

# LA SÍNTESI DEL GLUCOGEN A PARTIR DE L'ÀCID LÀCTIC EN EL FETGE «IN VITRO»

per

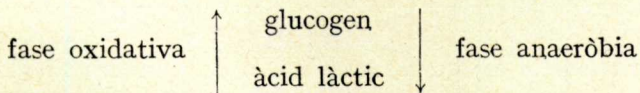
C. PI-SUÑER I BAYO

J. FOLCH I PI

Segona nota

En una nota anterior (1) ens ocupàvem de la síntesi de glucogen a partir de l'àcid làctic en el fetge «in vitro», en atmosfera d'oxigen. Una vegada vistos els resultats satisfactoris que ens proporcionaren aquelles experiències, corroborant els de diversos investigadors, i en contra de l'opinió sostinguda per d'altres (vegeu la bibliografia en la nota anterior), vàrem creure interessant de repetir-les, però operant aquesta vegada en atmosferes de diversos gasos inerts.

Efectivament, des de ja fa temps es considera vàlid en el que es refereix l'esquema de Meyerhof, amb les seves fases d'oxidació i de reducció:



esquema que també s'admeté en què es referia al metabolisme hepàtic. Però els treballs de Lundsgaard (2) i Nachmansohn (3), intoxicant el múscul amb àcid monoiòdaciàtic i observant com continuava treballant sense donar lloc a la formació d'àcid làctic, sinó a la descom-

posició del fosfagen d' Eggleton (4) en àcid fosfòric i creatina; els d' Embden (5), que observà exactament el mateix operant amb àcid monobromoacètic; i els molt recents de Mozolowski i col·laboradors (6), Lundsgaard (7), V. Henriques i Lundsgaard (8), etc., etc., demostrant que el múscul en aquestes condicions es troba en un estat absolutament normal (cronàxia, temps de reposició, etc.), semblen demostrar que el procés químic de la formació de l'àcid làctic és tan solament un més entre els variats que tenen lloc en el múscul.

D'altra banda, aquesta necessitat de reposició de l'aerobiosi per a efectuar-se la síntesi, recolzava en el fet de la quantitat d'energia necessària, i que se suposava alliberada per 1/5 de l'equivalent d'àcid làctic, que s'oxidava, mentre la resta era resintetitzada a glucogen. Recordant la teoria de la deshidrogenació de Wieland (9) veiem, però, que les oxidacions intraorgàniques són també possibles en absència d'oxigen. Molt recentment s'ha observat la capacitat d'algunes bactèries facultatives o anaeròbies (*b. proteus*, *b. coli*, *b. acidi lactici*) (10) de portar a cap el mecanisme de reoxidació de l'àcid succínic, tan ben esclarit per les investigacions de Thunberg (11), Widmark (12), Ohlson (13), Ahlgreen (14), etc. Un altre exemple ben típic el tenim en la redoxidació del glutathion, descobert per Hopkins (15) en el llevat i, més tard, en els teixits animals. Com que no creiem indicat el lloc per insistir sobre d'altres processos semblants, remetem el lector interessat en l'assumpte a la tesi de J. Pi-Suñer i Bayo (16), però sí que desitgem expressar clarament la nostra convicció que els fets descrits en aquestes experiències han de trobar llur explicació a la llum d'aquesta doctrina.

Pensant en tots els fets exposats, ¿per què no admetre la hipòtesi de la possibilitat de la síntesi hepàtica del

glucogen a partir de l'àcid làctic en anaerobiosi, o sigui en atmosfera de gasos inerts, negada fins ara pels investigadors? ¿No seria possible que l'energia necessària per a aquesta síntesi fos proporcionada per alguna reacció interna encara desconeguda? Efectivament, sense necessitat d'exposar hipòtesis més o menys arriscades, ens basta recordar l'existència de les dehidrases làctiques, tan esteses en els teixits animals, però sobretot en el fetge, i preparades després també a partir del llevat de cervesa i de certes bactèries (Bernheim (17) Stephenson (18)). Les làctico-dehidrases tenen una especificitat molt estricta, limitada als alfa-oxiàcids, i l'hidrogen que mobilitzen no es combina amb l'oxigen dissolt com acceptor; per la qual raó, seguint la classificació de Keilin, són dehidrases anoxítropes. Per llur intervenció, l'àcid làctic (lactats) dels teixits es transforma en àcid pirúvic (Hahn i Fischbach (19)), originant una reacció d'oxidació indirecta de l'àcid làctic, per deshidrogenació. La síntesi del glucogen a partir de l'àcid làctic, demostrada per tants mitjans experimentals, segueix un mecanisme bioquímic encara desconegut en gran part.

