

EFFECTO DEL EJERCICIO SOBRE ALGUNAS ENZIMAS
GLUCONEOGENICAS EN HIGADO Y RIÑON DE RATA

JOSEFA PREDESTINACIÓN GARCÍA-RUIZ, ROSARIO MUÑOZ-CLARES,
MARÍA JOSÉ FAUS y FERMÍN SÁNCHEZ-MEDINA

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto del ejercicio (natación en agua a 22° durante dos horas) sobre las actividades de la glucosa-6-fosfatasa, fructosa difosfatasa, lactato deshidrogenasa, alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa en hígado y riñón, así como sobre la actividad de la glutaminasa dependiente de fosfato en riñón de rata. El ejercicio produce un aumento en la actividad de la glucosa-6-fosfatasa (que se impide por administración previa de bicarbonato), alanina aminotransferasa y glutaminasa renales y no afecta a ninguna de las actividades enzimáticas ensayadas en hígado.

La producción de glucosa a partir de alanina en cortes de corteza renal es apreciable, a pesar de la precaria actividad de la alanina aminotransferasa, y también se activa por el ejercicio.

Estos resultados no desvirtúan el papel fundamental de la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa durante la adaptación metabólica del riñón al ejercicio pero sugieren puntos adicionales de regulación de la gluconeogénesis en estas condiciones.

SUMMARY

The effect of exercise (swimming in water at 22° for 2 hours) on rat liver and kidney glucose 6-phosphatase, fructose diphosphatase, lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase activities and kidney phosphate-dependent glutaminase activity was studied. Exercise increases the activities of glucose 6-phosphatase (prevented by previous treatment with bicarbonate), alanine aminotransferase and phosphate-dependent glutaminase in kidney and does not affect the enzymic activities tested in liver.

Glucose production from alanine by kidney cortical slices is not negligible despite the low activity of alanine aminotransferase and is also activated by exercise.

These results do not preclude the key role of phosphoenolpyruvate carboxykinase activation during the metabolic adaptation of kidney to exercise but suggest additional points of regulations of gluconeogenesis in these conditions.

INTRODUCCION

En trabajos anteriores realizados en nuestro Departamento se ha puesto de manifiesto que el ejercicio (natación en agua a 22° durante dos horas) produce una activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal de rata, muy probablemente debido a la acidosis metabólica que acompaña a la actividad muscular forzada (1-3). Aunque la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa juega un papel fundamental en la regulación de la gluconeogénesis renal en condiciones de acidosis metabólica (4), pareció aconsejable estudiar también el efecto del ejercicio sobre otras enzimas implicadas en este proceso. Dada la vinculación entre la producción de glucosa y de amonio en el riñón, el estudio se amplió a la glutaminasa renal dependiente de fosfato, cuya activación en acidosis metabólica experimental está bien establecida (5,6).

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado ratas de raza Wistar, hembras, de 150-200 gramos de peso, a las que se ha obligado a nadar en un baño con agua a 22° de temperatura durante dos horas, al cabo de las cuales se han sacrificado por dislocación cervical.

Para medir la actividad de la glucosa-6-fosfatasa (E. C. 3.1.3.9) de hígado y corteza renal, se homogeneizó el tejido con tampón citrato 0,1 M pH 6,5 y se filtró por una torunda de gasa, determinando la actividad enzimática en el filtrado según el método descrito por Harper (7). Para medir las actividades de la fructosa difosfatasa (E. C. 3.1.3.11) y lactato deshidrogenasa (E. C. 1.1.1.27) se homogeneizó un trozo de hígado o corteza renal con tampón Tris (0,01 M)-sacarosa (0,25 M) pH 7,5 y se centrifugó a $38.000 \times g$ a 4° durante veinte minutos. La fructosa difosfatasa se determinó en el sobrenadante según la técnica descrita por Pontremoli *et al.* utilizando tampón de glicocola 0,04 M pH 9,4 (8). La determinación de la lactato deshidrogenasa en el sobrenadante se realizó por el método descrito por Bergmeyer *et al.* (9). Para la estimación de las actividades de la aspartato aminotransferasa (E. C. 2.6.1.1) y alanina aminotransferasa.

nados a partir de hígado o riñón con tampón fosfato 0,1 M ph 7,4 y se trataron con ondas ultrasónicas de 15 kiclociclos durante dos

minutos (hígado) y cuatro minutos (riñón), centrifugando posteriormente a $39.000 \times g$ a 4° durante 30 minutos. Las actividades enzimáticas de los sobrenadantes correspondían a enzimas totales (citoplasmática y mitocondrial) y se determinaron de acuerdo con la técnica descrita por Bergmeyer, utilizando malato deshidrogenasa (10) y lactato deshidrogenasa (11), respectivamente, como enzima auxiliar. La glutaminasa (E. C. 3.5.1.2) fue determinada en homogenados totales de riñón en presencia de fosfato, tal como ha sido detalladamente descrito por Curthoys y Lowry, incluida la purificación de la glutamina utilizada como sustrato (6). Las proteínas se han determinado por el método de Lowry *et al.* (12).

