

Efecto de la radiación gamma sobre el metabolismo nitrogenado

A. Galarza, D. Carriazo y B. Feijó

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Madrid

(Recibido el 5 de mayo de 1971)

A. GALARZA, D. CARRIAZO and B. FEIJOO. *Effect of Gamma Radiation on the Protein Metabolism*. R. esp. Fisiol., 27, 283-288. 1971.

Following our works about the effect of the gamma radiation on living organisms, we studied its action on the blood proteins, albumins, globulins, fibrinogen, haemoglobin, urea and free aminoacids from various organs related with the blood composition (liver, spleen, kidney, lung, heart) were determined. Changes were observed in the blood protein concentrations; but do not think the drops were produced directly by the radiation: albumins, fibrinogen, haemoglobin, decreased after the inoculation of 500 $\mu\text{c}/\text{kg}$ of $^{65}\text{ZnCl}_2$, while the globulins increased; the less haemoglobin concentration appeared immediately after the inoculation, with a maximum of ^{65}Zn in the organs; but the fibrinogen and the albumins decreased slowly, with a minimum at 25 days. In this period, the ^{65}Zn concentration in the organs is very small. The free proteinogenic aminoacids did not alter by the radiation. Delta aminolevulinic was the only aminoacid that increased. It is a haemoglobin precursor, and it is possible a Hb decrease- δ -ALA increase relationship. An increment of urea in blood was observed, but this increment coincided with a deficient elimination by urine. Because this, we do not think the urea elevation is produced by a major catabolism of proteins.

Los isótopos radiactivos utilizados como trazadores, aun en dosis muy pequeñas, son capaces de producir alteraciones en la composición de la sangre.

En trabajos anteriores dimos cuenta de la radiación gamma, utilizando Zn-65 como fuente de radiación, era capaz de provocar, inmediatamente después de la administración del isótopo, un descenso de todas las células de la sangre circulante y que una de las causas de la disminución de eritrocitos era la acción directa de la radiación sobre la permeabilidad del estroma celular, haciéndose las células más sensibles a la lisis (2, 7).

Prosiguiendo los estudios de los efectos

que los isótopos trazadores ejercen sobre la biología animal, hemos estudiado las variaciones de las proteínas plasmáticas (fibrinógeno, albúminas, globulinas); endocelulares (hemoglobina); de los aminoácidos séricos, de la reserva amínica de distintos órganos hemopoiéticos o relacionados con la composición de la sangre (hígado, bazo, riñón, pulmón y corazón), así como de los productos de la degradación proteica (urea) en sangre y orina.

Material y métodos

Se han utilizado ratas blancas Wistar en lotes de 10 animales. Como fuente de

radiación gamma se han empleado soluciones de Zn-65 por vía intraperitoneal por ser un elemento fácilmente asimilable por todos los órganos hematopoiéticos o relacionados.

En todos los casos la dosis administrada ha sido 500 $\mu\text{C}/\text{kg}$ en un conjunto de isótopo estable más isótopo radiactivo y siempre dentro de las necesidades normales del oligoelemento.

Para evitar al máximo los errores se sometieron al mismo tratamiento animales testigo inoculados con la misma cantidad de Zn, en forma única, de isótopo estable.

Para la determinación de fibrinógeno se separó del plasma oxalatado por recalcificación con Cl_2Ca y se valoró fotocolorimétricamente frente a un patrón de tirosina, estableciéndose las correspondencias consiguientes (9).

La determinación de las proteínas totales plasmáticas se efectuó fotocolorimétricamente por el método de Biuret (7).

La determinación de albúmina se realizó por fotocolorimetría por el método de Biuret, previa precipitación de las globulinas por aumento de fuerza iónica (5). Las globulinas se determinaron por diferencia entre proteínas totales y albúminas.

La valoración de hemoglobina (Hb) se realizó por fotocolorimetría, después de la lisis total de eritrocitos en medio hipotónico.

La determinación del nitrógeno sérico se verificó fotocolorimétricamente después de la reacción con β -naftoquinon-sulfonato-sódico (1, 8).

Para el fraccionamiento de aminoácidos séricos se purificaron previamente por cromatografía en columna y se fraccionaron por cromatografía sobre papel, realizando una triple separación sobre el mismo problema con Bu/Ac/ H_2O (4:1:5).

Para la determinación de aminoácidos tisulares de reserva se extrajeron de los homogenados de los tejidos con etanol absoluto, a fin de bloquear los procesos enzimáticos de repercusión en la cantidad

y cualidad de los aminoácidos libres (aminotransferasas, amoníaco y carboxiliasas, oxidorreductasas, peptidasas, etc.). Se fraccionaron por cromatografía sobre papel, verificando una triple separación sobre el mismo problema. El revelado se efectuó por tinción policromática con solución etanólica de ninhidrina al 0,1 %, acético glacial y colidina (100:30:4). Para conseguir las mínimas variaciones de tonalidad frecuentes con el revelado clásico en caliente, éste ha sido realizado a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante 12 horas, dentro de cartón negro (Ref. 1.310).

