glutamina los resultados que aquí se obtuvieron están de acuerdo con las observaciones de Dawson (10) en experimentos similares y en cambio discrepan con los de Castro (5, 6). La concentración de aminoácidos libres totales de hígado disminuyen también durante el choque insulínico aunque no en la misma proporción que los aminoácidos libres individualmente señalados.

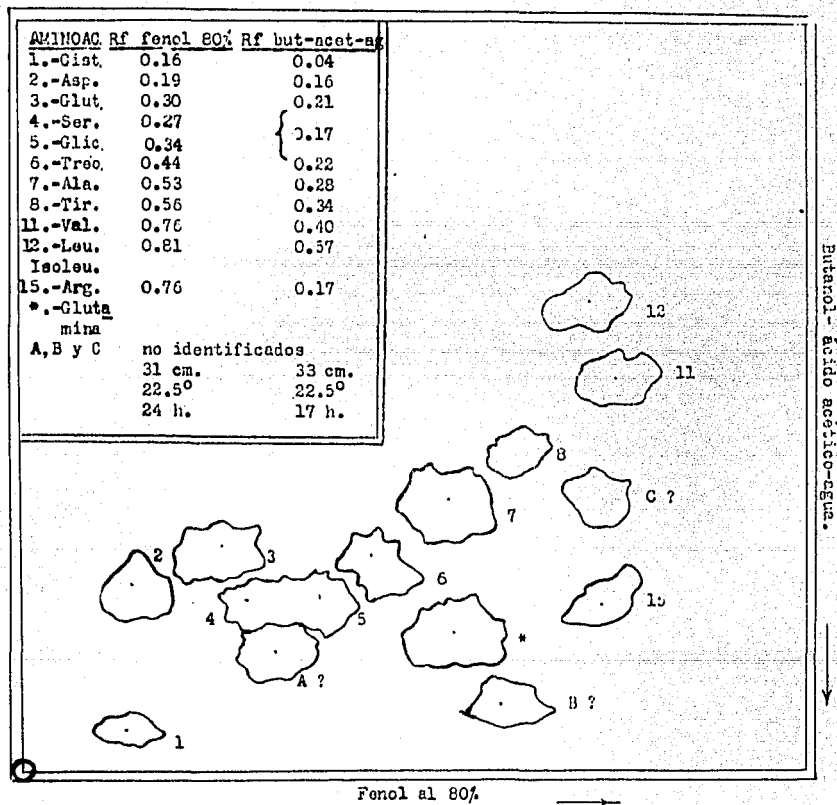
En la tabla III y en la gráfica 2 se puede notar que en los hígados de los animales tratados con adrenalina se observan cifras más bajas de ácido glutámico, glutamina, ácido aspártico y aminoácidos totales, cuando se comparan con los niveles que se encontraron en los animales testigos. Las diferencias señaladas son altamente significantes desde el punto de vista estadístico en los casos de ácido glutámico y glutamina, cuando se aplica la prueba "t". ~~Las diferencias son menos significantes en los casos de ácido aspártico y aminoácidos totales.~~ La concentración de alanina libre del hígado no se afectó por el tratamiento de adrenalina.

Como era de esperarse los animales sometidos al cho-

que insulínico mostraron cifras muy bajas de glucemia, como puede observarse en la tabla IV. Es conveniente hacer notar que en el método de Nelson-Somogyi que se usó para determinar la glucemia se obtienen cifras más bajas que con otras técnicas como por ejemplo la de Folin. Esta diferencia puede ser hasta del 100 por ciento según Bumberg y colaboradores (4), cuando la glucemia es muy baja, pero estos autores señalan que la técnica de Nelson-Somogyi es con la que se obtienen los valores reales de glucosa.

En la tabla V se anotan los valores de glucemia de los animales tratados con adrenalina, en el momento de sacrificarlos, en comparación con la obtenida en los testigos. Se observa una clara hiperglucemia de aproximadamente un 200 por ciento debida a la acción de la hormona, en todos los animales tratados.

Tanto en los animales tratados con insulina como en los tratados con adrenalina, no se produjeron cambios en el contenido de agua del hígado como puede verse en la tabla VI.



Esquema de un cromatograma de los aminoácidos libres de hígado de rata corrido por la técnica bi-dimensional (fenol-but.ác. acet.-agua).

T A B L A I

Efecto de la congelación con mezcla de acetona-hielo seco de ratas normales sobre la retención de los aminoácidos glutámico del hígado. (Ver el texto) ¹

