

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



TESIS DOCTORAL

**Papel de los glucocorticoides en la regulación de la  
gluconeogénesis hepática**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Guadalupe Ciprés Palacín**

Madrid, 2015



T 577.17  
CIP  
pap

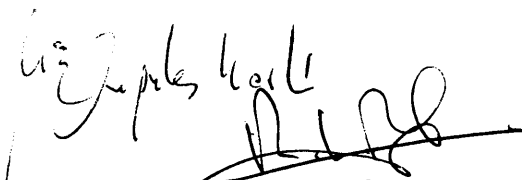
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**PAPEL DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA REGULACION  
DE LA GLUCONEOGENESIS HEPÁTICA**

TRABAJO PRESENTADO POR GUADALUPE CIPRES PALACIN PARA OPTAR  
AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Vº Bº DIRECTORES DE TESIS



Angeles Martín Requero, Colaborador Científico y  
Roberto Parrilla Sánchez, Investigador Científico  
Centro de Investigaciones Biológicas  
(C.S.I.C.)

DOCTORANDO



Guadalupe Ciprés Palacín

R- 22.231

*A mi familia*

## AGRADECIMIENTOS.

*Deseo, en primer lugar, expresar mi agradecimiento a los Dres. Angeles Martín Requero y Roberto Parrilla Sánchez como directores de este trabajo, por la magnífica formación científica y ayuda que me han brindado.*

*Deseo mencionar mi especial agradecimiento a la Dra. Angeles Martín Requero como directora de esta tesis. Su dedicación, confianza y ayuda han sido un estímulo constante para mí.*

*Mi más profundo agradecimiento a la Dra. Matilde Sánchez Ayuso por su competente orientación en la elaboración de este manuscrito.*

*Al Dr. José María Odriozola Lino, que amablemente aceptó ser el ponente de esta tesis.*

*Quiero expresar también mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra me han ayudado y alentado en la finalización de esta tesis, especialmente a D. Miguel Vargas, por su colaboración en la realización de este trabajo.*

*A mis padres, que siempre me animaron y tanta ilusión han puesto en ver terminada esta tesis.*

## **INDICE**

## INDICE

### ABREVIATURAS Y ENZIMAS

#### INTRODUCCION

P á g.

1.-	ANTECEDENTES HISTORICOS.	1
2.-	MECANISMO DE ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES.	5
3.-	EFFECTOS METABOLICOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES:	1 1
	3.1.- SOBRE EL METABOLISMO DE GLUCOSA:	1 1
	3.1.1.- Utilización de glucosa.	1 1
	3.1.2.- Metabolismo de glucógeno.	1 4
	3.1.3.- Gluconeogénesis.	2 4
	3.2.- SOBRE EL METABOLISMO DE LIPIDOS.	3 2
4.-	OBJETIVOS DE ESTA TESIS Y SU JUSTIFICACION.	3 9
5.-	PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.	4 6

#### MATERIALES Y METODOS

5 0

1.-	ANIMALES DE EXPERIMENTACION.	5 1
2.-	REACTIVOS.	5 1
3.-	MANIPULACION DE ANIMALES, TRATAMIENTO Y TOMA DE BIOPSIAS.	5 1
4.-	PERFUSION HEPATICA.	5 7
	4.1.- MEDIO DE PERFUSION.	5 7
	4.2.- TECNICA OPERATORIA.	5 8
	4.3.- EQUIPO DE PERFUSION HEPATICA.	5 9
	4.4.- MEDIDA DE CONSUMO DE OXIGENO.	6 2
	4.5.- MEDIDA DE LAS CONCENTRACIONES DE K <sup>+</sup> Y Ca <sup>2+</sup> .	6 3
	4.6.- MEDIDA DEL pH EN EL EFLUENTE HEPATICO.	6 3
5.-	METODOS ANALITICOS.	6 4
	5.1.- DETERMINACION DE GLUCOSA, INSULINA Y ACIDOS GRASOS LIBRES EN PLASMA.	6 4

	P á g .
5.2.- DETERMINACION DE INTERMEDIARIOS:	6 5
5.2.1.- Determinación de glucosa.	6 6
5.2.2.- Determinaciones de lactato y de piruvato.	6 6
5.2.3.- Determinación de cuerpos cetónicos.	6 7
5.3.- DETERMINACION DEL CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO.	6 8
5.4.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LACTICO DESHIDROGENASA (LDH) HEPATICA.	6 8
5.5.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HEPATICA DE PROTEINA QUINASA C (PKC).	6 9
6.- ESTIMACION DEL FLUJO A TRAVES DEL CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS.	7 1
7.- TRATAMIENTO ESTADISTICO.	7 2
<b><u>RESULTADOS</u></b>	7 3
1.- METABOLISMO HEPATICO DE LACTATO Y DE PIRUVATO EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.	7 4
1.1.- EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL METABOLISMO HEPATICO DE LACTATO.	7 4
1.2.- EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL METABOLISMO HEPATICO DE PIRUVATO.	7 8
2.- METABOLISMO DE ACIDOS GRASOS EN HIGADOS DE ANIMALES ADRENOPRIVOS.	8 1
3.- REGULACION DEL METABOLISMO HEPATICO DE LACTATO POR ACIDOS GRASOS EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.	8 8
3.1.- EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE OCTANOATO SOBRE LAS TASAS DE RESPIRACION Y GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE LACTATO EN HIGADOS PERFUNDIDOS DE RATAS CONTROLES Y ADRENALECTOMIZADAS.	8 8

