

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA
MOLECULAR. UNIVERSIDAD DE GRANADA.

“INFLUENCIA DE CICLOS ALTERNATIVOS ALIMENTACION-
AYUNO SOBRE LOS PRINCIPALES ENZIMAS DEL METABOLISMO
RENAL DE CARBOHIDRATOS”.

García-Salguero, L., Corpas, J., Barroso, J.B. y Lupiáñez, J.A.

RESUMEN

Con objeto de explicar molecularmente los cambios descritos en el metabolismo renal de carbohidratos (1) se han estudiado los efectos que diferentes ciclos de alimentación y ayuno presentan sobre los principales enzimas implicados en los procesos glucolítico y gluconeogénico. En general durante el período de alimentación se activan los enzimas glucolíticos y se inhiben los gluconeogénicos. Efectos opuestos se observan durante los períodos de ayuno. Estos resultados permiten concluir que la corteza renal es capaz de adaptar continuamente los mecanismos enzimáticos necesarios para ajustar el destino de macronutrientes tanto de procedencia exógena como endógena.

SUMMARY

In order to explain the changes previously described by us in the renal carbohydrate metabolism during different starved-feed cycles (1), the effects of this nutritional situation on the most important enzymes involved in the glycolytic and gluconeogenic processes have been studied. In general, during the feed-state all the glycolytic enzymes increased its activities whereas a decrease was found in the gluconeogenic ones. Opposite effects were obtained during starvation. Several mechanism of enzymatic regulation are shown throughout the development of these nutritional conditions.

INTRODUCCION

Uno de los aspectos más importantes para todos los organismos vivos, desde el punto de vista metabólico, es la adaptación de las diferentes rutas me-

tabólicas que operan en cada tejido, de acuerdo con el estado nutricional y hormonal que domina en ese momento. El adecuado balance de estas vías metabólicas se consigue por el continuo intercambio de sustratos y productos entre los distintos órganos y tejidos, la actividad de los enzimas que en ellas participan y el supracontrol que sobre ellos ejercen las diferentes hormonas. El destino de los nutrientes que proceden de la dieta dependerá de la situación metabólica existente.

La capacidad de síntesis de glucosa es de vital importancia para la supervivencia del animal, ya que le permite el mantenimiento de los niveles aceptables de glucosa en sangre por bastante tiempo después de que toda la glucosa procedente de la dieta se haya utilizado completamente.

El proceso glucolítico en mamíferos tiene lugar en todas las células del organismo, sin embargo, la gluconeogénesis ocurre de forma importante y significativa sólo en dos tejidos, hígado y corteza renal. Al ser el hígado el principal órgano encargado de mantener la homeostasis glucémica, la mayoría de los trabajos aparecidos hasta ahora en la bibliografía se refieren a este órgano. El significado biológico de la gluconeogénesis renal aún no está claro del todo, aunque hay datos que indican que ésta es importante al menos bajo determinadas circunstancias, especialmente cuando la capacidad gluconeogénica hepática se encuentra disminuida (2-4). La contribución renal puede ser de un 50 %, como en casos de ayuno o diabetes (5,6) o de hasta un 95 % en casos de incapacidad funcional hepática (2-4), con el fin de procurar unas concentraciones de glucosa en sangre adecuadas para el animal.

El objeto de este trabajo se ha centrado en conocer los posibles cambios adaptativos del metabolismo de carbohidratos en corteza renal en respuesta a diferentes ciclos de alimentación y ayuno, estudiando el comportamiento catalítico de los principales enzimas implicados en los procesos glucolítico y gluconeogénico de este tejido.

MATERIAL Y METODOS

Animales.

Tanto las características de los animales como su manipulación, se especifican en la sección de Material y Métodos del trabajo anterior (1). Se han analizado las actividades enzimáticas a las 0 horas, 96 h con la dieta (o ayuno), 24, 48 y 96 h de ayuno (o dieta) y 24 y 48 h de dieta (o ayuno).

Determinaciones enzimáticas.

