

NIVELES DE ALGUNOS ENZIMAS PARTICIPANTES EN EL METABOLISMO DE LOS NUCLEOTIDOS DE ADENINA EN EL MUSCULO DE CORDERO DE RAZA «CHURRA» (4-6 SEMANAS); CAMBIOS EXPERIMENTADOS EN LOS ANIMALES AFECTOS DE MIODISTROFIA NUTRICIONAL ENZOOTICA*

*Por J. Zumalacárregui Rodríguez
y J. Burgos González*

INTRODUCCION

Los nucleótidos de adenina son objeto de un activo metabolismo tanto en el músculo del animal vivo como después de su sacrificio. En condiciones *post-mortem* el ADP liberado bajo la acción de las ATP-*asas* (generalmente la sarcoplasmática y en ciertas condiciones anómalas de la de la miosina) posteriormente se degrada a IMP e inosina a través de reacciones de desaminación e hidrólisis de ésteres fosfato.

Pese a su indudable interés desde el punto de vista de la bioquímica del músculo como alimento nuestros conocimientos de las rutas que conducen del ADP a la inosina e hipoxantina ofrecen todavía numerosas lagunas. Es muy poco también lo que se sabe sobre las alteraciones de los niveles alcanzados por algunos de los enzimas participantes en estas rutas en los músculos distróficos en general y en particular en los de los óvidos afectados de miodistrofia nutricional enzoótica. Prácticamente sólo se sabe que en los corderos afectados de distrofia nutricional experimentalmente provocada aumenta la tasa de la 5'-nucleotidasa (SCHUBERT y col. 1960; TAPPEL y col. 1962; ARNOLD y col. 1965).

Es de hacer notar, que en este laboratorio se han observado considerables diferencias en la marcha de las transformaciones *post-mortem* de los nucleótidos de los músculos de los corderos sanos y miodistróficos (MARTÍNEZ, 1975);

* Este trabajo forma parte de algunas investigaciones descritas en la tesis doctoral de la que es autor don José Zumalacárregui Rodríguez.

por lo que en este trabajo se consideró interesante determinar los niveles alcanzados en los músculos de los corderos sanos y en los afectos de miodistrofia nutricional enzoótica por algunos enzimas que participan en las reacciones de desaminación de los nucleótidos (AMP-desaminasa, Adenosín-desaminasa, ADP-desaminasa y Adenín-desaminasa); así mismo se consideró de interés el estudio de los niveles alcanzados por la creatino-quinasa (exponente del funcionamiento en el músculo de la reacción de Lohman).

MATERIAL Y METODOS

La obtención y preparación de las muestras es idéntica a la descrita en un trabajo previo (ZUMALACÁRREGUI y BURGOS, 1976).

Los sustratos utilizados en las determinaciones enzimáticas fueron suministrados por Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim (Alemania); el resto de los reactivos procedían de la casa Merck.

Para la preparación de los extractos necesarios para la determinación de las distintas desaminasas se siguió la técnica descrita por STONE (1970) y para la creatino-quinasa el método de BASS y col. (1969).

La creatino-quinasa se determinó de acuerdo con el método originalmente descrito por TANZAER y GILVARG (1959), basándose en el cambio de extinción a 340 mμ debido a la oxidación del NADH a NAD. Las distintas desaminasas se determinaron siguiendo la metodología descrita por KALCKAR (1947).

Las distintas actividades enzimáticas se expresan en términos de micromoles de sustrato transformados por gramo de músculo y por minuto a 25°C.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los enzimas responsables del metabolismo de los nucleótidos de adenina en el músculo de distintas especies animales han merecido la atención de distintos investigadores. Los más frecuente e intensamente estudiados son, sin duda, las ATP-asas que no han sido ensayadas por nosotros pero cuyas variaciones en las miodistrofias hereditarias y nutricionales son conocidas. MCCAMAN (1963) ha descrito un ligero incremento en los ratones con miodistrofia hereditaria de las ATP-asas activadas por el Ca y Mg y LOBLEY y col. (1971) un descenso de la actividad ATP-asa de la miosina activada por el Ca, en los conejos con distrofia nutricional inducida por falta de vitamina E.