Para determinar la capacidad gluconeogénica de la corteza renal se ha seguido el procedimiento descrito por incubando cortes de corteza renal en un medio salino y utilizando como sustrato L-alanina 10 mM, a 40° , durante una hora, gaseando con O_2/CO_2 (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° y se determinó la glucosa, en el medio, por el método de la glucosa oxidasa, según Krebs *et al.* (13, 14).

RESULTADOS Y DISCUSION

La actividad de la glucosa-6-fosfatasa aumenta significativamente en la corteza renal tras dos horas de ejercicio (Tabla I) aunque no se llega a los niveles de activación característicos del ayuno de 48 horas. La administración de bicarbonato previamente al ejercicio impide el incremento de la actividad enzimática en ambas situaciones. Por lo que se refiere a la enzima de origen hepático, nuestros resultados corroboran su conocida activación por el ayuno (15), mientras que no se observa efecto significativo del ejercicio.

La abolición por bicarbonato de la activación de la enzima renal por el ejercicio parece indicar que dicha activación está ligada a la acidosis metabólica que acompaña a esta situación fisiológica. Sin embargo, y al contrario que la fosfoenolpiruvato carboxinasa, la glucosa-6-fosfatasa de corteza renal de rata no sufre activación alguna durante la acidosis metabólica experimental inducida por administración de cloruro amónico (16). Es lógico pensar, por tanto, que deben existir otros mecanismos involucrados

en esta activación, quizás similares a los que operan en el ayuno. Para interpretar el efecto del tratamiento con bicarbonato es interesante tener en cuenta que este anión es capaz de inhibir la actividad fosfohidrolásica de la enzima (17).

En conexión con este hallazgo conviene citar que el entrenamiento (quince minutos diarios de natación durante dos semanas) hace aumentar la actividad de la glucosa-6-fosfatasa tanto en hígado (18 por 100) como en riñón (64 por 100) de rata (18). Estos incrementos

do en ambos casos muy poco significativos para el hígado. Dada la importancia de la enzima en la liberación de la glucosa a la sangre, su activación posee un interés fisiológico indudable en el contexto de la adaptación renal al ejercicio, tanto si se realiza de una vez como en el caso del entrenamiento.

La actividad ensayable de la fructosa difosfatasa no se modifica tras dos horas de natación ni en hígado ni en corteza renal (Tabla I). Esta ausencia de efecto no es sorprendente, puesto que

TABLA I

EFFECTO DEL EJERCICIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFATASA Y FRUCTOSA DIFOSFATASA EN HIGADO Y RIÑÓN DE RATA

El bicarbonato (solución salina fisiológica a los controles) se administró en dosis de 10 ml de solución 0,2 M, por intubación gástrica, inmediatamente antes del ejercicio (6 dosis a los animales sometidos a ayuno, espaciadas uniformemente durante 48 horas). Los resultados se expresan como medias \pm el error estándar, con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores estadísticamente significativos según el test de Student se expresan por: * $P < 0,01$.

	Glucosa-6-fosfatasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tejido fresco)		Fructosa difosfatasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tejido fresco)
	Solución salina	CO ₂ :HNa	
<i>Riñón</i>			
Controles	14,00 \pm 1,05 (6)	15,30 \pm 0,62 (6)	8,20 \pm 0,40 (6)
Ejercicio	18,75 \pm 1,10 (8)*	13,72 \pm 1,40 (6)	8,40 \pm 0,31 (6)
Ayuno	22,10 \pm 1,40 (6)*	18,54 \pm 1,52 (11)	9,08 \pm 0,71 (6)
<i>Hígado</i>			
Controles	9,70 \pm 0,50 (6)	—	5,22 \pm 0,12 (6)
Ejercicio	12,30 \pm 0,72 (8)	—	5,56 \pm 0,10 (6)
Ayuno	29,37 \pm 0,98 (6)*	—	6,13 \pm 0,27 (6)

esta enzima puede intervenir en la regulación génesis sin que existan cambios en su concentración, dada su sensibilidad a los efectores alostéricos y a la posibilidad de su modificación estructural por cambios covalentes (19). Nuestros resultados en animales sometidos a ayuno confirman la inexistencia de alteraciones apreciables en la actividad máxima de la enzima en estas condiciones, en las que existe, sin embargo, un funcionamiento importante de la gluconeogénesis (20, 21).

