

ORIGINALES

Biosíntesis de fosfatidilcolina durante la hipertrofia renal compensadora

F. Manzano *, P. Esbrit * y C. Castillo **

* Laboratorio de la Unidad Metabólica y ** Experimentación Animal.
Fundación Jiménez Díaz. Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid.

RESUMEN

Hemos estudiado las rutas de biosíntesis de la fosfatidilcolina en túbulos aislados de corteza renal canina a diferentes tiempos después de una nefrectomía unilateral. La vía de la transmetilación, que a nivel basal es unas 60 veces menos activa que la ruta de la transcolinación en este sistema, no parece mediar el aumento de síntesis de fosfatidilcolina durante la hipertrofia renal que sigue a la uninefrectomía. Sin embargo, la actividad de la fosfocolintransferasa, que cataliza la síntesis de fosfatidilcolina por transcolinación, se eleva alcanzando un máximo a las veinticuatro horas la uninefrectomía. Este aumento es debido a un incremento de la V_{max} de la enzima sin que se altere la K_m aparente para la CDP-colina.

Palabras clave: **Hipertrofia renal. Fosfatidilcolina. Transmetilación. Transcolinación. Uninefrectomía.**

BIOSYNTHESIS OF PHOSPHATIDYLCHOLINE DURING RENAL
COMPENSATORY HYPERTROPHY

SUMMARY

The pathways of phosphatidylcholine biosynthesis have been studied in canine renal tubules, at different times after uninephrectomy. The transmethylation pathway was 60-fold less active than the transcholination pathway under basal conditions. This pathway does not appear to contribute significantly to the increased phosphatidylcholine synthesis which occurs during renal hypertrophy after uninephrectomy. On the contrary, phosphocholintransferase activity, which catalyzes phosphatidylcholine synthesis by the transcholination pathway, increases reaching a maximum 24 h after uninephrectomy. This activation is due to an increase in the V_{max} of the enzyme without change of the apparent K_m for CDP-choline.

Key words: **Renal hypertrophy. Phosphatidylcholine. Transmethylation. Transcholination. Uninephrectomy.**

Correspondencia: Dr. P. Esbrit.
Laboratorio de la Unidad Metabólica.
Fundación Jiménez Díaz.
Avda. Reyes Católicos, 2.
28040 Madrid.

Recibido: 10-XII-85.
En forma definitiva: 20-I-86.
Aceptado: 23-I-86.

Introducción

La reducción de la masa renal funcionante, tanto en hombres como en animales, conduce a una serie de mecanismos de adaptación que tienen como objetivo restaurar la función del riñón en un breve período de tiempo. Las alteraciones inducidas por estos mecanismos de adaptación, al parecer mediadas por un factor renotrópico humoral, se traducen en cambios bioquímicos, morfológicos y funcionales en el tejido renal remanente¹⁻³.

En ratones se ha observado un aumento de la incorporación de colina marcada en fosfolípidos de corteza renal, como primer cambio bioquímico detectado cinco minutos después de una nefrectomía unilateral (uNx)¹, seguido de un aumento en la síntesis de ADN, ARN y proteínas que tiene lugar varias horas después de la uNx^{2, 4}.

La biosíntesis de fosfatidilcolina (PC) puede ocurrir por dos rutas diferentes: la vía de Kennedy o de la transcolinación y la ruta de Bremer o de la transmetilación (fig. 1). La ruta de Kennedy implica la transferencia de fosfocolina de la CDP-colina al 1,2-diacilglicerol, catalizada por la fosfocolina transferasa⁵. La ruta de la transmetilación consiste en la adición secuencial de grupos metilo desde la S-adenosil-metionina a la fosfatidiletanolamina, catalizada por la fosfolípido N-metil transferasa⁶.

La biosíntesis de PC renal, al igual que en otros tejidos, se produce principalmente por la ruta de Kennedy; mientras que la ruta de Bremer, de poca importancia cuantitativa en la mayoría de los tejidos, parece estar implicada en mecanismos de transmisión de señales en diversos tipos de células⁶ o en la regulación de procesos de transporte iónico⁷.

