

EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOENOLPIRUVATO
CARBOXICINASA EN HIGADO Y RIÑON DE RATA A LO
LARGO DEL DIA

ALBERTO VARGAS, MARIA LUISA PITA, JOSE ANTONIO LUPIAÑEZ
y FERMIN SANCHEZ-MEDINA

RESUMEN

Se han determinado las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxi-
cinasa hepática y renal, el contenido en glucógeno hepático, la capacidad
gluconeogénica renal y las concentraciones de glucosa y lactato en sangre
a lo largo del día en ratas con acceso a la comida y en animales a los
que se privó de alimento al comenzar la experiencia. La evolución de
estos parámetros bioquímicos fue muy semejante en ambos grupos y con-
cordó en general con los datos obtenidos en condiciones semejantes,
aunque a distintos tiempos, por otros investigadores.

SUMMARY

The activities of hepatic and renal phosphoenolpyruvate carboxy-
kinase, liver glycogen content, renal gluconeogenic capacity and blood glu-
cose and lactate concentrations were determined at several times of the
day in rats with free access to food and in rats deprived of food during
the experience. The evolution of these biochemical parameters was similar
in both groups of animals and generally agreed with the data obtained
by other investigators in similar conditions but at different times of
the day.

INTRODUCCION

La fosfoenolpiruvato carboxicinasa (E.C. 4.1.1.32.) es una
enzima fundamental en la gluconeogénesis a efectos de regu-
lación, dada su sensibilidad a estímulos nutricionales y hor-
monales (1, 2). Una de las características más notables de esta
enzima es que presenta variaciones acusadas en su actividad
tanto a lo largo del día como de tipo estacional. El ritmo cir-
cadiano de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa ha sido estudia-

do por PHILLIPS y BERRY en hígado de ratón (3, 4), por NAGAI, SUDA y NAKAGAWA (5, 6) y por LANE y MAVRIDES (7) en hígado de rata y por NAGAI *et al.* en riñón de rata (8). Estos últimos autores han puesto de manifiesto igualmente variaciones en la actividad de la enzima renal a lo largo del año (8).

Es interesante destacar que la amplitud de estas variaciones se acerca en muchos casos a la de los efectos originados por manipulaciones nutricionales y hormonales. Parecía, por tanto, aconsejable conocer la evolución de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa a lo largo del día en nuestras condiciones experimentales, tanto en hígado como en riñón de rata, como dato previo a la realización de posteriores estudios de regulación. En la presente publicación se describen también las variaciones de la capacidad gluconeogénica renal y de otros parámetros bioquímicos relacionados con la gluconeogénesis en ratas con acceso a la comida y en animales a los que se privó de alimento desde el comienzo de la experiencia.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado ratas hembras de raza Wistar, de peso comprendido entre 150 y 200 g, que han sido alimentadas con dieta estándar. Se mantuvieron una semana como mínimo en una habitación termostataada a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y con luz artificial que se encendía a las 7 h. y se apagaba a las 19 h. A un grupo de animales se les privaba de alimento a las 9 h., mientras que a otro se le dejaba libre acceso a la comida. En este último caso, la ingestión de alimento fue muy pequeña, prácticamente nula hasta las 12 h., llegándose a consumir alrededor de 3 g de pienso a las 18 h. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua.

Para la determinación de glucosa y lactato en sangre, ésta se extrajo de la aorta abdominal en jeringas heparinizadas tras anestesiarse a los animales con pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso). En los demás casos las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical.

La capacidad gluconeogénica de la corteza renal se ha determinado siguiendo el método descrito por KREBS y colaboradores (9), incubando cortes de tejido en solución salina de Krebs -Henseleit, utilizando como sustrato L-lactato 10 mM,

a 40°C, durante una hora 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.

La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas se ha determinado espectrofotométricamente en la dirección de síntesis de oxalacetato en presencia de un exceso de malato deshidrogenasa, según se ha descrito previamente (10).

La determinación de glucosa se realizó según la técnica de BERGMAYER *et al.* (11) por el método enzimático de la glucosa oxidasa -peroxidasa. El lactato fue medido usando la técnica enzimática de HÖRST (12). La determinación de glucógeno se ha realizado al estado de glucosa después de su hidrólisis con amiloglucosidasa según el método descrito por KREBS *et al.* (9, 13).

