

ADAPTACION METABOLICA DEL CICLO  
DE LAS PENTOSAS FOSFATO EN CORTEZA RENAL DE RATA.  
I.- REGULACION NUTRICIONAL DE LAS ACTIVIDADES  
GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA  
Y 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA

Peragón, J., García-Salguero, L., Aranda, F. y Lupiáñez, J.A.

RESUMEN

Se han estudiado las actividades glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa de corteza renal de rata en animales sometidos a diferentes situaciones nutricionales. Ni situaciones claramente lipogénicas (tales como las dietas altas en carbohidratos), ni lipolíticas (como ayuno y las dietas altas en grasas), modificaron las actividades de ambos enzimas, solo la suplementación con proteínas en la dieta fue capaz de producir una estimulación de la actividad G6PDH y 6PGDH del orden del 60 y 70 % respectivamente. Esta estimulación tuvo lugar tanto a concentración saturante de sustrato como subsaturante, a partir de los ocho días de tratamiento. Posiblemente este incremento en las actividades enzimáticas sea el resultado de un aumento en la síntesis de nuevas moléculas de enzima. Finalmente se discuten las razones que pueden explicar esta inducción, así como el papel que juegan los aspectos nutricionales en la regulación del ciclo en corteza renal.

SUMMARY

The effects of several different nutritional conditions on rat-kidney-cortex glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH) activities have been studied. Neither lipogenic (high-carbohydrate diet) nor lipolytic (fast and high-fat diet) conditions modified the enzymes activities. Only the high-protein diet produced a significant increase

on both renal G6PDH and 6PGDH activities about 60-70 % respectively. These changes were significant as well at saturant as subsaturant substrate concentrations after eight days of treatment. The enhanced enzyme activity are in agreement with variations in the cellular concentration of these enzymes. Finally, the reasons of this induction was analized and the different aspects of renal nutritional regulation of pentose phosphate pathway have been discussed.

## INTRODUCCION

El metabolismo de carbohidratos en el hígado presenta una elevada adaptabilidad funcional, siendo las condiciones nutricionales uno de los factores determinantes de la distribución del flujo metabólico entre las diferentes rutas que integran esta faceta del metabolismo celular.

La principal función del ciclo de las pentosas fosfato es producir pentosas fosfato para la biosíntesis de nucleótidos y NADPH necesario para una gran variedad de reacciones reductoras entre las que se encuentra la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol.

Los dos enzimas claves en la regulación de la velocidad de la ruta son la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (D-glucosa-6-fosfato: NADP<sup>+</sup> 1-oxidoreductasa, EC 1.1.1.49, G6PDH) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-fosfo-D-gluconato: NADP<sup>+</sup> 2 oxidoreductasa (decarboxilante), EC 1.1.1.44., 6PGDH), ambas forman parte de la rama oxidativa de este ciclo.

La capacidad adaptativa de la ruta del fosfogluconato ante diferentes condiciones nutricionales en el hígado, órgano sometido a continuas fluctuaciones ambientales y encargado de distribuir y regular el aporte de nutrientes con las necesidades del organismo, es muy elevada. En general, la presencia de altas concentraciones de carbohidratos y proteínas en la dieta de ratas normales, es esencial para la inducción de enzimas lipogénicos (1,2). Se sabe desde hace bastante tiempo que la G6PDH y 6PGDH se inducen cuando se ven sometidas a condiciones lipogénicas (2-5), este primer enzima puede llegar a incrementar su actividad de veinte a treinta veces en relación a la proteína soluble en este tejido (6). Esta inducción se bloquea al aumentar el aporte de ácidos grasos especialmente los poliinsaturados (7-9). La naturaleza de estos cambios ha sido estudiada desde muchos puntos de vista (10,11), trabajos recientes (12,13) han demostrado que los cambios responsables de la regulación de los niveles de ambos enzimas deben localizarse a nivel pretraduccional.

