

Evolución de la concentración de los metabolitos gluconeogénicos en hígado y riñón de rata a lo largo del ejercicio

A. Vargas, R. Muñoz-Clares, A. Sánchez-Pozo y F. Sánchez-Medina

Departamento de Bioquímica
Universidad de Granada
Granada

(Recibido el 7 de octubre de 1980)

A. VARGAS, R. MUÑOZ-CLARES, A. SANCHEZ-POZO and F. SANCHEZ-MEDINA. *Evolution of the Content of Gluconeogenic Metabolites in Rat Liver and Kidney During Exercise*. Rev. esp. Fisiol., 37, 277-284. 1981.

The evolving concentration of metabolite intermediates for gluconeogenesis in liver and kidney has been studied in rats after varying periods of exercise (swimming in water at 22° C). Lactate consumption by liver, according to the results, does not take place by gluconeogenesis primarily, since the values for malate, aspartate and PEP show a low *in vivo* activity for phosphoenolpyruvate carboxykinase. The PEP/aspartate ratio, on the contrary, gradually rises in kidney, suggesting a gradual increase in the *in vivo* activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase, which agree quite well with the results previously obtained *in vitro*.

The prevention of metabolic acidosis by bicarbonate administration affects the metabolite profile in liver during exercise only very slightly. Renal phosphoenolpyruvate carboxykinase activity *in vivo* decreases in relation to previously untreated rats, as well as gluconeogenesis, although to a lesser extent.

Se ha señalado que el ejercicio muscular (natación en agua a 22° C) origina un incremento en la capacidad gluconeogénica de la corteza renal, muy probablemente debido a la acidosis metabólica provocada por la sobreproducción de lactato en estas circunstancias (19, 22, 23). El aumento de la capacidad gluconeogénica renal parece vinculado a la inducción de la fosfoenolpiruvato carboxicina-sa (21). Por otra parte, el perfil de los metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis a las dos horas de ejercicio

sugiere que dicho aumento de la capacidad renal se corresponde con un mayor funcionamiento *in vivo* del proceso de síntesis de glucosa (20).

Nuestros datos indican que la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicina-sa y de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal tiene lugar de forma continua durante las dos horas de ejercicio (23). Por eso pareció aconsejable estudiar el perfil de metabolitos a lo largo del tiempo de natación. Teniendo en cuenta, por otra parte, la vinculación de la res-

puesta metabólica renal a la acidosis, hemos determinado también la concentración de los intermediarios gluconeogénicos en ratas tratadas previamente con bicarbonato. Las determinaciones se han ampliado al hígado en ambas condiciones en un intento de esclarecer la contribución relativa de ambos órganos gluconeogénicos a la glucemia.

Material y métodos

Se han utilizado ratas Wistar hembras de unos 150-200 g, a las que se forzó a nadar en un baño con agua a 22° C durante 15, 30, 60, 90 ó 120 min. A un lote de ratas se les administró bicarbonato sódico (10 ml de una solución 0.2 M) por intubación gástrica, 30 min antes de comenzar el ejercicio. Los demás animales recibieron una dosis de 10 ml de solución salina. Inmediatamente después del ejercicio las ratas se sacrificaron por dislocación cervical.

Tras realizar una incisión abdominal las muestras de hígado y riñón se tomaron muy rápidamente y se comprimieron entre dos placas de aluminio enfriadas previamente con nitrógeno líquido (28). El tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la congelación del tejido fue en todos los casos inferior a los diez segundos. El tejido congelado se pulverizó en un mortero enfriado con nitrógeno líquido. Los extractos obtenidos con una solución de ácido perclórico se neutralizaron con KOH (26).