| ANIMAL | HIGADOS SIN CONGELAR | | | | | ANIMAL | I | |
|--------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|------------|------------|--------------------------|------------------------------|----------------|
| | AMINO ACI- DOS TOTALES | ACIDO GLUTAMICO | ACIDO ASPARTICO | GLUTAMINA | ALANINA | | AMINO ACI- DOS TOTALES | ACID GLUTAI |
| 1 | 42.6 | — | — | 59.0 | 35.3 | 7 | 45.0 | 62. |
| 2 | 47.1 | 47.3 | — | — | 43.0 | 8 | 52.6 | 62 |
| 3 | 47.4 | 36.2 | 7.1 | 57.6 | 29.3 | 9 | 41.0 | 56. |
| 4 | 44.4 | 42.9 | 8.8 | 59.7 | 20.7 | 10 | 43.3 | 63. |
| 5 | 59.2 | 36.9 | 8.2 | 53.1 | 23.3 | 11 | 46.3 | 73 |
| 6 | — | — | 5.8 | — | 24.2 | 12 | 45.9 | 63. |
| FROMMEDIO | 48.1 | 40.8 | 7.5 | 57.4 | 29.8 | PROMEDIO | 45.7 | 63. |
| DESVIACION "STANDARD" | + — 5.8 | + — 4.6 | + — 1.2 | + — 2.6 | + — 6.7 | DESVIACION "STANDARD" | + — 3.56 | + — 5. |
| | | | | | | t | 0.8 | 6. |
| | | | | | | P | 40.5 | 0. |

1.—Las cifras se expresan en mg. del amino ácido por 100 g. de tejido húmedo.

y aspártico, alanina y glutamina libres:

HIGADOS CONGELADOS

| NO MICO | ACIDO ASPARTICO | GLUTAMINA | ALANINA |
|------------|--------------------|-----------|---------|
| 7 | — | 66.3 | 31.5 |
| 9 | 6.5 | 72.3 | 26.2 |
| 3 | 5.6 | 60.6 | — |
| 2 | 6.9 | 60.4 | — |
| 3 | — | 63.8 | — |
| 6 | 8.1 | 70.2 | — |
| 8 | 6.7 | 67.4 | 28.9 |
| 7 | + — | + — | 4.8 |
| 7 | 0.87 | 9.1 | — |
| 001 | 0.5 | 0.001 | — |

T A B L A I I

Comparación entre niveles de amino ácidos libres del hígado (ácido glutámico y ácido aspártico, glutamina y alanina) de animales con y sin insulina. (Ver el texto). ¹

| ANIMAL | | TESTIGOS | | | | | ANIMAL | | TR |
|--------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|-------------|------------|--------------------------|------------------------------|----------------|----|
| | AMINO ACI- DOS TOTALES | ACIDO GLUTAMICO | ACIDO ASPARTICO | GLUTAMINA | ALANINA | | AMINO ACI- DOS TOTALES | ACID GLUTAM | |
| 1 | 60.2 | 33.0 | 10.8 | 66.8 | — | 5 | 44.9 | 21.0 | |
| 2 | 57.0 | 31.9 | 13.9 | 81.7 | 13.5 | 6 | 40.8 | 20.0 | |
| 3 | 52.1 | 51.4 | 10.3 | 93.6 | 16.4 | 7 | 42.9 | 18.0 | |
| 4 | 61.8 | 27.8 | 10.2 | 90.3 | — | 8 | 43.1 | 17.0 | |
| 1 b | 62.8 | 24.6 | 14.2 | 90.4 | — | 5 b | 50.1 | 21.0 | |
| 2 b | 54.2 | 26.1 | 11.8 | 81.5 | 10.4 | 6 b | 47.4 | 18.0 | |
| 3 b | 62.2 | 36.0 | 12.5 | 108.5 | 13.0 | 7 b | 43.5 | 17.0 | |
| 4 b | 59.0 | 29.5 | 10.9 | 69.2 | — | 8 b | — | 20.0 | |
| PROMEDIO | 58.7 | 32.5 | 11.8 | 85.2 | 13.3 | PROMEDIO | 44.7 | 19.0 | |
| DESVIACION "STANDARD" | + — 3.5 | + — 8.1 | + — 1.4 | + — 12.7 | + — 2.1 | DESVIACION "STANDARD" | + — 2.9 | + — 1.0 | |
| | | | | | | t | 7.68 | 4.0 | |
| | | | | | | P | 0.001 | 0.0 | |

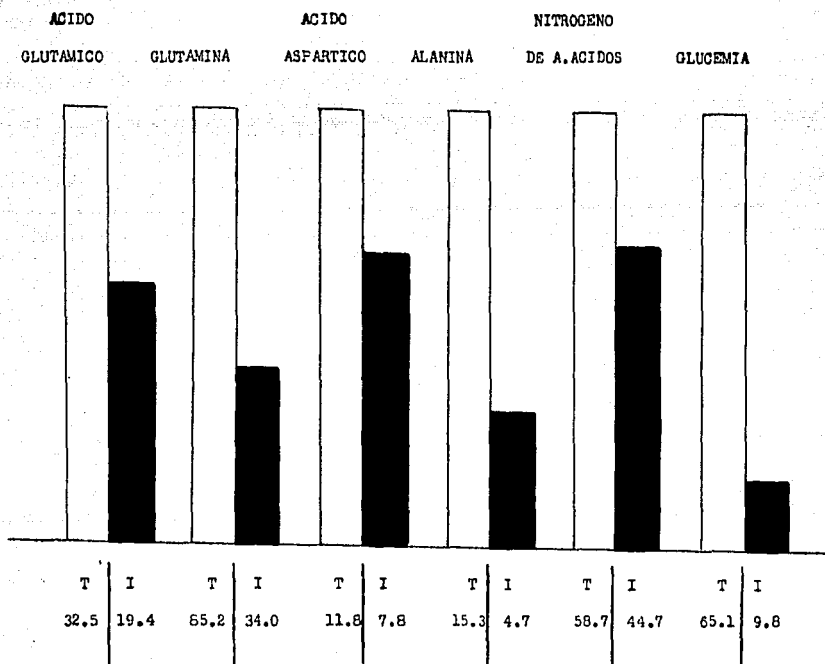
1.—Las cifras se expresan en mg. del amino ácido por 100 g. de tejido húmedo.