RESULTADOS

Las concentraciones de glucosa y lactato en sangre, así como el contenido en glucógeno del hígado están sumarizados en la figura 1. La concentración de glucosa en sangre se mantuvo prácticamente constante a lo largo del día en los animales con acceso a la comida, mientras que fue descendiendo levemente en los animales privados de alimento hasta alcanzar a las 18 h. valores significativamente más bajos ($P < 0.02$) que los correspondientes a esa misma hora en el primer grupo. Las concentraciones de lactato no mostraron variaciones significativas en ninguno de los grupos. El contenido en glucógeno hepático fue descendiendo a lo largo del día en ambos casos, siendo más pronunciado el descenso en los animales privados de alimento. Como era de esperar, por tratarse de algo bien conocido, a las 24 horas de ayuno se registró un descenso significativo en la glucemia y los valores de glucógeno hepático fueron prácticamente nulos.

La figura 2 muestra las variaciones en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de hígado y corteza renal y de la capacidad gluconeogénica en este último origen. La enzima hepática fue incrementando continuamente su actividad desde las 10 h. hasta las 18 h. en ambos grupos de animales. La en-

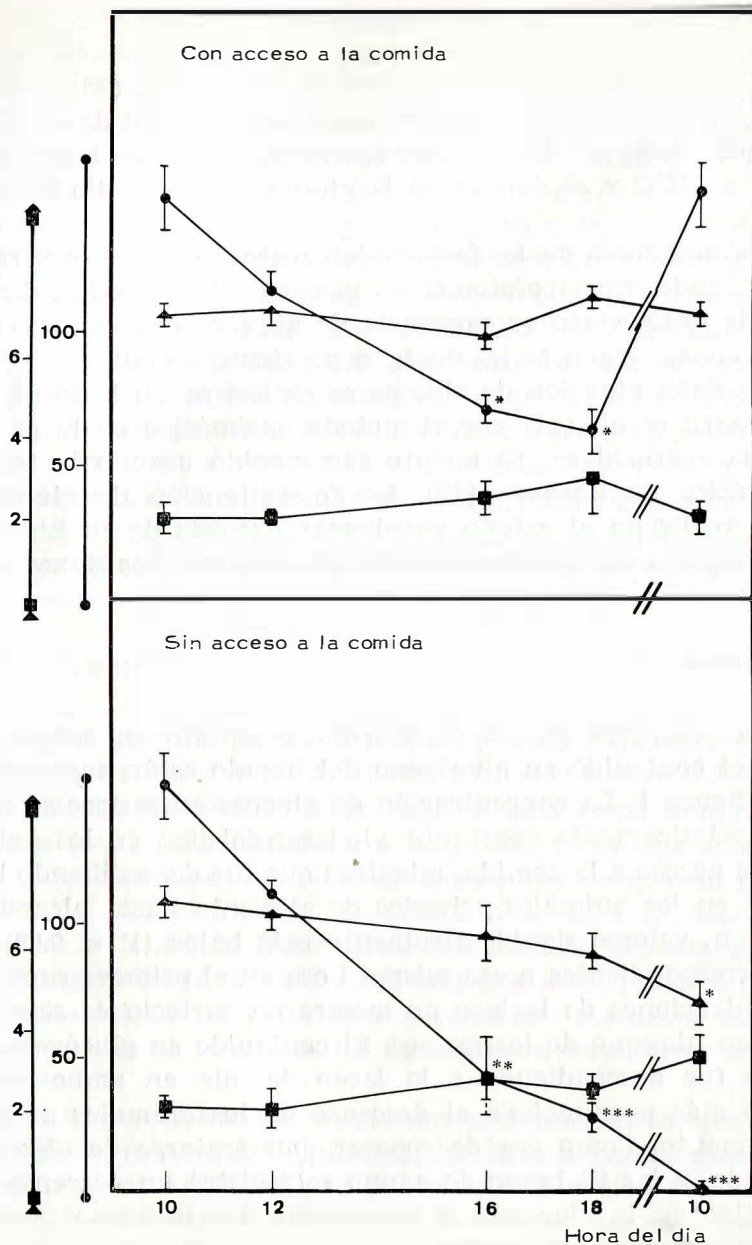


Figura 1.- Evolución de las concentraciones de glucosa y lactato en sangre y del contenido en glucógeno hepático.
 ▲Glucosa ($\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$). ■Lactato ($\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$). ●Glucógeno (nmoles de glucosa $\times \text{gr}^{-1}$ de tejido fresco).
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, según el test de Student con respecto a los valores iniciales.

