

Evolución de la gluconeogénesis hepática y renal durante la intoxicación aguda del hígado por tetracoloruro de carbono *

Paloma Hortelano, M.^a José Faus, Pilar Morata y F. Sánchez-Medina

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada
Granada

(Recibido el 7 de noviembre de 1978)

P. HORTELANO, M.^a J. FAUS, P. MORATA and F. SANCHEZ-MEDINA. *Evolution of Liver and Kidney Gluconeogenesis During Acute Liver Intoxication by Carbon Tetrachloride*. Rev. esp. Fisiol., 35, 341-346. 1979.

Evolution of early renal metabolic adaptation to the rat liver intoxication by carbon tetrachloride is studied.

Liver glycogen is very rapidly depleted (20 % of initial values at 3 h) and liver gluconeogenic capacity is completely inhibited 7 h after carbon tetrachloride treatment. Contrariwise, a gradual enhancement of phosphoenolpyruvate carboxikinase activity and gluconeogenic capacity of kidney cortex takes place during this period.

Accordingly, renal concentrations of aspartate, malate, and phosphoenolpyruvate indicate that the reaction catalysed by phosphoenolpyruvate carboxykinase is accelerated *in vivo*.

These findings suggest that metabolic adaptation of kidney cortex in response to liver functional impairment plays an important role early after carbon tetrachloride administration.

Actualmente parece bien establecido que la corteza renal puede contribuir a la homeostasis glucémica en condiciones de hipofuncionalidad hepática (12, 18, 19). En este sentido, en nuestro departamento se ha puesto de manifiesto un aumento de

la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal en ratas con degeneración hepática experimental inducida por la administración de galactosamina (7) y al inhibir selectivamente la gluconeogénesis hepática por administración de ácido 5-metoxi-indol-2-carboxílico (17). Más recientemente, se ha reseñado una respuesta adaptativa renal del mismo tipo, pero más intensa, en ratas con intoxica-

* Esta investigación ha sido financiada en parte por una ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

ción aguda del hígado producida por la administración de tetracloruro de carbono (6).

En el presente trabajo se ha estudiado la evolución de esta adaptación metabólica en las primeras horas tras la administración de tetracloruro de carbono, en un intento de esclarecer su importancia *in vivo* en orden al mantenimiento de la glucemia.

Material y métodos

Reactivos. Las enzimas utilizadas han sido suministradas por Boehringer (Mannheim, Alemania), excepto la glucosa oxidasa, que procedía de Sigma Chemical Co. Los coenzimas utilizados eran de Sigma o de Boehringer, la heparina, de los laboratorios Leo (Madrid) y el pentobarbital sódico, de los laboratorios Abbot (Madrid). Los demás productos procedían de Merck, Probus y Carlo Erba.

Tratamiento de los animales. Se han utilizado ratas Wistar hembras de unos 150-200 g. El tetracloruro de carbono se ha inyectado intraperitonealmente 3, 5 y 7 horas antes del estudio, en una dosis de 0.2 ml de $\text{Cl}_4\text{C}/100$ g de peso (solución 1:1 en parafina líquida). Los animales controles han sido inyectados con una solución 1:1 de parafina líquida y ClNa al 0.9 %. Durante todo el tiempo del experimento los animales fueron privados de comida y tomaron agua *ad libitum*.

Perfusión hepática. Se ha utilizado el método descrito por HEMS *et al.* (10). El medio de perfusión (150 ml) estaba compuesto por solución salina Krebs-Henseleit (13), albúmina bovina (fracción V) disuelta en solución salina Krebs-Henseleit y filtrada a través de un filtro Millipore de $1.2 \mu\text{m}$ y hematíes procedentes de sangre humana conservada por un espacio de 3-4 semanas a 4°C en solución anticoagulante citrato/dextrosa. Como sustrato se ha utilizado lactato sódico,

10 mM. El tiempo total de perfusión ha sido 135 min, dejando los 40 primeros para su estabilización.

Gluconeogénesis renal. Las medidas de la capacidad gluconeogénica renal se han realizado por el método descrito por KREBS *et al.* (14), incubando los cortes de corteza renal en un medio salino y utilizando como sustrato, lactato sódico, 10 mM, a 40°C , durante 1 h, gaseando con O_2/CO_2 (95:5). El tejido, 1.5-4 mg de peso seco, se suspendió en 4 ml del 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.

Tratamiento de los tejidos. La sangre se extrajo de la aorta abdominal de ratas anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg), con jeringa heparinizada. En todos los demás casos, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical (con objeto de provocar el mínimo *stress* al animal). Para la determinación de las concentraciones tisulares de aspartato, malato y fosfoenolpiruvato se extrajeron los riñones o una porción de hígado, tras una incisión abdominal y se comprimieron entre dos placas de aluminio enfriadas con nitrógeno líquido, según la técnica de WOLLENBERGER *et al.* (23). El tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la congelación no fue superior a 8 s. El órgano congelado se pulverizó en un mortero enfriado con nitrógeno líquido, se obtuvo un extracto con una solución de ácido perclórico y se neutralizó con KOH, según el método descrito por WILLIAMSON *et al.* (22).

