

Estimulación de la capacidad gluconeogénica renal en ratas parcialmente hepatectomizadas

M.^a Luisa Pita, Paloma Hortelano, M.^a José Faus y F. Sánchez-Medina

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

(Recibido el 6 de abril de 1981)

M.^a L. PITA, P. HORTELANO, M.^a J. FAUS and F. SANCHEZ-MEDINA. *Stimulation of Gluconeogenic Capacity in Partially Hepatectomized Rats*. Rev. esp. Fisiol., 38, 21-28. 1982.

Renal gluconeogenic capacity was enhanced to 150 % 24 h after partial hepatectomy, remained increased at 48 h (144 %) and returned to normal values at 72 h. Glucose production by renal cortical slices from hepatectomized rats was also enhanced 48 h after surgery when pyruvate, α -ketoglutarate and fructose were used as gluconeogenic precursors.

The stimulation of renal gluconeogenic capacity seems to be due to the increase of phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase activities which behaved similarly to glucose production after hepatectomy.

The renal metabolic response may be partially due to starvation in the first 24 h. Afterwards food intake became normalized and the acceleration of glucose production should be attributed to hepatectomy. Since there was no metabolic acidosis in our experimental conditions the involvement of glucocorticoids in the stimulation of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase activities is suggested.

Existe una creciente evidencia de que la gluconeogénesis renal puede contribuir al mantenimiento de la glucemia cuando la funcionalidad del hígado se encuentra disminuida (10, 18, 20). Cabe destacar el trabajo de OWEN *et al.* (20) en el que se describe un aumento del 50 % en la producción total de glucosa, después de un ayuno prolongado, por los riñones de pacientes obesos, cuando la gluconeogénesis hepática se encuentra disminuida. Dentro de este contexto, en nuestro departamento se ha encontrado un incremento en la

actividad de la fosfoenolpiruvato carboxi-
cinasa y de la capacidad gluconeogénica
de corteza renal en ratas con degenera-
ción hepática experimental producida por
galactosamina (6) y en ratas en las que
la gluconeogénesis hepática se inhibe se-
lectivamente por el ácido 5-metoxi-indol-
2-carboxílico (15). Más recientemente, se
ha descrito un incremento de la gluco-
neogénesis renal después de una intoxi-
cación aguda del hígado con Cl_4C (5).

La hepatectomía parcial produce una
considerable disminución de la funciona-

lidad hepática, a pesar del aumento en la capacidad gluconeogénica de la porción de hígado remanente (2, 3). NIEDERLAND *et al.* han descrito un aumento en la producción de glucosa por el riñón, tanto *in vivo* como *in vitro*, en ratas parcialmente hepatectomizadas (18). Sin embargo, estos autores han determinado sólo la gluconeogénesis renal a los tres días de haber efectuado la hepatectomía y no han medido la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, una enzima clave de la gluconeogénesis (21). Consecuentemente, se ha emprendido el estudio de la gluconeogénesis renal en los primeros días después de efectuada la hepatectomía, incluyendo la determinación de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa.

Material y métodos

Tratamiento de los animales. Se han empleado ratas Wistar hembras, con un peso comprendido entre 150-200 g, mantenidas a temperatura constante (23° C), con un período de luz desde las 7 hasta las 19 horas y con libre acceso al alimento, salvo que se especifique otra cosa. La hepatectomía parcial se llevó a cabo bajo anestesia con éter y según el método descrito por HIGGINS y ANDERSON (9), extirpándose, aproximadamente, un 70 % del total del hígado. Los controles fueron sometidos a idéntica operación, pero sin extirpación del órgano. En todos los casos la operación fue llevada a cabo entre las 16 y las 18 horas, para evitar la influencia de los ritmos circadianos en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática y renal y en la gluconeogénesis renal (13, 17).

Tratamiento de los tejidos. Las muestras de sangre se extrajeron de la aorta abdominal con jeringas heparinizadas y tras anestesiarse a los animales con pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso). En los demás casos las ratas fueron sacrifi-

cadas por dislocación cervical. El hígado y los riñones se extrajeron rápidamente manteniéndolos en frío, en solución salina.

Experimentos con cortes renales. La capacidad gluconeogénica de la corteza renal se ha determinado siguiendo el método descrito por KREBS *et al.* (11), incubando cortes de tejido en solución salina de Krebs-Henseleit, a la que se le habían añadido los distintos substratos en concentración 10 mM, a 40° C, durante 1 h y gaseando con O₂/CO₂ (95 : 5). El tejido (1,5-4 mg de peso seco) se suspendió en 4 ml de medio, en matraces de 25 ml. Después de la incubación, los cortes se desecaron a 110° C y se determinó la glucosa en el medio de incubación.

