

Ayuno y diabetes experimental en el estudio de las interrelaciones hidratos de carbono y grasas

por

EMILIO HERRERA y ELADIO MONTOYA *

RESUMEN

Se ha utilizado la diabetes inducida por la administración de streptozotocin a ratas, como modelo experimental para estudiar las interrelaciones hidratos de carbono y grasas. Tras 72 horas de administración de la droga, los animales presentan hiperglucemia, hipercetonemia e hipoin-sulinemia. En el hígado de las ratas tratadas con streptozotocin se presenta una disminución de la concentración de glucógeno y ácido cítrico, mientras que los estados estacionarios de ácidos grasos y acetyl-CoA están elevados con relación a los de sus respectivos controles.

El panorama metabólico cambia tras el ayuno, en el que, con la excepción de la hiperglucemia en las ratas tratadas con streptozotocin, desaparecen las diferencias entre ambos grupos experimentales debido a la falta de respuesta en los animales diabéticos. Estos resultados son interpretados con relación a la actividad gluconeogénica y glicolítica en los animales diabéticos, regida por los niveles hepáticos de metabolitos con implicaciones alostéricas y por los niveles circulantes de insulina, cuya secreción está fija en estos animales, a un nivel alcanzado por los controles solamente tras el ayuno.

* Cátedra de Fisiología General. Facultad de Ciencias. Universidad de Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Las interrelaciones hidratos de carbono y grasas se encuentran parcialmente reguladas por la acción de distintos efectos alostéricos sobre enzimas que catalizan reacciones irreversibles y/o limitantes de las correspondientes vías metabólicas. Como ejemplo (fig. 1), podemos destacar la acción activadora del acetil CoA sobre la piruvato carboxilasa (1) e inhibidora sobre la piruvato deshidrogenasa (2), y la acción activadora del ácido cítrico sobre la acetil CoA carboxilasa (3) e inhibidora sobre la fosfofructokinasa (4, 5). La forma de determinar las implicaciones fisiológicas de estas relaciones es el correlacionar la actividad de las distintas vías metabólicas con el estado estacionario de dichos metabolitos en condiciones experimentales en las que las interrelaciones hidratos de car-

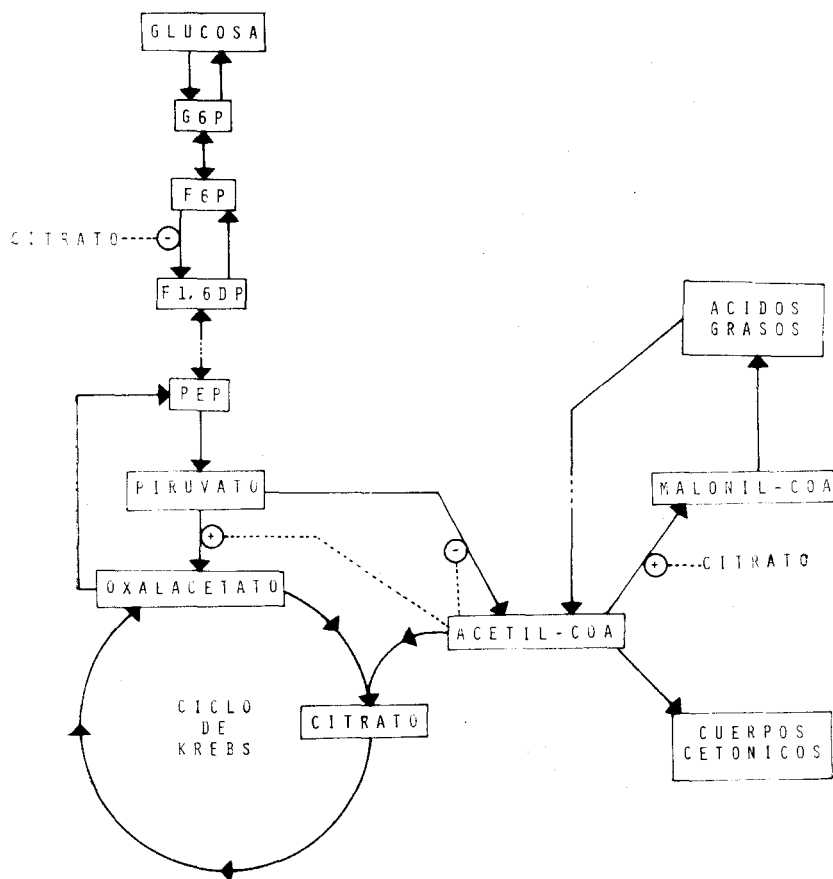


FIG. 1

bono y grasas se encuentren alteradas. En el presente trabajo hemos estudiado esta relación en animales hechos diabéticos mediante la administración de streptozotocin.