La creatino-quinasa es un enzima cuyas tasas, dada la función (regeneración inmediata del ATP durante la contracción muscular) a que está destinada, deben ser más altas en los músculos blancos que en los rojos. Las observaciones experimentales de RAGGI y col. (1969) así parecen confirmarlo; sin em-

bargo, TURNER y MANCHESTER (1972) encuentran en un músculo rojo (el diafragma) tasas tan elevadas como en los músculos blancos.

Nuestros resultados, Tablas I, II y III, demuestran que la actividad creatino-quinasa de los tres músculos considerados es en los animales sanos muy similar, careciendo de cualquier significación estadística las diferencias observadas ($P > 0,05$).

TABLA I
Niveles alcanzados por los enzimas participantes en el metabolismo de los nucleótidos de adenina en el músculo «Longissimus dorsi» de corderos sanos y distróficos

Enzimas	Controles	Distróficos	Sign.	Unidades
<i>Creatino-quinasa</i>	179.07 (4) ±25.39	66.43 (7) ±11.17	$P < 0.001$	Micromoles de sustrato transformados min/gr de músculo
<i>AMP-desaminasa</i>	0.93 (6) ±0.20	0.96 (10) ±0.28	$P > 0.05$	»
<i>ADP-desaminasa</i>	0.12 (5) ±0.05	0.11 (5) ±0.05	$P > 0.05$	»
<i>Adenosín-desaminasa</i>	0.19 (5) ±0.02	0.35 (9) ±0.08	$P < 0.001$	»
<i>Adenín-desaminasa</i>	no poseen	no poseen	—	—

(): número de animales analizados.

TABLA II
Niveles alcanzados por los enzimas participantes en el metabolismo de los nucleótidos de adenina en el músculo «Seminembranosus» de corderos sanos y distróficos

Enzimas	Controles	Distróficos	Sign.	Unidades
<i>Creatino-quinasa</i>	169.74 (6) ±40.28	80.17 (8) ±46.22	$P < 0.01$	Micromoles de sustrato transformados min/gr de músculo
<i>AMP-desaminasa</i>	0.98 (6) ±0.30	0.64 (10) ±0.30	$P < 0.05$	»
<i>ADP-desaminasa</i>	0.14 (6) ±0.05	0.06 (5) ±0.04	$P < 0.05$	»
<i>Adenosín-desaminasa</i>	0.22 (5) ±0.05	0.46 (9) ±0.12	$P < 0.001$	»
<i>Adenín-desaminasa</i>	no poseen	no poseen	—	—

(): número de animales analizados.

TABLA III
Niveles alcanzados por los enzimas participantes en el metabolismo de los nucleótidos de adenina en el músculo «Semitendinosus» de corderos sanos y distróficos

Enzimas	Controles	Distróficos	Sign.	Unidades
<i>Creatino-quinasa</i>	178,81 (7) ±36,62	66,03 (8) ±26,04	P < 0,001	Micromoles de sustrato transformados min/gr de músculo
<i>Adenosín-desaminasa</i>	0,20 (5) ±0,06	0,33 (3) ±0,06	P < 0,05	»
<i>AMP-desaminasa</i>	no ensayada	no ensayada	—	—
<i>ADP-desaminasa</i>	no ensayada	no ensayada	—	—
<i>Adenín-desaminasa</i>	no poseen	no poseen	—	—

() : número de animales analizados.

Los músculos de los animales enfermos ven muy disminuida su tasa de esta actividad enzimática: en el *Semimembranosus* se reduce al 47 % (P < 0,01), en el *Semitendinosus* al 36 % (P < 0,001) y en el *Longissimus dorsi* al 37 % (P < 0,001). Este descenso de los niveles de creatino-quinasa debe traducirse en un entorpecimiento de la resíntesis rápida del ATP durante la contracción muscular.