Los resultados que se expresan en la Tabla II señalan un incremento en la actividad de la glutaminasa dependiente de fosfato y de la alanina aminotransferasa renales por el ejercicio, no existiendo variaciones significativas en las demás actividades enzim -

TABLA II

EFFECTO DEL EJERCICIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA GLUCONEOGENESIS Y VIAS METABOLICAS RELACIONADAS EN HIGADO Y RI N DE RATA

Los resultados se expresan como medias \pm el error estándar, con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores estadisticamente significativos según el test de Student se expresan por: * $P < 0,05$.

	Lactato des- hidrogenasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ proteína)	Aspartato amino- transferasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tejido fresco)	Alanina amino- transferasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tejido fresco)	Glutaminasa dependiente de fosfato ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tejido fresco)
<i>Ri�n</i>				
Controles	117 \pm 13 (5)	86,0 \pm 6,0 (10)	0,91 \pm 0,05 (5)	16,7 \pm 0,3 (4)
Ejercicio	140 \pm 12 (5)	90,1 \pm 4,6 (6)	1,41 \pm 0,15 (6)	* 21,1 \pm 1,4 (4)*
<i>Higado</i>				
Controles	316 \pm 20 (7)	99,7 \pm 3,5 (9)	31,3 \pm 3,8 (6)	—
Ejercicio	305 \pm 5 (7)	107,0 \pm 3,3 (6)	28,3 \pm 2,4 (7)	—

ticas ensayadas. Por lo que respecta a la glutaminasa dependiente de fosfato, es bien conocido que esta enzima se activa durante la acidosis metabólica experimental (5, 6) por lo que el aumento producido por el ejercicio era de esperar. Quizá el efecto no sea muy pronunciado, sobre todo teniendo en cuenta el fuerte incremento promovido por el ejercicio sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal utilizando glutamina como sustrato (2). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la actividad enzimática se en-

sayó en homogenados totales de riñón, mientras que la producción de glucosa se determinó en cortes de corteza renal, zona en la que se encuentra esta enzima de forma preferencial (6).

La actividad de la alanina aminotransferasa en el riñón es muy baja, tal como había sido descrito con anterioridad (22), pero aumenta significativamente por el ejercicio. Por ello pareció aconsejable estudiar

la corteza renal a partir de alanina (Tabla III). Se puede observar

TABLA III

EFFECTO DEL EJERCICIO SOBRE LA PRODUCCION DE GLUCOSA A PARTIR DE L-ALANINA POR CORTES DE CORTEZA RENAL DE RATA

Los resultados se expresan como medias \pm el error estándar, con el número de observaciones entre paréntesis. Los valores estadísticamente significativos según el test de Student se expresan por: * $P < 0,001$.

	Producción de glucosa ($\mu\text{mol/hora/g}$ peso seco)	
	L-alanina (10 mM)	Sin sustrato
Controles	52,5 \pm 3,0 (8)	32,1 \pm 3,2 (10)
Ejercicio	72,7 \pm 4,1 (13)*	42,0 \pm 2,9 (8)

que la producción de glucosa por los controles no es despreciable (aproximadamente la mitad que a partir de lactato) (2), en contraste con la precaria actividad de la alanina aminotransferasa. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que gran parte de la glucosa parece proceder de sustratos endógenos por lo que el papel fundamental de la alanina podría ser la activación de la gluconeogénesis a partir de estos sustratos por inhibición de la piruvato cinasa (23). En este sentido, Friedrichs y Schöner han señalado que la alanina favorece la gluconeogénesis renal a partir de lactato (24). Si ello es así, el incremento en la producción de glucosa por los cortes procedentes de ratas sometidas a ejercicio podría explicarse fundamentalmente por la existencia de una mayor cantidad de sustratos gluconeogénicos en el riñón de estos animales. Esto parece probable, dado el aumento de lactato (25) y de la propia alanina (26) en sangre en el curso de la actividad muscular.

Cabe resaltar, por último, la ausencia de efecto del ejercicio sobre las enzimas hepáticas ensayadas. Ello concuerda con obser-

vaciones anteriores, en las que se subraya la necesidad de un ejercicio continuado (entrenamiento) para la aparición de efectos adaptativos en el hígado (27). Aunque la producción de glucosa por las células del parénquima hepático juega un gran papel durante el ejercicio (28), la gran capacidad metabólica del hígado no parece necesitar de modificaciones a corto plazo. Por el contrario, el riñón exhibe una gran rapidez de adaptación en estas circunstancias, tal como se desprende de nuestros anteriores trabajos y de los resultados que acabamos de considerar. Estos últimos datos no desvirtúan el papel fundamental de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas durante la adaptación metabólica del riñón al ejercicio pero sugieren que existen puntos adicionales de regulación de la gluconeogénesis en estas condiciones.