	Pág.
3.2.- INFLUENCIA DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL EFECTO DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE OCTANOATO SOBRE GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE CONCENTRACIONES ESTACIONARIAS DE LACTATO.	108
3.3.- EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL FLUJO A TRAVES DEL CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS.	121
4.- INFLUENCIA DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA REGULACION DEL METABOLISMO HEPATICO DE PIRUVATO POR ACIDOS GRASOS.	128
5.- INFLUENCIA DEL ESTADO REDOX DEL SISTEMA NAD <sup>+</sup> CITOSOLICO EN LA RESPUESTA GLUCONEOGENICA A ACIDOS GRASOS EN HIGADOS DE RATAS CONTROLES Y ADRENALECTOMIZADAS.	134
6.- RESPUESTA METABOLICA HEPATICA A ESTIMULANTES $\alpha$ -ADRENERGICOS EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.	156
6.1.- EFECTO DEL ESTADO DE NUTRICION EN LA RESPUESTA METABOLICA A FENILEFRINA EN HIGADO PERFUNDIDO.	156
6.1.1.- Efecto de la adrenalectomía sobre la respuesta hepática a fenilefrina en ratas alimentadas <i>ad libitum</i> .	157
6.1.2.- Efecto de la adrenalectomía sobre la respuesta hepática a fenilefrina durante el ayuno.	161
6.2.- EFECTO DEL TRATAMIENTO <i>IN VIVO</i> CON GLUCOCORTICOIDES SOBRE LOS EFECTOS DE FENILEFRINA EN RESPIRACION Y PRODUCCION DE GLUCOSA.	170
6.3.- EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA EN LA ACTIVACION $\alpha$ Y $\beta$ ADRENERGICA.	172
7.- EFECTO DE LA SUSTITUCION DE CLORURO DE SODIO POR CLORURO DE COLINA, EN EL MEDIO DE PERFUSION, SOBRE LA RESPUESTA HEPATICA A FENILEFRINA.	179
8.- ACTIVIDAD PROTEINA QUINASA C EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.	181
9.- RESPUESTA METABOLICA A VASOPRESINA Y ANGIOTENSINA II EN HIGADOS DE ANIMALES ADRENALECTOMIZADOS.	183

	Pág.
<b><u>DISCUSION</u></b>	185
1.- METABOLISMO HEPATICO DE ACIDOS GRASOS EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.	186
2.- GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE LACTATO O DE PIRUVATO EN HIGADOS DE ANIMALES ADRENOPRIVOS.	187
3.- INTERACCION GLUCOCORTICOIDES-ACIDOS GRASOS EN LA REGULACION DE GLUCONEOGENESIS.	188
4.- ESTADO REDOX DEL SISTEMA NAD <sup>+</sup> HEPATICO EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.	196
5.- METABOLISMO ENERGETICO EN HIGADOS DE ANIMALES ADRENOPRIVOS.	200
6.- RESPUESTA HEPATICA A ESTIMULANTES $\alpha$ -ADRENERGICOS, DE HIGADOS DE ANIMALES ADRENOPRIVOS.	204
7.- PAPEL DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA REGULACION DE GLUCONEOGENESIS POR FENILEFRINA.	214
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	220
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	225

## **ABREVIATURAS Y ENZIMAS**

**ABREVIATURAS**

<b>ADX</b>	Adrenalectomía.
<b>E.C.</b>	Comisión de enzimas seguido de números que indican la clasificación de enzima.
<b>ERE</b>	Elemento de respuesta a estrógenos.
<b>GRE</b>	Elemento de respuesta a glucocorticoides.
<b>H-7</b>	1-(5-isoquinolinil-sulfonil)-2-metilpiperacina.
<b>H-R</b>	Complejo hormona-receptor.
<b>HRE</b>	Elemento de respuesta hormonal.
<b>IP<sub>3</sub></b>	D- <i>mio</i> -inositol 1,4,5-trisfosfato.
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa.
<b>PEPCK</b>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.
<b>PK</b>	Piruvato quinasa.
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C.
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetil-sulfonil.
<b>RG</b>	Receptor de glucocorticoides.
<b>SRE</b>	Elemento de respuesta esteroídea.

