

VALOR DE L'AMINOGRAMA PLASMÀTIC EN RATES HIPOTIROÏDEES I HIPERTIROÏDEES

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

per

X. REMESAR, LL. AROLA,* A. PALOU, E. HERRERA
I M. ALEMANY ****

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

Aquest treball ha estat realitzat en part, gràcies a una ajuda
de la «Comisión Asesora para la Investigación Científica y Técnica
de la Presidencia del Gobierno»

INTRODUCCIÓ

L'efecte de les hormones tiroïdals sobre el metabolisme proteic és conegut des de fa molt temps. Les hormones tiroïdals potencien l'anabolisme proteic i afavoreixen la incorporació d'aminoàcids a les proteïnes del fetge, del ronyó i del cor^{5, 7, 18}, mentre que no s'han observat aquests efectes a altres teixits com el cervell. Aquesta acció sembla estar fortament correlacionada amb la influència sobre el consum d'oxigen per les mitocondries²⁴ car els teixits que acusen menys l'acció activadora de la síntesi de proteïnes per les hormones tiroïdals són també els que mostren també menys efecte sobre l'activació del consum d'oxigen¹⁰. Aquesta acció sembla estar mediatitzada per l'increment en la disponibilitat d'energia que afavoreix la síntesi proteica^{11, 20}, tot i que també s'ha suggerit que les hormones tiroïdals tenen acció sobre la síntesi de proteïnes a nivell de producció i traducció de l'ARN^{9, 12}.

* Adreça actual: Bioquímica, Facultat de Químiques (Dependències de Tarragona). Universitat de Barcelona.

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

L'efecte potenciador de la síntesi proteica per les hormones tiroïdals, de tota manera, no és general, car la injecció de fortes dosis d'hormones tiroïdals a rates normals i tiroïdectomitzades produeix un descens global a la síntesi de proteïnes^{22, 23}. A l'hipertiroïdisme crònic s'ha observat també un increment del catabolisme proteic¹⁵. A l'hipertiroïdisme, la degradació de proteïnes sembla estar lleugerament incrementada respecte dels animals controls¹⁷. A més, els aminoàcids lliurats al recanvi proteic sembla que són preferentment oxidats en lloc de ser reutilitzats per a la síntesi proteica¹³, degut al fet que les variacions en les activitats de síntesi de proteïnes i de la proteòlisi han d'alterar els nivells d'aminoàcids circulants.

En aquest treball s'ha volgut estudiar l'efecte de l'hipertiroïdisme i l'hipotiroïdisme crònics sobre els nivells d'aminoàcids plasmàtics, com a mesura de l'homeostasi dels aminoàcids, i tractar d'establir relacions entre aquest aspecte del metabolisme proteic i l'acció de les hormones tiroïdals.

MATERIALS I MÈTODES

S'utilitzaren rates de la soca Wistar d'uns 40-50 grams de pes corporal que foren tiroïdectomitzades²⁵. S'incloué un grup control de rates operades però no tiroïdectomitzades. Tots els animals van ser alimentats amb una dieta pobre en iode tipus Remington²¹ complementada amb 1,7 µg/g d'iodat potàssic en el cas dels controls. Les rates foren mantingudes en gàbies col·lectives en una cambra de temperatura controlada (23 ± 2 °C) sota un cicle de llum/fosc de 12/12 hores. Els animals tiroïdectomitzats van ser separats en dos grups, hipotiroïdeu (h) i hipertiroïdeu (H); els segons reberen una injecció intraperitoneal diària de 0,25 ml/100 g de pes de L-tiroxina en solució de 0,1 g/l en solució salina-plasma (25 µg de L-T₄/100 g de pes). Els animals hipotiroïdeus i els controls reberen diàriament també 0,25 ml/100 g de pes de solució salina isotònica.

Els animals van ser sacrificats per decapitació amb guillotina passats 40 dies del tractament crònic. Els controls havien atès un pes mitjà de $179,6 \pm 9,6$ g. El fetge va ser dissecat i pesat, mentre que la sang vessada de la ferida del coll fou recollida en potets de plàstic heparinitzats. D'aquesta sang heparinitzada s'obtingué plasma per centrifugació. També es determinà el valor d'hematòcrit de totes les mostres per centrifugació en tubs capil·lars.