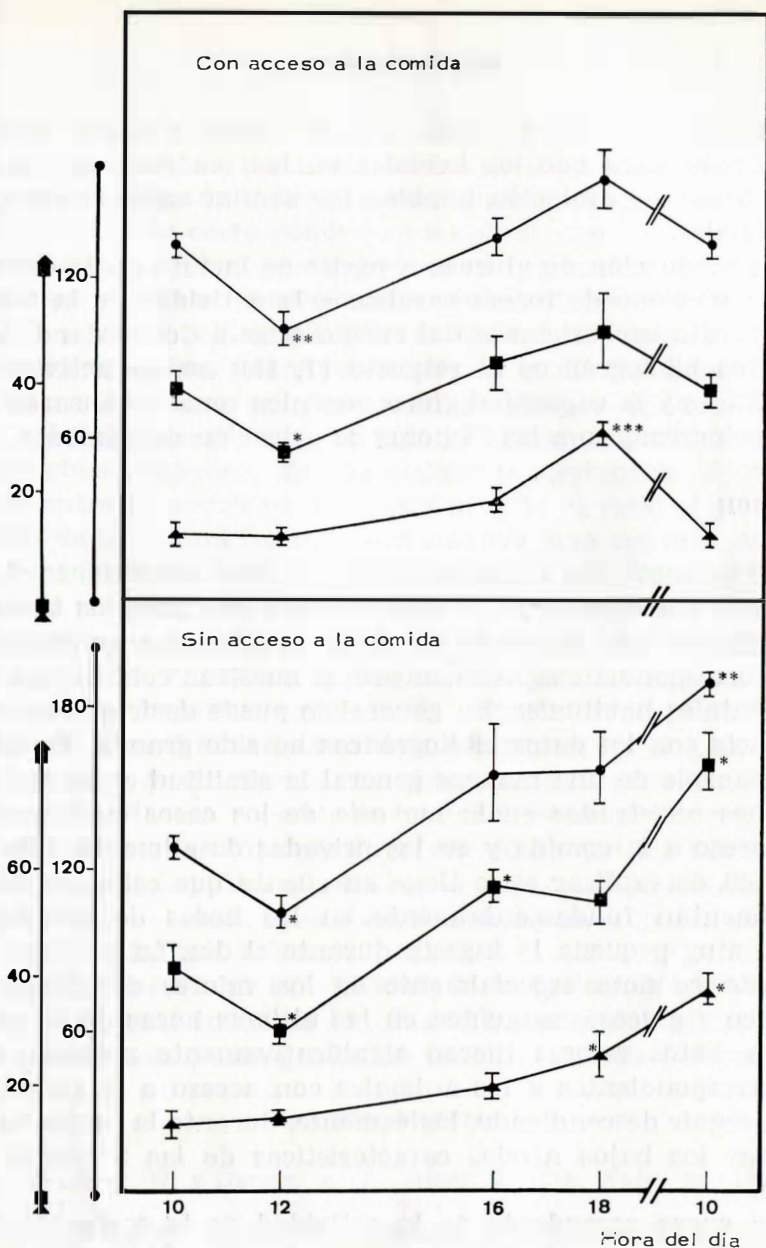


Figura 2. - Evolución de la actividad de la Fosfoenolpiruvato carboxicinasa de hígado y corteza renal y de la capacidad gluconeogénica de corteza renal.

▲ Fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática ($\text{nmoles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína). ■ Fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal ($\text{nmoles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína) ● Capacidad gluconeogénica (μmoles de glucosa producida $\times \text{hora}^{-1} \times \text{gr}^{-1}$ de tejido seco).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, según el test de Student con respecto a los valores iniciales.

zima renal descendió a las 12 h. para alcanzar valores ligeramente más altos que los iniciales en las medidas efectuadas por la tarde. La evolución también fue similar en ambos grupos de animales.

La producción de glucosa a partir de lactato en la corteza renal evolucionó de forma paralela a la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas del mismo origen. Concordando con los datos bibliográficos al respecto (1, 14), ambas actividades enzimáticas y la capacidad gluconeogénica renal alcanzaron un notorio incremento a las 24 horas de privación de alimento.

DISCUSION

Nuestro estudio se ha realizado en unas condiciones similares a las reseñadas en la bibliografía (3-8), pero los tiempos a los que se han realizado las determinaciones eran distintos pues correspondían específicamente a nuestras condiciones experimentales habituales. En general se puede decir que la concordancia con los datos bibliográficos ha sido grande. También es destacable de una manera general la similitud entre las variaciones registradas en la mayoría de los casos en las ratas con acceso a la comida y en las privadas de alimento. Ello no es difícil de explicar si se tiene en cuenta que estos animales se alimentan fundamentalmente en las horas de oscuridad, siendo muy pequeña la ingesta durante el día. La ausencia de alimento se nota especialmente en los valores de glucógeno hepático y glucosa sanguínea en las últimas horas de la experiencia. Estos valores fueron significativamente menores que los correspondientes a los animales con acceso a la comida y deben seguir descendiendo, lógicamente, durante la noche hasta alcanzar los bajos niveles característicos de las 24 horas de ayuno.