La hipertrofia renal compensadora tanto en el ratón como en la rata se sabe que va acompañada por un aumento precoz en la síntesis de PC por la ruta de Kennedy en membranas renales¹. Sin embargo, la aportación de la transmetilación a la síntesis de PC durante esta situación de estímulo fisiológico en estas u otras especies animales es actualmente desconocida.

Por lo menos en dos sistemas, hígado de rata y polimorfonucleares humanos, parece que existe un equilibrio entre la síntesis de PC mediante ambas rutas metabólicas, transcolinación y transmetilación. El mecanismo regulador de este equilibrio es desconocido, si bien poseemos evidencia de la participación de proteína-quinasa dependientes de AMPc y/o Ca⁺⁺, lo que apunta a un mecanismo de fosforilación-defosforilación⁸. En este trabajo hemos estudiado la contribución de la transcolinación y de la transmetilación al aumento de la biosíntesis de PC en túbulos aislados de corteza renal canina, a diferentes tiempos tras la uNx.

Material y métodos

La colagenasa, la S-adenosil-L-metionina y la citidín-difosfocolina se obtuvieron de Boehringer Mannheim (RFA).

La S-adenosil-L-(metil-H³) metionina (5-15 Ci/mmol) era de New England Nuclear (Boston, EE. UU.), y la CDP-(metil-C¹⁴) colina (56 mCi/mmol) de Amersham (Buckinghamshire, England). Todos los reactivos fueron de grado analítico.

Aislamiento de túbulos renales: Se utilizaron perros «cimarrones» alimentados con una dieta comercial estándar. El día del estudio, los perros fueron anestesiados con pentobarbital i.v. (25 mg/kg. peso) y se les practicó una nefrectomía por incisión en la línea media. Los túbulos se obtuvieron por una modificación del método de Vinay y cols.⁹. El riñón, inmediatamente de ser extraído, se perfundió a través de la arteria renal con tampón de Krebs-Henseleit glucosado (KHG) (NaCl 118 mM, KCl 5 mM, Ca Cl 2,5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM y glucosa 5 mM), pH 7,4, saturado con O₂ 95 %/CO₂ 5 % a 4° C. Una vez decapsulado se obtuvieron rebanadas de corteza de 0,2-0,3 mm. de espesor con un microtomo Stadie-Riggs. Los fragmentos de corteza se incubaron con 1 mg/ml. de colagenasa en KHG conteniendo 0,25 % (w/v) de albúmina bovina durante cincuenta minutos, en un baño con agitación a 37° C. A continuación, la suspensión se filtró a través de una gasa cuádruple y se diluyó hasta 50 ml. con KHG frío. La suspensión resultante se centrifugó a 60 × g. durante treinta segundos y los túbulos del sedimento se lavaron tres veces con más KHG. Después del último lavado, los túbulos se resuspendieron en KHG y se mantuvieron a 4° C hasta realizar los experimentos. En la suspensión de túbulos así obtenida, la proporción, estimada por análisis mediante microscopía óptica, de túbulo proximal es de un 65 %, y la de distal, de un 35 %. La viabilidad de los túbulos, estimada por tinción con azul de tripán, fue superior al 90 %.

Después de extraer el riñón izquierdo, los perros fueron mantenidos con vida durante un período variable de tiempo, hasta dos semanas. Entonces se realizó una segunda nefrectomía y los túbulos se aislaron como se ha descrito anteriormente.

Los túbulos aislados (250 mg. peso neto/ml. de suspensión) fueron homogeneizados por congelación instantánea en un baño de hielo seco / acetona (-70° C) y descongelación a 37° C.

Metilación de lípidos: Los túbulos permeabilizados (1 mg. de proteína) se incubaron a 37° C en tris-acetato 50 mM (pH 9) con diferentes cantidades de S-adenosil-L-(metil-H³) metionina (1 μCi) en un volumen total de 0,5 ml. La reacción se detuvo pipeteando 0,1 ml. de la mezcla de incubación en 2 ml. de cloroformo/metanol/HCl 2N (6:3:3:1, v/v) para ex-