BIBLIOGRAFIA

- (1) SÁNCHEZ-MEDINA, F.; SÁNCHEZ-URRUTIA, L.; MEDINA, J. M., y MAYOR, F.: *FEBS Letters.*, 19, 128-130 (1971).
- (2) SÁNCHEZ-MEDINA, F.; SÁNCHEZ-URRUTIA, L.; MEDINA, J. M., y MAYOR, F.: *FEBS Lett.*, 26, 25-26 (1972).
- (3) SÁNCHEZ-URRUTIA, L.; GARCÍA-RUIZ, J. P.; SÁNCHEZ-MEDINA, F., y MAYOR, F.: *Biochem. Med.*, 14, 355-367 (1975).
- (4) 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 Mehrlan, M. A., eds.), John Wiley & Sons, New York, 1976, pp. 335-368.
- (5) ALLEYNE, G. A. O.: *J. Clin. Invest.*, 49, 943-951 (1970).
- (6) CURTHOYS, N. P., y LOWRY, O. H.: *J. Biol. Chem.*, 248, 162-168 (1973).
- (7) HARPER, A. E.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.), Academic Press, New York, 1965, pp. 788-792.
- (8) PONTREMOLI, S.; TRANIELLO, S.; LLUPIS, B., y WOOD, W. A.: *J. Biol. Chem.*, 240, 3459-3463 (1965).
- (9) BERGMAYER, H. U.; BERNT, E., y HESS, B.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.), Academic Press, New York, 1965, pp. 736-743.
- (10) BERGMAYER, H. U.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.), Academic Press, New York, 1965, pp. 837-845.
- (11) BERGMAYER, H. U.: En «Methods in Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.), Academic Press, New York, 1965, pp. 846-851.
- (12) LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- (13) KREBS, H. A.; BENNETT, D. A.; DE GASQUET, P.; GASCOYNE, T., y YOSHIDA, T.: *Biochem. J.*, 86, 22-27 (1963).
- (14) KREBS, H. A.; DIERKS, C., y GASCOYNE, T.: *Biochem. J.*, 93, 112-121 (1964).

- (15) NORDLIE, R. C.: En «Gluconeogenesis. Its Regulation in Mammalian Species» (Hanson, R. W., y Mehlman, M. A., eds.), John Wiley & Sons, New York, 1976, pp. 93-152.
- (16) ALLEYNE, G. A. O., y SCULLARD, G. H.: *J. Clin. Invest.*, 48, 364-370 (1969).
- (17) DYSON, J. E. D.; ANDERSON, W. B., y NORDLIE, R. C.: *J. Biol. Chem.*, 244, 560-566 (1969).
- (18) BEDI, G. S.; BHANDARI, P. K., y NATH, N.: *Indian J. Exp. Biol.*, 9, 326-328 (1971).
- (18) PONTREMOLI, S., y HOREKER, B. L.: En «The Enzymes», vol. IV (Boyer, P. D., ed.), Academic Press, New York, 1971, pp. 661-646.
- (20) START, C., y NEWSHOLME, E. A.: *FEBS Lett.*, 6, 171-173 (1970).
- (21) WEBER, G.; SINGHAL, R. L., y SRIVISTAVA, S. K.: *Advances in Enzyme Regulation*, 3, 43-75 (1965).
- (22) KREBS, H. A.: *Advances in Enzyme Regulation*, 10, 397-420 (1972).
- (23) LLORENTE, P.; MARCO, R., y SOLS, A.: *Eur. J. Biochem.*, 13, 45, 54 (1970).
- (24) FRIEDRICHS, D., y SCHONER, W.: *Biochim. Biophys. Acta*, 343, 341-355 (1974).
- (25) GOLLNICK, P. D.: En «Exercise and Sport Sciences Reviews» (Wilmore, J. H., ed.), Academic Press, New York, 1973, pp. 1-43.
- (26) FELIG, P., y WAHREN, J.: En «Muscle Metabolism During Exercise» (Pernow, B., y Saltin, B., eds.), Plenum Press, New York, 1971, páginas 205-214.
- (27) YAKOLEV, N. N.: En «Biochemistry of Exercise» (Poortmans, J. R., ed.), S. Karger, Basel, 1969, pp. 245-248.
- (28) 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.