La làctico-dehidrasa potser formaria en un sistema de redoxidació, en el qual constituïria la primera anella i la més important. Mobilitzant els hidrògens de l'àcid làctic, aquest queda oxidat per una reacció en la qual no intervé directament l'oxigen, i passa automàticament a la fase oxidativa del metabolisme cel·lular dels hidrats de carbon. Sense gran esforç podríem desenrotllar un esquema de reaccions químiques que ens expliqués la transformació de l'àcid làctic en aldehyd pirúvic (metilglioxal) o en el seu hidrat, a partir del qual tindria lloc la polimerització a molècules més complexes. Els oxiàcids (i entre ells el làctic) intervenen, sens dubte, en la síntesi del glucogen, a l'estat d'aldehyd, sia el metil-

glioxal, sia l'acetaldehid, resultant de la descarboxilació de l'àcid pirúvic.

La identitat dels resultats obtinguts amb el O, N i CO<sub>2</sub> ens revela l'existència d'un mateix procés fonamental, que potser podria explicar-se fent actuar les dehidrases, segons el mecanisme indicat, de manera que per a la síntesi àcid làctic-glucogen no caldria el contacte de l'oxigen dissolt en el líquid amb les cèl·lules.

Seria possible, per altra banda, que aquesta síntesi fos un procés purament enzimàtic? Tot sembla indicar el contrari, i a més a més en totes les experiències fins avui conegudes la síntesi va unida a la vitalitat cel·lular, i, per tant, a l'existència de biocatalitzadors dels sistemes de dehidrases. És possible que també intervinguin constants físico-químiques, la modificació de les quals només sigui possible per un mecanisme col·loïdal unit a la mateixa vida de les cèl·lules. Donada la novetat dels nostres resultats, hem d'iniciar noves experiències per a confirmar-los o corregir-los, si calgués.

La manera d'operar ha estat la descrita en la nostra nota anterior, però substituint només l'oxigen pel nitrogen o l'anhidrid carbònic.

Per a la hidròlisi del glucogen hem usat el mètode de Pflüger, modificat per Collazo, i el sucre resultant fou valorat pel mètode de Bertrand.

Per a l'estudi de l'àcid làctic del Ringer ens valíem del mètode de von Fürth i Charnas, modificat per Hirsch i Kaufmann.<sup>1</sup>

1. Aquest mètode, donat a conèixer pels seus autors en 1910, descrit amb lleugeres variants en l'edició espanyola dels *Micromètodes* de L. Pincussen (1.<sup>a</sup> edició, pàg. 118) i citat repetidament per nosaltres en diverses notes, ha estat recentment descrit, sense menció del seu origen, pels Srs. J. Outeiriño i Maria Hernanz en *Medicina Ibero*, n.º 707, pàg. 853, 1931.

L'ordre de les experiències fou també el mateix, fent de cada fetge tres porcions (aproximadament de 1,5 gr.); en la primera de les quals, control, determinàvem directament el contingut en sucres reductors totals després de la hidròlisi; la segona s'introduïa en un dels tubs pels quals circulava la solució de Ringer sola, i la tercera en un altre que contenia el Ringer amb lactat. D'aquest últim prenem una certa quantitat, i després de la perfusió (50 cc.), per a observar si paral·lelament a l'augment del glucogen, es notava una disminució en el seu contingut en àcid làctic.