La determinación del nitrógeno ureico en sangre y orina se verificó por hidrólisis de la urea por acción de la ureamidohidrolasa, valorándose el N_2 por fotocolorimetría, previa reacción con reactivo Nessler.

El N_2 en sangre se refirió a 100 ml y el N_2 en orina al volumen eliminado en 24 horas (3).

Resultados

Según el período de latencia de la respuesta a la radiación, los derivados nitrogenados estudiados pueden ser divididos en dos grupos: a) de respuesta rápida (Hb, N_2 amínico); b) de respuesta lenta (proteínas plasmáticas y N_2 ureico).

La Hb disminuye en sangre circulante en las primeras horas que siguen a la administración del isótopo (fig. 1), mientras que el N_2 amínico aumenta por efecto de la radiación. La elevación es discreta (alrededor de un 11 % del valor inicial) (fig. 2).

El fraccionamiento de los aminoácidos libres indica que difieren en los distintos órganos relacionados con la bioquímica de la sangre (tabla I). Cualitativamente, esta composición no varía por efecto de la radiación; pero en hígado hay una manifestación cuantitativa en el δ -ALA, cuya concentración se eleva (fig. 3).

La radiación gamma influye poco sobre

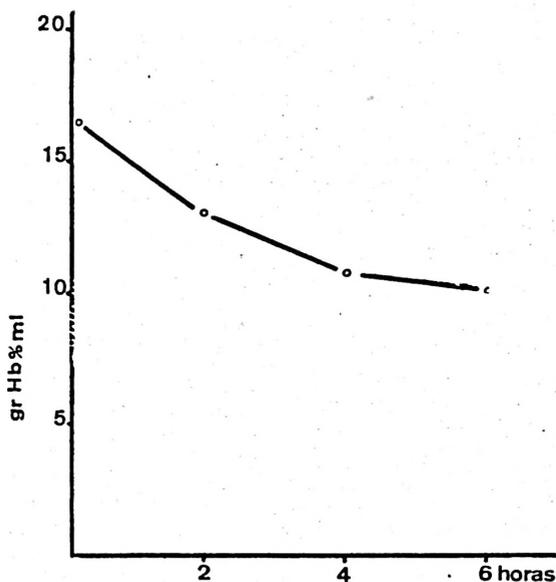


Fig. 1. Efecto de la radiación gamma (Zn-65) sobre el nivel de hemoglobina en la rata. La hemoglobina fue liberada por lisis total de los eritrocitos con agua desionizada y valorada por fotocolorimetría a 540 mμ.

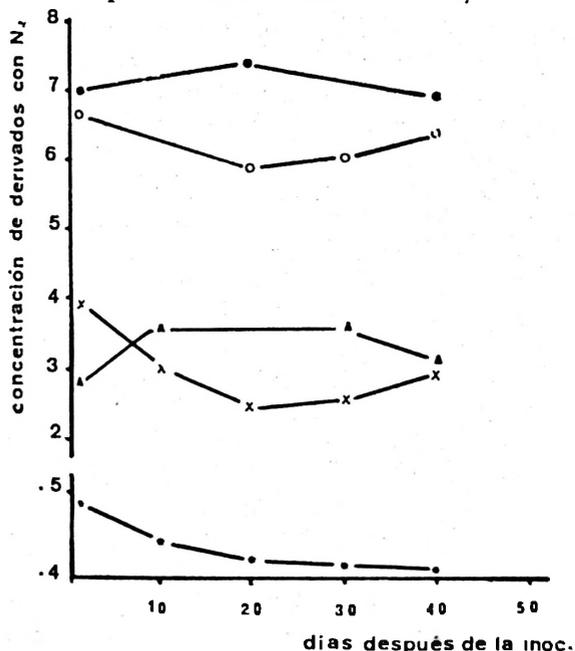


Fig. 2. Variaciones de las proteínas plasmáticas de la rata inducidas por la radiación gamma con Zn-65.

Proteínas totales en g % (●); N₂ aminico en mg % (○); albúminas en g % (×); globulinas en g % (▲); fibrinógeno en mg % (*).

Tabla I. Aminoácidos libres en suero y diversos órganos de rata.