Métodos analíticos. La glucosa se determinó por el método de la glucosa oxidasa (11, 12). El lactato fue medido según la técnica descrita por GUTMAN y WAHLEFELD (7). La actividad de la glucosa-6-fosfatasa se determinó según el método de HARPER (8). La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa fue medida en los sobrenadantes obtenidos después de homogeneizar el tejido hepático o la corteza renal con 20 volúmenes de tampón Tris-sacarosa 0,05 : 0,25 M, pH 7,0 y centrifugar a 105.000 × g durante 45 min. La determinación se realizó mediante una modificación (1) del método de CHANG y LANE (4). La concentración de proteínas se determinó por el método de LOWRY *et al.* (14) utilizando albúmina bovina como estándar.

Resultados

Metabolitos en sangre. Durante los cuatro primeros días después de la operación los niveles de glucosa en sangre son inferiores a los de los animales controles. La concentración de lactato sanguíneo no cambia significativamente en ninguno de los dos grupos de animales a lo largo de este período (tabla I).

Tabla I. Efecto de la hepatectomía a lo largo del tiempo sobre las concentraciones de glucosa y lactato en sangre. Los resultados son medias $\pm$ S.E.M.; el número de experiencias se indica entre paréntesis.

Tiempo h	Condiciones experimentales	Glucosa en sangre (μ mol/ml)	Lactato en sangre (μ mol/ml)
0	Control	8,275 $\pm$ 0,430 (10)	3,468 $\pm$ 0,332 (9)
24	Controles	7,240 $\pm$ 0,296 (5)	2,905 $\pm$ 0,331 (5)
	Hepatectomizadas	5,204 $\pm$ 0,387 (6) *	2,696 $\pm$ 0,315 (6)
48	Controles	7,837 $\pm$ 0,488 (7)	3,217 $\pm$ 0,454 (7)
	Hepatectomizadas	5,439 $\pm$ 0,331 (5) *	3,695 $\pm$ 0,448 (5)
72	Controles	8,023 $\pm$ 0,428 (8)	3,285 $\pm$ 0,326 (6)
	Hepatectomizadas	6,024 $\pm$ 0,325 (5) *	2,643 $\pm$ 0,264 (11)
96	Controles	7,479 $\pm$ 0,335 (4)	3,910 $\pm$ 0,478 (4)
	Hepatectomizadas	5,466 $\pm$ 0,272 (9) **	3,326 $\pm$ 0,325 (8)

* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, nivel de significación según el test de Student.

Capacidad gluconeogénica renal. La capacidad gluconeogénica renal (fig. 1) se encuentra incrementada en un 150 % 24 h después de efectuada la hepatectomía,

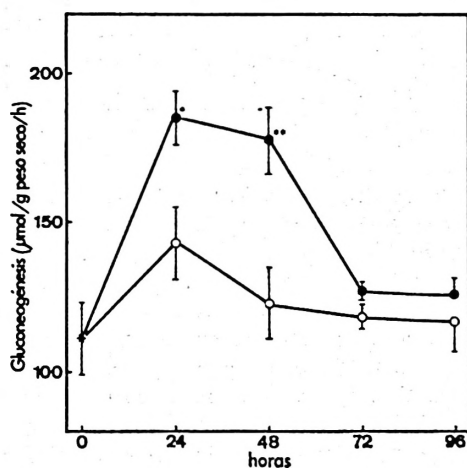


Fig. 1. Efecto de la hepatectomía a lo largo del tiempo sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal a partir de lactato 10 mM.

● Ratas hepatectomizadas, ○ ratas controles. Cada punto es media de 6 experiencias. Las barras verticales representan el S.E.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, nivel de significación según el test de Student.

permaneciendo aumentada a las 48 horas (144 %) y volviendo a valores normales a las 72 horas. En los animales controles hay también un aumento en la capacidad gluconeogénica renal a las 24 horas de la operación, recuperándose los valores normales a las 48 horas.

La gluconeogénesis renal de las ratas hepatectomizadas también aumenta cuando los sustratos gluconeogénicos empleados son diferentes al lactato (tabla II). Estas medidas se efectuaron a las 48 horas de la operación, cuando las diferen-

Tabla II. Efecto de la hepatectomía sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal a partir de diferentes sustratos, a las 48 horas de efectuada la operación.