El lactato ha sido determinado por el método de GUTMAN y WAHLEFELD (9); el aspartato, de acuerdo con BERGMAYER *et al.* (4); el malato, por el método de HOHORST (12); piruvato, fosfoenolpiruvato, 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato, por el método de CZOC y ECKERT (6); dihidroxiacetona fosfato, gliceraldehído fosfato y fructosa difosfato, según BUCHER y HOHORST (5); y glucosa-6-fosfato y fruc-

tosa-6-fosfato, por el método de LANG y MICHAL (17).

Resultados

La evolución de la concentración de los metabolitos gluconeogénicos en hígado durante el ejercicio se expresa gráficamente en la figura 1. Es destacable que lactato y piruvato evolucionan de forma paralela, alcanzando a los 15 y 30 min de ejercicio valores máximos, muy por encima de los iniciales, para decrecer fuertemente después hasta quedar al cabo de las dos horas por debajo de ellos. Aunque no de forma tan paralela, también las concentraciones de malato y aspartato exhiben fluctuaciones semejantes, permaneciendo a lo largo del ejercicio por encima de los valores iniciales, especialmente por lo que se refiere al aspartato. Los demás metabolitos muestran variaciones poco importantes respecto al perfil de los quince minutos. Los niveles de triosas-fosfato y fructosa difosfato descienden muy ligeramente, con algunas fluctuaciones, a lo largo del ejercicio. También hay fluctuaciones en el caso de las hexosas-monofosfato, alcanzándose un máximo a los 60 min, momento en que también son máximas las concentraciones de aspartato y fosfoenolpiruvato (PEP).

El tratamiento previo con bicarbonato no modifica sustancialmente estos resultados (fig. 1). El lactato se acumula menos en la primera media hora y permanece por encima de los valores controles durante todo el tiempo. La acumulación de piruvato también es mucho menos acusada en la primera media hora. En general, los valores de los metabolitos están por debajo de los obtenidos en ratas sin tratamiento con bicarbonato.

Por lo que se refiere al riñón (fig. 2), la evolución de lactato y piruvato es semejante a la observada en hígado, aunque el acúmulo en la primera parte del ejercicio es menos importante. El malato también exhibe un incremento más mo-

derado que en el hígado, regresando a valores muy próximos a los iniciales en la segunda mitad del período de natación. La evolución de las concentraciones de aspartato es sustancialmente distinta a la observada en el hígado, ya que los valores se mantienen siempre por debajo de la normalidad y alcanzan el mínimo a los 60 min de ejercicio. También la evolución del PEP es muy distinta en el riñón, donde este metabolito muestra un incremento continuo a lo largo del ejercicio. En cuanto a los demás intermediarios metabólicos, es destacable que las triosas-fosfato sólo se encuentran por encima de la normalidad a los 120 min (en el hígado se encontraban permanentemente elevados) y que los azúcares fosforilados, aunque con fluctuaciones, van incrementando sus concentraciones con el tiempo de ejercicio.

El tratamiento previo con bicarbonato produce cambios apreciables en la evolución de las concentraciones renales de los metabolitos gluconeogénicos, sobre todo en la última fase del ejercicio (fig. 2).

Se puede apreciar sobre todo un fuerte descenso de piruvato y la ausencia de incremento en el PEP. También las concentraciones de hexosas-fosfato son globalmente menores que en las ratas sin tratamiento previo al ejercicio.