Nuestras observaciones son concordantes con las de BUCHANAN - SMITH y col. (1969), efectuadas en el músculo *Quadriceps* de corderos con miodistrofia nutricional inducida, y con el notable incremento en la actividad creatinoquinasa observada en el suero sanguíneo de los animales distróficos (BUCHANAN - SMITH y col. 1969; TOLLERSRUD, 1971).

Es digno de señalar que de acuerdo con el trabajo de KENDRICK - JONES y PERRY (1967) el nivel de actividad alcanzado en las primeras semanas por los músculos de los animales depende de la actividad muscular. Aunque los corderos nacen en un considerable estado de madurez y el incremento en la actividad de este y otros enzimas importantes para la función contráctil del músculo debe tener lugar en ellos más rápidamente que en otros animales como la rata y el cobayo mucho más inmaduros al nacer, es probable que la escasa actividad muscular durante el período de inactividad que la miodistrofia provoca sea una de las causas (aunque también pueda ser en parte la consecuencia) de la escasa actividad creatino-quinasa muscular.

Los niveles de AMP-desaminasa y Adenosín-desaminasa parecen ser también más altos en los músculos blancos que en los rojos (RAGGI y col. 1969), aunque los resultados de TURNER y MANCHESTER (1972) no están plenamente de acuerdo con esta hipótesis. En cualquier caso también son, durante las primeras etapas de la vida de los animales, fuertemente dependientes de la edad y en los músculos esqueléticos del entrenamiento.

Nuestras determinaciones de AMP-desaminasa (realizadas sólo en el *Semimembranosus* y *Longissimus dorsi*) dan, en los animales control, valores muy similares para ambos músculos sin diferencias significativas entre ellos. Estos valores son comparables a las tasas observadas por TSAI y col. (1972) en el *Longissimus dorsi* de cerdos de la raza Chester White y muy considerablemente inferiores a las cifras que TURNER y MANCHESTER (1972) dan para distintos músculos de la rata.

De las distintas aminohidrolasas estudiadas esta es, con toda probabilidad, la más específicamente asociada a la bioquímica del músculo, ya que suele alcanzar tasas mucho más altas (60-100 veces) que en el resto de los tejidos (CONWAY y COOKE, 1939). Parece desempeñar funciones de gran importancia ya que es probable que contribuya de un modo muy apreciable a controlar, a través de la regulación del AMP, entre otras, actividades musculares tan importantes como la fosforilasa y fosfofructoquinasa. En el metabolismo muscular *post-mortem* parece jugar un importante papel en el control del pH final (SCOPES, 1974).

La comparación de las tasas alcanzadas por esta actividad enzimática en los músculos sanos y enfermos revela en el *Semimembranosus* un descenso del 30 %, estadísticamente significativo (P < 0,05) que no se aprecia, en cambio, en el *Longissimus dorsi*. Es muy probable que esta discrepancia en el comportamiento de ambos músculos de los animales enfermos esté relacionado con el distinto grado en que se ven afectados por la miodistrofia.

La Adenosín-desaminasa, parece ser un enzima mucho menos activo en el tejido muscular; así se ha demostrado en los conejos en los que su actividad es al nacer inferior a un 5 % de la AMP-desaminasa y desciende rápidamente después del nacimiento (KENDRICK - JONES y PERRY, 1967) y en los cerdos en los que TSAI y col. (1972) observan tasas de Adenosín-desaminasa 10 veces inferiores a las de AMP-desaminasa.

Nuestros resultados revelan tasas prácticamente idénticas en los tres músculos considerados de los animales sanos; estas tasas representan alrededor de un 20 % de la actividad AMP-desaminasa; evidentemente en los corderos parece alcanzar una importancia relativa a la AMP-desaminasa mucho más alta que en los conejos y en los cerdos; se desconoce en qué medida pueda este hecho verse reflejado en el metabolismo «*in vivo*», pero parece claro, en cambio, su importancia en lo que se refiere a las posibles vías de transformación del AMP en hipoxantina, si en los corderos funciona con alguna intensidad la 5'-nucleotidasa.