En corteza renal de rata, las condiciones nutricionales regulan las capacidades glucolítica y gluconeogénica, así como las actividades de los enzimas clave de ambas rutas. Tanto el ayuno (14), como las dietas ricas en carbohidratos (15), proteínas (16) y los ciclos ayuno-realimentación (16-18) provocan una clara respuesta adaptativa de la fructosa 1,6 bifosfatasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y fosfofructoquinasa en las diferentes fracciones tubulares. La naturaleza de estos cambios es diferente y variada según el enzima y la situación

analizada, confluyendo alteraciones de los niveles enzimáticos con cambios en la afinidad por su sustrato de moléculas enzimáticas preexistentes.

Para estudiar la regulación nutricional y la capacidad adaptativa del ciclo de las pentosas fosfato en corteza renal se han determinado las actividades G6PDH y 6PGDH cuando los animales se alimentaban con dietas ricas en carbohidratos, proteínas, lípidos o frente al ayuno.

## MATERIAL Y METODOS

### *Dietas y. Diseño Experimental.*

Los experimentos se realizaron en ratas machos de raza Wistar de 200-250 gramos de peso, obtenidas del animalario de la Universidad y mantenidas al menos diez días antes de los experimentos bajo ciclo de luz-oscuridad (8.00 a.m. a 20.00 p.m.), temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y alimentación (dieta comercial estándar) controladas.

Tras este periodo de adaptación, se separaron en varios grupos, manteniendo en cada jaula 2 ó 3 animales con libre acceso al agua y a la dieta ensayada. Para el caso de las dietas ricas en grasas y proteínas se mantuvieron en estas condiciones, hasta un total de ocho días, dieciséis para la rica en carbohidratos y seis para el ayuno. Se realizaron controles periódicos en cada caso. La composición de dichas dietas, así como el contenido calórico de cada una, se recogen en la Tabla 1. Los componentes utilizados en su elaboración fueron obtenidos de marcas comerciales de la mejor calidad.

TABLA 1

Composición de las dietas.

Componentes (g/110g)	Dieta			
	CONTROL	PROTEINAS	GLUCIDOS	GRASA
Caseína	20.5	79.5	6.0	15.0
Almidón + Sacarosa	64.0	6.0	79.5	40.5
Aceite Oliva	9.0	8.5	8.5	8.0
Mantequilla	—	—	—	15.0
Celulosa	1.5	1.0	1.0	16.5
Mezcla Mineral	4.0	4.0	4.0	4.0
Mezcla Vitaminas	1.0	1.0	1.0	1.0
Contenido Energético (kJ/100g dieta)	1,753.3	1,751.4	1,751.4	1,795.2

La caseína estaba enriquecida con metionina 5%. El contenido en sacarosa fue el 13% de los carbohidratos totales. La mezcla de sales contenida (g/100 g mezcla): Carbonato cálcico, 17.122; fosfato cálcico monobásico, 34.688; sulfato de cobre, 0.0178; sulfato potásico aluminico, 0.009; cloruro cálcico, 0.009; fluoruro sódico, 0.009; carbonato de zinc, 0.045; ioduro potásico, 0.067; sulfato magnésico, 0.132; sulfato de hierro, 8.005; cloruro sódico, 11,230; carbonato potásico monobásico, 23.416. La mezcla vitamínica contenía (mg/100 g mezcla): Biotina, 2; ácido fólico, 20; cianocobalamina, 0.10; riboflavina, 60; piridoxina, 70; pantotenato cálcico, 160; tiamina, 60; colina, 4000; ácido ascórbico, 2000; inositol, 200; menadiol, 0.005; retinol A palmitato, 400 UI/g; vitamina D, 100 UI/g, tocoferol, 100 UI/kg y sacarosa hasta 100 g mezcla.

Siempre a las 8.00 a.m. se sacrificaban los animales por dislocación cervical e inmediatamente se extraían los riñones, colocándose en solución salina fría. Después de decapsularlos se preparaban finos cortes de corteza renal. El tejido (aproximadamente 150 mg/ml) se homogenizaba en un medio que contenía Tris (10 mM), EDTA (1mM) y NADP<sup>+</sup> (0.1 mM), pH 7.6. Este homogenado se centrifugaba a 30.000 g durante 30 minutos a 4°C, usándose el sobrenadante para determinar las actividades enzimáticas.

