

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.
UNIVERSIDAD DE GRANADA

ADAPTACIÓN METABÓLICA DEL CICLO DE LAS PENTOSAS FOSFATO
DE CORTEZA RENAL DE RATA. II. EFECTO DE DIFERENTES
SITUACIONES PATOLÓGICAS SOBRE EL COMPORTAMIENTO
CINÉTICO DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA Y
6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA

Peragón Sánchez, J.; García-Salguero, L.; Aranda Haro, F.;
Barroso Albarracín, J. B. y Lupiáñez Cara, J. A.

RESUMEN

Se ha investigado el efecto de la acidosis crónica y diabetes experimental, a corto y largo plazo, sobre las actividades deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato de corteza renal de rata. A los 7 días de tratamiento, la ingestión de una solución de ClNH_4 0.28 M provoca un incremento en la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa del orden del 90 y 60% respectivamente; tanto a concentración saturante de sustrato como subsaturante. La diabetes experimental provocada por la inyección intraperitoneal de alloxan (200 mg/Kg peso) induce, a los dos días, un incremento del 100% en la actividad G6PDH y del 40% en la 6PGDH tanto a concentración saturante como subsaturante de sustrato. A corto plazo, no se detecta ningún cambio en el comportamiento cinético de este enzima. Las Kms para la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa en las distintas situaciones se mantienen sin variaciones apreciables. Se discute la naturaleza de los cambios observados, así como su relación con procesos de crecimiento y proliferación celular.

SUMMARY

The long-term and short-term effects of chronic metabolic acidosis and experimental diabetes on the PPC dehydrogenases activities have been investigated. The ingestion of 0.28 M ammonium chloride solution produced an increase in the G6PDH and 6PGDH activities about 90% and 60%, at day seven, either saturate or subsaturate substrate concentration. The alloxan induce diabetes (200 mg/Kg body weight) produced a significant increase of G6PDH and 6PGDH around 100 and

40% respectively, at both saturating or subsaturating substrate concentrations. Nevertheless, no significant changes were found during the short time periods. Also, during these pathological situations not significant variations were found in the K_m values for G6PDH and 6PGDH. The nature of these increases and its relationship with the renal hipertrophy and cellular proliferation have been discussed.

INTRODUCCIÓN

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH, EC 1.1.1.44) son las enzimas de la rama oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato que catalizan las reacciones en las que se producen como productos finales NADPHA y Ribulosa 5-P. Ambos intermediarios son utilizados bien como fuente de poder reductor o como precursores estructurales básicos de diferentes macromoléculas.

Aunque en el hígado y otros tejidos esté claramente demostrada la alta capacidad adaptativa de esta ruta ante diferentes situaciones nutricionales y hormonales (1-6), el riñón muestra una diferente adaptabilidad. Esta capacidad está relacionada con procesos en los que se pone de manifiesto un aumento en el trabajo renal, crecimiento y proliferación celulares (7-10). Dos situaciones patológicas en las que en el riñón están potenciados estos procesos son la acidosis metabólica crónica y la diabetes experimental.

El metabolismo de carbohidratos en el hígado durante estas situaciones, ha sido extensamente estudiado (11-17), pero pocos son los trabajos que investigan el papel del ciclo de las pentosas fosfato en corteza renal durante la diabetes experimental y la acidosis crónica.

El grupo de McLean (9,10) ha encontrado una estrecha relación entre diabetes experimental y el crecimiento renal, proliferación celular y aumento del flujo de glucosa a través del ciclo e incremento de las actividades G6PDH y 6PGDH. De ahí que uno de los propósitos del presente trabajo haya sido estudiar los efectos de esta situación patológica a corto y largo plazo sobre el comportamiento cinético de ambas deshidrogenasas.

Una consecuencia de la diabetes es la acidosis cetónica, un tipo particular de acidosis metabólica. Ambas situaciones someten al riñón a un elevado funcionamiento provocando una mayor capacidad en la producción de amonio y glucosa. Dichos aumentos son debidos a fenómenos de inducción y activación enzimática (16-20). Igualmente se ha relacionado la acidosis metabólica crónica con un aumento en el crecimiento celular (21,22). La posible relación de todos estos fenómenos con el comportamiento de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato nos ha hecho estudiar el efecto a corto y largo plazo de dichas situaciones sobre ambos enzimas.