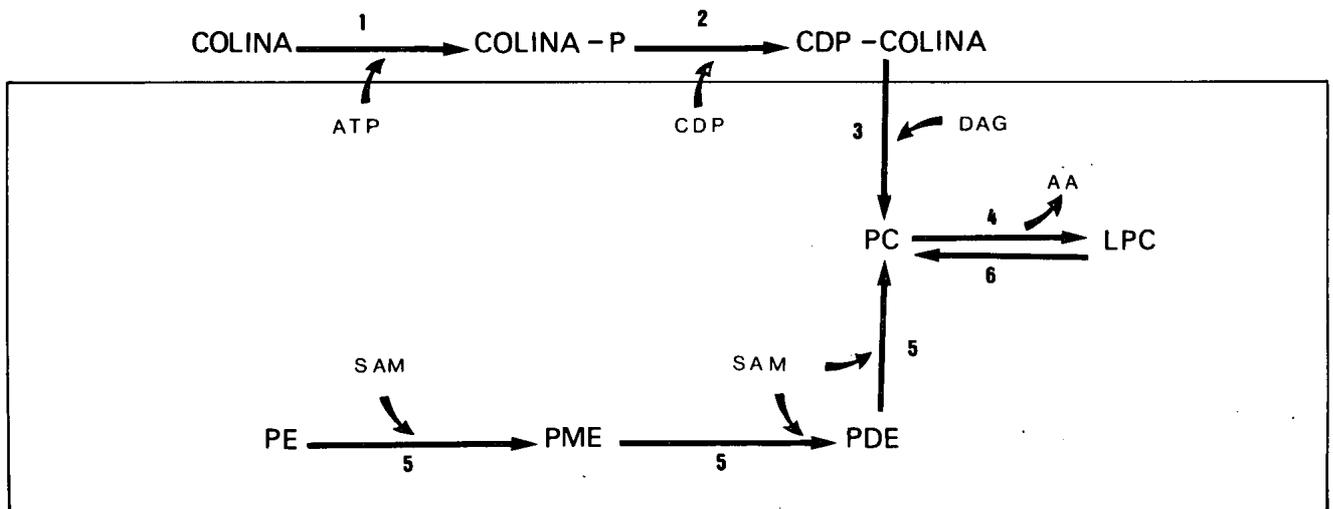


Fig. 1.—Biosíntesis de fosfatidilcolina. Ruta de Kennedy. Colina-P, fosfocolina; CDP-colina, citidín-difosfocolina; DAG, 1,2-diacilglicerol; PC, fosfatidilcolina; CDP, citidín-difosfato; 1) colina quinasa; 2) fosfocolina citidiltransferasa; 3) CDP-colina: 1,2-diacilglicerol fosfocolinatransferasa. Ruta de Bremer; PE, fosfatidi-

letanolamina; PME, fosfatidil N-monometiletanolamina; PDE, fosfatidil N,N-dimetiletanolamina; SAM, S-adenosil-L-metilmetionina; 5) fosfolípido N-metiltransferasa. Ciclo acilación deacilación: LPC, lisofosfatidilcolina; AA, ácido araquidónico; 4) fosfolípasa A₂; 6) acil-CoA: lisofosfatidil aciltransferasa.

traer los lípidos. La fase clorofórmica se lavó tres veces con 1 ml. de KCl 0,5 M en metanol al 50 %. A continuación, la fase clorofórmica se secó con N₂, se disolvió en 10 ml. de líquido centelleador con Tritón X-100 y se contó su radiactividad en un contador de radiación β.

Para separar y cuantificar los diferentes lípidos metilados, el residuo llevado a sequedad con N₂ se disolvió en 125 μl. de cloroformo/metanol (2:1), que se aplicaron en placas de gel de sílice G, previamente activadas a 110° C durante cuarenta y cinco minutos y eluidas con ácido propiónico/alcohol n-propílico/cloroformo/agua (2:2:1:1; v/v)¹⁰. Después de la cromatografía, la sílice correspondiente a la posición de los diferentes lípidos se raspó y se contó su radiactividad.

