

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA  
MOLECULAR. UNIVERSIDAD DE GRANADA.

“EFECTOS NUTRICIONALES SOBRE LOS FLUJOS GLUCOLITICO Y  
GLUCONEOGENICO EN TUBULOS RENALES DE RATA”.

García-Salguero, L., Martínez-López, M. y Lupiáñez, J.A.

RESUMEN

Se han estudiado las capacidades gluconeogénica y glucolítica, así como los principales enzimas implicados en estos procesos bajo diferentes condiciones nutricionales, en túbulos renales. Existe un claro paralelismo entre los cambios que ocurren en los procesos gluconeogénico y glucolítico y los enzimas responsables de ambos procesos durante la ingestión de una dieta alta en glúcidos. Con una dieta alta en proteínas el comportamiento glucolítico indica claramente un elevado flujo del metabolismo mitocondrial. Por último, durante el ayuno, el aumento en la formación de glucosa y la disminución de la capacidad glucolítica, parece depender además de la actividad de otros enzimas implicados en estos procesos.

SUMMARY

Gluconeogenic and glycolytic capacities as well as the most important enzymes of these processes have been studied in isolated renal tubules under different nutritional conditions. During a high-carbohydrate diet there is a parallelism between the changes in gluconeogenic and glycolytic processes and the enzymes involved in these processes. Whereas with a high-protein diet the glycolytic behaviour clearly indicate a high flux of the mitochondrial metabolism. Finally, during starvation, besides the activity of the enzyme assayed, the opposite effect in renal glucose synthesis and oxidation appears to be related to other molecular aspects involve in these processes.

## INTRODUCCION

Tradicionalmente se ha considerado al tejido hepático como el principal responsable del mantenimiento de los niveles de glucosa sanguíneos, tanto por su papel de almacenador de glucógeno, destinado no para su consumo sino para su distribución como glucosa al resto del organismo, como el ser el tejido encargado de llevar a cabo todos aquellos cambios adaptativos necesarios para suplir la falta de este combustible mediante su síntesis de novo (1).

De la misma manera, y de forma generalizada, se ha considerado a la corteza renal como el tejido capaz de aportar glucosa al organismo entero de una forma constante y fundamentalmente reducida (2), salvo en aquellos casos que se requiera para llevar a cabo el específico metabolismo renal. Sin embargo existen varias razones que permiten pensar que esto no es así, y que por tanto la corteza renal juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis glucémica, y los últimos trabajos así lo demuestran (3-6).

Por ello, se ha querido estudiar de forma global y sistemática, los posibles cambios adaptativos que experimenta el riñón, y concretamente la corteza renal, frente a un grupo de situaciones caracterizadas por el aporte exógeno de diferentes macronutrientes, a fin de comprobar si este tejido es capaz de conectar el metabolismo de los mismos con el proceso gluconeogénico, y si es así, cuales son los principales mecanismos responsables para llevarlo a cabo, siendo éste el principal objetivo de este trabajo.

## MATERIAL Y METODOS.

Se han utilizado ratas machos de raza Wistar, con un peso entre 200 y 250 gramos. Se mantuvieron con luz artificial que se encendía a las 8 horas y se apagaba a las 20 horas, en habitación termostizada a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Fueron alimentadas con una dieta estándar (Sandermus D.G.P.A. 14685: 54.5 % carbohidratos, 18 % proteínas, 4,5 % aceite de oliva) al menos durante 10 días para su adaptación. Tras este período y siempre a las 8 horas (inicio del ciclo de luz), eran separados en diferentes jaulas 5 ó 6 animales para ser alimentados con una dieta alta en carbohidratos (80 % carbohidratos, 6 % proteínas, 8 % aceite de oliva), dieta alta en proteínas (78 % proteínas, 5 % carbohidratos, 10.5 % aceite de oliva) o bien ser sometidos a ayuno durante 24 ó 48 horas, en todos los casos con libre acceso al agua.

Para la preparación de túbulos renales se ha seguido el método de Vinay et al. (7) que consiste en la digestión del tejido de corteza renal durante 30 min. y a  $37^\circ\text{C}$  en un medio que contiene 1mg/ml de colagenasa y 5mg/ml de albúmina bovina. El material utilizado en cada momento fue de plástico o de vidrio previamente siliconado con una mezcla de diclorometano-trimetilclorosilano (100:2), para evitar la adherencia del tejido a las paredes del vidrio.