La concentració de glucosa plasmàtica va ser determinada amb un mètode enzimàtic amb glucosa oxidasa i peroxidasa¹⁴. Les concentracions d'urea van ser determinades per la reacció de l'indofenol⁸. Petites mos-

tres de plasma van ser desproteïnitzaades amb acetona en tubs capillars⁴, que després van ser utilitzades per a la determinació d'aminoàcids individuals mitjançant llur derivatització amb clorur de dansil (clorur de 1-dimetil-amino-5-sulfonil-naftalè) radioactiu i ulterior separació cromatogràfica mitjançant el mètode d'AROLA i d'altres⁵. Les proteïnes plasmàtiques totals van ser determinades amb el mètode del reactiu de FOLIN¹⁶.

A fi de posar més de manifest les diferències entre els diversos grups tractats, s'han expressat totes les dades com a percentatges dels valors atesos pels controls, i s'hi ha donat en cada ocasió gràficament el valor de l'error tipus de la mitjana i el grau de significació de les diferències envers els controls.

Per consideracions de tipus estructural i fisiològic hem reunit els aminoàcids en sis grups: el grup dels aminoàcids gluconeogenètics, que inclou l'alanina, el glutamat més la glutamina, que per raons metodològiques es donen plegats, l'aspartat més l'asparagina, que també es donen plegats, la glicina, la serina i la treonina (aquests no són tots els aminoàcids gluconeogenètics, però en conjunt, constitueixen la part més important d'aminoàcids utilitzats per a aquest fi); el grup dels iminoàcids, que són la prolina i la hidroxiprolina; el grup dels aminoàcids de cadena ramificada, que són la leucina més la isoleucina, valors que es donen plegats, i la valina; el grup d'aminoàcids bàsics que són la lisi-na, l'arginina, la histidina i la citrullina; els aminoàcids sulfurats, que són la taurina, la cisteïna més l'àcid cisteic, la metionina més l'ornitina (tot i que l'ornitina té caràcter bàsic i no té sofre, però els valors es donen plegats per raons metodològiques) i el grup d'aminoàcids aromàtics que són la tirosina, la fenilalanina i el triptòfan.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

A la figura 1 es poden veure les variacions en el pes corporal, percentatge del pes del fetge respecte al pes del cos, hematòcrit, glucosa plasmàtica, proteïnes plasmàtiques i urea plasmàtica. L'hipotiroïdisme produeix un fort descens del pes corporal respecte dels controls, fet que està d'acord amb les dades trobades generalment a la bibliografia^{2, 6}; aquest efecte ve originat, probablement, per la manca d'hormona de creixement deguda a la deficiència d'hormones tiroïdals. L'hipertiroïdisme, en canvi, no ens dona lloc a diferències significatives quant al pes corporal, tot i que s'apunta una certa deficiència no significativa que s'aproparia més a les dades d'ARANDA, de MONTOYA i d'HERRERA² i podria ser degut a la incidència de l'excés d'hormones tiroïdals sobre el catabolisme general. En els animals hipertiroïdeus s'observa una hepatomegàlia significativa, mentre