MÉTODOS

Procedimiento Experimental

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en ratas macho de raza Wistar, previamente aclimatada a condiciones ambientales standard.

La diabetes experimental fue provocada por un tóxico hepático, el alloxan, inyectado intraperitonealmente a una concentración de 200 mg/Kg peso corporal, en un volumen final de 1 ml. de solución salina (23). A los controles solo se les inyectó ClNa 0.9%. El estado diabético fue controlado midiendo glucosa en orina y sangre. Las medidas se realizaron a las 2 horas y 2 días después de la inyección.

La acidosis metabólica crónica fue inducida sustituyendo el agua de bebida por una solución de ClNH_4 0.28 M (equivalente al 15% peso/volumen) en las que se mantuvo a los animales a lo largo de 7 días.

Las actividades enzimáticas fueron ensayadas en extractos libres de células obtenidos por centrifugación a 30.000 g. durante 30 minutos a 4°C., a partir de homogenados tisulares obtenidos de cortes de corteza renal (150 mg/ml), en un medio de homogenización compuesto de una solución 10 mM Tris, 1 mM EDTA y 0.1 mM NADP, pH 7,6.

Ensayos enzimáticos

Las actividades glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa a 25° C. fueron ensayadas según describe Lupiañez et al (24) con algunas modificaciones. Las concentraciones de sustrato utilizadas fueron de 2 y 0.5 mM como saturante y subsaturante respectivamente. El medio de ensayo estaba compuesto por 0.15 ml de sobrenadante, 5 mM EDTA, 0.6 mM NADP y 0.05 y 2 mM de G6P o 6PG en un volumen final de 1 ml. Los valores obtenidos utilizando G6P fueron corregidos con la actividad 6 PGDH. La concentración de proteínas en los extractos fue determinada por el método de Lowry et al (25).

Los valores de K_m y V_{max} se obtuvieron aplicando la representación de Lineweaver-Burk a los resultados obtenidos.

Expresión de los resultados

Los valores de velocidad y actividad específica se expresan como mU y mU/mg proteína respectivamente, definiéndose cada mU como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 nmol de NADP por minuto a 25° C. Todos los resultados se representan como el valor medio \pm Error Estandar de la Media (SEM). Se utilizó el test t de Student para calcular la significación estadística de las diferencias entre los animales tratados y los controles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diabetes experimental y crecimiento renal

El alloxan es un citotóxico específico de las células beta de los Islotes de Langerhans que induce la rotura de moléculas de DNA impidiendo la formación de pro-insulina normal (26), también actúa sobre la membrana plasmática de estas células impidiendo la secreción de esta hormona (27). Por esta razón se ha estudiado la influencia a corto y largo plazo de la diabetes experimental, producida por este tóxico, sobre las actividades deshidrogenasas y sus parámetros cinéticos.

A los dos días de tratamiento se observa un incremento en la actividad G6PDH, aproximadamente de un 100% a concentración saturante siendo este incremento semejante al que tiene lugar a concentración subsaturante de glucosa 6-fosfato. En el caso de la 6PGDH los incrementos son de menor rango, alrededor del 40%. Estos aumentos producen diferencias significativas en la V_{max} de ambas enzimas mientras que las K_m s se mantienen sin variaciones apreciables (Fig. 1). A corto plazo, 2 horas de tratamiento, no se observa ningún cambio significativamente estimable.