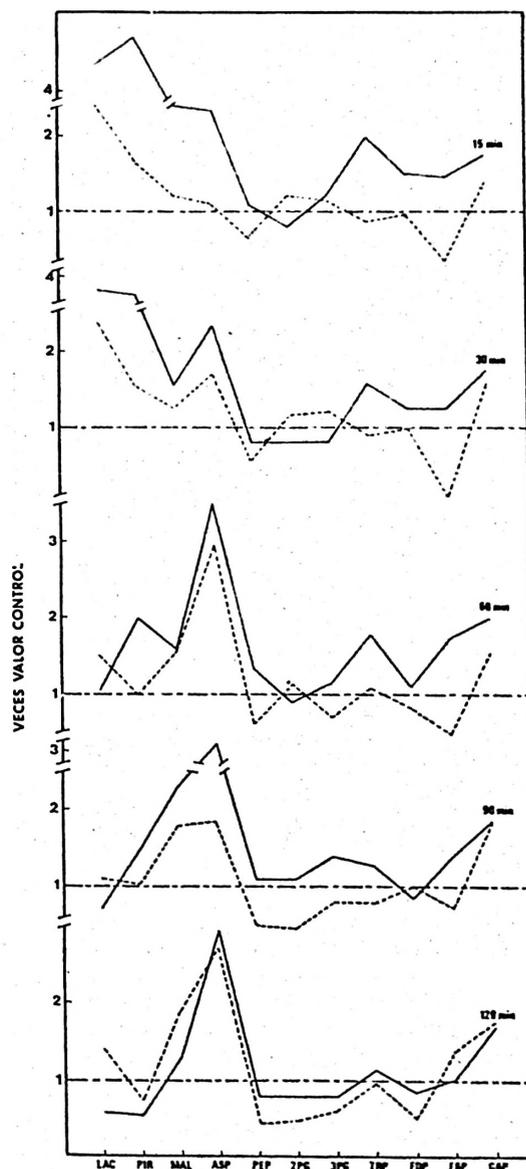


Fig. 1. Evolución de la concentración de los metabolitos gluconeogénicos en hígado a lo largo del ejercicio en ratas normales (—) y en ratas tratadas con bicarbonato (-----). Los valores se expresan como múltiplos de los controles, tomando éstos como la unidad. Cada punto representa la media de 4-6 experimentos (8-12 para los controles). Los valores para los controles, expresados en nmol/g de peso fresco \pm el error estándar de la media, son los siguientes: LAC (lactato), 982 ± 147 ; PIR (piruvato), 63 ± 14 ; MAL (malato), 523 ± 32 ; ASP (aspartato), 695 ± 59 ; PEP (fosfoenolpiruvato), 105 ± 11 ; 2PG (2-fosfoglicerato), 46 ± 7 ; 3PG (3-fosfoglicerato), 240 ± 27 ; TRP (suma de triosas fosfato), 50 ± 9 ; FDP (fructosa difosfato), 26 ± 2 ; F6P (fructosa 6-fosfato), 29 ± 3 ; y G6P (glucosa 6-fosfato), 354 ± 41 .