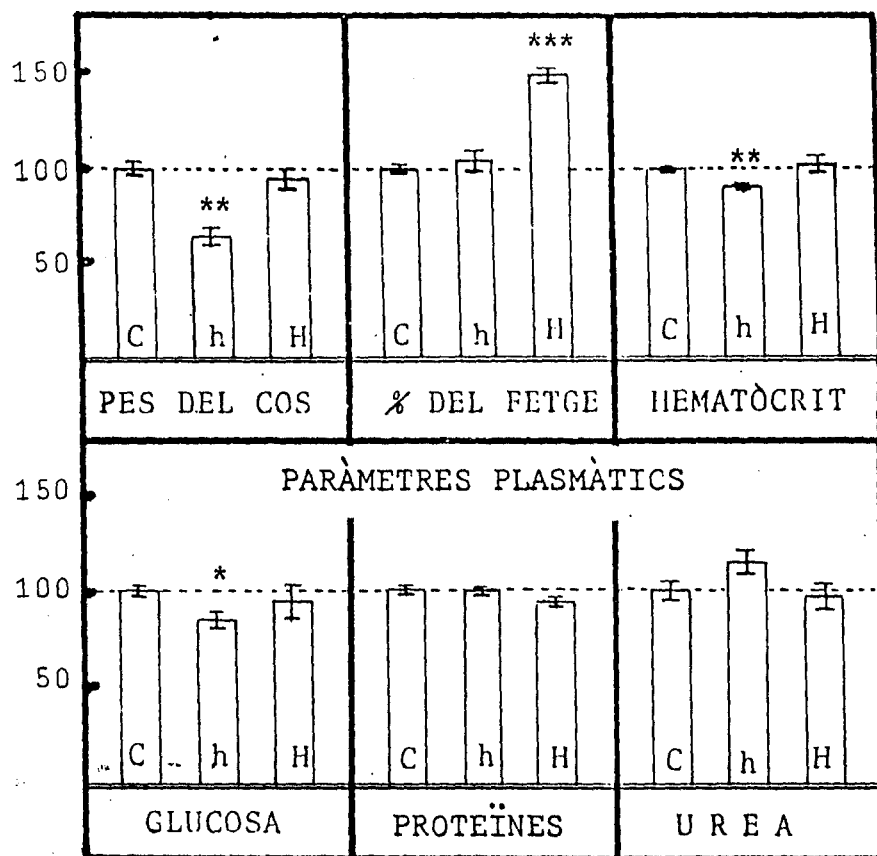


FIG. 1.

que els animals hipertiroïdeus presenten un percentatge de pes de fetge normal. En les rates hipotiroïdees s'observa un lleuger descens de l'hematòcrit, essent les hipertiroïdees normocitèmiques. Això es pot interpretar també com una conseqüència del dèficit de síntesi de proteïnes que origina aquesta lleugera anèmia. Els valors de proteïnes plasmàtiques totals, però, no presenten cap variació significativa en tots els animals estudiats. Els nivells de glucosa en plasma de les rates hipertiroïdees són molt pròxims als controls en contradicció amb les dades d'altres autors², que ob-