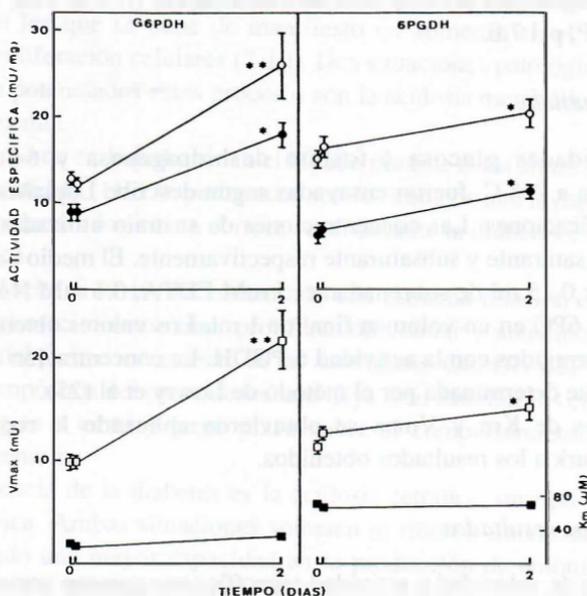


Figura 1.- Efecto de la diabetes experimental sobre el comportamiento cinético de la G6PDH y 6PGDH. La concentración de glucosa 6-fosfato utilizada como saturante fue de 2 mM (○) y como subsaturante 0.05 mM (●). K_m (■) y V_{max} (□) se expresan en M y mU y se representan en la parte inferior de la Figura. Cada valor se expresa como la media de al menos cuatro experimentos \pm SEM. Diferencias significativas entre animales controles y tratados se expresan como (*) $p < 0.005$ y (**) $p < 0.0005$.

Este comportamiento nos hace suponer que los incrementos en la actividad enzimática sean más un producto de la síntesis de nuevas moléculas de enzima que de la activación de las moléculas preexistentes.

Rogers et al. (28) utilizando ratas tratadas con Streptozotocina, encuentra un incremento de un 30% en la cantidad de proteína mitocondrial/gramo de tejido, reflejo de un incremento en el peso relativo del riñón. Según estos autores, este aumento está ocasionado por una mayor demanda de ATP durante el incremento del bombeo renal a que se ve sometido este órgano durante esta situación patológica.

Igualmente se han descrito incrementos significativos en el peso renal, consecuencia de fenómenos de proliferación celular e hipertrofia de este órgano (8,9), así como un aumento en el flujo de glucosa y en las actividades de los enzimas reguladores de esta ruta (9,10). Encontrándose además, clara relación entre estos fenómenos de hipertrofia y la activación de las rutas de síntesis de nucleótidos de adenina (29).

En definitiva, como consecuencia del exceso de trabajo al que se ve sometida la corteza renal durante esta situación patológica, la activación de los procesos de crecimiento y proliferación celulares redundará en un incremento de todos aquellos procesos de biosíntesis de macromoléculas necesarias para los nuevos requerimientos celulares. Las demandas de NADPH y pentosas fosfato, necesarias para la biosíntesis de ácidos nucleicos, colesterol, ácidos grasos, deben estar aumentadas y justificados así los incrementos en las actividades de la G6PDH y 6PGDH posiblemente producto de un mecanismo de inducción enzimática más que de una activación de las moléculas preexistentes.

Acidosis metabólica crónica

Las determinaciones de las actividades enzimáticas se efectuaron a los 3 y 7 días de consumo del ClNH_4 0.28 M. Al igual que en el caso de la diabetes, observamos incrementos en las actividades enzimáticas a largo plazo (siete días de tratamiento), tanto a concentración saturante como subsaturante, del orden del 90% para la G6PDH y del 60% para la 6PGDH. A corto plazo (tres días), se mantienen los valores constantes. En el caso de los parámetros cinéticos, existen fuertes incrementos de la V_{max} frente a una ausencia de alteraciones en la afinidad por sus sustratos (K_m) (Fig. 2). Esto último nos hace suponer que los incrementos en las actividades sean debidos a incrementos en el número de moléculas de enzima.

Durante la acidosis metabólica crónica, la misión del riñón adquiere especial relevancia al ser el encargado de mantener el equilibrio ácido-base del organismo. Además de contrarrestar el exceso de protones en el medio interno, debe controlar el equilibrio salino. La capacidad renal de sintetizar amonio y glucosa se ve aumentada (16). Estos aumentos se deben fundamentalmente a incrementos en las actividades de los enzimas de la ruta, en unos casos son debidos a fenómenos de los enzimas de la ruta, en unos casos son debidos a fenómenos de inducción a largo