Ensayo de la CDP-colina: 1,2-diacilglicerol fosfocolina-transferasa: Los túbulos aislados se lavaron y resuspendieron en Tris-HCl 100 mM, MgCl₂, 50 mM, EGTA 1 mM, pH 8,5 antes de su homogeneización. A continuación, los túbulos homogeneizados (1 mg. de proteína) se incubaron a 37° C en Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, EGTA 1 mM, pH 8,5 con diferentes cantidades de CDP-(metil-C¹⁴) colina (0,5 μCi) en un volumen total de 0,5 ml. La reacción se detuvo pipeteando 0,1 ml. de la mezcla de incubación en 2 ml. de cloroformo/metanol/HCl 2N (6:3:1, v/v). El método de extracción de lípidos, así como el conteo de radiactividad incorporada, se efectuó como se ha descrito anteriormente.

Las proteínas se determinaron utilizando el ensayo de Bio-Rad, según el método de Bradford¹¹.

La prueba de significación utilizada fue la t de Student emparejada.

Resultados

No se detectó ningún cambio significativo en la

Tabla I. Porcentaje de lípidos metilados en el riñón control (RC) y en el riñón remanente (RR) a diferentes tiempos tras la uNx (hasta una semana). La metilación se efectuó durante treinta minutos con 100 μM de SAM.

	LPC	PC	PDE	PME	LN
RC	3 ± 1	42 ± 8	14 ± 2	8 ± 3	15 ± 2
RR	4 ± 1	43 ± 11	17 ± 2	10 ± 5	16 ± 6

LPC, lisofosfatidilcolina; PC, fosfatidilcolina; PME, fosfatidil N-monometiletanolamina; PDE, fosfatidil N,N-dimetiletanolamina; LN, lípidos neutros.

actividad de metilación de lípidos durante las dos semanas después de la uNx. Los valores de esta actividad enzimática coincidían con los obtenidos en corteza renal de perros sometidos a «operación simulada» (S-uNx) (fig. 3). Además, el perfil de lípidos metilados aislados a partir del riñón remanente, separados por cromatografía en capa fina, coincidía con lo obtenido a partir del riñón control, a diferentes tiempos tras la uNx (tabla I).

En cambio, hemos observado un aumento significativo ($p < 0,025$) en la actividad de la CDP-colina: 1,2-diacilglicerol fosfocolinatransferasa en túbulos aislados del riñón remanente a las dos horas tras la uNx, que alcanzaba un máximo a las veinticuatro horas y se mantenía en un valor doble del control a partir de una semana después de la uNx (fig. 2).

La cinética de saturación para la S-adenosil-L-metionina de la metilación de lípidos mostró la misma V_{max} y K_m aparentes en túbulos aislados del riñón control y del riñón remanente a las veinticuatro