En los animales enfermos su tasa aumenta significativamente en todos los músculos, duplicándose su valor en *Semimembranosus* (P < 0,001) y en el *Longissimus dorsi* (P < 0,001) y multiplicándose por 1,65 en el *Semitendinosus* (P < 0,05).

Las determinaciones de ADP-desaminasa en los músculos son muy esca-

sas, aunque la existencia de este enzima en ellos se pusiera de manifiesto hace ya unos 25 años (DEUTSCH y NILSSON, 1954). Las efectuadas en el trabajo que estamos describiendo rinden valores muy similares para el *Longissimus dorsi* y el *Semimembranosus* de los corderos sanos y revelan un descenso del orden del 50 %, estadísticamente significativo ($P < 0.05$), en el *Semimembranosus* de los animales enfermos.

Es bien sabido que pese a la continua acción de las ATP-asas que degradan el ATP a ADP, en ningún momento se produce en condiciones *post-mortem* un acúmulo de ADP en el músculo, y que el producto final de la degradación de los nucleótidos de adenina en este tejido es la hipoxantina.

Las vías a través de las cuales puede teóricamente formarse la hipoxantina a partir del ADP son muy diversas y quedan recogidas en la Fig. 1.

Dos son pues las rutas que teóricamente pueden conducir del ADP al IMP; una a través de la mioquinasa y la AMP-desaminasa y otra vía la ADP-desaminasa y la inosindifosfatasa. Ordinariamente sólo se considera la primera, sin embargo, parece muy probable que también funcione la segunda ya que, según se ha dicho, la existencia en el músculo de la ADP-desaminasa fue probada en 1954 por DEUTSCH y NILSSON y la existencia de la inosindifosfatasa en algunos tejidos animales, como el hígado, fue demostrada por PLAUT (1955).

En los músculos de los corderos sanos la ADP-desaminasa ofrece una actividad apreciable y sin embargo (MARTÍNEZ, 1975) apenas si detecta IDP en ningún momento, en los músculos, dentro de las 24 horas siguientes al sacrifi-

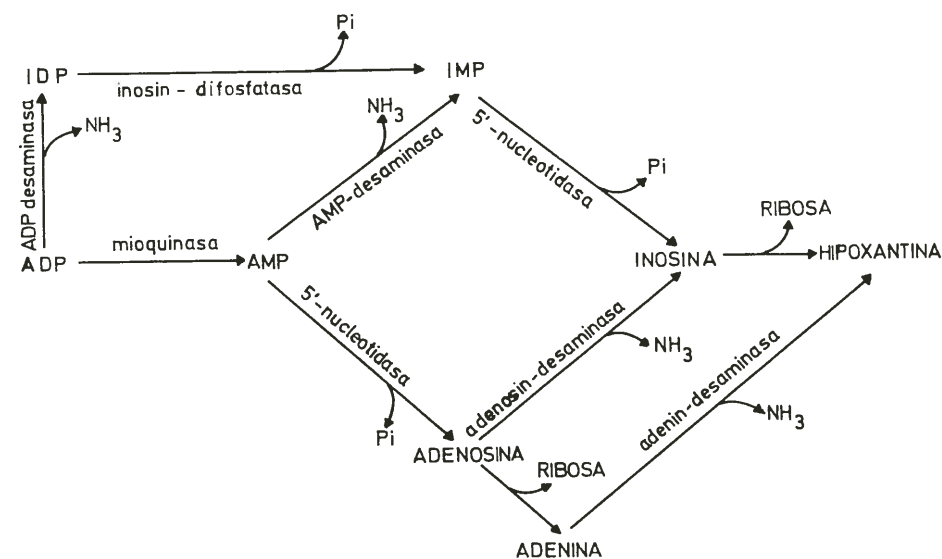


Fig. 1.—Transformaciones metabólicas de los nucleótidos de adenina.