Para el ensayo de las actividades enzimáticas, se homogeneizó la corteza renal en un medio que contenía 0.25 mM de sacarosa, 1mM de Tris, 0.1 de EDTA y 1 mM de DTT a pH 7.6.

Para la determinación de la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa (EC 3.1.3.11) se siguió el método descrito por Mendicino y Vasarhely (7). Las con-

concentraciones de sustrato utilizadas fueron 0.0025 mM de fructosa 1,6-bisfosfato (concentración subsaturante) y 0.1 mM (concentración saturante) y de acuerdo con la constante de equilibrio de la reacción se utilizaron las triosas fosfato como precursoras del sustrato. La actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (EC 4.1.1.32) fue ensayada según el método de Ballard y Hanson (8). Las concentraciones de fosfoenolpiruvato utilizadas fueron 0.0025 mM (subsaturante) y 1 mM (saturante). La actividad enzimática fue ensayada a 30°C. Para la determinación de la actividad fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.11) se utilizó el método de Castaño et al. (9). La actividad fue medida a 25°C y con dos concentraciones de sustrato, 0.25 mM (subsaturante) y de 3 mM (saturante). La actividad piruvato quinasa (EC. 2.7.1.40) se determinó según el método descrito por Carbonell et al. (10). Las concentraciones de fosfoenolpiruvato utilizadas fueron 0.02 mM y 3 mM.

Las proteínas se midieron según el método de Bradford (11) con albúmina bovina como estándar. Las actividades específicas de los diferentes enzimas se expresan como nmoles de sustrato transformados por minuto y por mg de proteína.

RESULTADOS

Después de analizar el comportamiento de las capacidades gluconeogénica y glucolítica de la corteza renal (1), se han estudiado los posibles cambios que tienen lugar en las actividades de los principales enzimas de estos procesos a nivel de dos de los ciclos de sustrato que intervienen en su regulación y que están constituidos por la fructosa 1,6-bisfosfatasa-fosfofructoquinasa (FBPasa-PFK) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa-piruvato quinasa (PEPCK-PK). Estos resultados se muestran en las figuras 1 y 2, y en las tablas 1 y 2.

En la corteza renal de animales alimentados con una dieta alta en carbohidratos durante 96 horas se reduce la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa (Fig. 1). Esta actividad se ve incrementada posteriormente durante el siguiente período de ayuno de 24, 48 ó 96 horas, alcanzándose valores superiores a los originales. Al mismo tiempo una dieta alta en carbohidratos provoca un aumento significativo (superior al 76 %) en la actividad fosfofructoquinasa, cuando se ensaya a concentraciones subsaturantes de sustrato. El ayuno hace disminuir esta actividad enzimática por debajo del valor encontrado a las 0 horas (Fig. 1). Los resultados obtenidos con el ciclo de ayuno-alimentación ensayado son semejantes, aunque de comportamientos opuestos. No se obtienen cambios en ninguno de los dos enzimas a velocidad máxima (tablas 1 y 2).

En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos con los otros dos enzimas (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y piruvato quinasa) a lo largo de los dos ciclos alternativos de alimentación y ayuno. La piruvato quinasa sólo presentó cambios a velocidad subsaturante, mientras que la fosfoenolpiruvato