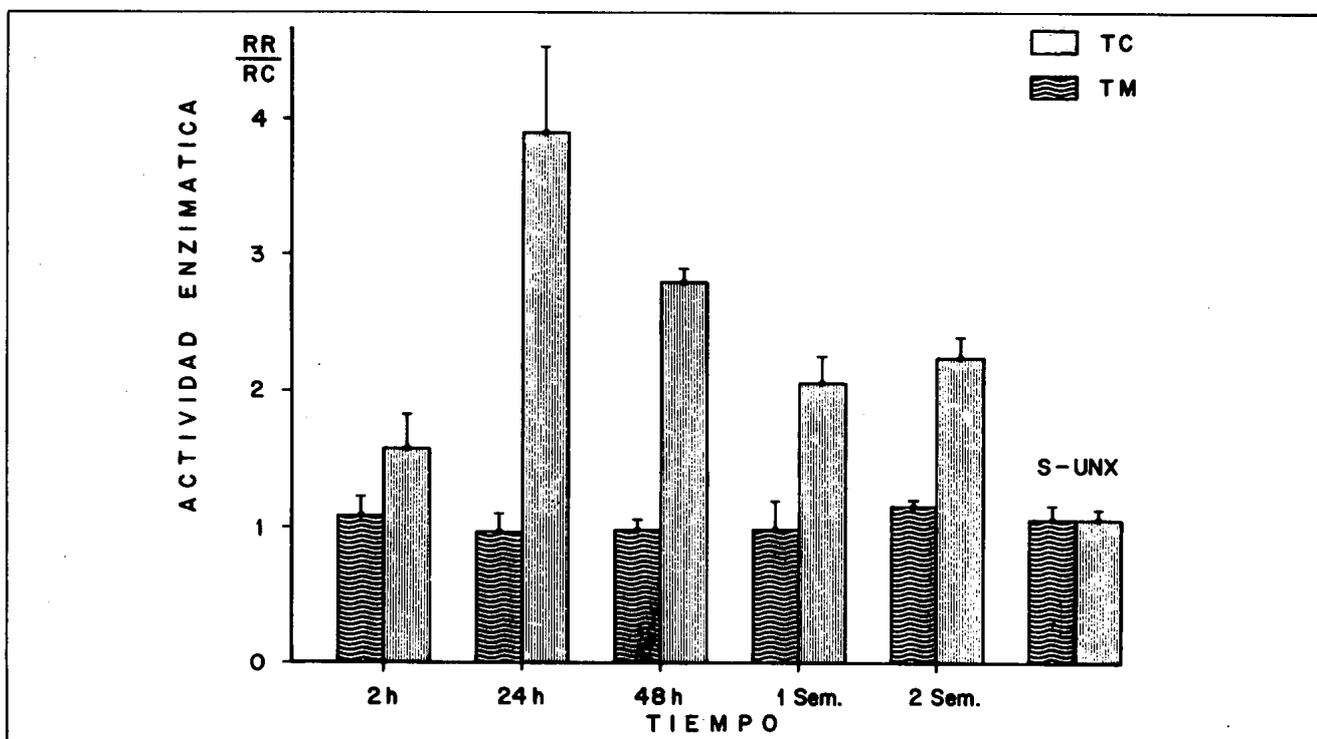


Fig. 2.—Representación doble recíproca de las curvas de saturación para CDP-colina y S-adenosil-L-metionina (SAM) en el riñón control (o) y en el riñón remanente a veinticuatro horas tras la uNx

(o). *pmol incorporados/mg. proteína/30 s.; **pmol incorporados/mg. proteína/min.

horas tras la uNx. Mientras que la CDP-colina: 1,2-duacilglicerol fosfocolintransferasa aumentaba su V_{max} en túbulo aislados del riñón remanente a las veinticuatro horas tras la uNx con respecto al riñón control, a la par que permanecía constante su K_m aparente para la CDP-colina (fig. 2).

Discusión

Hemos encontrado que la actividad de la fosfocolintransferasa es unas 60 veces mayor que la de la metiltransferasa en túbulo cortical del riñón control, de acuerdo con lo publicado por otros autores en diversos tejidos⁶.

No hemos apreciado ningún cambio significativo en la actividad metiltransferasa hasta dos semanas después de la uNx, un período de tiempo durante el que el riñón remanente aumenta notablemente su función¹². Es interesante hacer notar el hecho de que, en un trabajo previo, no hemos encontrado regulación «in vitro» de la actividad metiltransferasa por Ca^{++} , Mg^{++} o diferentes hormonas renotrópicas (angiotensina II, vasopresina o parathormona) ni por AMPc o GMPc (datos no publicados) en túbulo de corteza renal canina¹³.

Paralelamente hemos observado un aumento significativo en la actividad fosfocolintransferasa en cor-

teza renal del riñón remanente frente al riñón control a las dos horas tras la uNx. Esto está de acuerdo con la experiencia de otros autores, que han descrito un aumento precoz de la síntesis de PC por la ruta de Kennedy en roedores¹. La estimulación máxima de la enzima se obtuvo a las veinticuatro horas tras la uNx, tiempo en el que los niveles de un posible factor renotrópico en sangre parecen ser máximos³.

En conclusión, estos datos confirman que la metilación de lípidos es una ruta minoritaria de síntesis de PC en la corteza renal del perro, igual que ocurre en otros sistemas⁶. Además, nuestros resultados indican que la metilación de lípidos no contribuye al aumento de la síntesis de PC en túbulo de corteza renal canina durante la hipertrofia renal compensadora después de la uNx. En este sistema, la biosíntesis de PC a través de las rutas de transcolinación y transmetilación no parece estar coordinada, al contrario de lo que se ha descrito en hígado de rata y en polimorfonucleares humanos⁸.

Agradecimiento

Este trabajo ha sido subvencionado en parte por la ayuda de investigación 85/1325 del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social.