animales testigo y de animales tratados

TRATADOS CON INSULINA

| NO MICO | ACIDO ASPARTICO | GLUTAMINA | ALANINA |
|------------|--------------------|----------------|----------------|
| 9 | 6.4 | 32.9 | 1.1 |
| 1 | 9.7 | 31.5 | — |
| 3 | 9.2 | 51.1 | 1.0 |
| 4 | 8.1 | 31.5 | — |
| 3 | 7.0 | 37.2 | 1.0 |
| 1 | 7.1 | 33.3 | 10.1 |
| 3 | — | 31.1 | — |
| 0 | 7.5 | 23.6 | — |
| 1 | 7.9 | 34.0 | 3.6 |
| 36 | \pm — 1.11 | \pm — 7.4 | \pm — 3.9 |
| 25 | 4.47 | 9.25 | 2.96 |
| 001 | 0.001 | 0.05 | — |

NIVELES DE AMINOACIDOS LIBRES EN HIGADO DE RATAS
 NORMALES Y DE RATAS EN HIPOGLUCEMIA INSULINICA
 (mg.%). Valores de los testigos tomados como 100



T A B L A I I I

Comparación entre niveles de amino ácidos libres del hígado de animales testigo (ácido glutámico y ácido aspártico, glutamina adrenalina. (Ver el texto). ¹

| ANIMAL | T E S T I G O S | | | | | ANIMAL | TRA | | |
|---------------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|-----------|---------|---------------------------------|-------|------------------------------|----------------|
| | AMINO ACI- DOS TOTALES | ACIDO GLUTAMICO | ACIDO ASPARTICO | GLUTAMINA | ALANINA | | | AMINO ACI- DOS TOTALES | ACID GLUTAM |
| 1 | 61.4 | 60.3 | 10.3 | 84.3 | 26.6 | 6 | 48.3 | 42.6 | |
| 2 | 51.6 | 58.7 | 8.3 | 71.2 | — | 7 | 49.6 | 48.0 | |
| 3 | 55.5 | 88.2 | 11.2 | 92.6 | 46.0 | 8 | 50.4 | 39.0 | |
| 4 | 50.7 | 81.6 | 10.5 | 87.6 | 34.4 | 9 | 44.0 | 55.6 | |
| 5 | 47.6 | 84.7 | 13.7 | 88.6 | — | 10 | 48.0 | 54.8 | |
| PROMEDIO | 53.8 | 74.7 | 10.8 | 84.9 | 35.7 | 11 | 45.5 | 44.4 | |
| DESVIACION "STANDARD" + — | 4.3 | + — | 12.3 | + — | 1.7 | + — | 8.8 | — | |
| | | | | | | PROMEDIO | 47.8 | 47.4 | |
| | | | | | | DESVIACION "STANDARD" + — | 2.2 | + — | 6.1 |
| | | | | | | t | 2.8 | 7.0 | |
| | | | | | | P | 0.025 | 0.0 | |

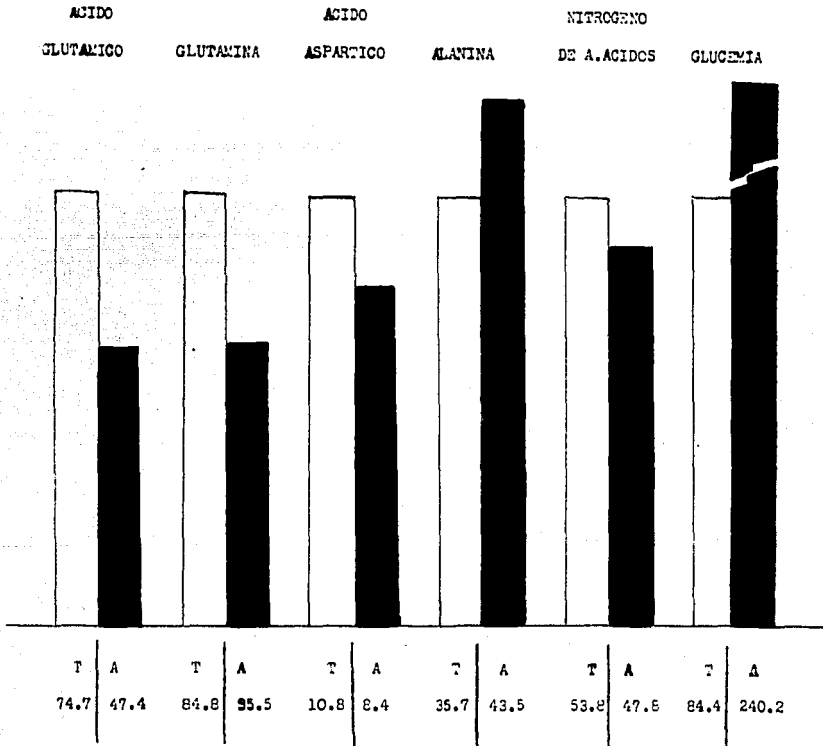
¹.—Las cifras se expresan en mg. del amino ácido por 100 g. de tejido húmedo.