La determinación de las capacidades gluconeogénica y glucolítica renales así como los ensayos de actividades enzimáticas se han llevado a cabo mediante los métodos descritos previamente (5, 6).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Para cada situación nutricional (dieta alta en carbohidratos, alta en proteínas y ayuno) se han analizado conjuntamente las capacidades gluconeogénica y glucolítica y las actividades enzimáticas de cada uno de estos procesos. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con una dieta rica en carbohidratos, indicando el porcentaje de activación (+) o inhibición (—), según el caso. Se puede observar un total paralelismo entre la formación de glucosa y la actividad del enzima gluconeogénico, fructosa 1,6-bisfosfatasa, presentando una inhibición aproximadamente del mismo orden. Esto parece indicar que la disminución que existe en la formación de la glucosa con una dieta alta en carbohidratos es debida a la disminución en la actividad de la fructosa 1,6-bisfosfatasa. Esta disminución sólo tiene lugar a concentración subsaturante de sustrato (tabla 1), sin cambios a velocidad máxima (tabla 4), por lo que se descartan cambios en el proceso de síntesis / degradación protéica.

Tabla 1.- Efecto de una dieta alta en carbohidratos sobre la gluconeogénesis y glucolisis, y actividades enzimáticas en túbulos renales.

Parámetro metabólico	0 horas	24 horas	48 horas	%
Gluconeogénesis	84.15±4.75 (9)	71.14±5.54 (6)	65.35±4.93 (6)	-22.4
FBPasa	33.00±2.36 (9)	26.77±2.53 (6)	24.04±2.13 (6)	-27.1
Glucolisis	16.07±1.16 (8)	23.63±2.10 (7)	32.09±3.06 (6)	+99.7
PFK	1.17±0.05 (9)	1.48±0.07 (7)	1.59±0.11 (6)	+35.9
PK	20.03±1.03 (9)	27.60±2.07 (6)	31.00±1.86 (6)	+54.8

Las capacidades gluconeogénica (formación de glucosa) y glucolítica (formación de piruvato + lactato) se expresan en nmoles/hora de incubación/mg de tejido seco. El — representa el S.E.M. y entre paréntesis se indica el n.º de experimentos. Las actividades enzimáticas que se indican en la tabla corresponden a la concentración subsaturante de sustrato, y se expresan en nmoles de sustrato transformado/min/mg de proteína. Se indican los porcentajes de activación (+) o de inhibición (—) con respecto a las 0 horas.

Tabla 2.-Efecto de una dieta alta en proteínas sobre la gluconeogénesis y glucolisis, y actividades enzimáticas en túbulo renales.

Parámetro metabólico	0 horas	24 horas	48 horas	%
Gluconeogénesis	84.15±4.75 (9)	93.55±6.20 (7)	103.62±5.04 (8)	+23.2
FBPasa	33.00±2.36 (9)	38.01±2.33 (8)	39.42±2.08 (6)	+19.5
Glucolisis	16.07±1.16 (8)	15.27±1.49 (7)	16.30±1.08 (6)	+1.4
PFK	1.17±0.05 (9)	1.40±0.09 (8)	1.53±0.09 (7)	+30.8
PK	20.03±1.03 (9)	26.70±1.71 (7)	29.48±2.23 (8)	+47.2

Las condiciones experimentales son idénticas a las de la tabla 1.

Tabla 3.- Efecto del ayuno sobre la gluconeogénesis y glucolisis, y actividades enzimáticas en túbulo renales.

Parámetro metabólico	0 horas	24 horas	48 horas	%
Gluconeogénesis	84.15±4.75 (9)	103.44±8.43 (7)	144.14±9.63 (8)	+71.3
FBPasa	33.00±2.36 (9)	41.63±2.76 (8)	44.31±1.75 (8)	+34.3
Glucolisis	16.07±1.16 (8)	9.42±0.98 (7)	8.48±0.85 (6)	-47.3
PFK	1.17±0.05 (9)	0.99±0.03 (7)	0.88±0.05 (8)	-24.8
PK	20.03±1.03 (9)	19.86±1.28 (7)	19.81±1.53 (8)	-1.2

Las condiciones experimentales son idénticas a las de la tabla 1.

La glucolisis por el contrario se ve activada fuertemente con esta dieta, coincidiendo prácticamente los valores de incremento en la capacidad glucolítica (99.7) con la suma de las actividades de los dos enzimas claves del proceso, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa (35.9 + 54.8), lo que demuestra un acusado paralelismo entre el comportamiento metabólico y las actividades enzimáticas claves de dicho proceso.