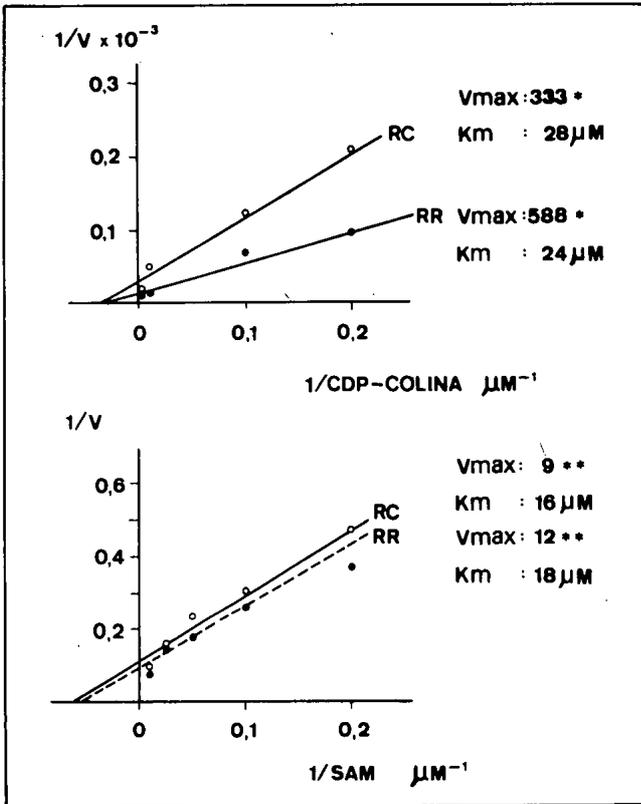


Fig. 3.—Actividades de transmetilación (TM) y transcolinación (TC) durante la hipertrofia renal compensadora en perros, posterior a la nefrectomía unilateral. Cada valor en el eje de ordenadas es la media del cociente entre los valores del riñón remanente (RR) y del riñón control (RC) \pm DE de dos-cinco perros. Los valores de S-Adx son la media \pm DE de los cocientes RR/RC de tres perros sometidos a operación simulada, obtenidos a distintos tiempos durante el período experimental.

Bibliografía

1. Toback FG, Smith PD y Lowenstein LM: Phospholipid metabolism in the initiation of renal compensatory growth after acute reduction of renal mass. *J Clin Invest* 54:91-97, 1974.
2. Fleck Ch y Braunlich H: Kidney function after unilateral nephrectomy. *Exp Path* 25:3-18, 1984.
3. Austin H III, Goldin H y Preuss HG: Humoral regulation of renal growth. *Nephron* 27:163-170, 1981.
4. Hayslett JP: Functional adaptation to reduction in renal mass. *Physiol Rev* 59:137-164, 1979.
5. Kennedy EP y Weiss SB: The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids. *J Biol Chem* 222:193-214, 1956.
6. Mato JM y Alemany S: What is the function of phospholipid N-methylation? *Biochem J* 213:1-10, 1983.
7. Chauhan VPS y Kalra VK: Effect of phospholipid methylation on calcium transport and $(Ca^{++} + Mg^{++})$ ATPase activity in kidney cortex basolateral membranes. *Biochim Biophys Acta* 72:185-195, 1983.
8. Mato JM, Alemany S, García Gil M, Marín Cao D, Varela I y Castaño JG: En Usdin F, Borchard RT y Creveling CR, ed: *Biochemistry of S-adenosylmethionine and related compounds*, pp 187-194: MacMillan Press, Londres, 1982.
9. Vinay P, Gougoux A y Lemieux G: Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *Am J Physiol* 241:F403-F411, 1981.
10. Hirata F, Strittmatter WJ y Axelrod J: β -adrenergic receptor agonist increase phospholipid methylation, membrane fluidity and β -adrenergic receptor-adenylate cyclase coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:3683-72, 1979.
11. Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.
12. Rouss SN y Wakim KG: Kidney function before, during and after compensatory hypertrophy. *J Urol* 98:30-35, 1967.
13. Manzano F; Esbrit P, López-Arrabe C, Tejedor A y López-Novoa JM: Caracterización de lípido metiltransferasa(s) en túbulos de corteza renal. *Nefrología* (en prensa).