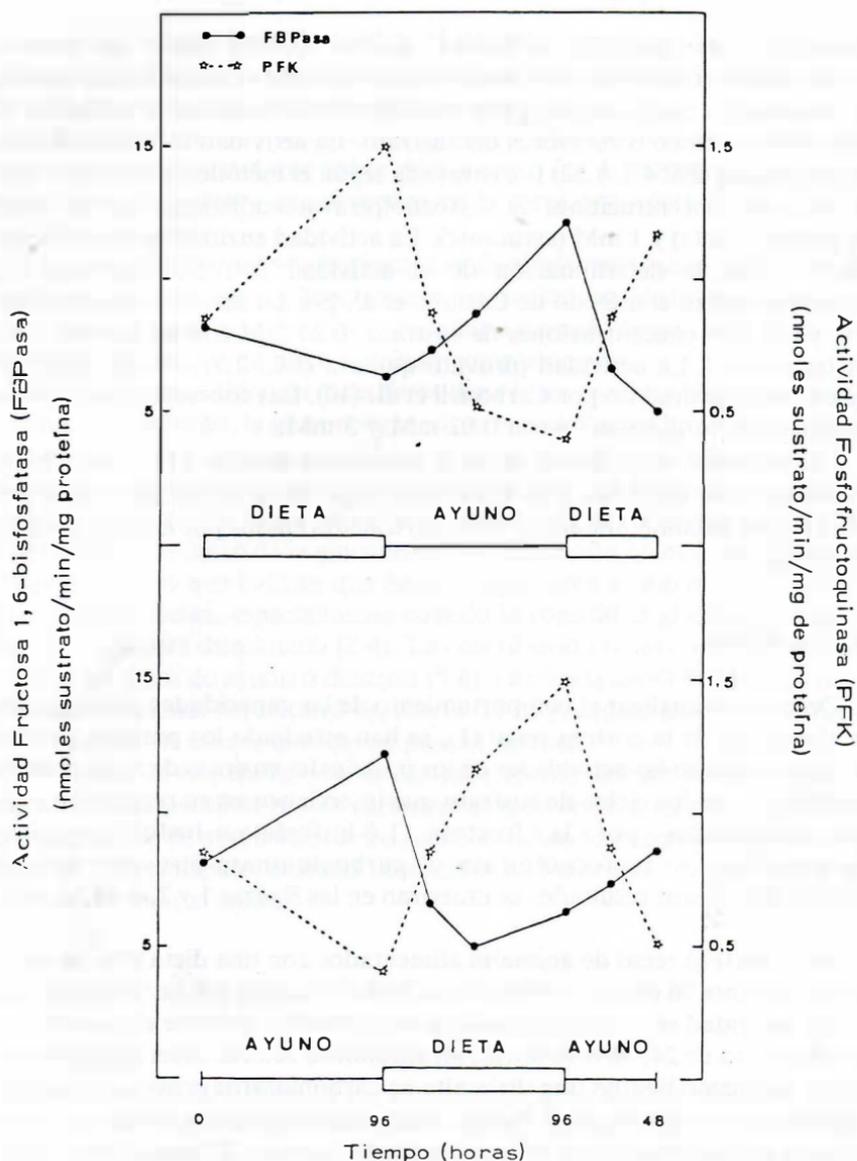


Figura 1. Evolución de las actividades fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa) y fosfofructoquinasa (PFK) de corteza renal durante ciclos de alimentación y ayuno. Las actividades enzimáticas van expresadas en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Cada punto corresponde al valor de actividad específica encontrado a concentración subsaturante de sustrato menos 6 experimentos individuales.