La hiperglucemia del diabético está preferentemente producida por los efectos yuxtapuestos de una elevada gluconeogénesis (6, 7, 8) y una disminuida utilización de glucosa (9), motivada por una disminución y/o una ineficacia metabólica de la insulina circulante (10, 11). El interés de este estudio ha sido despertado por los escasos datos existentes en la literatura sobre los mecanismos moleculares de regulación de la síntesis de glucosa en esta situación.

El streptozotocin es un derivado de la glucosamina, que ejerce su acción citotóxica sobre las células β del páncreas (12, 13, 14), dejando intactas las células α y el páncreas exocrino (15, 16), permitiendo por tanto el estudio de animales hechos diabéticos por un efecto primario y único sobre la secreción pancreática de insulina.

El estudio lo hemos realizado en animales alimentados *ad libitum* y en ayunas de 48 h, ya que previamente hemos demostrado que el ayuno es una situación especialmente interesante para determinar las interrelaciones hidratos de carbono y grasas en la rata (17).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas machos de raza Wistar de un peso comprendido entre 167 y 182 g, alimentadas con la dieta común de nuestro criadero. Los animales se dividieron en dos grupos, uno de los cuales fue inyectado intraperitonealmente con streptozotocin (The Upjohn Co.) (65 mg/kg de peso corporal) disuelto en 0,5 ml de tampón de citrato (pH 4,6). El otro grupo fue considerado como control, inyectándosele 0,5 ml del mismo tampón. Los animales se sacrificaron por decapitación 72 horas después de la inyección. La sangre se recogió del cuello en vaso de precipitado refrigerado y al mismo tiempo se disecó un trozo de hígado, que fue colocado en nitrógeno líquido en menos de diez segundos del momento de la decapitación. Alícuotas de la sangre se utilizaron para la determinación de glucosa, cuerpos cetónicos e insulina inmunológicamente activa, por métodos ya publicados (18, 19, 20, 21). En alícuotas del hígado congelado en nitrógeno líquido se analizaron las proteínas, glucógeno, ácidos grasos totales, acetyl-CoA y ácido cítrico, siguiendo métodos descritos (17, 21, 23).

RESULTADOS

Al comienzo del experimento los animales se dividieron en dos grupos; el primero recibió una inyección única de 65 mg/kg de streptozotocin disuelto en tampón citrato y el segundo sólo recibió dicho tampón,