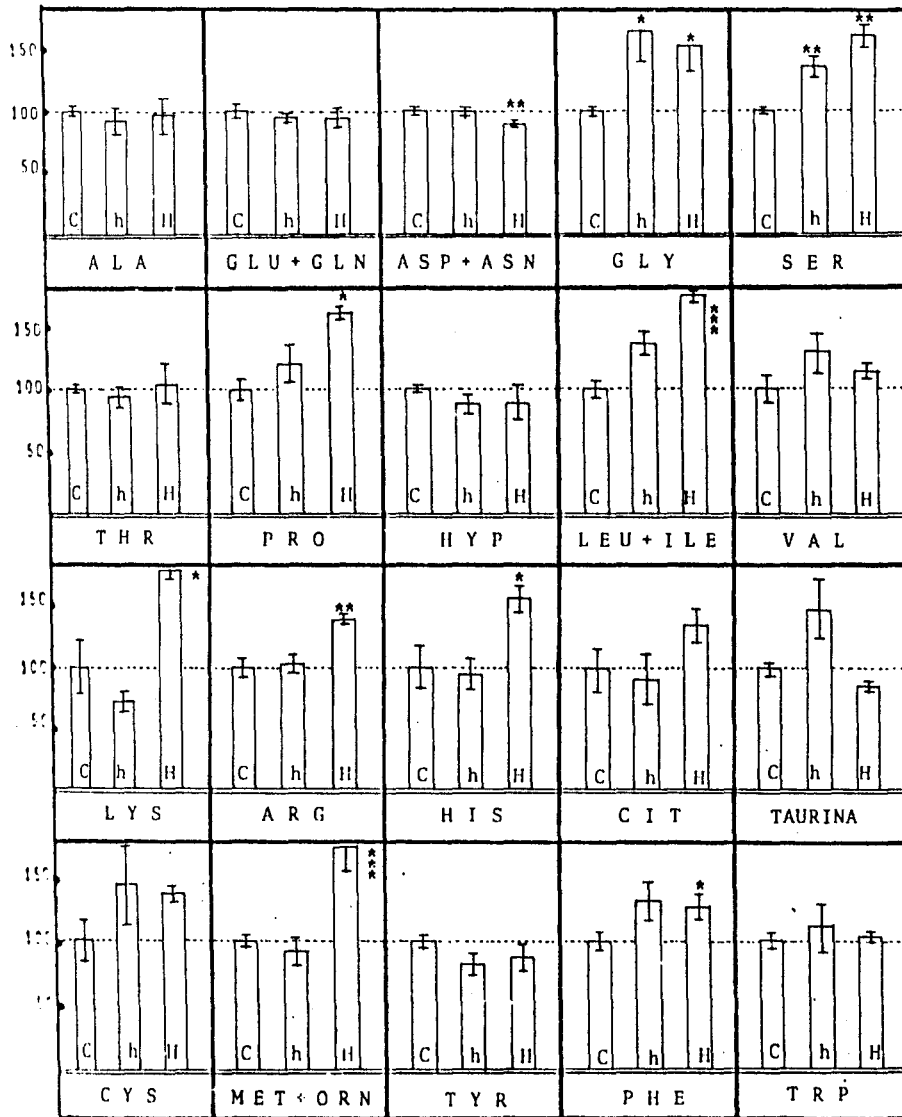


FIG. 2.

servaren una hipoglucèmia relativa en els animals hipertiroïdeus, diferència que pot ser deguda al temps de tractament amb hormones tiroïdals. Per altra banda, hi ha una hipoglucèmia significativa en les rates hipotiroïdees. No s'observaren diferències significatives a les concentracions plasmàtiques d'urea, tot i que s'apunta la tendència a augmentar la concentració que presenten les rates hipotiroïdees.