y alanina) y de animales tratados con

TRATADOS CON ADRENALINA

| GRUPO | ACIDO ASPARTICO | GLUTAMINA | ALANINA | |
|---------|--------------------|---------------|---------|-----|
| | 5.6 | 54.1 | 46.4 | |
| | 7.9 | 62.8 | 35.4 | |
| | 8.5 | 49.2 | 28.8 | |
| | 9.8 | 54.3 | 49.1 | |
| | 9.0 | 46.3 | 48.5 | |
| | 7.5 | 66.2 | 52.7 | |
| | 8.4 | 55.5 | 43.5 | |
| + - | 1.2 | + - | 7.1 | 8.4 |
| 8 01 | 2.48 0.025 | 5.67 0.001 | | |

NIVELES DE AMINOACIDOS LIBRES EN HIGADO DE RATAS
 NORMALES Y DE RATAS EN HIPERGLUCEMIA
 ADRENALINICA (mg.%). Valores de los
 testigos tomados como 100



T A B L A I V

Glucemia de las ratas testigos y de las ratas tratadas con insulina.

| SIN INSULINA | | | CON INSULINA | | |
|--------------------------|---------------|-----|--------------------------|---------------|-----|
| ANIMAL | GLUCOSA mg. % | | ANIMAL | GLUCOSA mg. % | |
| 1 | 64.0 | | 5 | 12.5 | |
| 2 | 59.5 | | 6 | 5.5 | |
| 3 | 73.0 | | 7 | 6.0 | |
| 4 | 57.2 | | 8 | 10.9 | |
| 1 b | 67.5 | | 5 b | 10.3 | |
| 2 b | 67.9 | | 6 b | 12.0 | |
| 3 b | 65.2 | | 7 b | 10.7 | |
| 4 b | 66.5 | | 8 b | 10.4 | |
| PROMEDIO | 65.1 | | PROMEDIO | 9.8 | |
| DESVIACION "STANDARD" | + — | 4.3 | DESVIACION "STANDARD" | + — | 2.4 |

T A B L A V

Glucemia de las ratas testigos y de las ratas tratadas con adrenalina.

| SIN ADRENALINA | | | CON ADRENALINA | | |
|--------------------------|---------------|------|--------------------------|---------------|------|
| ANIMAL | GLUCOSA mg. % | | ANIMAL | GLUCOSA mg. % | |
| 1 | 82.0 | | 6 | 240.0 | |
| 2 | 72.0 | | 7 | 230.0 | |
| 3 | 80.0 | | 8 | 231.0 | |
| 4 | 90.2 | | 9 | 250.0 | |
| 5 | 98.0 | | 10 | 237.5 | |
| | | | 11 | 252.5 | |
| PROMEDIO | 84.4 | | PROMEDIO | 240.2 | |
| DESVIACION "STANDARD" | + — | 8.68 | DESVIACION "STANDARD" | + — | 8.68 |

T A B L A V I

Comparación del contenido de agua en los hígados de los animales tratados con insulina o adrenalina, con respecto a los encontrados en los testigos correspondientes.

| EXPERIMENTOS CON INSULINA | | | | |
|---------------------------|--------|-----------------------|-------|--|
| T E S T I G O S | | TRATADOS CON INSULINA | | |
| ANIMAL | AGUA | ANIMAL | AGUA | |
| 1 | 69.06 | 5 | 79.40 | |
| 2 | 69.55 | 6 | 70.64 | |
| 3 | 68.55 | 7 | 70.94 | |
| 4 | — | 8 | 70.65 | |
| 1 b | 70.42 | 5 b | 70.90 | |
| 2 b | 69.73 | 6 b | 64.27 | |
| 3 b | 70.47 | 7 b | 69.50 | |
| 4 b | 63.37 | 8 b | 69.50 | |
| PROMEDIO | | | 70.72 | |
| DESVIACION "STANDARD" | | + | + | |
| | - 2.26 | | - 4.5 | |

| EXPERIMENTOS CON ADRENALINA | | | | |
|-----------------------------|--------|-------------------------|-------|--|
| T E S T I G O S | | TRATADOS CON ADRENALINA | | |
| ANIMAL | AGUA | ANIMAL | AGUA | |
| 1 | 70.08 | 6 | 68.27 | |
| 2 | 69.44 | 7 | 68.32 | |
| 3 | 69.33 | 8 | 69.54 | |
| 4 | 70.00 | 9 | 67.63 | |
| 5 | 69.80 | 10 | 68.11 | |
| | | 11 | 68.05 | |
| PROMEDIO | | | 68.32 | |
| DESVIACION "STANDARD" | | + | + | |
| | - 0.61 | | - 0.4 | |