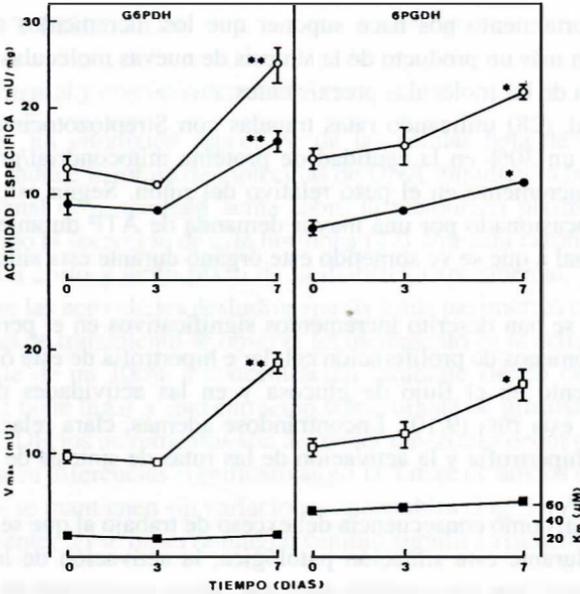


Figura 2.- Efecto de la acidosis metabólica crónica sobre el comportamiento cinético de la G6PDH y 6PGDH. La concentración de 6-fusfogluconato utilizada como saturante fue de 2mM (○) y como subsaturante 0.05 mM (●). Km (■) y Vmax (□) se expresan en M y mU y se representan en la parte inferior de la Figura. Cada valor se expresa como la media de al menos cuatro experimentos \pm SEM. Diferencias significativas entre animales controles y tratados se expresan como (*) $p < 0.01$ y (**) $p < 0.0005$.

plazo (glutaminasa dependiente de fosfato y glutamato deshidrogenasa) (16,19) o de modulación covalente, corto plazo, (18, 19). Además de estos enzimas, el ciclo de nucleótidos de purina es importante en la amoniogénesis renal en la rata, viéndose fuertemente activado en situaciones de acidosis crónica (16, 30-31) incrementándose la adenil succinato sintentasa del orden de un 60% después de dos días de acidosis metabólica (16).

El incremento en las actividades G6PDH y 6PGDH encontrado a largo plazo en esta situación de alta presión renal, puede, además, justificarse teniendo en cuenta varios aspectos: a) se ha relacionado esta situación un fenómenos de hipertrofia renal (21, 22) posiblemente relacionada con el aumento en la producción de amonio y en la excreción de protones. b) que durante esta situación metabólica están potenciados todos aquellos mecanismos encargados de evitar daños celulares provocados por el estrés oxidativo al que se encuentra sometido el riñón durante esta situación patológica (32-34). Ambas situaciones pueden ser las responsables del incremento en las actividades deshidrogenasas del ciclo, al estar este implicado directamente tanto en los fenómenos de síntesis de nuevas macromoléculas como en los mecanismos de lucha contra los radicales activos de oxígeno.

Conclusión global

En estos dos trabajos (7 y el presente), se ha puesto de manifiesto una clara respuesta adaptativa de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato ante situaciones estrechamente relacionadas con el crecimiento renal y la proliferación celular como son el aporte masivo de aminoácidos en la dieta, la acidosis crónica y la diabetes experimental. Esta adaptación se produce a largo plazo y posiblemente es el resultado de un proceso de inducción enzimática. Se demuestra así un papel básico de esta ruta en la infraestructura metabólica del riñón, diferente al encontrado en el hígado, donde los estímulos responsables de sus respuestas adaptativas están más relacionados con las necesidades energéticas globales del organismo que con procesos básicos de crecimiento del órgano.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo constituye la publicación nº 158 del Grupo de Investigación Drogas, Tóxicos Ambientales y Metabolismo Celular. J.P. es becario del P.F.P.I. de la Junta de Andalucía.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) TEPPERMAN, J. y TEPPERMAN, H. M. (1958). *Am. J. Physiol.* 193, 55-64.
- (2) RUDACK, E., CHISHOLM, E. M. y HOLTEN, D. (1971). *J. Bio. Chem.* 246, pp. 1294-1254.
- (3) GARCÍA, D. R. y HOLTEN, D. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, pp. 3960-3965.
- (4) VOLPE, J. J. y VAGELOS, P. R. (1976). *Physiol. Rev.* 56, pp. 339-417.
- (5) GRIGOR, M. R. (1984). *Archs. Biochem. Biophys.* 229, pp. 612-622.
- (6) STUMPO, D. L. y KLETZIEN, R. F. (1985). *Biochem. J.* 226, pp. 123-130.
- (7) PERAGON, J., ARANDA, F., GARCÍA-SALGUERO, L. y LUPIAÑEZ, J. A. (1989). *Ars Pharmaceutica*. En prensa.
- (8) SEYER-HANSEN, K., GUNDERSE, H. J. G. y OSTERBY, R. (1981). *Diabetología.* 21, pp. 374-375.
- (9) STEER, K. A., SOCHOR, R. M. y McLEAN, P. (1985). 34, pp. 485-490.
- (10) SOCHOR, M., KUNJARA, S., GREENBAU, A. L. y McLEAN, P. (1986). *Biochem. J.* 234, pp. 573-577.
- (11) DESSI, S., CHIODINO, C., BATETTA, B., LACONI, E., ENNAS, C. y PANI, P. (1985). *Exp. Mol. Path.* 43, pp. 177-186.
- (12) WENETTE-HAMMOND, M. E. y LARDY, H. A. (1985). *Diabetes.* 34, pp. 767-773.
- (13) LUSSIER, B., URANIC, M., KOVACEVIC, N. y HETENYI, G. Jr. (1986). *Metabolism.* 35, pp. 18-24.
- (14) NIEWOEHNER, C. B. y NUTTALL, F. Q. (1986). *Diabetes.* 35, 705-711.
- (15) CODERC, R., DURAND, G., FEGER, J. y AGUERAY, J. (1986). *Ann. Nutr. Metab.* 30, pp. 129-136.
- (16) TANNEN, R. L. (1978). *Am. J. Physiol.* 235, pp. F265-277.
- (17) PITTS, R. F. (1972). *Kidney Int.* 1, pp. 297-305.
- (18) ALLEYNE, G. A. O., LUPIAÑEZ, J. A., McFARLANE-ANDERSON, N., HORTELANO, P., BENJAMÍN, J., BARNSWELL, J. y SCOTT, B. (1982). *Ciba F. Symp.* 87, pp. 101-119.