Los resultados son medias $\pm$ S.E.M. el número de experimentos se indica entre paréntesis.

Sustratos (10 mM)	Producción de glucosa (μ moles/g tejido seco/h)	
	Controles	Hepatectomizadas
Lactato	122 $\pm$ 12 (4)	176 $\pm$ 12 (6) *
Piruvato	257 $\pm$ 9 (7)	301 $\pm$ 17 (7) **
α -Cetoglutarato	180 $\pm$ 6 (4)	199 $\pm$ 3 (4) *
Fructosa	414 $\pm$ 17 (7)	521 $\pm$ 14 (9) ***

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, nivel de significación según el test de Student.

cias entre los dos grupos de animales eran mayores en lo que respecta a la producción de glucosa a partir de lactato (fig. 1).

Actividades enzimáticas. La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática se encuentra incrementada a lo largo de todo el período, siendo significativos estos aumentos a las 24 y 72 h. Por el contrario, la actividad de la glucosa-6-fosfatasa se encuentra significativamente disminuida a las 48, 72 y 96 horas (fig. 2).

La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal aumenta casi un 250 % a las 24 horas de efectuada la hepatectomía. Los valores van disminuyendo progresivamente después, para recuperar la normalidad a las 96 horas. La actividad de esta enzima se incrementa también en las ratas controles; sin embargo, los valores en los animales hepatectomizados son significativamente mayores con respecto a los controles a las 48 y 72 h. La actividad de la glucosa-6-fosfatasa se incrementa significativamente en los animales hepatectomizados a las 24 y 48 horas, mientras que permanece casi constante en los animales controles.

Experimentos con animales sometidos a ayuno. Las ratas hepatectomizadas consumen muy poco alimento durante las primeras 24 horas después de la operación, siendo ligeramente superior en los animales controles. Se sabe que la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa se incrementa fuertemente con el ayuno (21). Por ello, el aumento observado en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y en la capacidad gluconeogénica de corteza renal de los animales controles y hepatectomizados a las 24 horas de la operación podría deberse al ayuno. Para estudiar la contribución relativa de la hepatectomía y del ayuno al incremento de la capacidad gluconeogénica renal y de las actividades enzimáticas, se han medido estos parámetros a las 15 y 24 horas de efectuada la operación en ra-

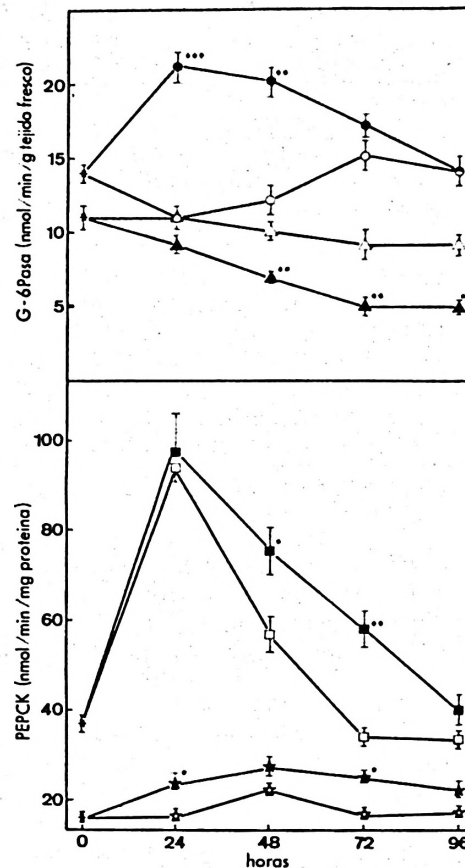


Fig. 2. Efecto de la hepatectomía a lo largo del tiempo sobre las actividades enzimáticas de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y glucosa-6-fosfatasa de hígado y riñón.

● Glucosa-6-fosfatasa renal, ▲ glucosa-6-fosfatasa hepática, ■ fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal, ★ fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática. Los signos vacíos corresponden a los animales controles. Cada punto es la media de 6 experiencias. Las barras verticales representan el S.E.M. ** $p < 0,01$, * $p < 0,02$, *** $p < 0,001$, nivel de significancia según el test de Student.

tas completamente privadas de alimento (figura 3). Tanto la capacidad gluconeogénica como las actividades enzimáticas son mayores en las ratas hepatectomiza-

das que en las controles, siendo las diferencias significativas todavía a las 24 horas.