CAPITULO IV

DISCUSION

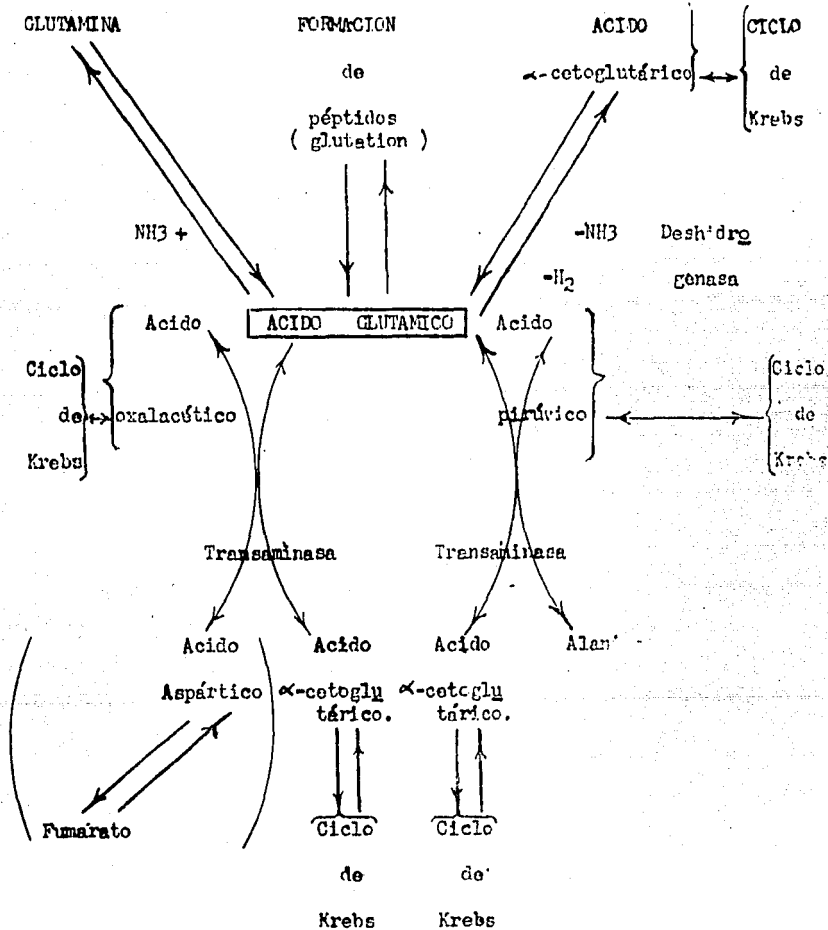
DISCUSION

Es difícil explicar el porqué de la discrepancia entre Dawson y Castro referente al efecto de la insulina sobre algunos de los aminoácidos libres, en ratas sometidas a un ayuno de doce horas. La diferencia principal entre los experimentos de estos dos autores radicó en la dosis de la hormona, ya que el primero utilizó 30 U./Kg. de peso y el segundo aproximadamente 110 U. Como se ha mencionado, en nuestro caso se utilizó una dosis de 20 U./Kg. de peso, que está más cerca de la empleada por Dawson y al igual que este autor se encontró una baja notable en ácido glutámico y glutamina como se ha dicho antes. Las discrepancias podrían también explicarse posiblemente por el grado de contaminación de las insulinas con glucagon, lo que podría hacerse más notable cuando se emplean dosis muy altas. Es probable que el glucagon y la insulina tengan acción antagonica en lo que se refiere a la acción de la primera sobre la aminocidemia, aunque no encontramos datos a este respecto en la literatura científica.

La explicación del porqué de la baja de los aminoácidos libres analizados, bajo la influencia de la insulina no puede ser sencilla ya que el metabolismo de estas sustancias es bastante complejo.

Dawson cree que la baja de ácido glutámico y glutamina libres del hígado durante el coma hipoglucémico insulínico puede explicarse en parte como debida a una utilización de estas sustancias como fuente de energía.

En el esquema adjunto se anotan los principales caminos metabólicos de dichos aminoácidos. No se consideraron sino las transformaciones que pueden ser *cuantitativamente* más importantes.



Se puede observar que los vínculos del ácido glutámico con los hidratos de carbono son fundamentalmente a través del ciclo de Krebs transformándose a ácido α-cetoglutarico ya sea por desaminación oxidativa o por reacción de transaminación. Podría suponerse que en hipoglucemia insulínica aumenta la utilización de este aminoácido a través de

los caminos señalados y esto podría explicar el abatimiento de su concentración en esas condiciones.

A primera vista no parece factible que esté aumentada la transformación de ácido glutámico a su correspondiente ceto-ácido, a través de transaminación con ácido pirúvico o ácido oxalacético ya que esto implicaría el aumento de alanina y ácido aspártico, la concentración de los cuales baja también durante el choque insulínico como se vio anteriormente. De esta manera solamente queda suponer que la reacción que está activada en hipoglucemia insulínica es la disaminación oxidativa de dicho aminoácido.