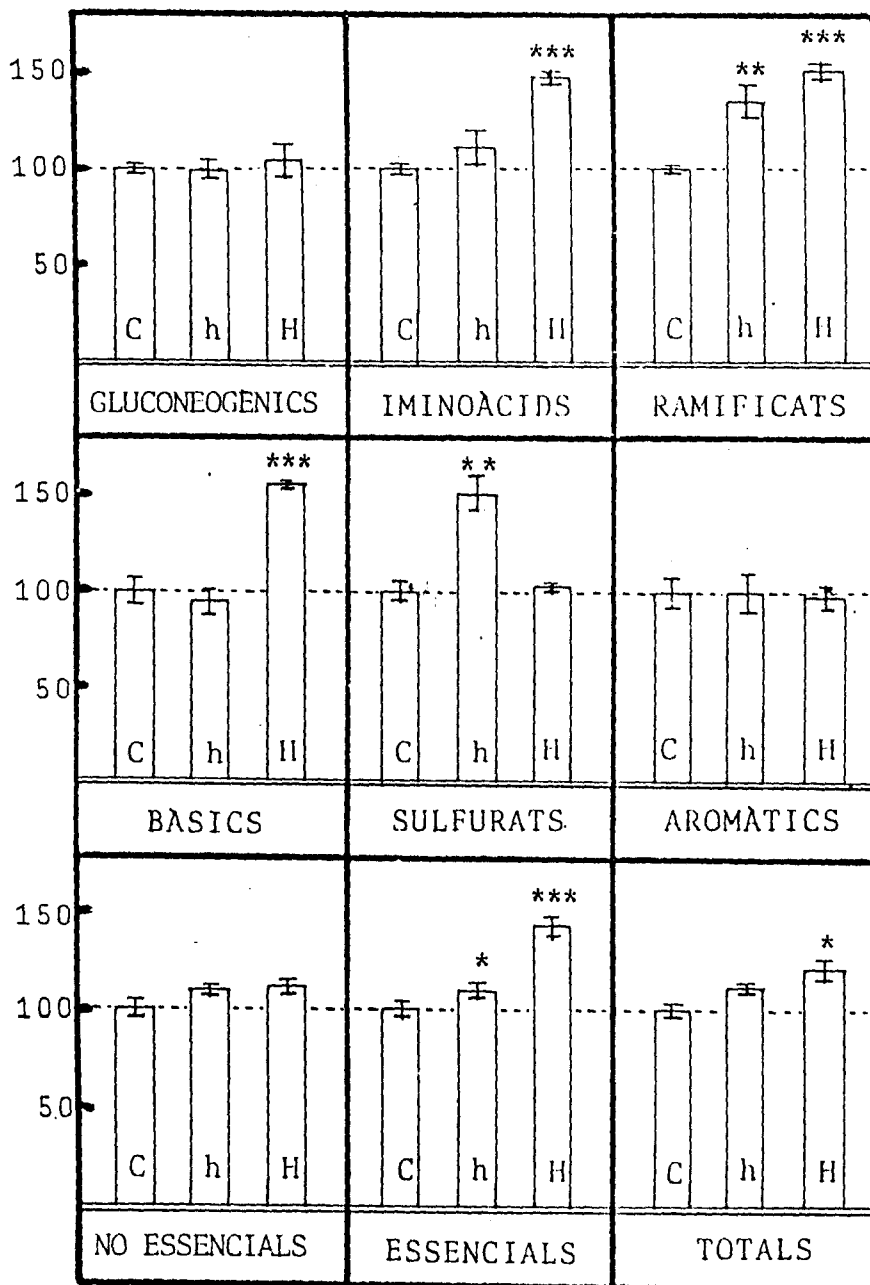


FIG. 3.

A la figura 2 es poden veure les variacions en les concentracions individuals dels aminoàcids plasmàtics a les rates hipo i hipertiroïdees; i a la figura 3 la dels grups fisiològics d'aminoàcids. No s'observaren variacions a les concentracions d'alanina i de glutamat més glutamina, tot i que s'ha descrit que les rates hipotiroïdees tenen una major capacitat d'utilització d'alanina pel fetge⁶. Els nivells circulants d'aspartat més asparagina a les rates hipertiroïdees són significativament més baixos, fet que podria explicar-se per l'estreta relació entre l'aspartat i la gluconeogènesi i l'increment de l'activitat dels enzims de la gluconeogènesi que s'ha demostrat en l'hipertiroïdisme^{17, 19}. Els nivells de glicina i de serina estan fortament incrementats tant en les rates hipo com hipertiroïdees, cosa que pot indicar una relativa dificultat de l'organisme no eutiroïdeu en la utilització d'aquests aminoàcids, que té lloc principalment al llit esplàncnic i que realitza preferentment el fetge¹. No s'aprecien variacions en els nivells de treonina ni tampoc en el conjunt dels aminoàcids gluconeogènics (fig. 3).

Les concentracions de prolina són significativament més altes en les rates hipertiroïdees, la qual cosa està d'acord amb un increment de la degradació de proteïnes¹⁵, especialment colagen, del qual la prolina és constituent majoritari, tot i que en les rates hipotiroïdees⁶ com en les hipertiroïdees hi ha un increment de la gluconeogènesi que podria utilitzar aquests aminoàcids, raó per la qual potser l'increment observat no reflecteix plenament l'increment del catabolisme proteic, car seria la resultant entre l'increment del seu catabolisme a través de la gluconeogènesi i l'alliberament degut a la proteòlisi. Els valors combinats dels aminoàcids reflecteixen el que s'ha dit per a la prolina, car no hi ha pràcticament variacions en els nivells d'hidroxi prolina.

Dintre dels aminoàcids de cadena ramificada, les leucines mostren un increment no significatiu a les rates hipotiroïdees, que junt amb un altre de la valina dona lloc a un increment més marcat al conjunt d'aminoàcids de cadena ramificada. En els animals hipertiroïdeus, l'increment de les leucines és molt més marcat i no s'observen pràcticament diferències a la concentració de valina. El catabolisme dels aminoàcids de cadena ramificada és realitzat preferentment pel múscul, així com pel tracte gastro-intestinal, en tant que són lliurats a la circulació per proteòlisi a molts teixits; també aquí l'excés d'aquests aminoàcids porta a suposar que la producció per proteòlisi supera amplament la seva oxidació.

En els aminoàcids bàsics, tant per separat com en conjunt s'observa un marcat increment als nivells dels animals hipertiroïdeus, mentre que els animals hipotiroïdeus mostren valors pràcticament normals. Els nivells d'arginina i de citrullina semblen indicar un funcionament actiu per part del cicle de la urea, tot i que els nivells d'urea no reflecteixin aquesta