Una de las principales características que presentan los animales sometidos a una dieta rica en carbohidratos, consiste en un aumento de hasta 10 veces en la relación insulina / glucagon (8,9). Este aumento en el nivel de insulina y disminución de glucagon podría explicar los cambios obtenidos en ambos procesos. Los resultados están de acuerdo con Krebs et al. (10) que muestran una respuesta adaptativa del riñón aunque ellos someten a los animales a una dieta baja en carbohidratos. Actualmente se considera al ciclo catalizado por la fosfofructoquinasa y fructosa 1,6-bisfosfatasa como el punto principal de regulación del proceso glucolítico / gluconeogénico, en donde juega un importante papel regulador la presencia o ausencia de fructosa 2,6-bisfosfato, principal activador de la fosfofructoquinasa (11) e inhibidor de la fructosa 1,6-bisfosfatasa (12).

En este sentido, Sommercorn y Freedland (13) muestran que las dietas altas en carbohidratos incrementan considerablemente las concentraciones de fructosa 2,6-bisfosfato en la corteza renal, las cuales podrían aumentar el proceso glucolítico por activación de la fosfofructoquinasa e inhibición de la fructosa 1,6-bisfosfatasa.

Tabla 4.-Efecto del ayuno, dieta alta en carbohidratos y dieta alta en proteínas sobre los enzimas gluconeogénicos y glucolíticos en túbulos renales.

	Control	48h Ayuno	48h CH	48h Prot
FBPasa	158.86±10.23 (9)	161.85±10.47 (8)	147.13±8.86 (6)	155.16±23.31 (7)
PFK	14.76±0.71 (9)	13.95±0.70 (8)	14.61±0.84 (6)	14.78±0.62 (7)
PK	144.39±6.09 (9)	134.63±6.30 (8)	147.24±6.33 (6)	173.06±6.22* (7)

Las actividades enzimáticas que se indican en la tabla corresponden a la concentración saturante de sustrato. La actividad específica va expresada en nmoles de sustrato transformados/min/mg de proteína. El  $\pm$  representa el error estándar de la media y entre paréntesis se indica el número de experimentos. El grado de significancia con respecto al control; \*  $P < 0,005$ .

En la tabla 2 se muestra el efecto de una dieta alta en proteínas sobre los diferentes aspectos estudiados del metabolismo glucídico en túbulos renales a las 24 y 48 horas, expresándose los cambios que tienen lugar a las 48 horas como porcentajes de activación o inhibición. En el caso de la gluconeogénesis, se observa la existencia de un paralelismo entre el proceso gluconeogénico y la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa, indicando, al igual que con la dieta alta en carbohidratos, que el incremento producido en la formación de glucosa es debido a la activación (únicamente a concentración subsaturante de sustrato) de este enzima.

Por lo que respecta a la glucólisis, el comportamiento es diferente. A lo largo del tiempo no se modifican los valores de glucólisis, medidos como la suma de lactato y piruvato producidos, mientras que aparecen cambios muy significativos en la actividad total de los dos enzimas glucolíticos ensayados, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa, con diferencias al final de las 48 horas del orden del 30 y 50 % respectivamente. Esta aparente contradicción podría ser explicada por un flujo acelerado del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en estas condiciones, que tiene lugar al incremento de intermediarios de esta ruta que proporciona la degradación del exceso de aminoácidos. Debido a esto, la mayor parte del piruvato y lactato producidos serían utilizados mitocondrialmente.

La actividad fosfofructoquinasa sólo se modifica a concentración subsaturante de sustrato, mientras que la piruvato quinasa a las 48 horas presenta también un incremento de su velocidad máxima (tabla 4), lo que pone de manifiesto una mayor síntesis de enzima.

Las variaciones en los niveles hormonales bajo estas condiciones parecen explicar los cambios que ocurren a nivel enzimático y del proceso gluconeogénico. La concentración de glucagón aumenta en ratas alimentadas con dietas altas en proteínas (9). Fafournoux et al. (14) sugieren asimismo que por medio de estos cambios hormonales, la dieta alta en proteínas estimula el sistema de transporte A de aminoácidos. Consecuentemente, la relación insulina / glucagón es inferior bajo esta situación, aunque Demigné et al. (15) encuentran un incremento de insulina, durante las primeras horas, necesaria en el período de máxima absorción de nutrientes.

Por último en la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos al haber sometido a los animales a ayuno de 24 ó 48 horas. Hay que destacar la fuerte activación producida en la formación de glucosa que no se corresponde totalmente con el aumento en la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa. Esto se explica porque durante el ayuno se produce un aumento muy significativo en otro enzima gluconeogénico, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (16). Por otra parte la actividad glucosa 6-fosfatasa hepática se incrementa también durante el ayuno (1).