Como la concentración de glutamina también se abate por la influencia de la hormona, no se puede considerar la transformación del aminoácido en su amida para explicar su disminución en el tejido hepático bajo la influencia de la insulina.

La baja en los niveles de alanina y ácido aspártico durante la hipoglucemia insulínica es difícil de explicar como debida a una mayor actividad de las transaminasas glutámico-oxalacética y glutámico-pirúvica, ya que esto implicaría el aumento en la concentración de ácido glutámico (21). Es pertinente señalar que Sass y Handelsman (25) no encontraron modificación de la actividad de estas enzimas en experimentos agudos con insulina (4 U.I./Kg.). Otras transaminasas hepáticas descritas son la α -aminobutírica-oxalacética y la α -aminobutírica-pirúvica, pero su actividad es relativamente baja (16).

La desaminación oxidativa de alanina y ácido aspártico no tiene lugar en el hígado (21) y por lo tanto no parece ser un camino probable para su entrada al ciclo de Krebs.

La baja de ácido glutámico libre del hígado puede explicarse no solamente por su transformación a ácido α -cetoglutárico sino también por una incorporación mayor a las proteínas tisulares, ya que se ha demostrado que la insulina estimula la proteinogénesis (17, 20, 27, 34, 35).

La influencia de la insulina sobre la proteinogénesis puede explicar en gran parte la hip aminoacidemia que

tiene lugar como uno de los efectos de la hormona, según parecen demostrarlo los experimentos de Lotspeich (18). Esta interpretación pudiera hacerse extensiva para explicar, por lo menos en parte, la baja de los aminoácidos libres en el hígado por la influencia de la hormona. Hay que hacer notar que la acción proteínogénica de la insulina parece estar coordinada con hormonas de la hipófisis anterior, como lo indicó Mirsky desde 1939 (22). Es conveniente recordar que la insulina tiene acción sobre la aminoacidemia aún en ausencia del hígado (13), que es el principal órgano desaminativo y además desde hace más de una década Bach y Holmes (3) y Stadie y colaboradores (29) indicaron que la insulina en realidad inhibe la desaminación de los aminoácidos por el hígado *in vitro* y también *in vivo*. Esto implica que la insulina aparentemente no favorece uno de los caminos señalados antes de los aminoácidos hacia el ciclo de Krebs.

Algunos de los autores consideran que en realidad la insulina no actúa directamente sobre la aminoacidemia ya que la hormona no tiene efecto cuando se aplica a animales adrenalectomizados (14, 19) y en cambio la adrenalina si produce hipoaminoacidemia en ratas adrenalectomizadas o hipofisectomizadas (14, 19). Como se ha indicado esta fue una de las razones para que en este trabajo se investigase si la adrenalina tiene un efecto semejante al de la insulina en lo que se refiere al efecto depresor sobre los aminoácidos libres del hígado. Como puede observarse en la tabla III está última hormona disminuyó en forma significativa los niveles de los ácidos glutámico y aspártico y glutamina libres del hígado, pero no afectó el nivel de alanina. Esta diferencia hace pensar que la acción de la insulina no es simplemente a través de estimulación de secreción de la adrenalina.

Es todavía más difícil de explicar el modo de actuar de la adrenalina ya que fuera de sus acciones conocidas sobre la glucogenolisis y la inhibición de la utilización periférica de la glucosa (7, 28) sólo existen algunos trabajos aislados referentes a su efecto sobre el metabolismo de ami-

noácidos. Entre estos trabajos destacan las observaciones de Highman, Maling y Thompson (15) concernientes a la acción de dosis altas de adrenalina inyectada intradérmicamente (similares a las que se utilizaron en este trabajo) sobre la actividad de transaminasas glutámico-oxalacética y glutámico-pirúvica séricas. Estos autores encuentran que la hormona induce a un incremento de la actividad de dichas enzimas, que alcanza un máximo a las 6 horas y va disminuyendo lentamente dentro de los dos o tres días siguientes. El aumento de la actividad de dichas transaminasas puede indicar cambios metabólicos en el hígado y corazón principalmente y los autores puntualizan que no encontraron lesiones por métodos histológicos, en dichos órganos. Estas observaciones podrían relacionarse con los cambios en el nivel de ácido glutámico que se observaron en este trabajo bajo la influencia de la adrenalina. Se sabe además que la hormona produce un aumento de ceto-ácidos hepáticos (8), los cuales por transaminación pueden producir aminoácidos, lo que explicaría en parte el ligero aumento que se observó en alanina libre.

Pudiera también pensarse que por influencia de la adrenalina aumenta la secreción de glucocorticoides lo que conduciría a un aumento de gluconeogénesis a partir de aminoácidos y esto explicaría su abatimiento en los tejidos, pero ya se ha mencionado que dicha hormona ejerce su acción aún en ausencia de hipófisis o de glándulas suprarrenales.