EFFECTO DE LA INYECCION DE STREPTOTOCIN SOBRE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA SANGUINEA EN LA RATA

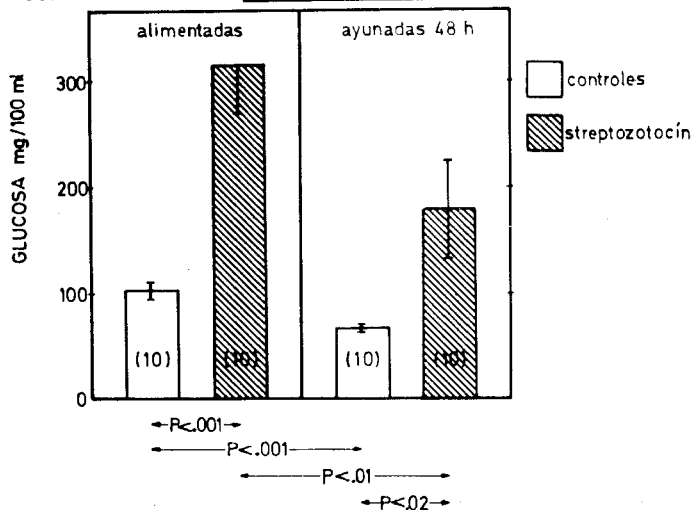


FIG. 2

EFFECTO DE LA INYECCION DE STREPTOZOTOCIN SOBRE LA CONCENTRACION DE CUERPOS CETONICOS EN SANGRE

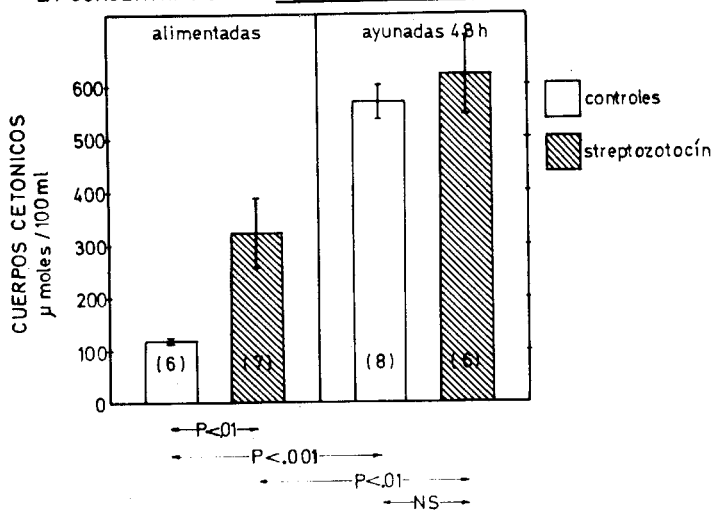


FIG. 3

siendo considerado como control. A los tres días del tratamiento, las ratas inyectadas con la droga muestran todos los síntomas de una diabetes aguda, puesta de manifiesto por sus elevados niveles de glucosa sanguínea (fig. 2), acompañados de una clara cetosis (fig. 3) y concomitantes con niveles de insulina muy bajos, con relación a sus respectivos controles (fig. 4). Cuando los animales se han sometido a un ayuno de 48 horas antes del sacrificio, los niveles circulantes de glucosa descienden

EFFECTO DE LA INYECCION DE STREPTOZOTOCIN SOBRE LA CONCENTRACION DE INSULINA PLASMATICA EN LA RATA

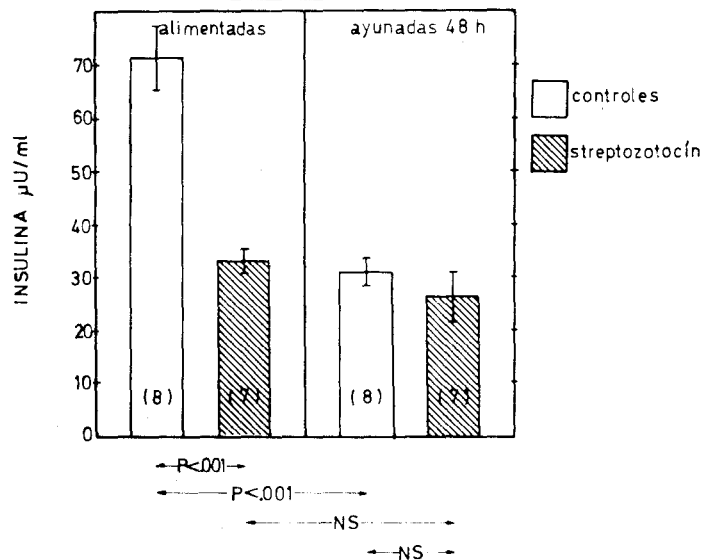


Fig. 4

en ambos grupos, manteniéndose la elevada glucemia en las ratas tratadas con streptozotocin con relación a sus controles respectivos (fig. 2). Las diferencias entre los grupos desaparecen en lo que se refiere a los datos de cetosis e insulinemia (figs. 3 y 4), debido a que el aumento de los cuerpos cetónicos en sangre producido por el ayuno en las ratas controles es mayor que en los animales inyectados con streptozotocin, y a que la insulina plasmática disminuye en aquéllos mientras que en éstos no cambia significativamente con relación a cuando están alimentados.

En el hígado aparecen también grandes diferencias entre ambos grupos experimentales (tabla 1). El peso del hígado en los animales tratados con streptozotocin es menor que en sus respectivos controles. Tras un ayuno de 48 horas la diferencia entre los dos grupos desaparece debido

al menor descenso de peso en el hígado de las ratas inyectadas con la droga (tabla 1). Estas alteraciones vienen acompañadas de cambios opuestos en la concentración de proteínas hepáticas de los distintos grupos. Así (tabla 1), cuando alimentadas, la concentración de proteínas en las ratas tratadas con streptozotocin es superior a la de sus correspondientes controles. Tras el ayuno, este parámetro no varía en el primer grupo, mientras que aumenta de forma significativa en los animales no tratados con la droga, desapareciendo las diferencias entre ambos grupos experimentales.