Métodos analíticos. El glucógeno ha sido determinado como glucosa, después de su hidrólisis enzimática, según la técnica descrita por KREBS *et al.* (14). La glucosa se ha determinado por el método de la glucosa oxidasa (14, 15). El lactato ha sido determinado por el método de

GUTMAN y WAHLEFELD (8); el malato, por el método de HOHORST (11); el fosfoenolpiruvato, por el método de CZOK y ECKERT (5); y el aspartato, por el método de BERGMAYER *et al.* (4).

La actividad de la lactato deshidrogenasa se ha medido por el método de BERGMAYER *et al.* (3); la de la glucosa-6-fosfatasa, por el método descrito por HARPER (9) y la de la fructosa difosfatasa, por el de PONTREMOLI *et al.* (20), usando una solución amortiguadora de glicocola 0.04 M a pH 9.4. La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas se ha realizado por el método isotópico de BALLARD *et al.* (2) y las proteínas se han determinado por el de LOWRY *et al.* con albúmina bovina como patrón (16).

Resultados y discusión

Evolución de la capacidad glucostática del hígado. El hígado dispone de dos mecanismos de obtención de glucosa para las necesidades de los tejidos periféricos: la degradación de las reservas de glucógeno y la gluconeogénesis. En la figura 1 se observa que el glucógeno hepático se agota rápidamente tras la administración de tetracloruro de carbono. A las 3 horas los valores son ya del orden del 20 % de los controles, para hacerse prácticamente nulos con posterioridad. Por lo que se refiere a la capacidad gluconeogénica, una vez desaparecido el glucógeno, puede medirse sin interferencias en hígado perfundido (10). La velocidad de producción de glucosa a partir de lactato sódico 10 mM es prácticamente nula (tabla I), tanto a las 7 como a las 9 horas, al comparar con los valores de los controles (animales en ayunas durante 48 h).

Las enzimas hepáticas ensayadas van disminuyendo en su actividad a lo largo del tratamiento (tabla II). Entre estas enzimas, la fructosa difosfatasa es la que se afecta más tempranamente (a las 3 h). A las 5 horas es significativo el descenso de la lactato deshidrogenasa y glucosa-6-

fosfatasa, mientras que la fosfoenolpiruvato carboxicinas disminuye significativamente a las 7 horas. En todos los casos los porcentajes de inactivación son del mismo orden que los encontrados a las

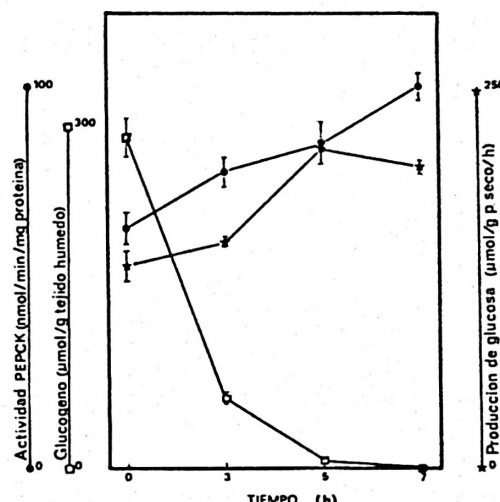


Fig. 1. Evolución del contenido en glucógeno hepático y de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas y de la capacidad gluconeogénica renales en las primeras horas tras la administración de tetracloruro de carbono. Cada punto representa la media de 4-6 experimentos, indicándose el error estándar de la media por las barras verticales. PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxicinas.

Tabla I. Efecto de la administración de Cl_4C sobre la capacidad gluconeogénica en hígado perfundido de rata.

Los resultados se expresan como medias $\pm$ el error estándar de la media. Número de experiencias por grupo, 4. P expresa los valores estadísticamente significativos según el test de Student.

	μmoles de glucosa producida/h/g tejido seco
Controles	
(ayuno 48 h)	261.80 $\pm$ 3.0
Cl_4C	
7 h	0.94 $\pm$ 0.05 (P < 0.001)
9 h	0.69 $\pm$ 0.04 (P < 0.001)

Tabla II. Efecto de la administración de Cl_4C , a lo largo del tiempo, sobre las actividades de la lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, fructosa difosfatasa y glucosa-6-fosfatasa de hígado, y sobre los valores de glucosa y lactato en sangre, de ratas privadas de acceso a la comida.

Los resultados se expresan como medias $\pm$ el error estándar de la media y con el número de experimentos entre paréntesis. Los valores estadísticamente significativos según el test de Student se expresan por: * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$.