A la vez que existe un incremento en la gluconeogénesis, tiene lugar una inhibición en la capacidad glucolítica y en uno de los dos enzimas glucolíticos, la fosfofructoquinasa; en cambio no existe ninguna modificación en la activi-

dad piruvato quinasa. Tampoco en este caso la inhibición producida en la capacidad glucolítica se corresponde totalmente con la producida en la actividad fosfofructoquinasa, lo que indica que otros enzimas deben estar implicados.

Los cambios producidos en la actividad de los dos enzimas modificados durante el ayuno, fructosa 1,6-bisfosfatasa y fosfofructoquinasa, sólo ocurren a concentración subsaturante de sustrato sin ningún cambio a concentración saturante de sustrato (tabla 4).

Es bien conocido que durante el ayuno, los principales factores responsables de los cambios metabólicos que en él tienen lugar, están asociados a un aumento en la concentración de glucagon y una disminución de insulina en plasma (17), lo que explicaría el aumento de la gluconeogénesis y la disminución de la glucólisis renal. Los efectos que producen los glucocorticoides son también esenciales en la adaptación metabólica al ayuno (18).

Los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato disminuyen mucho, incluso después de 24 horas de ayuno, como consecuencia del aumento de glucagon circulante, activando la fructosa 1,6-bisfosfatasa e inhibiendo la fosfofructoquinasa (19).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por la CAICYT (proyecto 1139/81). L. García-Salguero ha sido becaria del P.F.P.I. del Ministerio de Educación y Ciencia.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) HERS, H.G. y HUE, L. (1983). *Ann. Rev. Biochem.* 52, 617-653.
- (2) KIDA, K., NAKAJO, S., KAMIYA, F., TOYAMA, Y., NISHIO, T. y NAKAGAWA, H. (1978). *J. Clin. Invest.* 62, 721-726.
- (3) LUPIAÑEZ, J.A. FAUS, M.J., MUÑOZ-CLARES, R. y SANCHEZ-MEDINA, F. (1976). *FEBS Lett.* 61, 277-281.
- (4) SANCHEZ-POZO, A., LUPIAÑEZ, J.A., CORNO, A., PITA, M.L. y SANCHEZ-MEDINA, F. (1983). *Molecular Physiology*, 3: 143-150.
- (5) GARCIA-SALGUERO, L., PERAGON, J. y LUPIAÑEZ, J.A. (1987). *Ars Pharmaceutica XXVIII*: 195-201.
- (6) GARCIA-SALGUERO, L., CORPAS, J., BARROSO, J.B. y LUPIAÑEZ, J.A. (1987). *Ars. Pharm.* En prensa.
- (7) VINAY, P., GOUGOUX, A. y LEMIEUX, G. (1981). *Am. J. Physiol.*, 341, F403-F411.
- (8) TIEDGEN, M. y STEITZ, H.G. (1980). *J. Nutr.* 110, 876-882.
- (9) PERET, J., FOUSTOCK, S., CHANEZ, M., BOIS-JOYEUX, B. y ASSAN, R. (1981). *J. Nutr.* 111, 1173-1184.
- (10) KREBS, H. A., BENNETT, D.A.H., DE GASQUET, P., GASCOYNE, T. y YOSHIDA, T. (1963). *Biochem. J.* 86, 22-27.
- (11) HUE, L., BLACKMORE, P. y EXTON, J.H. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 8900-8903.
- (12) VAN-SCHAFTINGEN, E., JET, M.F., HUE, L. y HERS, H.G. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 3483-3486.
- (13) SOMMERCORN, J. y FREEDLAND, R.A. (1984). *J. Nutr.* 114, 1462-1469.
- (14) FAFOURNOUX, P. REMESY, C. y DEMIGNE, C. (1982). *Biochem. J.*, 206, 13-18.

- (15) DEMIGNE, C., FAFOURNOUX, P. y REMESY, C. (1985). *J. Nutr.* 115, 1065-1072.
- (16) CIMBALA, M.A., LAMERS, W.H., NELSON, K., MONAHAN, J.E., YOO-WARREN, H. y HANSON, R.W. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 7629-7636.
- (17) MARLISS, E.B., AOKI, T.T., POZEFSKY, T., MOST, A.S. y CAHILL, G.F. Jr. (1971). *J. Clin. Invest.* 50, 814-817.
- (18) EXTON, J.H., MILLER, T.B. Jr., HARPER, S.C. y PARK, C.R. *Am. J. Physiol.* 230, E163-E179.
- (19) PILKIS, S.J., CHRISMAN, T.D., BURGESS, B., MCGRANE, M., COLOSIA, A., PILKIS, J., CLAUS, T.H. y EL-MAGHRABI, M.R. (1983). *Adv. Enzyme. Regul.* 21, 147-173.