TABLA 1
Efecto de la inyección de streptozotocin en el hígado de ratas alimentadas y en ayunas de 48 horas.

Situación alimenticia	Alimentadas			En ayuno de 48 horas			
	Grupo	Control	Streptozotocin	P	Control	Streptozotocin	P
Peso del hígado <i>P'</i>		8,15 ± 0,17	6,65 ± 0,40	<0,05	4,95 ± 0,11 <0,001	5,33 ± 0,27 <0,02	N. S.
Proteínas (mg/g) <i>P'</i>		152,00 ± 3,66	191,62 ± 4,40	<0,001	182,77 ± 4,07 <0,001	181,87 ± 2,39 N. S.	N. S.

Detalles de la metodología se describen en el texto. *P* representa la significatividad de la diferencia entre las medias ± E. S. de los valores (6-9 ratas/grupo) de los animales controles y los tratados con streptozotocin. *P'* representa la significatividad entre las medias de los grupos alimentados y en ayunas de 48 horas.

Como índice del metabolismo hidrocarbonado y graso del hígado hemos determinado la concentración de glucógeno y ácidos grasos totales. El glucógeno hepático está disminuido en los animales tratados con streptozotocin con respecto a sus controles, cuando están alimentados (fig. 5). El ayuno hace que este parámetro disminuya en los controles, mientras que en las ratas tratadas con streptozotocin no cambia, estando incluso aumentado con relación a los primeros (fig. 5). La concentración de ácidos grasos totales hepáticos está ligeramente aumentada en las ratas tratadas con la droga, cuando alimentadas (fig. 6). El ayuno hace que dichos ácidos grasos aumenten en el hígado de las controles, mientras que no cambia en los animales inyectados con streptozotocin.

Los anteriores resultados nos han llevado al estudio de parámetros más característicos y específicos de los metabolismos de hidratos de carbono y grasas. Acetil-CoA en el hígado de los animales tratados con streptozotocin está aumentado con relación a los valores obtenidos en los controles (fig. 7). El ayuno hace que el estado estacionario de este metabolito aumente, como en otras ocasiones (17, 21, 23), mientras que