#### *Ensayos Enzimáticos.*

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa fue ensayada a 25°C como describe Lupiañez et al. (19) con algunas modificaciones (20). La actividad G6PDH fue corregida por la actividad 6PGDH. El medio de medida contenía 0.15 ml de sobrenadante, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.6 mM NADP y glucosa 6-fosfato o 6-fosfogluconato en un volumen total de 1ml. Las concentraciones de sustrato ensayadas fueron 0.05 mM y 2 mM. Una miliUnidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 nmol NADP/min a 25°C. La actividad enzimática se expresa en términos de mU/mg de proteína. Las proteínas se cuantificaron siguiendo el método de Lowry et al. (21).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se han estudiado los efectos de tres tipos de situaciones nutricionales sobre la capacidad de adaptación a corto y largo plazo de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato de corteza renal de rata (Figuras 1 y 2).

Situaciones claramente lipolíticas como son el ayuno y la administración de una dieta rica en grasas (23 %), no provocan ningún tipo de alteración significativa en las actividades G6PDH y 6PGDH, ni a corto (1-2 días) ni a largo plazo (6-8 días). Tampoco se observan cambios a concentraciones de sustrato saturante ni subsaturante.

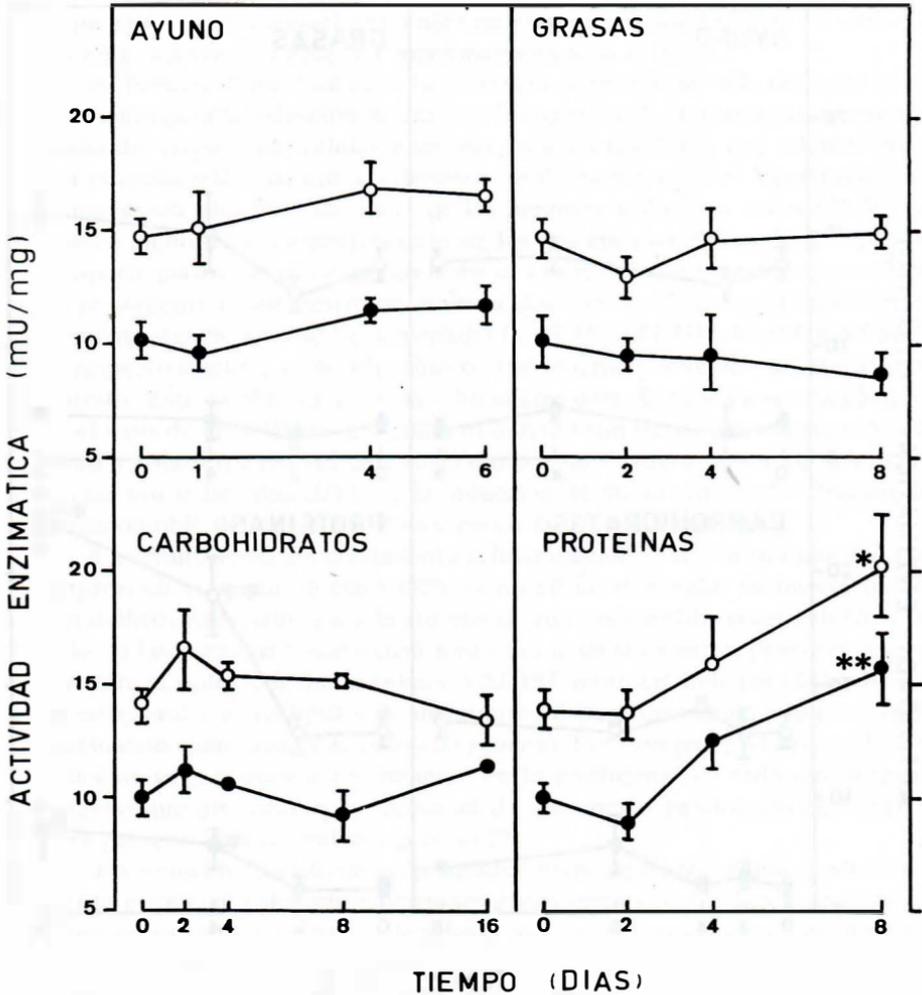


Figura 1.- Evolución de la actividad G6PDH de corteza renal de rata ante diferentes situaciones nutricionales. La concentración de glucosa utilizada como saturante fué de 2 mM (●) y como subsaturante (○) 0.05 mM. La actividad específica se expresa como mU/mg. Cada valor se expresa como la media de al menos cuatro experimentos  $\pm$  SEM. Los valores obtenidos han sido comparados con los controles mediante un test de la t de Student. Diferencias significativas entre el control y los diversos tratamientos se expresan como \*  $P < 0.01$  y \*\*  $P < 0.005$ .

Algo muy similar ocurre cuando se le suministra a los animales una dieta rica en carbohidratos (80 %), situación claramente lipogénica, en la que el tratamiento llega a mantenerse hasta un total de dieciséis días.

Estos resultados demuestran claramente que la corteza renal juega un reducido papel en los procesos relacionados con la biosíntesis de lípidos, frente