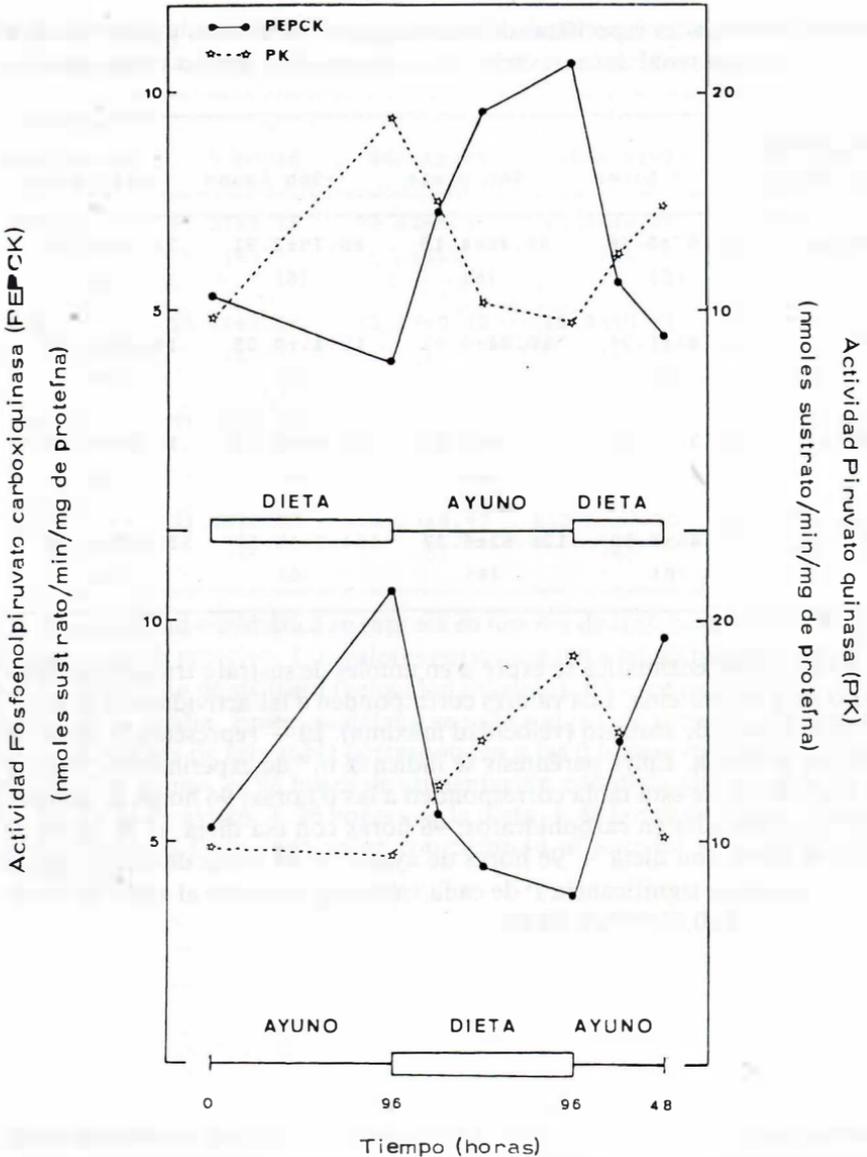


Figura 2. Evolución de las actividades fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y piruvato quinasa (PK) de corteza renal durante ciclos de alimentación y ayuno. Las actividades enzimáticas van expresadas en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Cada punto corresponde al valor de actividad específica encontrado a concentración subsaturante de sustrato y es media de al menos 6 experimentos individuales.

Tabla 1.- Actividades específicas de enzimas gluconeogénicas y glucolíticas de corteza renal durante ciclos de alimentación - ayuno - alimentación.

Actividad enzimática	0 horas	96h Dieta	+96h Ayuno	+48h Dieta
FBPasa	91.57±9.76 (6)	88.46±4.15 (6)	86.79±2.91 (6)	79.39±4.47 (6)
PFK	13.46±1.26 (6)	10.84±0.81 (6)	10.41±0.05 (6)	10.85±1.21 (6)
PEPCK	21.35±1.41 (6)	14.03±1.59* (6)	57.08±1.02** (6)	16.88±1.03** (6)
PK	137.46±5.50 (6)	126.62±6.37 (6)	124.23±5.65 (6)	134.41±9.09 (6)

La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados / minuto / mg de proteína. Los valores corresponden a las actividades a concentración saturante de sustrato (velocidad máxima). El \pm representa el error estándar de la media. Entre paréntesis se indica el n.º de experimentos realizados. Los valores de esta tabla corresponden a las 0 horas; 96 horas de alimentación con dieta alta en carbohidratos; 96 horas con esa dieta + 96 horas de ayuno; 96 horas con dieta + 96 horas de ayuno + 48 horas de nuevo con la dieta. El grado de significancia P de cada valor con respecto al anterior se expresa como: * $P < 0.01$; ** $P < 0.00001$.

carboxiquinasa presentó variaciones considerables a ambas concentraciones de sustrato (tablas 1 y 2), siendo este comportamiento característico de un enzima inducible. Los cambios cualitativos que tienen lugar en la actividad PEPCK son semejantes a los vistos anteriormente para el otro enzima gluconeogénico (FBPasa). El incremento producido en esta actividad enzimática después de 96 horas de ayuno es superior al 100 %, bajando a los niveles iniciales durante la alimentación. Hay que destacar que en todos los casos la capacidad adaptativa es mayor durante las primeras 24 horas de cambiar la situación nutricional.