La curva ascendente de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas hepáticas concuerda totalmente con los datos bibliográficos (5-7). Es interesante resaltar que las variaciones enzimáticas son inversas al contenido en glucógeno, lo que resulta de importancia fisiológica, dado el papel gluconeogénico fundamental de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas. Al alcanzar la máxima actividad aumenta el potencial de resíntesis de glucosa, aunque probablemente esta capacidad no será utilizada

a gran escala a menos que los animales sean privados de alimento durante las horas siguientes de oscuridad.

Las fluctuaciones de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa de corteza renal se corresponden en amplitud con las reseñadas en la bibliografía (8), aunque el incremento en la actividad se inicia antes en nuestras condiciones experimentales. Por lo que se refiere a la capacidad gluconeogénica renal, nuestros resultados confirman los obtenidos por NAGAI et. al (8), aunque estos autores sólo miden la producción de glucosa en dos tiempos (de máxima y mínima actividad) y utilizan malato como sustrato gluconeogénico. Es especialmente destacable el paralelismo entre la actividad de la enzima y la capacidad gluconeogénica de la corteza renal, lo que subraya, una vez más, el papel esencial de dicha enzima en la regulación de la producción de glucosa por el riñón (14). Aunque a nivel hepático existe un paralelismo semejante en la mayor parte de las circunstancias fisiológicas (1, 2, 15), no hemos determinado la capacidad gluconeogénica hepática en nuestras condiciones experimentales porque resulta difícil realizar esta determinación con exactitud en presencia de glucógeno, cuya degradación enmascara la producción de glucosa a partir de los precursores gluconeogénicos.

Por último, es interesante hacer notar que las actividades de la enzima hepática y renal y la capacidad gluconeogénica en este último origen a las 24 horas de ayuno superan ampliamente los máximos valores encontrados la tarde anterior, aunque el incremento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal entre las 12 y las 16 horas es del mismo orden que el aumento global producido por el ayuno de 24 horas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—HANSON, R. W. y GARBER, A. J.: *Amer. J. Clin. Nutr.*, 25, 1010-1021 (1972).
- 2.—HANSON, R. W., GARBER, A. J., RESHEF, L. y BALLARD, F. J.: *Amer. J. Clin. Nutr.*, 26, 55-63 (1973).
- 3.—PHILLIPS, L. J. y BERRY, L. J.: *Amer. J. Physiol.*, 218, 1440-1444 (1970).
- 4.—PHILLIPS, L. J. y BERRY, L. J.: *Amer. J. Physiol.*, 219, 697-701 (1970).
- 5.—SUDA, M., NAGAI, K. y NAKAGAWA, H.: *J. Biochem.*, 73, 727-738 (1973).
- 6.—NAGAI, K., SUDA, M. y NAKAGAWA, H.: *J. Biochem.*, 74, 863-871 (1973).
- 7.—LANE, F. A. y MAVRIDES, C.: *Canad. J. Biochem.*, 48, 1287-1301 (1970).
- 8.—NAGAI, K., SUDA, M., YAMAGISHI, O., TOYAMA, Y. y NAKAGAWA, H.: *J. Biochem.*, 77, 1249-1254 (1975).

- 9.—KREBS, H. A.
T.: *Biochem. J.*, 86, 22-27 (1963).
- 10.—SANCHEZ-MEDINA, F., SANCHEZ-URRUTIA, L., MEDINA, J. M. y MAYOR, F.:
FEBS Lett., 19, 128-130 (1971).
- 11.—BERGMEYER, H.-U. y BERNT, E.: en "Methods in Enzymatic Analysis"
(Bergmeyer, H.-U., ed.), Academic Press, New York, 1965, pp. 123-130.
- 12.—HOHORTS, H. J.: en "Methods in Enzymatic Analysis" (Bergmeyer,
H. U., ed), Academic Press, New York, 1965, pp. 266-270.
- 13.—KREBS, H. A., DIERK, C. y GASCOYNE, T.: *Biochem. J.*, 93, 112-121 (1964).
- 14.—POGSON, C. I., LONGSHAW, I. D., ROOBOL, A., SMITH, S. A. y ALLEYNE,
G. A. O.: en "Gluconeogenesis. Its Regulation in Mammalian Species"
(Hanson, R. W. y Mehlman, M. A., eds.), John Wiley & Sons,
New York, 1976, pp. 335-368.
- 15.—TILGHMAN, S. M., HANSON, R. W. y BALLARD, F. J.: en "Gluconeogenesis.
Its Regulation in Mammalian Species" (Hanson, R. W. y Mehlman,
M. A., eds.),