Les experiències, a l'igual que amb l'oxigen, duraven unes cinc hores; la temperatura del termòstat era de 37-39°, el PH del Ringer de 7-7'2 (excepció feta d'algunes experiències amb anhidrid carbònic, com veurem més endavant), i la quantitat de solució de Ringer que circulà per cada tub, d'uns 250 cc. La composició química del Ringer isotònic, així com unes consideracions sobre el poder rotatori de l'àcid làctic de què partirem i de la importància d'aquesta circumstància per a la bona marxa de la síntesi, es trobaran en la nostra nota anterior, repetidament esmentada.

#### ATMOSFERA DE NITROGEN

A continuació exposem els resultats de les cinc experiències efectuades en atmosfera d'aquest gas, en les quals pot observar-se un notable augment de la quantitat de sucres reductors totals després de la hidròlisi, al mateix temps que una intensa disminució en el contingut en àcid làctic del Ringer. De nou ens trobem amb l'augment dels sucres reductors totals amb només suspendre els trossets de fetge en el Ringer, exposat ja

en la nota anterior i observat també per J. Burn i H. Marks (20) i A. Carruthers (21).

## TAULA I

*Controls*

Sucres reductors totals després de la hidrolisi

<u>Fetge mgr.</u>	<u>Glucosa mgr.</u>	<u>Glucosa per 100</u>
1'333	14'6	1'27
1'472	17'4	1'67
1'361	27'1	2'00
1'808	13'0	0'73
1'782	28'0	1'57

## TAULA II

*Ringer sense lactat*

Sucres reductors totals després de la hidrolisi

<u>Fetge mgr.</u>	<u>Glucosa mgr.</u>	<u>Glucosa per 100</u>
1'434	30'5	2'1
1'481	25'3	1'7
1'377	27'8	2'0
1'723	17'0	1'1
1'751	38'0	2'5

## TAULA III

*Ringer amb lactat*

Sucres reductors totals després de la hidrolisi

<u>Fetge mgr.</u>	<u>Glucosa mgr.</u>	<u>Glucosa per 100</u>
1'399	36'0	3'3
1'096	20'1	2'7
1'104	30'8	3'2
1'628	48'0	3'1
1'786	56'0	3'2

A la taula següent, per tal de facilitar la visió de conjunt, donem reunits els valors per als sucres reductors totals després de la hidròlisi, en les porcions de fetge de

control, en les tractades amb solució de Ringer sola i en aquelles que ho foren amb el Ringer contenint lactat:

TAULA IV

Glucògen hepàtic per 100 de fetge fresc

Control	Ringer sense lactat	Ringer amb lactat
1'27	2'1	3'3
1'17	1'7	2'7
2'00	2'0	3'2
0'73	1'1	3'1
1'57	2'5	3'2
Valor mit. 1'35 %	1'8 %	3'1 %

Els valors per a l'àcid làctic que donem a la taula a continuació corresponen a les dues darreres experiències, ja que en les primeres no es verificà, desgraciadament, la determinació:

TAULA V

Àcid làctic en el Ringer

Abans del tractament	Després del tractament
0'160 por 100	0'061 por 100
0'160 por 100	0'070 por 100

## ATMOSFERA D'ANHÍDRID CARBÒNIC

Vegem ara als resultats de les vuit experiències efectuades en atmosfera d'anhídrid carbònic. Com s'observarà, els resultats obtinguts són molt dissemblants d'una experiència a una altra i les mitjanes resultants quasi iguals en el fetge de control i en el tractat amb solució de Ringer amb lactat. En determinar el PH d'aquest

Ringer, després de la perfusió, vàrem veure que de vegades àdhuc arribava a assolir valors de 5'1; sobretot en el Ringer sense lactat, ja que aquest, com és natural, actuava d'espasmòlic. Cal tenir en compte que en ambdues solucions existia una quantitat de bicarbonat disposada al mateix fi, que fou insuficient. Afegint una mescla de mono i difosfat sòdic, de manera que el Ringer continués essent isotònic, el PH després de la perfusió adquirí ja caràcters normals, i en les determinacions efectuades en aquestes condicions, el glucogen del fetge tractat amb lactat assolí valors majors al de control, cosa que demostra un altre cop l'acció glucolítica de l'acidesa del medi (J. Elias) (22). En resum, posant suma cura a neutralitzar absolutament l'acidesa del medi, originada pel pas durant cinc hores d'un corrent de carbònic, la síntesi a glucogen de l'àcid làctic sembla també tenir lloc en una atmosfera d'aquest gas, i se suspèn quan és massa accentuada l'acidesa del medi. Sobre aquest fet i la determinació del límit d'acidesa compatible amb la síntesi, pensem efectuar noves experiències. A continuació donem els resultats:

## TAULA VI

*Controls*

## Sucre reductors totals després de la hidrolisi

<u>Fetge mgr.</u>	<u>Glucosa mgr.</u>	<u>Glucosa per 100</u>
1'662	79'0	4'75
1'631	45'3	2'92
1'720	69'5	4'04
1'700	55'0	3'13
1'720	55'0	3'11
1'808	50'0	2'76
1'690	43'1	2'54
1'180	46'0	3'89



## TAULA VII

*Ringer sense lactat*

Sucre reductors totals després de la hidrolisi

Fetge mgr.	Glucosa mgr.	Glucosa per 100
I'431	37'5	2'62
I'378	35'5	2'58
I'670	82'0	4'91
I'875	57'0	3'04
I'650	27'5	1'66
I'757	61'4	3'48
I'735	56'3	3'24
I'620	69'1	4'26

## TAULA VII

*Ringer amb lactat*

Sucre reductors totals després de la hidrolisi

Fetge mgr.	Glucosa mgr.	Glucosa per 100
I'632	43'5	2'66
I'351	43'5	3'18
2'750	114'0	4'15
0'843	26'0	3'34
I'740	50'0	2'87
I'724	63'5	3'68
I'802	55'6	3'08
I'552	78'4	5'05

A la taula següent donem, com a la iv, conjuntament els valors dels sucres reductors totals per a les tres porcions de fetge : la de control, la tractada amb Ringer sol i la que ho fou amb el Ringer amb lactat:

TAULA IX

Glucogen hepàtic en per 100 de fetge fresc

Control	Ringer sense lactat	Ringer amb lactat
4'75	2'62	2'66
2'93	2'58	3'18
4'04	4'91	4'15
3'13	3'04	3'34
3'11	1'66	2'87
2'76	3'48	3'68
2'54	3'24	3'08
3'89	4'26	5'05
Valor mit. 3'40 %	3'22 %	3'50 %

A continuació transcrivim els valors d'àcid làctic corresponents tan solament a les cinc primeres experiències, per no haver-se efectuat la seva determinació en les últimes. Com es veu, la disminució de l'àcid làctic és molt menor que en l'atmosfera de nitrogen, paral·lelament al petit augment dels sucres reductors totals.

TAULA X

Àcid làctic del Ringer per 100

Abans del tractament	Després del tractament
0'1658	0'1630
0'1658	0'1602
0'1728	0'1719
0'1728	0'1710
0'1728	0'1692

Examinant els resultats anteriors, veiem que en les cinc experiències efectuades en atmosfera de nitrogen, s'observa un augment del glucogen, acompanyat d'un descens paral·lel en el contingut del Ringer en àcid làctic.

Pel que fa a les experiències amb anhídrid carbònic, els resultats són molt més irregulars, però sembla ésser que quan es té cura de neutralitzar exactament l'acidesa originada pel pas del corrent de gas durant cinc hores, s'observa també un augment en la quantitat de glucogen. És indubtable que un tan curt nombre d'experiències no permet pas d'establir conclusions definitives, sobretot en un assumpte tan delicat i exposat a múltiples causes d'error. Ja hem dit al principi que aquest augment — en cas d'ésser confirmat en noves experiències, ja en curs — podria tal vegada explicar-se de dues maneres: o bé que la síntesi pogués tenir també lloc en anaerobiosi, sempre que un procés químic simultani qualsevulla proporcionés la quantitat necessària d'energia, o que la tal síntesi no fos més que una acció fermentativa o zimàsica, independent del metabolisme de la cèl·lula hepàtica viva, i que àdhuc podria tenir lloc quan la cèl·lula hagués mort, a conseqüència de les condicions inadequades del medi. Destinades a esclarir aquest darrer extrem, hem començat una sèrie d'investigacions consistents, en línies generals, a sotmetre el teixit hepàtic, ben esmicolat prèviament amb arena fina, a la plasmòlisi amb solució de Ringer, tractat el plasmolitzat durant cinc hores en el nostre tub, com si fos la cèl·lula hepàtica, i investigar si d'aquesta manera augmentava, respecte al control, el seu contingut en sucres reductors totals. Els dos assaigs que portem efectuats fins ara no semblen demostrar, en aquestes condicions, síntesi de cap mena. Per això ens inclinem a favor de la primera de les hipòtesis exposades, per bé que és indubtable que cal verificar experiències en major escala, per tal de poder arribar a conclusions definitives.