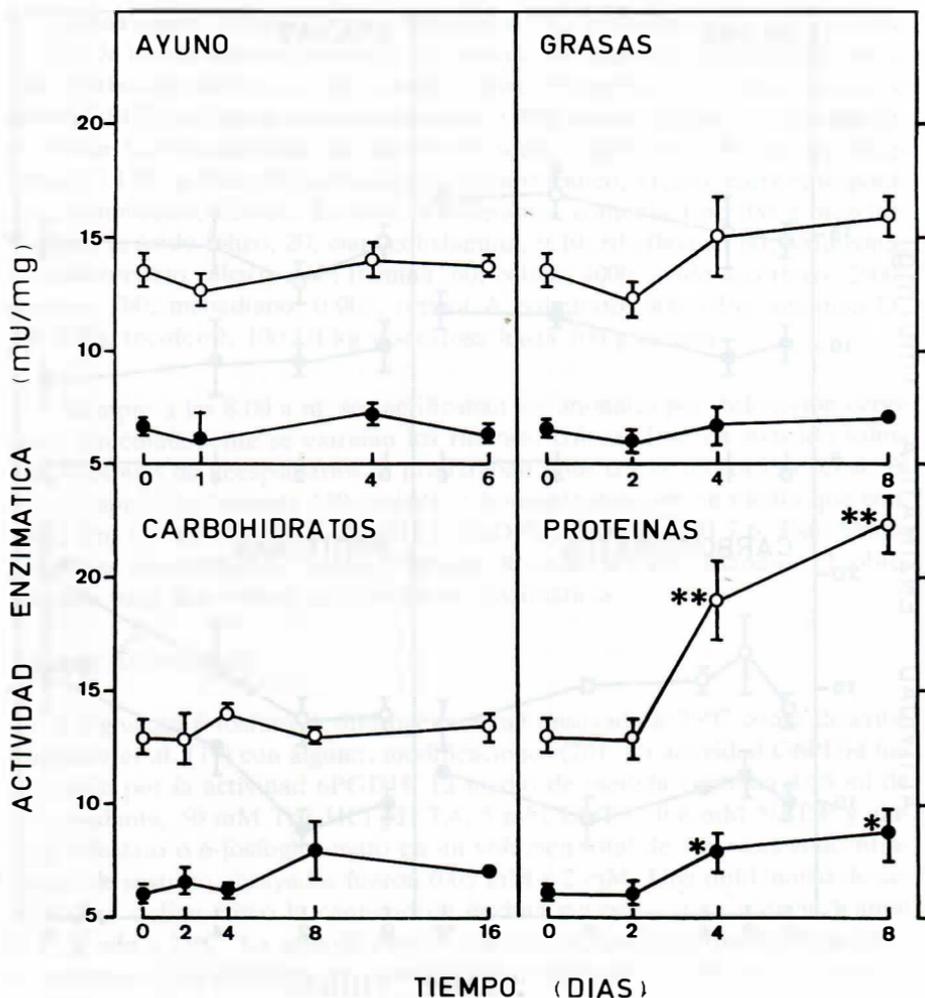


Figura 2. Evolución de la actividad 6PGDH de corteza renal de rata ante diferentes situaciones nutricionales. La concentración de glucosa utilizada como saturante fue de 2 mM (○) y como subsaturante (●) 0.05 mM. La actividad específica se expresa como mU/mg. Cada valor se expresa como la media de al menos cuatro experimentos  $\pm$  SEM. Los valores obtenidos han sido comparados con los controles mediante un test de la t de Student. Diferencias significativas entre el control y los diversos tratamientos se expresan como \*  $P < 0.05$  y \*\*  $P < 0.0005$ .

a la gran capacidad de adaptación que este tejido presenta respecto al metabolismo glucídico bajo las mismas condiciones nutricionales (14-18).

Por el contrario, el flujo del ciclo de las pentosas fosfato en las células de los tejidos hepático, adiposo y glándula mamaria, donde el metabolismo lipídi-

co juega un papel esencial, presenta una enorme versatilidad ante las variaciones en el aporte de diferentes macronutrientes en la dieta.

Al haberse demostrado que la presencia de proteínas en la dieta era necesaria tanto para la inducción de enzimas lipogénicos (1,2), como para la estimulación del crecimiento celular y síntesis proteica (21-22), y que además existe una estrecha relación entre crecimiento, proliferación celular, hipertrofia renal o incremento del flujo del ciclo de las pentosas fosfato en riñón (24-26), se decidió analizar el comportamiento de las dos enzimas claves de la ruta ante un aporte masivo de proteínas en la dieta. Los resultados muestran como cuando se aumenta el suministro de aminoácidos (80 %) (Fig. 1 y 2) existe un incremento significativo de las actividades G6PDH y 6PGDH del orden del 60-70 % respectivamente, a los ocho días de tratamiento y a velocidad saturante de sustrato. Este cambio ya se inicia a los cuatro días, llegando a ser significativo en el caso de la 6PGDH. Un comportamiento similar se observa para la actividad a concentración subsaturante, tanto a los cuatro como a los ocho días, lo cual nos indica que debe ser la inducción de nuevas moléculas enzimáticas la responsable del aumento observado en la actividad específica.