Tiempo h	Actividades enzimáticas				Sangre	
	Lactato deshidrogenasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$)	Fructosa difosfatasa ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$)	Glucosa-6- fosfatasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tejido)	Glucosa ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)	Lactato ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)
0	$3,12 \pm 0,34$ (4)	22 ± 1 (5)	96 ± 6 (6)	$11,3 \pm 1,2$ (6)	$8,67 \pm 0,37$ (4)	$2,75 \pm 0,20$ (4)
3	$2,62 \pm 0,33$ (4)	19 ± 3 (4)	56 ± 3 (5) ****	$11,3 \pm 1,0$ (4)	$7,83 \pm 0,36$ (4)	$2,59 \pm 0,22$ (4)
5	$1,38 \pm 0,12$ (4) ***	20 ± 2 (4)	48 ± 7 (4) ****	$7,8 \pm 1,1$ (4) *	$7,34 \pm 0,36$ (4) *	$1,76 \pm 0,29$ (4) *
7	$1,62 \pm 0,05$ (4) ***	15 ± 1 (4) ***	69 ± 3 (7) ***	$8,6 \pm 1,1$ (4)	$6,09 \pm 0,76$ (4) *	$2,71 \pm 0,17$ (4)

24 horas de tratamiento, excepto para la glucosa-6-fosfatasa, que es menor (6).

El decrecimiento en la actividad de estas enzimas explica sólo parcialmente la desaparición casi total de la capacidad gluconeogénica hepática observada a las 7 horas. Dado el fuerte impacto del Cl_4C sobre el metabolismo hepático (21) es lógico pensar que otras enzimas implicadas en la gluconeogénesis se afecten también por el tratamiento. Otra posibilidad es que el tóxico influya negativamente sobre el estado energético del hígado, interfiriendo así en el proceso de síntesis de glucosa.

Evolución de la capacidad gluconeogénica renal. La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y la capacidad gluconeogénica de la corteza renal aumentan en forma gradual durante el tratamiento (fig. 1), observando un cierto paralelismo entre sí, y contrastando con la evolución de la capacidad glucoestática del hígado. La capacidad gluconeogénica renal está sustancialmente aumentada a las 7 horas de tratamiento, alcanzando valores similares a los encontrados a las 24 horas (6). En este momento, el glucógeno hepático está agotado y es nula la capacidad glu-

coneogénica de dicho órgano. Teniendo en cuenta que los animales no tienen acceso a la comida, está claro que a partir de este momento el único tejido que puede aportar glucosa a la sangre es la corteza renal. Los valores de glucemia a las 7 horas de la administración de Cl_4C son menores que los iniciales (muy altos, por tratarse de animales recién alimentados) pero todavía pueden considerarse normales.

Evolución de la concentración tisular de aspartato, malato y fosfoenolpiruvato. Con el fin de obtener información sobre el funcionamiento *in vivo* de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática y renal durante las primeras horas del tratamiento con Cl_4C , se han determinado las concentraciones tisulares de aspartato, malato y fosfoenolpiruvato, a las 3, 5 y 7 horas de la administración del tóxico.

Durante el tratamiento, estos metabolitos se alteran ligeramente en el hígado (figura 2). Por el contrario, en el riñón disminuyen las concentraciones de aspartato y malato y existe un gran incremento en fosfoenolpiruvato (hasta cinco veces los valores iniciales). Las concentraciones de aspartato y malato reflejan las de oxa-

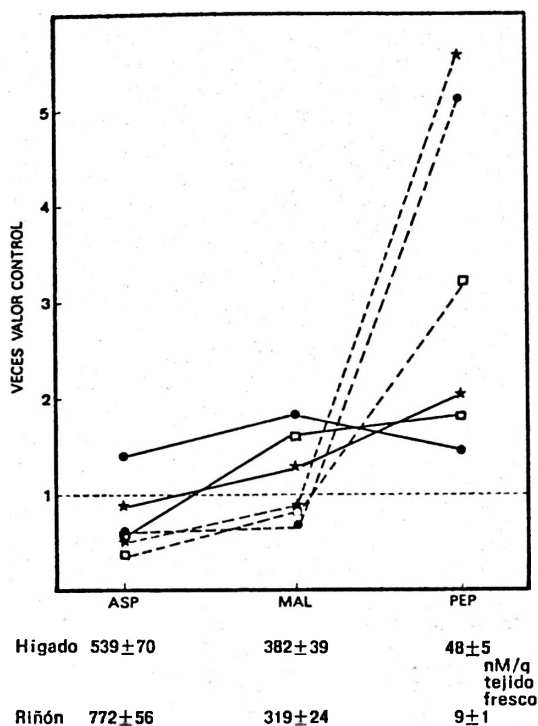


Fig. 2. Evolución de la concentración de aspartato, malato y fosfoenolpiruvato en hígado (—) y riñón (----) de rata en las primeras horas tras la administración de tetracloruro de carbono.