Se extrajeron de los homogenados con etanol absoluto y se fraccionaron por triple cromatografía monodimensional en Bu/Ac/agua (4:1:5). Se revelaron con ninhidrina al 0,1 % en etanol, acético y colidina (100:30:4) en la oscuridad a temperatura ambiente.

libres Am-Ac	Distribución en:					
	Suero	Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Pulmón
α-Ala.	+	+	+	+	+	+
β-Ala.		+	+	+	+	+
δ-Ala.		+	+			
Arg.	+		+	+	+	+
Asp.	+	+	+	+	+	+
Asp.-NH ₂	+					
Cis.	+	+	+	+	+	+
S-S-Cis.	+	+	+	+	+	+
Ac.-Cis.	+	+	+	+	+	+
Cit.	+	+		+		
Fen.	+	+	+	+	+	
Gli.	+	+	+	+	+	+
Glu.	+	+	+	+		
Glu.-NH ₂	+					
His.	+	+	+	+	+	+
Ileu.	+	+	+	+	+	+
Leu.	+	+	+	+	+	+
Lis.	+	+	+	+	+	+
Met.	+	+	+	+	+	
Orn.		+				
Prot.	+	+	+	+		
Ser.	+	+	+	+	+	+
Tau.	+	+	+	+	+	+
Tir.	+	+	+	+	+	
Tre.	+	+	+	+	+	+
Tri.	+		+	+		
Val.	+	+	+	+	+	+

las proteínas totales plasmáticas, ya que, aunque se observa un ligero descenso, éste no sobrepasa de 0,5 g/100 ml. Sin embargo, las fracciones proteicas (albúminas, globulinas y fibrinógeno) sufren una alteración más pronunciada que las proteínas totales, disminuyendo a lo largo del tiempo las cifras de albúminas y fibrinógeno, y aumentando las globulinas. Esta disparidad en el efecto sobre las fracciones proteicas del plasma hace que la suma de las mismas, después de la administración

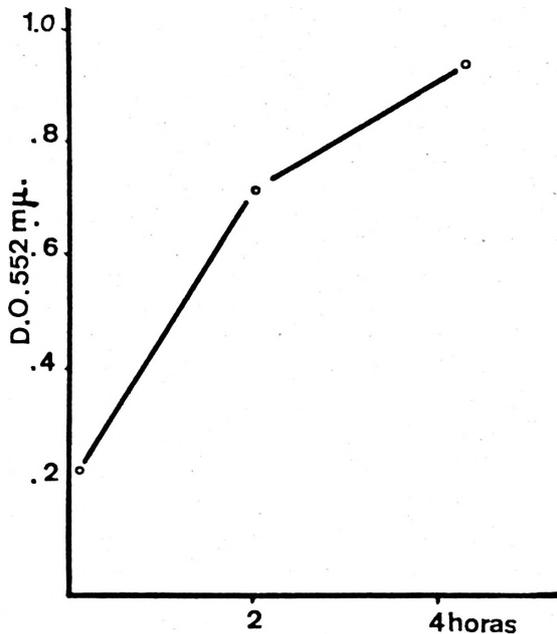


Fig. 3. Variación de δ -ALA.

El δ -ALA se eluyó en agua, se condensó con acetilacetona a 100°C y se valoró a 552 $m\mu$ con reactivo Erlich.

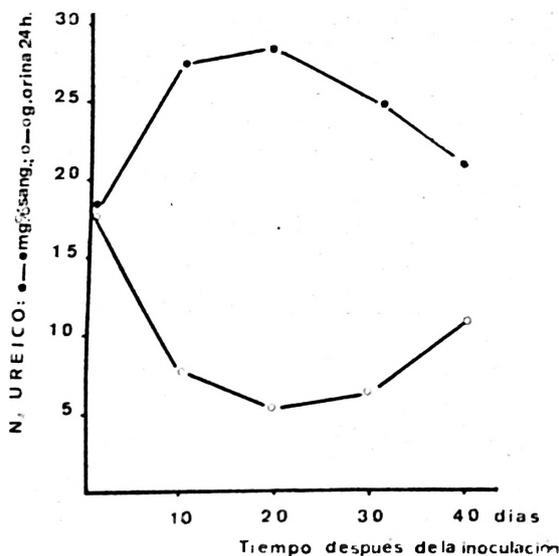


Fig. 4. Variación del N_2 ureico.

Se utilizó para su valoración el método de la ureasa y el N_2 se determinó con reactivo Nessler a 420 $m\mu$; (○) mg % en sangre; (●) g en 24 horas en orina.

del isótopo, no refleje los efectos con la intensidad con que se producen (fig. 2).

La aparición de las variaciones no es tan brusca como en el caso de la Hb, sino que se manifiesta lentamente y durante un período de tiempo mucho más prolongado.

El aumento de las globulinas plasmáticas no coincide con una elevación paralela de los leucocitos (6).

El N_2 procedente de la urea de la sangre se eleva al tiempo que disminuye el N_2 ureico en orina (fig. 4).