La estimulación del crecimiento celular cuando se suministra una dieta hiperproteica ocasiona un claro incremento en las demandas de intermediarios metabólicos necesarios para la síntesis de nuevos constituyentes celulares. El ciclo de las pentosas fosfato cuya misión es la de suministrar pentosas necesarias para la síntesis de nucleótidos y NADPH imprescindible para la biosíntesis de colesterol y otros lípidos de membrana, debe estar claramente potenciado funcionando como sostén de todo este proceso. Por otro parte, el exceso de aminoácidos va a ocasionar un aumento en la producción de radicales libres de oxígeno que provocaran la necesidad de una mayor producción de NADPH para prevenir daños celulares graves (27).

En resumen, el ciclo de las pentosas fosfato de corteza renal resulta claramente estimulado durante situaciones nutricionales que inducen procesos de crecimiento celular y síntesis de nuevas moléculas estructurales, mientras que el mayor o menor aporte de otro tipo de combustibles celulares (carbohidratos o lípidos) no es capaz de provocar alteraciones en las actividades deshidrogenasas, quizás debido a que en este tejido, otras vías metabólicas (glucólisis-gluconeogénesis) son las encargadas de contrarrestar las variaciones producidas durante estas situaciones nutricionales.

Por todo ello se demuestra que el ciclo de las pentosas fosfato en corteza renal actuaría como un elemento básico en la infraestructura metabólica del riñón suministrador de precursores biosintéticos de moléculas estructurales básicas y no como una ruta encargada de mantener el status energético del órgano ante diferentes situaciones nutricionales.