situació; potser això podria explicar-se per una relativa manca d'activitat de l'arginasa hepàtica; en el cas de la lisina i de la histidina, donat el caràcter essencial d'aquests aminoàcids per a la rata, s'observa un comportament anàleg al que hem observat tant pels aminoàcids de cadena ramificada com pels iminoàcids; fins i tot els valors trobats per al conjunt metionina més ornitina, que hem inclòs al grup dels aminoàcids sulfurats, sembla més pròxim a l'esquema dels aminoàcids bàsics, probablement a causa de que el comportament de l'ornitina podria identificar-se amb el que s'ha dit abans, donat que també participa al cicle de la urea. Dels altres aminoàcids sulfurats cal destacar l'efecte conjunt de la cisteïna i l'àcid cisteïc i la taurina, el qual reflecteix en els valors combinats dels aminoàcids sulfurats, en què es veu un considerable increment en els nivells d'aquests aminoàcids en les rates hipotiroïdees, mentre que el petit descens de taurina de les rates hipertiroïdees queda compensat pel lleuger increment de la cisteïna i de l'àcid cisteïc. La taurina pot ser emprada com a indicador de l'estat de buidor dels «pools» intracel·lulars d'alguns teixits, com és el cas del múscul. Així, nivells més alts ens indicarien una situació d'exhauriment dels aminoàcids dels teixits, mentre que concentracions més baixes acostumen a indicar-nos una relativa manca d'alliberació d'aminoàcids pels teixits perifèrics.

Els aminoàcids aromàtics en conjunt no mostren cap diferència entre els grups estudiats, però sembla que tant en els animals hipo com hipertiroïdeus, els nivells de tirosina són més baixos i els de fenilalanina més alts, cosa que fa suposar que la disfunció tiroïdal afecta el funcionament de la fenilalanina hidroxilasa. No s'observaren variacions a les concentracions de triptòfan.

En els valors combinats no s'apreciaren variacions significatives a les concentracions dels aminoàcids no essencials, però tant el grup hipotiroïdeu, com el grup hipertiroïdeu presentaren increments significatius a les concentracions d'aminoàcids essencials, més marcats en el cas dels animals hipertiroïdeus. Això es reflecteix en el valor dels aminoàcids totals, de manera que fa que l'increment de concentració en els animals hipertiroïdeus envers els controls sigui significatiu. Això, sembla indicar, tant en els hipo com en els hipertiroïdeus, un alliberament més important d'aminoàcids des dels teixits perifèrics que en els controls; els aminoàcids no essencials són catabolitzats per a l'obtenció d'energia i els aminoàcids essencials ho són més lentament. En el cas dels hipotiroïdeus, sembla clar que les coses són així per l'existència d'uns nivells de taurina elevats, però en el cas dels hipertiroïdeus es dona la situació contrària amb respecte a la taurina, ja que els nivells són més baixos, la qual cosa sembla indicar que hi ha una certa retenció dels aminoàcids als «pools» dels teixits perifèrics, i que està en oberta contradicció amb els nivells elevats d'aminoàcids essencials i també amb el paper potenciador

relatiu de l'excés d'hormones tiroïdals de la proteòlisi intracel·lular²⁴; així, doncs, cal acceptar com a explicació alternativa que les hormones tiroïdals produeixen o bé una depressió de la síntesi i emmagatzemament de la taurina o bé que ens facilita la seva excreció per via biliar o renal.

Com a conclusió general d'aquest treball pot indicar-se que l'estat tiroïdal afecta considerablement l'homeostasi nitrogenada de l'organisme i afecta també de manera diferent els diversos aminoàcids, de tal manera que tant l'hipertiroïdisme com l'hipotiroïdisme donen lloc a modificacions característiques de l'aminograma plasmàtic, i són més importants les variacions que es presenten en l'hipertiroïdisme que en l'hipotiroïdisme respecte de l'aminograma plasmàtic normal.