En esta discusión no se tomaron en cuenta otros caminos metabólicos que requieren la presencia por ejemplo de ácido aspártico: su intervención en el ciclo de la ornitina en donde se consume al formarse ácido arginino-sucínico y éste finalmente se transforma en fumarato y arginina, o su utilización en la síntesis de purinas (21), etc., que bajo la influencia de las hormonas ensayadas pudieran adquirir mayor importancia cuantitativa. Lo mismo puede decirse respecto a otros caminos metabólicos, aparte de los considerados, que pueden seguir el ácido glutámico, alanina

y glutamina y que posiblemente sean influenciados por la insulina y la adrenalina.

Cabe señalar que los dos grupos de experimentos, con insulina y adrenalina, no son estrictamente comparables porque las condiciones de los animales fueron diferentes. En el primer caso los animales se mantuvieron en ayunas de 12 a 16 horas antes de la aplicación de la hormona y en los de adrenalina no se sometieron a dicho ayuno.

Es evidente que la explicación del mecanismo de acción de las hormonas mencionadas es un tema complejo. La posibilidad de que la hipoaminoacidemia provocada por la insulina sea en última instancia el resultado de una estimulación hipofisiaria por la adrenalina, parece estar excluida por los trabajos de Luck, Griffin, Boer y Wilson (14). Estos autores encontraron que tanto la adrenalina como la insulina, la hormona del crecimiento y la HACT exhiben efecto depresor de la aminoacidemia tanto en la rata normal como en la hipofisectomizada. Por lo tanto parece que no es un factor hipofisiario el mediador de los efectos de la insulina y la adrenalina.

Solamente experimentos posteriores pueden aclarar qué camino predomina en la metabolización de los aminoácidos bajo la influencia de la insulina o de la adrenalina. Dichos experimentos comprenderían la medición de las actividades de ciertas enzimas (transaminasas, deshidrogenasas de aminoácidos, etc.) y el uso de aminoácidos marcados con isótopos con objeto de dilucidar de una manera precisa los porcentajes que de ellos se incorporan a proteínas o derivan a carbohidratos, en condiciones experimentales parecidas a las que se utilizaron en este trabajo.

CAPITULO V

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se investigaron las concentraciones de aminoácidos libres totales y de glutamina, alanina y ácidos glutámico y aspártico libres, en hígado de ratas normales y en hígado de ratas tratadas con insulina o adrenalina. El análisis de alanina, glutamina y ácidos aspártico y glutámico, se realizó utilizando técnicas bi-dimensionales de separación cromatográfica en papel filtro, utilizando el sistema fenolbutanol-ácido acético-agua. Asimismo se estudiaron los procedimientos más adecuados para preparar el tejido hepático antes de someterlo al análisis de aminoácidos libres.

En los hígados de ratas en ayuno (12 - 16 horas) inyectadas con insulina y sacrificadas durante las convulsiones se encontraron niveles notablemente menores de aminoácidos totales libres y alanina, glutamina y ácidos aspártico y glutámico libres, que los observados en hígados de animales testigos. Los animales tratados con la hormona mostraron una glucemia correspondiente al 15% de la encontrada en los testigos.

En los hígados de ratas inyectadas con adrenalina (1 mg./Kg. de peso, subcutánea) y sacrificadas a las dos horas siguientes de la aplicación de la hormona, se encontraron niveles menores de aminoácidos libres totales, glutamina y ácidos aspártico y glutámico que los observados en hígados de animales testigos. En el momento de sacri-

ficarlos, los animales tratados mostraron hiperglucemias de 100 o más por ciento al compararlos con las observadas en los testigos.

Se discuten los posibles mecanismos por los cuales las hormonas mencionadas modificaron los patrones de los aminoácidos libres del hígado.

CAPITULO VI
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.—Awapara, J., Application of paper chromatography to the estimation of the free amino acids in tissues, *Arch. Biochem.*, **19**: 172, 1948.
- 2.—Awapara, J., Landua, A. J. y Fuerst, R., Distribution of free amino acids and related substances in organs of the rat, *Biochem et Biophys. Acta.*, **5**: 457, 1949.
- 3.—Bach, S. J., y Holmes, E. G., The effect of insulin on carbohydrate formation in liver, *Biochem. J.*, **31**: 89, 1937.
- 4.—Bumberg, A. G., Cohen, L., Croghan, J. y Kelsey, D., Apparent and true blood sugar levels in insulin coma therapy, *J. Hillside Hosp.*, **5**: 41, 1956.
- 5.—Castro, V., Comportamento di alcuni aminoacido liberi glicogenetici durante lo shock insulinico, *Boll. Soc. Ital. biol. sper.*, **28**: 1958, 1952.
- 6.—Castro, V., Azione dell' insulina sugli aminoacidi liberi di organi diversi, *Arch. fisiol.*, **55**: 58, 1955.
- 7.—Cohen, J. A., Jr., Effect of adrenaline on the utilization of glucose, *Biochem et Biophys. Acta.*, **3**: 231, 1949.
- 8.—Craig, A. B., Jr., Effects of epinephrine on lactic acid and keto-acid production, phosphate balance and pH changes in the isolated perfused frog liver, *Am. J. Physiol.*, **196**: 969, 1959.
- 9.—Croxtton, F. E., Elementary statistics with applications in medicine. Ed. Prentice Hall Inc., New York, 1953.
- 10.—Dawson, R. M. C. y Williams, R. B., Glutamine and glutamic acid contents of the rat liver during insulin hypoglycemia, *Biochem. J.* **47**: 391, 1950.