cio, lo que sugiere el funcionamiento de una inosindifosfatasa, que complete la ruta ADP-IMP vía el IDP, y a una velocidad que no debe ser la limitante de la ruta. La importancia cuantitativa de las dos rutas que conducen a la formación de IMP puede, en cierto modo, establecerse comparando las actividades ADP y AMP-desaminasa. Tanto en los animales sanos como en los enfermos la actividad AMP-desaminasa es 7-9 veces más alta que la ADP-desaminasa; no obstante debe tenerse en cuenta que la mioquinasa, aunque parece ser un enzima más activo en los músculos que la AMP-desaminasa (TURNER y MANCHESTER, 1972) también parece ser el enzima limitante de la ruta ADP-AMP-IMP, dado que el AMP no se acumula en el músculo en ningún momento dentro de las 72 horas siguientes al sacrificio (KASTENSCHMIDT y col. 1968; TSAI y col. 1972; MARTÍNEZ, 1975).

La ausencia, tanto en los animales sanos como en los enfermos, de actividad Adenín-desaminasa pone de manifiesto que la ruta AMP - adenosina - adenina - hipoxantina no funciona; la misma observación ha sido hecha en el cerdo por TSAI y col. (1972) y en numerosos pescados por STONE (1970).

La conocida existencia en los músculos de los corderos de actividad 5'-nucleotidasa (SCHUBERT y col. 1960; TAPPEL y col. 1962; ARNOLD y col. 1965) y de Adenosín - desaminasa demostrada en este trabajo (como en los conejos por KENDRICK - JONES y PERRY, 1967 y en los cerdos por TSAI y col. 1972), demuestran la posibilidad de que parte del AMP pase a inosina vía la adenosina. La adenosina no parece acumularse en ningún momento en el músculo (KERR y SERAYDARIAN, 1945; TSAI y col. 1972) lo que sugiere (puesto que tampoco se acumula adenina y no existe Adenín - desaminasa) que la actividad limitante de esta ruta es la 5'-nucleotidasa, no medida en nuestros experimentos; el acúmulo de IMP que se observa siempre a lo largo de las transformaciones *post-mortem* de los nucleótidos sugiere que la ruta AMP-IMP-inosina se ve también limitada por la 5'-nucleotidasa.

En los animales distróficos se sabe que la 5'-nucleotidasa alcanza actividades considerablemente más altas que en los animales sanos (SCHUBERT y col. 1960; TAPPEL y col. 1962; ARNOLD y col. 1965) y según ponen de manifiesto los datos en este trabajo recogidos se ven deprimidas las actividades ADP y AMP-desaminasa y elevada la actividad Adenosín desaminasa, lo que sugiere un incremento considerable de la importancia relativa en estos animales de la ruta AMP-adenosina-inosina.

RESUMEN

Se ha investigado en los músculos *Semitendinosus*, *Semimembranosus* y *Longissimus dorsi* de corderos de raza «Churra» (4-6 semanas de edad) sanos y afectados de la miodistrofia nutricional enzoótica, los niveles alcanzados por la

creatino-quinasa y algunos enzimas participantes en el metabolismo de los nucleótidos de adenina.

Se observa en los músculos de los animales distróficos un descenso en los niveles de la creatino-quinasa, AMP y ADP-desaminasa, estando por el contrario aumentados en estos animales los niveles de adenosin-desaminasa. Se proponen varias rutas teóricas conducentes del ADP a la hipoxantina y de los resultados obtenidos se deduce que en los animales distróficos aumenta la importancia de la vía AMP – adenosina – inosina y que se ve entorpecida la resíntesis de ATP vía la reacción de Lohman.

RÉSUMÉ

On a fait des recherches sur les niveaux obtenus par la créatine-quinase et quelques enzymes qui participent dans le métabolisme des nucléotides d'adénine, dans les muscles *Semitendinosus*, *Semimembranosus* et *Longissimus dorsi* d'agneaux de race Churra (âges de 4 à 6 semaines) sains et affectés par la miodystrophie nutritive enzootique.