**AGRADECIMIENTOS.** Este trabajo constituye la publicación nº 157 del Grupo de Investigación Drogas, Tóxicos Ambientales y Metabolismo Celular, J.P. es becario del P.F.P.I. de la Junta de Andalucía.

**BIBLIOGRAFIA**

- (1) ZAKIM, D., PARDINI, R.S., HERMAN, R.H., y SANBERLICH, H.E. (1967). *Biochim. Biophys. Acta* 144, 242-251.
- (2) HERZBERG, G.R. (1983). *Adv. Nutr. Res.* 5, 221-253.
- (3) TEPPERMAN, H.M. y TEPPERMAN, J. (1958). *Diabetes* 7, 478-485.
- (4) BALDWIN, R.L. RONNING, M., RADANOVICS, C. y PLANGE, G. (1966). *J. Nutr.* 90, 47-55.
- (5) BACK, D.W., SOHAL, P.S., y ANGEL, J.F. (1985). *J. Nutr.* 115, 625-632.
- (6) RUDACK, D., CHISHOLM, E.M. y HOLTEN, D. (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 1249-1254.
- (7) BARTLEY, J.C. y ABRAHAM, S. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 260, 169-177.
- (8) CENTURY, B. (1972) *J. Nutr.* 102, 1067-1078.
- (9) MUSCH, K., OJAKIAN, M.A., y WILLIAMS, M.A. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 337, 343-348.
- (10) PERAGON, J., GARCIA-SALGUERO, L., ARANDA, F. y LUPIAÑEZ, J.A. (1989). *Ars Pharmaceutica* 30, 155-156.
- (11) PERAGON, J., GARCIA-SALGUERO, L., ARANDA, F. y LUPIAÑEZ, J.A. (1988). *Ars Pharmaceutica* 29, 331-341.
- (12) MICKSICEK, R.J. y TOWLE, H.C. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 9575-9579.
- (13) KLETZIEN, R.F. PROSTKO, C.R., STUMPO, D.S., McLUNG, J.K. y DREHER, K.L. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 5621-5624.
- (14) GARCIA-SALGUERO, L. y LUPIAÑEZ, J.A. (1988). *Mol. Cell. Biochem.* 83, 167-178.
- (15) GARCIA-SALGUERO, L. y LUPIAÑEZ, J.A. (1989). *Mol. Cell. Biochem.* 85, 91-100.
- (16) GARCIA-SALGUERO, L. y LUPIAÑEZ, J.A. (1989). *Mol. Cell. Biochem.* 90, 99-110.
- (17) GARCIA-SALGUERO, L. y LUPIAÑEZ, J.A. (1988). *Int. J. Biochem.* 20, 943-950.
- (18) GARCIA-SALGUERO, L., PERAGON, J. y LUPIAÑEZ, J.A. (1987). *Ars Pharmaceutica* 28, 195-201.
- (19) LUPIAÑEZ, J.A., ADROHER, F.J., VARGAS, A.M. y OSUNA, A. (1987). *Int. J. Biochem.* 193, 265-275.
- (20) PERAGON, J., ARANDA, F., GARCIA-SALGUERO, L. y LUPIAÑEZ, J.A. (1989). *Int. J. Biochem.* 21, 689-694.
- (21) LOWRY, D.H., RESENBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- (22) MADWIG, P. y ABRAHAM, S. (1970). *J. Nutr.* 110, 100-104.
- (23) DIDIER, R., REMESY, C., DEMIGNE, C. y FAJOURUSAX, P. (1985). *Nutr. Res.* 5, 1093-1102.
- (24) SEYER-HANSEN, K., GUNDERSEN, H.J.G. y OSTERBY, R. (1981). *Diabetol.* 21, 374-375.
- (25) STEER, K.A., SOCHOR, R.M. y McLEAN, P. (1985). *Diabetes* 34, 485-490.
- (26) SOCHOR, M., KUNJARA, S., GREENBAUM, A.L. y McLEAN, P. (1986). *Biochem. J.* 234, 573-577.
- (27) KIRKMAN, H.N. y GAETANI, G.F. (1986). *J. Biol. Chem.* 261, 4033-4038.