- 11.—Florin, M., Composante amino-acide des tissus et des liquides organiques, *Exposés Annuels de Biochimie Médicale*, 19: 121, 1957.
- 12.—Frame, E. G., Russell, J. y Wilhelmi, A. E., The colorimetric estimation of nitrogen in blood, *J. Biol. Chem.*, 128: 255, 1943.
- 13.—Frame, E. G., y Russell, J., The effect of insulin and anterior pituitary extract on the blood amino nitrogen in eviscerated rats. *Endocrinology*, 39. 420, 1946.
- 14.—Griffin, A. C., Luck, J. M., Kulakoff, V. y Mills, M., Further observation on the endocrine regulation of blood amino acids, *J. Biol. Chem.*, 209: 387, 1954.
- 15.—Highman, B., Maling, H. M. y Thompson, E. C., Serum transaminase and alkaline phosphatase levels after large doses of norepinephrine in dogs, *Am. J. Physiol.*, 196: 436, 1959.
- 16.—Iyer, G. Y. N. y Sukumaran, M., Some studies on transamination with oxalacetate, *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 37: 1517, 1959.
- 17.—Krahl, M. E., Incorporation of C14 amino acids into glutathione and protein fraction of normal and diabetic rats tissues, *J. Biol. Chem.*, 200: 99, 1953.
- 18.—Lotspeich, W. D., The role of insulin in the metabolism of amino acids, *J. Biol. Chem.*, 179: 175, 1949.
- 19.—Luck, J. M., Griffin, A. C., Boer, G. y Wilson, M., On the endocrine regulation of blood amino acids content, *J. Biol. Chem.*, 206: 767. 1954.
- 20.—Manchester, K. L. y Young, F. G., The effect on insulin on incorporation of amino acid into protein of normal rat diaphragm in vitro, *Biochem. J.*, 70: 353, 1958.
- 21.—Meister, A., *Biochemistry of the amino acids*, Academic Press Pub., New York, 1957.
- 22.—Mirsky, I. A., The influence of the anterior pituitary gland on protein metabolism, *Endocrinology*, 25: 52, 1939.
- 23.—Naftalin, L., Quantitative chromatographic estimation of amino acids *Nature*, 161: 763, 1948.
- 24.—Nelson, N., A photometric adaptation of the Somogvi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, 153: 375, 1944.

- 35.—Sass, M. D. y Handelsman, M. B., In vivo effect of insulin and chlorpropamide on certain liver enzymes in rat, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 74: 482, 1959.
- 26.—Sherman, H. C., Chemistry of food and nutrition, pág. 637, 1946. The MacMillan, Co. New York.
- 27.—Sinex, M., MacMuller, J. y Hastings, A. B., The effect of insulin on the incorporation of C14 into the protein of the rat diaphragm. *J. Biol. Chem.*, 198: 615, 1952.
- 28.—Somogyi, M., Studies of arteriovenous differences in blood sugar V. Effect of epinephrine on the rats of glucose assimilation, *J. Biol. Chem.*, 188: 513, 1950.
- 29.—Stadie, W. C., Luckens, F. D. W. y Zapp, J. A. Jr., The effect of insulin upon urea formation, carbohydrate synthesis and respiration of liver of normal and diabetic animals, *J. Biol. Chem.*, 132: 393, 1940.
- 30.—Thompson, H. T., Schurr, P. E., Henderson, L. M. y Elvehjem, C. A., The influence of fasting and nitrogen deprivation on the concentration of free amino acids in rat tissues, *J. Biol. Chem.*, 182: 47, 1950.
- 31.—Villano, F., Influence of insulin in the metabolism of the acids of the citric cycle in the normal subjects and in the diabetic patients, *Rend. et. atti. accad. sci. et chir.*, 105/6: 78, 1951/52.
- 32.—William, J. N., Jr., Schurr, P. E. y Elvehjem, C. A., The influence of chilling and exercise of free amino acids concentration in the rat tissues, *J. Biol. Chem.*, 182: 55, 1950.
- 33.—Williams, R. J. y Kirby, H., Paper chromatography using capillary ascent, *Science*, 107: 481, 1948.
- 34.—Wool, I. G. y Krahl, M. E., Incorporation of C14 amino acids into protein of isolated diaphragm: an effect of insulin independent of glucose entry, *Am. J. Physiol*, 196: 961, 1959.
- 35.—Wool, I. G. y Krahl, M. E., An effect of insulin on peptide synthesis independent of glucose or amino acid transport, *Nature*, 183: 1399, 1959.
- 36.—Wu, C., Metabolism of free amino acids in fasted and zein fed rats, *J. Biol. Chem.*, 207: 775, 1954.