**ENZIMAS**

<b>NOMBRE COMUN</b>	<b>NOMBRE CIENTIFICO</b>	<b>E.C.</b>
Adenilato ciclasa	ATP Pirofosfatasa liasa(ciclante)	4.6.1.1.
Adenosina deaminasa	Adenosina aminohidrolasa	3.5.4.4.
Aspartato aminotransferasa	L-Aspartato: 2-oxoglutarato aminotransferasa	2.6.1.1.
Fosfodiesterasa de AMPc	3'5'AMPc 5'nucleósido hidrolasa	3.1.4.17.
Fosfoenol piruvato carboxiquinasa	GTP: oxalacetato carboxiligasa (transfosforilante)	4.1.1.32.
Fosfofructoquinasa	ATP: D-fructosa-6-fosfato-1-fosfotransferasa	2.7.1.11.
6-Fosfofructo 2-quinasa	ATP: D-fructosa-6-fosfato-2-fosfotransferasa	2.7.1.105.
Fosforilasa	$\alpha$ -1-4-glucosa: ortofosfato glicosil transferasa	2.4.1.1.
Fosforilasa fosfatasa	Fosforilasa fosfohidrolasa	3.1.3.17.
Fosforilasa quinasa	ATP: Fosforilasa fosfotransferasa	2.7.1.38.
Fructosa bisfosfatasa	D-Fructosa-1,6-Difosfato 1-fosfohidrolasa	3.1.2.11.
Fructosa-2-6-bisfosfatasa	D-Fructosa-2, 6-difosfato 2-fosfohidrolasa	3.1.3.17.
Gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa	D-Gliceraldehido-3-fosfato NADP óxido-reductasa	1.2.1.19.
Glucógeno sintasa	UDP-Glucosa-glucógeno glicosil transferasa	2.4.1.11.
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	D-Glucosa-6-fosfato: NADP oxido-reductasa	1.1.1.49.
Glucóquinasa	ATP: D-glucosa-6-fosfo-transferasa	2.7.1.2.
Hexoquinasa	ATP:D-hexosa-6-fosfo-transferasa	2.7.1.1.

$\beta$ -Hidroxi butirato deshidrogenasa	D-3-Hidroxi butirato: NAD oxido-reductasa	1.1.1.30.
Lactato deshidrogenasa	L-lactato: NAD óxido-reductasa	1.1.1.27.
Lipoproteína lipasa	Triacilglicerol-proteína acilhidrolasa	3.1.1.34.
Piruvato carboxilasa	Piruvato: carbón dióxido ligasa (ADP)	6.4.1.1.
Piruvato quinasa	ATP: Piruvato fosfotransferasa	2.7.1.40.
Tirosina aminotransferasa	L-Tirosina: 2-oxoglutarato aminotransferasa	2.6.1.5.
Triacilglicerol lipasa	Glicerol-éster-hidrolasa	3.1.1.3.
Triptófano oxigenasa	Triptófano 2.3-dioxigenasa	1.13.11.11.

## **INTRODUCCION**

## 1.- ANTECEDENTES HISTORICOS.

En 1855, Thomas Addison y un grupo de colaboradores del Guy's Hospital describen el caso de 11 pacientes con una sintomatología especial, relacionada con un trastorno en las cápsulas suprarrenales. Era el comienzo en la investigación científica de las también llamadas glándulas adrenales. Posteriormente se define con mayor precisión que son órganos esenciales para la vida (Brown-Sequard, 1856) y que juegan un papel muy importante en la defensa del organismo ante las infecciones (Cohoe, 1922). Cuando se descubre la epinefrina y su lugar de síntesis, se empieza a distinguir entre corteza y médula adrenal, y se llega a la conclusión de que es la corteza, y no la médula, el tejido esencial para el ser vivo (Hartman, 1927). A partir de este momento se intensificaron los trabajos para tratar de dilucidar la función o funciones de esta corteza adrenal. Se piensa en un posible papel endocrino; pero, con las técnicas de aquel momento, resultaba difícil aislar los productos de secreción en forma activa y, además, eliminar la posible contaminación por catecolaminas del tejido muscular.