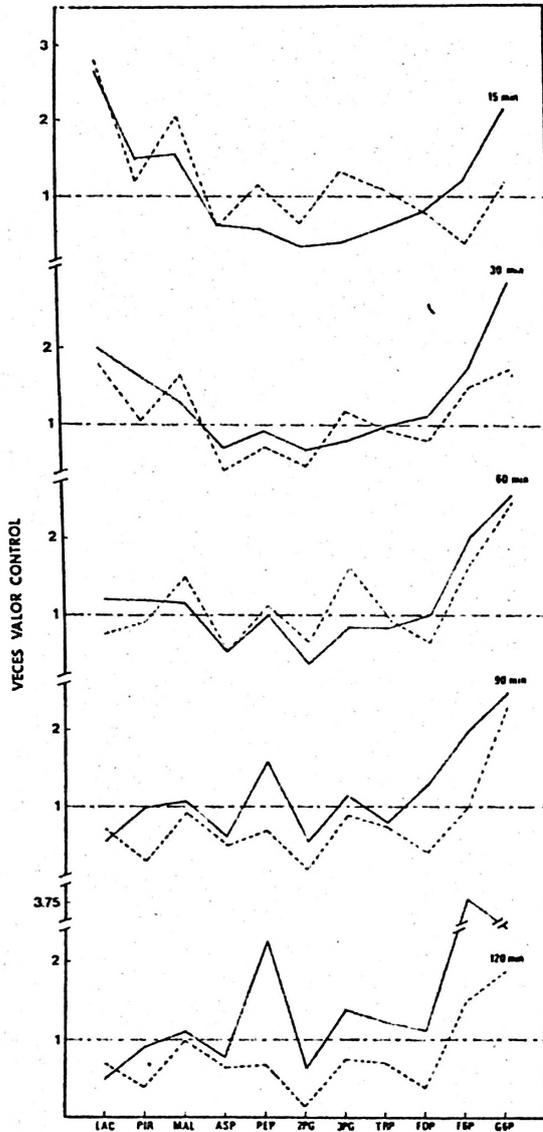


Fig. 2. Evolución de la concentración de los metabolitos gluconeogénicos en riñón a lo largo del ejercicio en ratas normales (—) y en ratas tratadas con bicarbonato (-----). Las indicaciones son las mismas que para la figura anterior. Los valores controles son los siguientes: LAC, 1.454 ± 244 ; PIR, 84 ± 3 ; MAL, 343 ± 33 ; ASP, 1.122 ± 86 ; PEP, 51 ± 5 ; 2PG, 47 ± 4 ; 3PG, 146 ± 15 ; TrP, 74 ± 2 ; FDP, 30 ± 4 ; F6P, 8 ± 3 ; y G6P, 39 ± 6 nmol/g tejido fresco.

Discusión

Efecto del ejercicio. Es destacable que las concentraciones tisulares de lactato y piruvato alcanzan un máximo en todos los casos a los quince minutos de ejercicio. Ello concuerda con las altas concentraciones plasmáticas de lactato encontradas en este tiempo (23). Por otra parte, el descenso de las concentraciones tisulares de estos metabolitos parece implicar un fuerte consumo metabólico del lactato en ambos órganos.

Nuestros resultados sugieren que el lactato se consume en el riñón por la vía gluconeogénica mientras que este camino metabólico es poco activo en hígado durante el ejercicio. Ello se deduce fundamentalmente de los niveles tisulares de aspartato y PEP, que traducen el funcionamiento *in vivo* de la fosfoenolpiruvato carboxinasa, enzima clave del proceso gluconeogénico. En efecto, se asume generalmente que las concentraciones de malato y aspartato están estrechamente relacionadas con las de oxalacetato (cuya determinación plantea problemas por su inestabilidad y pequeña concentración en los tejidos). Cuando se utiliza lactato como precursor gluconeogénico, el transporte de oxalacetato desde la mitocondria hasta el citoplasma, donde se encuentra localizada la fosfoenolpiruvato carboxinasa, se realiza fundamentalmente como aspartato (27). En consecuencia, los valores de oxalacetato deben estar reflejados mayoritariamente por el aspartato en nuestras condiciones experimentales.

A lo largo del ejercicio, las concentraciones hepáticas de aspartato van aumentando mientras que las de PEP se mantienen sin grandes diferencias. Por lo tanto, se puede deducir que, en estas condiciones, la fosfoenolpiruvato carboxinasa no es muy activa en hígado. Por el contrario, las concentraciones renales de aspartato se mantienen por debajo de las iniciales mientras que las de PEP aumen-

tan gradualmente. Ello indica un funcionamiento creciente de la enzima, en concordancia con el aumento progresivo de su actividad ensayable y de la capacidad gluconeogénica renal encontrados anteriormente *in vitro* (23).

El escaso funcionamiento de la gluconeogénesis en el hígado puede explicarse si se tiene en cuenta que el ejercicio se realiza por la mañana, tras el período nocturno de ingestión de alimento, por lo que el hígado contiene una apreciable cantidad de glucógeno (24). Está bien establecido que durante el ejercicio existe una intensa glucogenolisis en el hígado (25). Ello asegura el mantenimiento de la glucemia y hace poco necesaria la contribución adicional de la gluconeogénesis hepática. La degradación del glucógeno puede explicar, por otra parte, el aumento de azúcares fosforilados durante el ejercicio.