- (19) LUPIAÑEZ, J. A., HORTELANO, P., SÁNCHEZ-MEDINA, F., SÁNCHEZ-POZO, A., McFARLANE-ANDERSON, N., BARNSWELL, J. y ALLEYNE, G. A. O. (1981). *FEBS Letters* 129, pp. 361-363.
- (20) GARCÍA-SALGUERO, L., HORTELANO, P. y LUPIAÑEZ, J. A. (1989). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 162, pp. 116-123.
- (21) LOTSPEICH, W. D. (1965). *Am. J. Physiol.* 208, pp. 1135-1142.
- (22) JANICKI, R. M. y ARGYRIS, T. S. (1969). *Am. J. Physiol.* 240, pp. E519-E525.
- (23) BOQUIST, L., ERICSSON, I., LORENTZON, R. y NELSON, L. (1985). *FEBS Letters* 183, pp. 173-176.
- (24) LUPIAÑEZ, J. A., ADROHER, F. J., VARGAS, A. M. y RANDALL, R. J. (1987). *Int. J. Biochem.* 19, pp. 1085-1089.
- (25) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., y RANDALL, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, pp. 265-275.
- (26) OKAMOTO, H. (1984). *BioEssays* 2, pp. 15-21.
- (27) JENNISCHE, E. y HANSSON, H. A. (1986). *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. A.* 94, pp. 153-158.
- (28) ROGERS, K. S., FRIEND, W. H. y HIGGINS, E. (1986). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 182, pp. 167-175.
- (29) KUNJARA, S., BEARDSLEY, S. J. y GREENBAUM, A. L. (1988). *Biochem. J.* 249, pp. 911-914.
- (30) BOGUSKY, R. T., LOWENSTEIN, L. M. y LOWNSTEIN, J. M. (1976). *J. Clin. Invest.* 58, pp. 326-335.
- (31) TORNHEIN, K. y LOWENSTEIN, L. M. (1983). *Biochem. Biophys. Acta* 757, pp. 137-139.
- (32) HUMES, H. D. y WEINBERG, J. M. (1983). *Mineral Electrolyte Metab.* 9, pp. 290-305.
- (33) RUSH, G. F. y ALBERTS, D. (1986). *Toxicol. Applied Pharmacol.* 85, pp. 324-331.
- (34) BELINSKY, S. A., REINKE, L. A., SCHOLZ, R., KAUFFMAN, F. C. y THURMAN, R. G. (1985). *Mol. Pharmacol.* 28, p. 371-376.