EFFECTO DE LA INYECCION DE STREPTOZOTOCIN SOBRE EL GLUCOGENO HEPATICO EN LA RATA

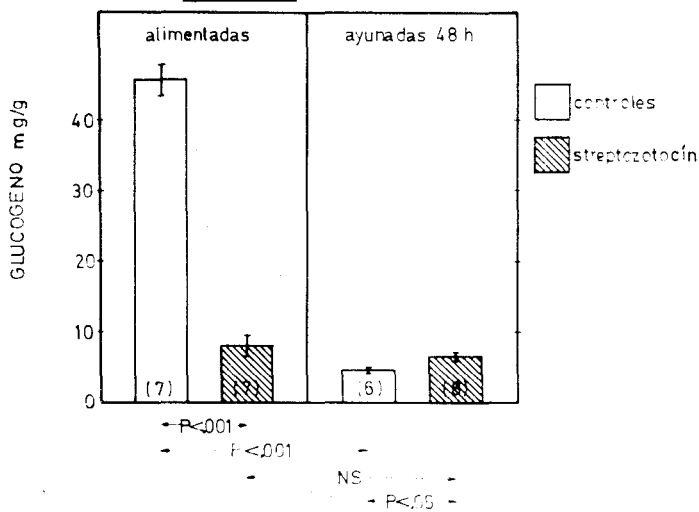


FIG. 5

EFFECTO DE LA INYECCION DE STREPTOZOTOCIN SOBRE LA CONCENTRACION HEPATICA DE ACIDOS GRASOS

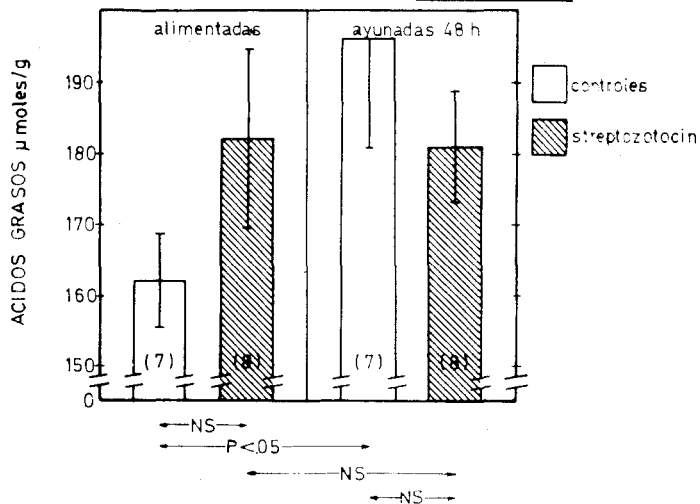


FIG. 6

EFFECTO DE LA INYECCION DE STREPTOZOTOCIN SOBRE LA CONCENTRACION HEPATICA DE ACETIL-CoA

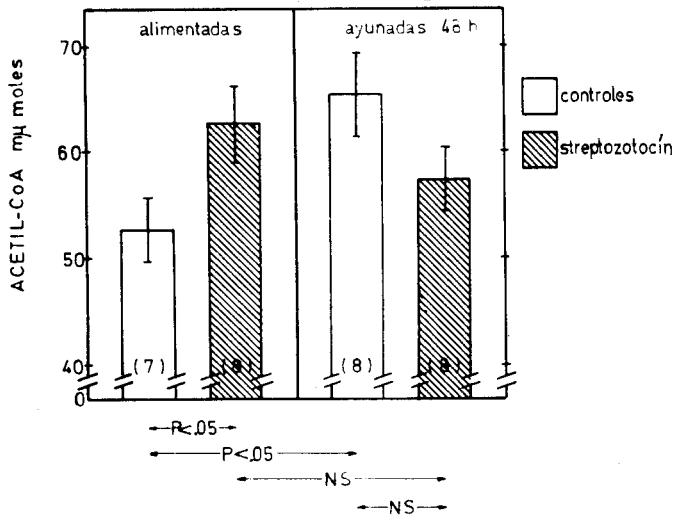


Fig. 7

EFFECTO DE LA INYECCION DE STREPTOZOTOCIN SOBRE LA CONCENTRACION HEPATICA DE ACIDO CITRICO

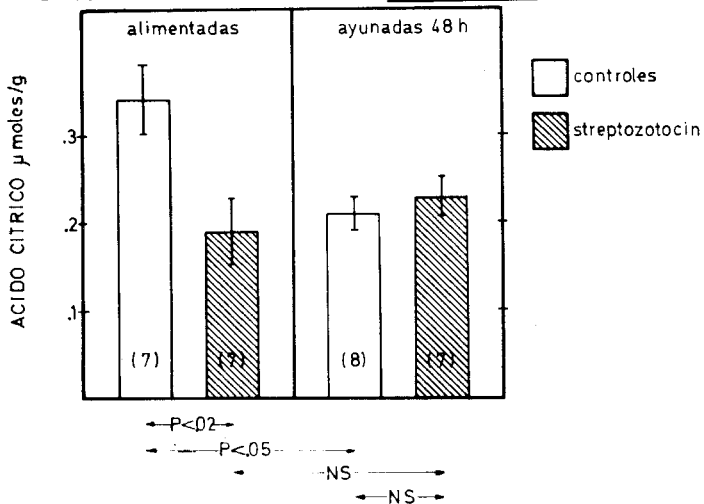


Fig. 8

no cambia en el hígado de los animales tratados con streptozotocin, y, por consiguiente, desaparecen las diferencias entre los grupos (fig. 7). Ácido cítrico hepático está disminuido en las ratas sometidas a la droga, cuando alimentadas (fig. 8), mientras que tras el ayuno este parámetro disminuye en los animales controles, como normalmente (17, 23), pero en los animales de streptozotocin no cambia (fig. 8). Así pues, de nuevo, las diferencias entre ambos grupos desaparecen tras el ayuno.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos observado, confirmando los trabajos de otros autores (12, 13, 14), que la administración de streptozotocin a animales experimentales es diabetogénica, como lo muestran la hiperglucemia e hiperketonemia y la hipoinsulinemia aparecida en las ratas tratadas con la droga. Al mismo tiempo, hemos encontrado que estas alteraciones desaparecen paralelamente con el ayuno, lo cual supone una nueva aportación al conocimiento de las alteraciones metabólicas en el individuo diabético. Con el estudio de metabolitos reguladores, hemos intentado lograr un mejor y más profundo entendimiento de los factores que contribuyen a la aparición de estas manifestaciones.