Dado que en el riñón no existe glucógeno en cantidades apreciables, el aumento de hexosas-fosfato por el ejercicio es un índice adicional de que en este órgano funciona activamente la gluconeogénesis a partir de lactato.

Efecto de la administración de bicarbonato. La acidosis metabólica produce efectos contrarios sobre la gluconeogénesis en hígado y riñón. Está muy bien demostrado que la gluconeogénesis renal aumenta con la acidosis a través de la inducción de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (2, 3, 8, 14), mientras que la enzima hepática no se afecta (3) y la gluconeogénesis disminuye en hígado en estas circunstancias (11, 13, 15, 18). La supresión de la acidosis metabólica por la administración previa de bicarbonato puede explicar, por tanto, el menor acúmulo de lactato y piruvato en hígado en la primera media hora de ejercicio. De todas formas, tampoco parece que exista una gluconeogénesis muy activa en estas condiciones, puesto que volvemos a encontrar un acúmulo de aspartato y valo-

res muy bajos de PEP a lo largo del tiempo de natación, indicando la falta de funcionamiento *in vivo* de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa.

Por lo que se refiere al riñón, los valores de malato, aspartato y PEP en la segunda mitad del ejercicio son semejantes a los encontrados por ALLEYNE (1) y por HEMS y BROSNAN (10) en ratas con acidosis metabólica experimental, lo que subraya la vinculación de la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal durante el ejercicio a la acidosis metabólica originada por la sobreproducción de lactato. La supresión de la acidosis durante el ejercicio se traduce en un claro descenso de los valores de PEP, que son muy bajos al compararlos con los de las ratas que nadan sin tratamiento previo. Ello indica una menor actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa *in vivo*, en concordancia con los datos obtenidos anteriormente *in vitro* en las mismas condiciones (22). No obstante, el perfil de metabolitos sugiere que la gluconeogénesis es operativa, ya que los niveles de hexosas-fosfato son sólo algo inferiores a los de las ratas sin tratar con bicarbonato. Es interesante señalar a este respecto que la gluconeogénesis renal funciona en las ratas con cierta intensidad aun en ausencia de acidosis metabólica, tal como se ha demostrado recientemente *in vivo* (16). Por ello, es lógico que se incremente ante un aporte importante de sustrato, como sucede durante el ejercicio.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Prof. G. A. O. Alleyne su ayuda en la discusión de los resultados.

Resumen

Se estudia la evolución de la concentración de los metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis en hígado y riñón de rata a distintos tiempos de ejercicio (natación en agua a

22° C). Los resultados sugieren que el consumo de lactato por el hígado no se hace fundamentalmente por la vía gluconeogénica, ya que los valores de malato, aspartato y PEP señalan una escasa actividad *in vivo* de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa. Por el contrario, la razón PEP/aspartato aumenta gradualmente en el riñón, sugiriendo el incremento paulatino de la actividad *in vivo* de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, en estrecho paralelismo con los resultados obtenidos anteriormente *in vitro*.

La prevención de la acidosis metabólica por administración de bicarbonato afecta sólo muy ligeramente el perfil de metabolitos en el hígado durante el ejercicio. En el riñón decrece el funcionamiento de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa con relación a las ratas sin tratamiento previo y desciende, aunque en menor medida, la gluconeogénesis.