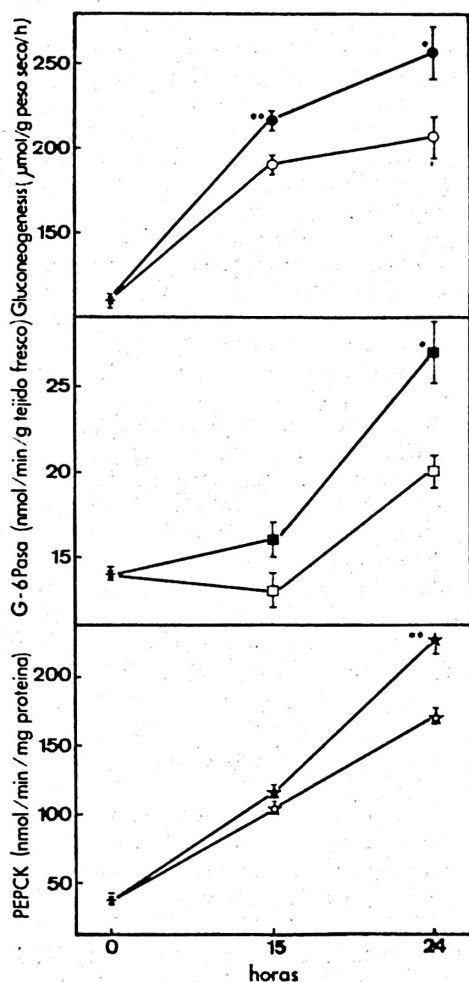


Fig. 3. Efecto de la hepatectomía a lo largo del tiempo sobre la capacidad gluconeogénica, a partir de lactato 10 mM, y sobre las actividades enzimáticas de corteza renal, en animales privados de alimento.

● Producción de glucosa, ■ actividad de la glucosa-6-fosfatasa, ★ actividad de la fosfoenol piruvato carboxicinasa. Los símbolos vacíos corresponden a los animales controles. Cada punto es la media de 6 experiencias. Las barras verticales representan el S.E.M. * $p < 0,01$, nivel de significación según el test de Student.

Discusión

Nuestros resultados demuestran claramente que la capacidad gluconeogénica renal se incrementa inmediatamente después de la hepatectomía, permaneciendo aumentada 48 horas después de la operación. Durante las primeras 24 horas, tanto las ratas hepatectomizadas como las controles consumen muy poco alimento. Por ello, la estimulación de la gluconeogénesis durante este período puede deberse parcialmente al ayuno. Sin embargo, el consumo de alimento se normaliza a las 48 horas de la operación, por lo que el aumento encontrado en este momento se debe atribuir solamente a la hepatectomía. Teniendo en cuenta, además, que la capacidad gluconeogénica renal es significativamente mayor en las ratas hepatectomizadas que en las controles a las 24 horas de efectuada la operación, cuando todos los animales habían sido privados de alimento durante este período, se puede concluir que existe un efecto de la hepatectomía sobre la capacidad gluconeogénica renal incluso durante el ayuno.

La estimulación de la capacidad gluconeogénica renal parece deberse al incremento en las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y glucosa-6-fosfatasa. De hecho, la actividad de ambas enzimas es bastante paralela a la producción de glucosa a lo largo de los cuatro días después de realizada la hepatectomía. El papel de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa como enzima clave de la gluconeogénesis está bien establecido (21). Por otra parte, el aumento en la actividad de la glucosa-6-fosfatasa podría explicar el que la formación de glucosa a partir de fructosa se encuentre también incrementada en los cortes renales de las ratas hepatectomizadas.

El comportamiento de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y glucosa-6-fosfatasa es diferente en la porción de hígado remanente. La primera enzima aumenta, mientras que la segunda disminuye. El

incremento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática después de una hepatectomía parcial ha sido descrita por BRINKMANN *et al.* (2), quienes indican también una pequeña disminución de la glucosa-6-fosfatasa hepática 48 horas después de la hepatectomía.