Hemos visto en el presente trabajo que las ratas diabéticas alimentadas *ad libitum*, presentan en su hígado cambios similares a los que aparecen normalmente en los animales en ayunas (17), como lo muestran el descenso del contenido hepático de glucógeno y el aumento de la concentración de proteínas y ácidos grasos totales. Estos cambios están también acompañados por alteraciones en el estado estacionario de metabolitos reguladores en el hígado. Acetil-CoA, el producto final de la beta-oxidación de los ácidos grasos y el activador alostérico del primer enzima gluconeogénico, la piruvato carboxilasa (fig. 1), está aumentado en el hígado de las ratas diabéticas. Por otro lado, la utilización del acetil-CoA para la formación de ácido cítrico parece estar disminuida en estos animales, como lo sugiere la reducida concentración de este metabolito en su hígado.

Esta interpretación concuerda con la cetosis que presentan cuando alimentados, lo que indica que la entrada de Acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico en los animales diabéticos está inhibida, y este metabolito sale a la circulación para ser utilizado como sustrato energético en otros tejidos periféricos en forma de cuerpos cetónicos. Este esquema metabólico podría estar inducido por los efectos concomitantes de una aumentada beta-oxidación de los ácidos grasos y una disminución de la concentración de oxaloacético en el hígado, debido a su rápida conversión a fosfoenolpirúvico y subsecuentemente a glucosa.

Todas estas alteraciones metabólicas en los animales hechos diabéti-

cos por el tratamiento con streptozotocin parecen estar inducidas primariamente por una disminución en la actividad de las células beta del páncreas (12, 13, 14), la cual es la causa de los bajos niveles circulantes de insulina. Realmente, estos cambios son similares a los encontrados en animales intactos en ayunas, como se ha visto en el presente estudio y en otras ocasiones (17, 23), en las que los niveles plasmáticos de insulina están disminuidos. De acuerdo con esta interpretación está el hecho demostrado previamente por nosotros (17) de que muchas de estas alteraciones que se presentan en el animal en ayunas desaparecen unos minutos después de la administración de insulina. También existe la posibilidad de que los cambios metabólicos que se presentan en los animales tratados con streptozotocin se deban a variaciones en otras hormonas, como podría ser una elevación en los niveles de glucagón circulante. KATSILAMBROS y col. (24) han encontrado un aumento en los niveles plasmáticos de glucagón tras la administración *in vitro* de streptozotocin, pero estos hallazgos no han podido ser reproducidos *in vitro* (24), lo que apoyaría una acción indirecta de esta droga sobre la actividad de las células alfa del páncreas, como consecuencia de la disminución de insulina y la hiperglucemia.

Hemos observado aquí que los parámetros estudiados en los animales diabéticos cuando alimentados, prácticamente no cambian con el ayuno, de tal forma que las diferencias con los controles desaparecen cuando las ratas han sido sometidas a un ayuno previo de 48 horas. Nosotros no tenemos aún suficiente apoyo experimental para comprender completamente esta falta de respuesta al ayuno en el animal diabético, pero existe la posibilidad de que sea una consecuencia de la falta de cambio en los niveles circulantes de insulina, probablemente debido al daño que poseen las células beta pancreáticas. En otras palabras, la secreción de insulina está relativamente fija en los animales diabéticos, a un nivel alcanzado por los controles cuando están sometidos al ayuno, por lo que en éstos la gluconeogénesis ha de ser activada cuando hay escasez de alimento para satisfacer las necesidades de los tejidos que utilizan preferentemente glucosa. La incapacidad de los diabéticos para poner en funcionamiento esta maquinaria metabólica cuando alimentados parece ser debida, por consiguiente, a la acción citotóxica y específica de la droga sobre las células beta pancreáticas, lo que origina una sobreproducción postprandial de glucosa, que contribuye activamente a su hiperglucemia.