Dans les muscles des animaux dystrophiques on observe une diminution dans les niveaux de la créatine-quinase, AMP et ADP-desaminase, tandis que les niveaux d'adénosine-desaminase sont augmentés. On propose plusieurs voies théoriques qui conduisent du ADP à l'hypoxantine, et d'après les résultats obtenus on déduit que chez les animaux dystrophiques l'importance de la voie AMP ...adénosine ...inosine augmente, et que la resynthèse du ATP vers la réaction de Lohman est embarrassée.

SUMMARY

The levels of creatine-kinase and some enzymes participating in the metabolism of adenine nucleotides in the *Semitendinosus*, *Semimembranosus* and *Longissimus dorsi* muscles of «Churra» lambs (4-6 weeks old) healthy and suffering from enzootic nutritional muscular dystrophy have been studied.

A fall in the levels of creatine-kinase, AMP and ADP-deaminase and an increase of adenosine - deaminase activities was observed in dystrophic animals.

Several theoretical routes leading from ADP to hypoxantine are suggested and it is deduced that the importance of one of them (AMP - adenosine - inosine) raises and that the resynthesis of ATP through the Lohman's reaction is hindered in dystrophic muscles.

BIBLIOGRAFIA

- ARNOLD, M. A., WESWIG, P. H., MUTH, O. H. y OLFIELD, J. E. (1965).—*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **118**, 75.
 BASS, A., BRDIZGA, P., EYER, P., HOFER, S. y PETTE, D. (1969).—*Europena. J. Biochem.* **10**, 198.
 BUCHANAN-SMITH, J. G., NELSON, E. C. y TILLMAN, A. D. (1969).—*J. Nutr.* **99**, 387.
 CONWAY, E. J. y COOKE, R. (1939).—*Biochem. J.* **33**, 479.
 DEUTSCH, A. y NILSSON, R. (1954).—*Acta Chem. Scand.* **8**, 1898.
 KALCKAR, H. M. (1947).—*J. Biol. Chem.* **167**, 429.
 KASTENSCHMIDT, L. L., HOEKSTRA, W. G. y BRISKEY, E. J. (1968).—*J. Food Sci.* **33**, 151.
 KENDRICK-JONES, J. y PERRY, S. V. (1967).—*Biochem. J.* **103**, 207.
 KERR, S. E. y SERAYDARIAN, K. (1945).—*J. Biol. Chem.* **159**, 637.
 LOBLEY, G. E., PERRY, S. V. y STONE, D. (1971).—*Nature* **231**, 317.
 MARTÍNEZ, C. (1975).—Comunicación personal.
 MCCAMAN, M. W. (1963).—*Am. J. Physiol.* **205**, 897.
 PLAUT, G. W. E. (1955).—*J. Biol. Chem.* **217**, 235.
 RAGGI, A., RONCA-TESTONI, S. y RONCA, G. (1969).—*Biochim. Biophys. Acta* **178**, 622.
 SCOPES, R. K. (1974).—*Biochem. J.* **142**, 79.
 SCHUBERT, J. R., MUTH, O. H., OLFIELD, J. E. y REMMERT, L. (1960).—*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **104**, 568.
 STONE, F. E. (1970).—*J. Food Sci.* **35**, 565.
 TANZAER, M. L. y GILVARG, C. (1959).—*J. Biol. Chem.* **234**, 3201.
 TAPPEL, A. L., ZALKIN, H., CALDWELL, K. A., DESAI, I. D. y SHIBKO, S. (1962).—*Arch. Biochem. Biophys.* **96**, 340.
 TOLLERSRUD, S. (1971).—*Acta Vet. Scand.* **12**, 365.
 TSAI, R., CASSENS, R. G., BRISKEY, E. J. y GREASER, M. L. (1972).—*J. Food Sci.* **37**, 612.
 TURNER, L. V. y MANCHESTER, K. L. (1972).—*Biochem. J.* **128**, 803.
 ZUMALACARREGUI, J. y BURGOS, J. (1976).—*Anales de la Facultad de Veterinaria de León*. (En prensa).