Tabla 2.- Actividades específicas de enzimas gluconeogénicos y glucolíticos de corteza renal durante ciclos de ayuno - alimentación - ayuno.

Actividad enzimática	0 horas	96h Ayuno	+96h Dieta	+48h Ayuno
FBPasa	91.57±9.76 (6)	89.62±8.36 (6)	83.39±4.53 (6)	81.01±2.68 (6)
PFK	13.46±1.26 (6)	11.67±0.92 (6)	11.23±0.81 (6)	10.70±1.28 (6)
PEPCK	21.35±1.41 (6)	64.29±2.31* (6)	15.58±0.90* (6)	51.66±1.96* (6)
PK	137.46±5.50 (6)	136.23±5.97 (6)	132.63±7.70 (6)	141.76±6.04 (6)

La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados / minuto / mg de proteína. Los valores corresponden a las actividades a concentración saturante de sustrato (velocidad máxima). El \pm representa el error estándar de la media. Entre paréntesis se indica el n.º de experimentos realizados. Los valores de esta tabla corresponden a las 0 horas; 96 horas de ayuno; 96 horas de ayuno + 96 horas de alimentación con dieta alta en carbohidratos; 96 horas de ayuno + 96 horas con la dieta + 48 horas de ayuno. El grado de significancia P de cada valor con respecto al anterior se expresa como: * P<0.00001.

DISCUSION

Los cambios que ocurren en las actividades enzimáticas implicadas en estos procesos, explican de una manera perfecta el comportamiento gluconeogénico y glucolítico de la corteza renal (1). La actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa varía con el tiempo y la situación nutricional, y sólo a concentraciones subsaturantes de sustrato, lo que pone de manifiesto que se debe a modulaciones alostéricas y/o covalentes, del enzima preexistente sin variaciones en su contenido celular.

Durante estos ciclos de ayuno y alimentación tiene lugar un cambio en la razón insulina/glucagon que explica estos comportamientos. Así, durante el período de alimentación, la disminución de glucagon (12,13) proporciona un aumento de los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato, 6-fosfogluconato (14) y fructosa 1,6-bisfosfato, así como una disminución de AMP cíclico, permitiendo una reducción en la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa y una activación de los enzimas glucolíticos.

Por otro lado, durante el ayuno cambia la relación insulina/glucagon por aumentar los niveles de glucagon (13). Este promueve efectos opuestos, un aumento de AMP cíclico y una disminución en los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato (15), dando lugar a un aumento de la actividad gluconeogénica y una reducción de la actividad glucolítica.

La actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa cambia también de forma paralela al comportamiento gluconeogénico. Sin embargo, la actividad de este enzima se modifica, tanto a la velocidad subsaturante como a velocidad máxima, y además de forma proporcional a lo largo de todo el período experimental, lo que indica que este enzima se regula principalmente por cambios en la síntesis de novo de enzima, aumentando o disminuyendo su concentración intracelular. Este comportamiento está de acuerdo con lo que ampliamente se muestra en la bibliografía, tanto para hígado como para corteza renal (12,16,17).

Los dos enzimas glucolíticos analizados cambian de forma paralela a las variaciones de la capacidad glucolítica. La actividad enzimática en ambos casos sólo se modifica a concentración subsaturante de sustrato, descartando un mecanismo de síntesis proteica como responsable de las capacidades reguladas de estos enzimas.