Los niveles de glucosa circulante y de glucógeno hepático están aumentados en los animales diabéticos en ayunas, con relación a sus respectivos controles, a pesar de que el estado estacionario de metabolitos reguladores de gluconeogénesis es igual en ambos grupos experimentales, lo cual estará facilitando una velocidad de síntesis de glucosa similar en ambos grupos. Esto sugeriría una aminorada utilización de glucosa en aquellos animales a pesar de iguales niveles de insulina circulante en

ambos grupos, lo cual apoya la idea de una inhibida actividad biológica de esta hormona en las ratas diabéticas. La yuxtaposición de estos efectos (aumentada síntesis de glucosa y disminuida concentración y actividad de la hormona que facilita su utilización, la insulina) hace que los animales hechos diabéticos por la administración de streptozotocin permanezcan hiperglucémicos incluso tras el ayuno.

BIBLIOGRAFÍA

1. D. B. KEECH y M. F. UTTER. — 1963. *J. Biol. Chem.*, 238, 2603.
2. P. B. GARLAND y P. J. RANDLE. — 1964. *Biochem. J.*, 91, 6.
3. D. B. MARTIN y P. R. VAGELOS. — 1962. *Biochim. Biophys. Acta*, 7, 101.
4. J. V. PASSONNEAU y O. H. LOWRY. — 1963. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 13, 372.
5. P. B. GARLAND, P. J. RANDLE y F. A. NEWSHOLME. — 1963. *Nature*, 200, 169.
6. B. FRIEDMAN, E. H. GOODMAN y S. WEINHOUSE. — 1965. *J. Biol. Chem.*, 240, 3729.
7. R. SANDLER, E. HERRERA y N. FREINKEL. — 1968. *Clin. Res.*, 16, 351.
8. E. BLÁZQUEZ, M. CASTRO y E. HERRERA. — 1971. *Diabetología Clínica*, 6, 41.
9. P. J. RANDLE, P. B. GARLAND, E. A. NEWSHOLME y C. N. HALES. — 1965. *Am. N. Y. Ac. Sciences*. 131, 324.
10. J. MAYER, R. E. RUSSEL, M. W. BATES y M. M. DICKIE. — 1953. *Metabolism*, 2, 9.
11. K. H. SHULL y J. MAYER. — 1956. *Endocrinology*, 58, 220.
12. R. PITKIN y W. REYNOLDS. — 1970. *Diabetes*, 19, 85.
13. W. STAUFFACHER, I. BURR, A. GUTZEIZ, D. BEAVEN y J. VELENINSKY. — 1970. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 133, 194.
14. N. RAKIETEN, M. L. RAKIETEN y M. V. NADCARN. — 1963. *Cancer Chemother. Res.*, 29, 91.
15. A. JUNOD, A. E. LAMBERT, L. ORCI, R. PICTET, A. E. GONET y A. E. RENOLD. — 1967. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 126, 201.
16. B. PATERSON, C. HELLERSTROM y R. GUNNARSON. — 1970. *Horm. Metab. Res.*, 2, 313.
17. E. HERRERA y N. FREINKEL. — 1968. *Biochim. Biophys. Acta*, 170, 244.
18. M. SOMOGYI. — 1945. *J. Biol. Chem.*, 160, 69.
19. A. St. G. HUGGETT y D. A. NIXON. — 1957. *Lancet*, 2, 368.
20. S. P. BESSMAN y M. ANDERSON. — 1957. *Fed. Proc.*, 16, 154.
21. E. HERRERA y N. FREINKEL. — 1967. *J. Lipid Res.*, 8, 515.
22. C. N. HALES y P. J. RANDLE. — 1963. *Biochem. J.*, 88, 137.
23. A. ARANDA, E. MONTROYA y E. HERRERA. — 1972. *Biochem. J.*, 128, 597.
24. N. KATSILAMBROS, Y. A. RAHMAN, M. HINZ, R. FUSSGANGER, K. SCHRODER, K. STRANB y E. F. PFEIFFER. — 1970. *Horm. Metab. Res.*, 2, 263.
25. H. LAUBE, R. FUSSGANGER, R. GOBERNA, K. SCHRODER, K. STRAUS, K. SUSSMAN y E. F. PFEIFFER. — 1971. *Horm. Metab. Res.*, 3, 238.