BIBLIOGRAFIA

1. AIKAWA, T., MATSUTAKA, H., TAKEZAWA, K. i ISHIKAWA, E. — *Gluconeogenesis and amino acid metabolism. I. Comparison of various precursors for hepatic gluconeogenesis «in vivo».* «Biochem. Biophys. Acta», 279: 234-244 (1975).
2. ARANDA, A., MONTOYA, E. i HERRERA, E. — *Effects of hypo- and hyperthyroidism on liver composition, blood glucose, ketone bodies and insulin in the male rat.* «Biochem. J.», 128: 597-604 (1972).
3. AROLA, LL., PALOU, A., HERRERA, E. i ALEMANY, M. — *Determination of plasma amino acids in small samples with the use of Dansyl chloride.* «Biochimie», 58: 1221-1226 (1976).
4. AROLA, LL., HERRERA, E. i ALEMANY, M. — *A new method for deproteinization of small samples of blood plasma for amino acids determination.* «Anal. Biochem.», 82: 236-239 (1977).
5. CARTER, W. J., FAAS, F. H. i WYNN, J. O. — *Thyroxine stimulation of protein synthesis «in vitro» in the absence of mitochondria.* «J. Biol. Chem.», 246: 4973-4977 (1971).
6. CASTRO, M. i HERRERA, E. — *Effect of thyroidectomy on circulating components and liver metabolism in fed and fasted rats.* «Hormone Res.», 4: 357-366 (1973).
7. DUTOIT, C. H. — A «Symposium on Phosphorus Metabolism» McElroy, W. D. i Glss., B. eds. John Hopkins Press, Baltimore, pp. 597-623 (1952).
8. FAWCETT, J. K. i SCOTT, J. E. — *A rapid and precise method for the determination of urea.* «J. Clin. Pathol.», 13: 156-163 (1960).
9. GARREN, L. D., RICHARDSON, A. P. i CROCCO, M. — *Studies on the role of ribosomes in the regulation of protein synthesis in hypophysectomized and thyroidectomized rats.* «J. Biol. Chem.», 242: 650-656 (1967).
10. GORDON, E. S. i HENING, A. E. — *Effect of thyroid treatment on respiration of various rat tissues.* «Endocrinology», 34: 353-358 (1944).
11. HANSON, R. W., LINDSAY, R. H. i BARKER, S. B. — *Correlation of thyroxine effects «in vitro» on oxygen consumption with incorporation of amino acid into protein.* «Biochem. Biophys. Acta», 68: 134-135 (1963).
12. HERD, P., KAPLAY, S. S. i SANADI, D. R. — *On the origin and mechanism action of a thyroxine responsive protein.* «Endocrinology», 94: 464-474 (1974).
13. HOBBERMAN, H. D., GRAAF, J. — *Influences of thyroxine on metabolism of amino acids and proteins during fasting.* «Yale J. Biol. Med.», 23: 195-201 (1950).
14. HUGGET, A. St. G. i NIXON, D. A. — *Use of glucose oxidase, peroxidase and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose.* «Lancet», ii, 368-370 (1957).

15. KYLE, L., BALL, M. F. i DOOLAN, P. D. — *Effects of thyroid hormone on body composition in myxedema and obesity.* «New Eng. J. Med.», 275: 12-17 (1966).
16. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. i RANDALL, A. J. — *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* «J. Biol. Chem.», 193: 265-275 (1951).
17. MENAHAN, L. A. i WIELAND, O. — *The role of thyroid function in the metabolism of perfused rat liver, with particular reference to gluconeogenesis.* «Eur. J. Biochem.», 10: 188-194 (1969).
18. MICHELS, R., CASON, J. i SOKOLOFF, L. — *Thyroxine. Effects on amino acid incorporation «in vivo».* «Science», 140: 1417-1418 (1963).
19. MURAD, S. i FREEDLAND, R. A. — *Effect of thyroxine administration on enzyme associated with glucose metabolism in the liver.* «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», 124: 1176-1178 (1967).
20. PRIMACK, M. P., TAPLEY, D. F. i BUCHANAN, J. — *Thyroid hormone stimulation of mitochondrial protein synthesis supported by an ATP generating system.* «Endocrinology», 91: 840-841 (1972).
21. REMINGTON, R. G. i LEVINE, H. — *Studies on the relations of diet to goiter.* «J. Nutr.», 72: 343-357 (1935).
22. RUPP, J. K., PASCHKIS, E. i CANTAROW, A. — *Influence of thyroxine on protein metabolism.* «Endocrinology», 44: 449-455 (1949).
23. SOKOLOFF, L. i KAUFMAN, S. — *Effects of thyroxine on amino acid incorporation into protein.* «Science», 129: 569-570 (1959).
24. WEISS, W. P. i SOKOLOFF, L. — *Reversal of thyroxine-induced hypermetabolism by puromycin.* «Science», 140: 1324-1326 (1963).
25. ZARROW, M. X., YOSHIN, J. M. i MCCARTHY, J. L. — A «Experimental Endocrinology». Academic Press, New York, pp. 240-248 (1964).