Los valores controles se expresan al pie de la gráfica como medias de 4-6 experiencias con indicación en cada caso del error estándar, y los correspondientes al tratamiento con Cl_4C se expresan como múltiplo de los controles tomando éstos como la unidad.

□ 3 horas, ★ 5 horas, ● 7 horas.

acetato, inestable y difícil de medir (1). Por ello, estos resultados indican que la reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxinasa está acelerada *in vivo*, confirmando los datos obtenidos *in vitro*.

Todo ello parece indicar que la adaptación metabólica de la corteza renal en respuesta a la hipofuncionalidad del hígado juega un papel importante durante las primeras horas tras la administración de tetracloruro de carbono.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Lda. Catalina Lara Coronado su ayuda en las experiencias de perfusión hepática.

Resumen

Se estudia la evolución de la adaptación metabólica renal a la intoxicación del hígado de rata por tetracloruro de carbono en las primeras horas de tratamiento.

El glucógeno hepático se agota muy rápidamente (20 % del valor inicial a las 3 h) y la capacidad gluconeogénica en este órgano es prácticamente nula a las 7 horas. Por el contrario, durante este tiempo existe un aumento progresivo de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxinasa y de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal.

Las concentraciones de aspartato, malato y fosfoenolpiruvato en el riñón indican que esta activación se corresponde con una aceleración de la reacción que cataliza *in vivo*.

Todo ello parece indicar que la adaptación metabólica de la corteza renal en respuesta a la hipofuncionalidad del hígado juega un papel importante durante las primeras horas tras la administración de tetracloruro de carbono.

Bibliografía

1. ALLEYNE, G. A. O.: *Nature*, **217**, 847-848, 1968.
2. BALLARD, F. J. y HANSON, R. W.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 5625-5630, 1969.
3. BERGMAYER, H. U., BERNT, E. y HESS, B.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.). Academic Press, Nueva York, 1965, pp. 736-743.
4. BERGMAYER, H. U., BERNT, E., MOLLERER, H. y PFLEIDERER, G.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.). Academic Press, Nueva York, 1974, pp. 1696-1700.
5. CZOK, R. y ECKERT, L.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.). Academic Press, Nueva York, 1965, pp. 229-233.
6. FAUS, M. J., LUPÍÁÑEZ, J. A., VARGAS, A. y SÁNCHEZ-MEDINA, F.: *Biochem. J.*, **174**, 461-467, 1978.

7. GARCÍA RUIZ, J. P., MORENO, F., SÁNCHEZ-MEDINA, F. y MAYOR, F.: *FEBS lett.*, **34**, 113-116, 1973.
8. GUTMANN, I. y WAHLEFELD, A. W.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.). Academic Press, Nueva York, 1974, pp. 1464-1468.
9. HARPER, A. E.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.). Academic Press, Nueva York, 1965, pp. 788-792.
10. HEMS, R., ROSS, B. D., BERRY, M. N. y KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, **101**, 284-292, 1966.
11. HOHORST, H. J.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.). Academic Press, Nueva York, 1965, pp. 328-332.
12. JONES, V. D., SPALDING, CH. T. y JENKINS, M. L.: *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm.*, **2**, 67-77, 1971.
13. KREBS, H. A. y HENSELEIT, K.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **210**, 33-66, 1932.
14. KREBS, H. A., BENETTI, D. A. H., DE GASQUET, P., GASCOYNE, T. y YOSHIDA, T.: *Biochem. J.*, **86**, 22-27, 1963.
15. KREBS, H. A., DIERKS, C. y GASCOYNE, T.: *Biochem. J.*, **93**, 112-121, 1964.
16. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
17. LUPIÁÑEZ, J. A., FAUS, M. J., MUÑOZ-CLARES, R. y SÁNCHEZ-MEDINA F.: *FEBS Lett.*, **61**, 277-281, 1976.
18. NIEDERLAND, T. R., DZURIC, R. y GREGOROVA, B.: *Physiol. Bohemoslov.*, **20**, 589-593, 1971.
19. OWEN, O. E., FELIG, P., MORGAN, A. P., WAHREN, J. y CAHILL, C. F., Jr.: *J. Clin. Invest.*, **48**, 574-593, 1969.
20. PONTREMOLI, S., TRANIELLO, S., LUPPIS, B. y WOOD, W. A.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 3459-3463, 1965.
21. VILLELA, G. G.: *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 665-676, 1964.
22. WILLIAMSON, D. H., LUND, P. y KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, **103**, 514-527, 1967.
23. WOLLENBERGER, A., RISTAU, O. y SCHOFFA, G.: *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, **270**, 399-412, 1960.