Bibliografía

- ALLEYNE, G. A. O.: *Nature*, **217**, 847-848, 1968.
- ALLEYNE, G. A. O.: *J. Clin. Invest.*, **49**, 943-951, 1970.
- ALLEYNE, G. A. O. y SCULLARD, G. H.: *J. Clin. Invest.*, **48**, 364-370, 1969.
- BERGMAYER, H. U., BERNT, E., MÖLLERING, H. y PFLEIDERER, G.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.). Academic Press, N. York, 1974, pp. 1696-1700.
- BUCHER, T. y HOHORST, H. J.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.). Academic Press, N. York, 1965, pp. 246-252.
- CZOC, R. y ECKERT, L.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.). Academic Press, N. York, 1965, pp. 229-233.
- FLORES, H. y ALLEYNE, G. A. O.: *Biochem. J.*, **123**, 35-39, 1971.
- GOODMAN, A. D., FUISZ, R. E. y CAHILL, G. F. Jr.: *J. Clin. Invest.*, **45**, 612-619, 1966.
- GUTMANN, I. y WAHLEFELD, A. W.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.). Academic Press, N. York, 1974, pp. 1464-1468.
- HEMS, D. A. y BROSNAN, J. T.: *Biochem. J.*, **123**, 391-397, 1971.
- HEMS, R., ROSS, B. D., BERRY, M. N. y KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, **101**, 284-292, 1966.
- HOHORST, H. J.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.). Academic Press, N. York, 1965, pp. 328-332.
- ILES, R. A., COHEN, R. D., RIST, A. H. y BARON, P. G.: *Biochem. J.*, **164**, 185-191, 1977.
- IYNEDIAN, P. B., BALLARD, F. J. y HANSON, R. W.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 5596-5603, 1975.
- KAMM, D. E. y CAHILL, G. F. Jr.: *Am. J. Physiol.*, **216**, 1207-1212, 1969.
- KIDA, K., NAKAJO, S., KAMIYA, F., TOYAMA, Y., NISHIO, T. y NAKAGAWA, H.: *J. Clin. Invest.*, **62**, 721-726, 1978.
- LANG, G. y MICHAL, G.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.). Academic Press, N. York, 1974, pp. 1238-1242.
- LLOYD, M. H., ILES, R. A., SIMPSON, B. R., STRUNIN, J. M., LAYTON, J. M. y COHEN, R. D.: *Clin. Sci. Mol. Med.*, **45**, 542-549, 1973.
- MUÑOZ-CLARES, R., VARGAS, A., MORATA, P. y SÁNCHEZ-MEDINA, F.: *J. Mol. Med.*, **3**, 299-303, 1978.
- MUÑOZ-CLARES, R., GARCÍA-RUIZ, J. P., VARGAS, A. y SÁNCHEZ-MEDINA, F.: *FEBS Lett.*, **99**, 340-342, 1979.
- SÁNCHEZ-MEDINA, F., SÁNCHEZ-URRUTIA, L., MEDINA, J. M. y MAYOR, F.: *FEBS Lett.*, **19**, 128-130, 1971.
- SÁNCHEZ-MEDINA, F., SÁNCHEZ-URRUTIA, L., MEDINA, J. M. y MAYOR, F.: *FEBS Lett.*, **26**, 25-26, 1972.
- SÁNCHEZ-URRUTIA, L., GARCÍA-RUIZ, J. P., SÁNCHEZ-MEDINA, F. y MAYOR, F.: *Biochem. Med.*, **14**, 355-367, 1975.

24. VARGAS, A., PITA, M. L., LUPIÁÑEZ, J. A. y SÁNCHEZ-MEDINA, F.: *Ars Pharm.*, **20**, 229-236, 1979.
25. WAHREN, J., FELIG, P., HAGENFELDT, L., HENDLER, R. y AHLBORG, G.: En «Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise» (Howald, H. y Poortmans, J. R., eds.). Birkhäuser Verlag, Basel, 1975, pp. 144-153.
26. WILLIAMSON, D. H., LUND, P. y KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, **103**, 514-527, 1967.
27. WILLIAMSON, J. R.: En «Gluconeogenesis. Its Regulation in Mammalian Species» (Hanson, R. W. y Mehlman, M. A., eds.). John Wiley, N. York, 1976, pp. 165-220.
28. WOLLENBERGER, A., RISTAU, O. y SCHOFFA, G.: *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **270**, 399-412, 1960.