Respecto al mecanismo de la respuesta metabólica se sabe que la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa aumenta en el riñón con el ayuno, con la acidosis metabólica y los glucocorticoides (21). Ya ha sido considerada la influencia relativa del ayuno y de la hepatectomía sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y la capacidad gluconeogénica. Por otra parte, no hay acidosis metabólica en nuestras condiciones experimentales: los niveles sanguíneos de lactato no varían (tabla I) y no hay diferencias significativas en los valores de pH, pCO₂ y concentración de bicarbonato en sangre entre las ratas controles y las hepatectomizadas (resultados no incluidos en el texto). Por tanto, es lógico pensar que los glucocorticoides deben de estar implicados en la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal después de la hepatectomía. Los glucocorticoides son también inductores de la glucosa-6-fosfatasa de corteza renal (19). Además, MAROTTA *et al.* (16) han demostrado que las concentraciones de corticosterona plasmática aumenta significativamente después de la hepatectomía, permaneciendo elevadas durante cuatro días. Por todo ello cabe pensar que los glucocorticoides están implicados en la estimulación de la capacidad gluconeogénica renal después de la hepatectomía parcial.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido subvencionada por una beca de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

Resumen

La capacidad gluconeogénica renal experimenta un aumento del 150 % a las 24 horas de realizar la hepatectomía parcial, permaneciendo incrementada a las 48 horas (144 %) y volviendo a valores normales a las 72 horas. La producción de glucosa por la corteza renal de las ratas hepatectomizadas también aumenta a las 48 horas de la operación cuando los substratos gluconeogénicos empleados son piruvato, α -cetoglutarato y fructosa.

La estimulación de la capacidad gluconeogénica renal parece deberse al incremento en las actividades de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxicinasa y glucosa-6-fosfatasa, que presentan un comportamiento similar al de la producción de glucosa después de la hepatectomía.

La respuesta metabólica renal puede deberse parcialmente al ayuno en las primeras 24 horas. Después, el consumo de alimento se normaliza y el incremento en la producción de glucosa debe ser atribuido a la hepatectomía. Puesto que en nuestras condiciones experimentales no existe acidosis metabólica, se sugiere la implicación de los glucocorticoides en la estimulación de las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y glucosa 6-fosfatasa renales.

Bibliografía

1. BALLARD, F. J. y HANSON, R. W.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 5625-5630, 1969.
2. BRINKMANN, A., DATZ, N., SASSE, D. y JUNGERMANN, K.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1561-1571, 1978.
3. CAMARGO, A. C. M. y MIGLIORINI, R. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **136**, 962-966, 1971.
4. CHANG, H. C. y LANE, M. D.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 2413-2420, 1966.
5. FAUS, M. J., LUPIÁÑEZ, J. A., VARGAS, A. y SÁNCHEZ-MEDINA, F.: *Biochem. J.*, **174**, 461-467, 1978.
6. GARCÍA-RUIZ, J. P., MORENO, F., SÁNCHEZ-MEDINA, F. y MAYOR, F.: *FEBS Lett.*, **34**, 113-116, 1973.
7. GUTMANN, I. y WAHLEFELD, A. W.: In «Methods in Enzymatic Analysis» (H. U. Bergmeyer, ed.). Academic Press, New York, 1974, pp. 1464-1468.

success or failure of the tumor rejection could depend on these diverse immune responses.

Resumen

El MCG4, un sarcoma de BALB/c (H-2^d), que expresa anormalmente antígenos H-2^k y H-2^b similar, regresa espontáneamente cuando se inocula en BALB/c y en híbridos F₁ de BALB/c. Se encuentra relación entre la actividad anti H-2^k y/o anti H-2^b detectada en el suero y las células inmunes de los ratones regresores y la capacidad de éstos para rechazar el tumor.

References

1. GARRIDO, F., FESTENSTEIN, H. and SCHIRRMACHER, V.: *J. Immunogen.*, 4, 15-27, 1977.
2. GARRIDO, F., SCHIRRMACHER, V. and FESTENSTEIN, H.: *Nature*, 259, 228-229, 1976.
3. INVERNIZZI, G. and PARMIANI, G.: *Int. J. Cancer*, 16, 756-767, 1975.
4. MARTIN, J. C., GIPSON, T. G., RICE, J.: *Nature*, 265, 738-739, 1977.
5. SCHIRRMACHER, V., BOSLET, K., SHANTZ, G., CLAUSER, K. and HÜBSCH, D.: *Int. J. Cancer*, 23, 245-252, 1979.
6. SCHIRRMACHER, V., GARRIDO, F., GARCÍA-OLIVARES, E., PÉREZ, M. and TORRES, M. D.: *J. Immunogen.*, 7, 51-59, 1980.
7. SCHIRRMACHER, V., GARRIDO, F., HÜBSCH, D., GARCÍA-OLIVARES, E. and KOSZINOWSKI, U.: *Transplant. Proc.*, 12, 32-34, 1980.
8. SCHIRRMACHER, V., MARXEN, I. and ROBINSON, P.: *Z. Immunitätsforschung. Immunobiology*, 155, 155-168, 1976.