Durante el período de alimentación, la disminución de los niveles de glucagon y AMP cíclico, permite el estado defosforilado y activo de estos enzimas (18). Además bajo estas condiciones, aumentan las concentraciones de fructosa 2,6-bisfosfato, potente activador de la fosfofructoquinasa (19-20). Todo ello incrementa el flujo glucolítico, lo que permite que suban los niveles de fructosa 1,6-bisfosfato, activándose alostéricamente la piruvato quinasa (21). Durante el ayuno, la secuencia de eventos es opuesta y por tanto influyen inhibiendo las actividades de estos enzimas.

Hay que destacar el hecho de que la piruvato quinasa no se modifica durante todo el período de ayuno, y sí después de ser alimentados los animales con la dieta, incrementándose su actividad. Esto sugiere que, entre otras razones, el efecto del glucagon sobre la fosforilación de la piruvato quinasa que existe *in vitro*, podría perderse durante la preparación experimental, al igual que ocurre en el caso de los hepatocitos (22), o que esta fosforilación no presente significado funcional en corteza renal.

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) GARCIA-SALGUERO, L., PERAGON, J. y LUPIAÑEZ, J. (1987). *Ars Pharmaceutica*. XXVIII: 195-201.
- (2) LUPIAÑEZ, J.A., FAUS, M.J., MUÑOZ-CLARES, R. y SANCHEZ-MEDINA, F. (1976). *FEBS Lett.* 61, 277-281.
- (3) SANCHEZ-POZO, A., LUPIAÑEZ, J.A., CORNO, A., PITA, M.L. y SANCHEZ-MEDINA, F. (1983). *Molecular Physiology*, 3: 143-150.
- (4) SANCHEZ-POZO, A., LUPIAÑEZ, J.A., GIL, A., VARGAS, A.M. y SANCHEZ-MEDINA, F. (1983). *Horm. Metabol. Res.*, 15: 171-175.
- (5) OWEN, O.E., FELIG, P., MORGAN, A.P., WAHREN, J. y CAHILL, G.F. Jr. (1969). *J. Clin. Invest.* 48, 574-583.
- (6) KIDA, K., NAKAJO, S., KAMIYA, F., TOYAMA, Y., NISHIO, T. y NAKAGAWA, H. (1978). *J. Clin. Invest.* 62, 721-726.
- (7) MENDICINO, J. y VASARHELY, F. (1963). *J. Biol. Chem.* 238, 3528-3534.
- (8) BALLARD, F. y HANSON, R.W. (1967). *Biochem. J.* 104, 866-871.
- (9) CASTAÑO, T.G., NIETO, A. y FELIU, J.E. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 5576-5579.
- (10) CARBONELL, J., FELIU, J.E., MARCO, R. y SOLS, A. (1973). *Eur. J. Biochem.* 37, 148-150.
- (11) BRADFORD, M. (1976). *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- (12) PERET, J., FOUSTOCK, S., CHANEZ, M., BOIS-JOYEUX, B. y ASSAN, R. (1981). *J. Nutr.* 111, 1173-1184.
- (13) TIEDGEN, M. y STEITZ, H.G. (1980). *J. Nutr.* 110, 876-882.
- (14) SOMMERCORN, J. y FREEDLAND, R.A. (1984). *J. Nutr.* 114, 1462-1469.
- (15) 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.
- (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) IYNEDJIAN, P.B., AUBERGER, P., GUIGOZ, Y. y LECAM, A. (1985). *Biochem. J.* 225, 77-84.
- (18) RICHARDS, C.S., YOKOYOMA, M., FURUYA, E. y UYEDA, K. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140, 1073-1079.
- (19) VAN-SCHAFTINGEN, E., JET, M.F., HUE, L. y HERS, H.G. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 3483-3486.
- (20) UYEDA, K., FURUYA, E. y SHERRY, A.D. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 8679-8684.
- (21) VAN BERKEL, T.J.C., KOSTER, J.F., KRUIJT, J.K. y HULSMANN, W.C. (1974). *Biochim. Biophys. Acta.* 370, 450-458.
- (22) AZZOUT, B. y PERET, J. (1984). *Biochem. J.* 218, 975-981.