## CONCLUSIONS

1.<sup>a</sup> Com a continuació d'una sèrie anterior es descriuen experiències de síntesi del glucogen a partir de l'àcid làctic en el fetge «in vitro», mantingut en una atmosfera de nitrogen, que donen un resultat positiu, com ja s'havia observat en el cas de l'oxigen.

2.<sup>a</sup> El mateix sembla esdevenir-se en atmosfera d'anhidrid carbònic, sempre que es tingui bona cura de neutralitzar degudament, en el Ringer, l'acidesa originada pel pas, durant cinc hores, del corrent del gas.

3.<sup>a</sup> Intentem explicar aquests fets, en certa contradicció amb les idees actuals i evidentment en nombre massa reduït per a poder deduir-ne conseqüències definitives, com una acció enzimàtica de la cèl·lula hepàtica, independent de la seva vida o mort (cosa que no sembla confirmar-se per alguns assaigs ja efectuats), o bé admetent la possibilitat de la síntesi en absència d'oxigen, sempre que una reacció simultània qualsevulla del complex quimisme cel·lular hepàtic cedeixi l'energia que calgui. És possible que pugui relacionar-se amb tot això el fet recentment observat que alguns microorganismes facultatius o anaerobis poden portar a terme el cicle d'oxidació àcid acètic-àcid succínic, i l'existència comprovada en diversos teixits, però sobretot en l'hepàtic, de les anomenades làcticodehidrases, capaces d'oxidar l'àcid làctic a àcid pirúvic, per deshidrogenació, en absència d'oxigen.

*Institut de Fisiologia  
Facultat de Medicina de Barcelona.*

## BIBLIOGRAFIA

1. *Pi-Suñer i Bayo i Folch i Pi*, Anal. Soc. Esp. Fis. Quim., 29, 560, 1931.
2. *Lundsgaard*, Bioch. Zeits., 217, 162, 1930.
3. *Nachmansohn*, Bioch. Zeits., 213, 262, 1929.
4. *Eggleton i Eggleton*, Journ. of Physiol., 63, 155, 1927.
5. *Embden*, Klin. Woch., 9, 1337, 1930.
6. *Mozolowski, Mann i Lutwak*, Bioch. Zeits., 231, 290, 1931.
7. *Lundsgaard*, Bioch. Zeits., 233, 322, 1931.
8. *Henriques i Lundsgaard*, Bioch. Zeits., 236, 219, 1931.
9. *Wieland*, Ergebn. d. Physiol., 20, 1922.
10. *Quastel i Weatley*, Bioch. Journ., 25, 117, 1931.
11. *Thunberg*, Skand. Arch. f. Physiol., 40, 1, 1927.
12. *Widmark*, Skand. Arch. f. Physiol., 61, 200, 1921.
13. *Ohlson*, Skand. Arch. f. Physiol., 61, 67, 1921.
14. *Ahlgreen*, Proc. of the Staff Meetings of the Mayo Clinic, 3, 86, 1927.
15. *Hopkins*, Biochem. Journ., 25, 1921.
16. *Pi-Suñer i Bayo*, Rev. Med. Barcelona, 73, 25, 1930.
17. *Bernheim*, Biochem. Journ., 22, 1928.
18. *Stephenson*, Biochem. Journ., 22, 1928.
19. *Hahn i Fischbach*, Zeits. f. Biol., 89, 149, 1926.
20. *Burns i Marks*, Journ. of Physiol., 61, 497, 1926.
21. *Carruthers*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 25, 850, 1928.
22. *Elias*, Bioch. Zeits., 68, 120, 1913.