Discusión

La administración de Zn-65 en dosis del oligoelemento comprendidas entre las cifras normales de la dieta, producen variaciones en la composición proteica de la sangre. Algunas se manifiestan inmediatamente después de la inoculación del isótopo, como las cifras de Hb, δ -ALA y del N_2 de aminoácidos libres plasmáticos. Otras aparecen lentamente y su duración se prolonga durante períodos comprendidos entre los 20 y los 40 días (proteínas totales, albúminas, globulinas, fibrinógeno, N_2 ureico, etc.).

Las variaciones observadas en el metabolismo nitrogenado pueden atribuirse a una alteración directa de la síntesis proteica, a una alteración directa en el catabolismo nitrogenado o bien a otros efectos secundarios. Puesto que ni el sentido de las variaciones es el mismo, ya que unas proteínas aumentan mientras otras disminuyen, ni los períodos de tiempo en que las alteraciones se presentan coinciden, ni la reserva de los aminoácidos proteínogénicos varían con la radiación, parece lógico concluir que las variaciones observadas en las proteínas no se deben a una acción directa sobre su metabolismo, sino a otras acciones, de las cuales se siguen las variaciones observadas. En el caso de la Hb puede tener significado la elevación de uno de sus precursores hepáticos, como el ácido delta AL, así

como también la coincidencia de una anemia hemolítica por la radiación gamma, ya que los eritrocitos, por efecto de la radiación, son más sensibles a la lisis (2) y las ferritoproteínas séricas aumentan después de la irradiación (4).

Posiblemente, la radiación no influye directamente en las dosis utilizadas en la síntesis de las globinas.

Por otro lado, el aumento de la urea en sangre, paralela a una disminución en orina, tampoco refleja una activación del catabolismo nitrogenado, sino una alteración a nivel renal.

Resumen

Se estudia el efecto de radiaciones gamma (Zn-65) sobre las proteínas de la sangre y aminoácidos libres en suero y en tejidos relacionados con la composición nitrogenada de la sangre. Se han determinado albúmina, globulinas, fibrinógeno, hemoglobina, urea y aminoácidos. Se observan cambios en las concentraciones de proteínas. La hemoglobina, el fibrinógeno y las albúminas decrecen después de la administración de 65-ZnCl_2 ($500\ \mu\text{c}/\text{kg}$); pero no se atribuyen estas variaciones a una acción directa de las radiaciones sobre el metabolismo proteico, ya que mientras disminuyen las proteínas citadas, otras aumentan (globulinas); los períodos de tiempo en que las variaciones se presentan no coinciden; la Hb disminuye inmediatamente después de la inoculación del isótopo; las albúminas, globulinas y fibrinógeno varían con lentitud; la disminución de la hemoglobina coincide con una alta concentración de Zn-65 en hígado, bazo, pulmón, corazón, riñón. En este mismo período, la variación de las demás proteínas es insignificante

y, sin embargo, su máximo se presenta cuando el cinc ha sufrido un notable descenso en los órganos estudiados; los aminoácidos libres proteínogénicos tampoco se alteran. Solamente se observó un incremento de un aminoácido precursor del hemo en el hígado, el ácido delta-aminolevulínico.

Aunque la concentración de urea en sangre aumenta en los períodos de tiempo en que se producen cambios en la concentración de las proteínas plasmáticas, se supone que no es una consecuencia de un acelerado catabolismo proteico, sino una retención del metabolito, ya que disminuye paralelamente su eliminación por vía renal. Sin embargo, es posible una relación entre el aumento de delta-aminolevulínico hepático y la disminución de hemoglobina.

Bibliografía

1. FRAME, E. G.: *J. Biol. Chem.*, **194**, 255, 1943.
2. GALARZA, A., MATA, A., LUQUE, J., SANTOS-RUIZ, A.: *X Reun. Nal. Soc. esp. C. Fisiol.*, **197**, 1967.
3. GENTZKOW, I. y MASEN, I.: *J. Biol. Chem.*, **143**, 531, 1942.
4. LUQUE, J.: Tesis doctoral. Madrid, 1966.
5. Photocolorimetric «Lumetron» Man. Photocolorimetric Corporation, New York.
6. PURATIC, C., GALARZA, A., GARCÍA-AMO, C. y SANTOS-RUIZ, A.: *R. esp. Fisiol.*, **19**, 117, 1963.
7. REINER, M.: «Métodos seleccionados de análisis clínicos». Vol. I. Ed. Aguilar. Madrid, 1956.
8. RUSSELL, J. A.: *J. Biol. Chem.*, **156**, 467, 1944.
9. VARLEY, H.: «Métodos de análisis clínicos y su interpretación». Ed. Tecnos. Madrid, 1956.