Hartman y col., (1927) y Rogoff y Stewart (1928) consiguen extractos de corteza adrenal que alargan la vida de animales adrenalectomizados durante unos días. Poco después, Swingle y Pfiffner (1930,1931) preparan unos extractos que mantienen en perfecto estado gatos adrenalectomizados durante 100 días. Britton y Silvette (1932) inyectaron este extracto a gatos

adrenalectomizados a punto de morir y los animales recobraron su vigor habitual. Después de la adrenalectomía habían rechazado la comida, tenían los niveles de azúcar en sangre extremadamente bajos, y carecían de reservas de glucógeno. Cuando administraban el extracto a ratas y conejos normales, pero mantenidos en ayuno, de nuevo se observaba un aumento en los niveles plasmáticos de glucosa y se prevenía la caída en las reservas hepáticas de glucógeno que normalmente ocurría a las 7 horas de ayuno. Long y col.(1940) corroboraron estos resultados y además vieron que el extracto adrenocortical aminoraba la glucosuria que presentaban las ratas adrenalectomizadas. Estas fueron las primeras observaciones acerca del efecto de los esteroides de la corteza adrenal sobre el metabolismo hidrocarbonado. Los trabajos posteriores permitieron poner de relieve la gran importancia de este efecto lo que condujo a la tan conocida denominación de glucocorticoides. Los corticosteroides sintetizados por las glándulas adrenales que tienen actividad de glucocorticoide son también los que actúan sobre metabolismo de proteínas y aumentan la capacidad del músculo para realizar un trabajo sostenido (Ingle y Baker, 1953).

La corteza suprarrenal sintetiza unos 30 esteroides. Reciben el nombre genérico de corticoides y pueden agruparse en tres clases. *Los glucocorticoides*, entre los que el cortisol es el más importante, se oponen a algunas acciones de la insulina. El cortisol promueve la gluconeogénesis a partir de aminoácidos y favorece el depósito hepático de glucógeno, aumenta la glucemia y disminuye

la utilización periférica de la glucosa. Estimula también la utilización de ácidos grasos y la cetogénesis. Los glucocorticoides poseen también una notable acción anti-inflamatoria y antialérgica.

La segunda clase de esteroides adreno corticales comprende a los *mineralocorticoides*, que promueven la retención de  $\text{Na}^+$  y la pérdida de  $\text{K}^+$  por los riñones; a través de esta acción estas hormonas mantienen el balance de agua y sales en el cuerpo. El corticosteroide más importante de este grupo es la aldosterona.

La tercera clase de esteroides adrenocorticales posee propiedades intermedias entre los glucocorticoides y los mineralocorticoides. La principal hormona de esta clase es la corticosterona.

En realidad esta clasificación es un poco arbitraria ya que algunos glucocorticoides tienen actividad mineralocorticoidea (Naray-Fejes-Toth y Fejes-Toth, 1990) y un mineralocorticoide como la aldosterona, administrado en dosis muy altas, perturba el metabolismo glucídico. Así, se ha visto que en intestino perfundido *in vivo* de ratas adrenalectomizadas, existe una marcada reducción en la absorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , en la secreción de potasio, y en la diferencia de potencial transmural, y que la administración de dexametasona y no de aldosterona, restauró el movimiento normal de los electrolitos. Por tanto los glucocorticoides regulan el fluido basal en el colon y la función electrolítica, (Bastl, y col., 1980). También se ha estudiado el papel que tienen los glucocorticoides

como reguladores de la adaptación del túbulo proximal a la acidosis metabólica, en riñón, (Kinsella y col., 1984). Noronha-Blob y Sacktor, (1986), observaron que en células aisladas de túbulos proximales de riñón de conejo, la administración aguda de dexametasona, incrementó la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Este efecto requería síntesis de ARN y proteínas lo cual sugiere una acción de glucocorticoides sobre síntesis *de novo* de intercambiadores (Bidet y col., 1987).

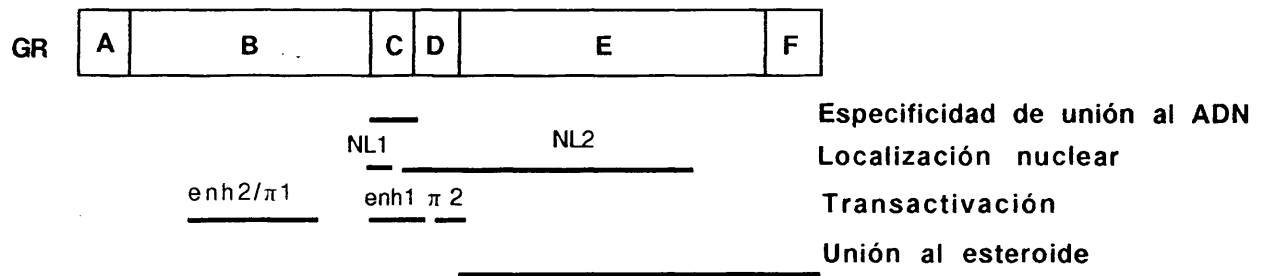
Hemos mencionado hígado y músculo como *tejido-diana* de la acción de los corticoides adrenales. Pero, además, hemos de destacar que estas hormonas tienen un efecto muy importante sobre sistema cardiovascular, procesos relacionados con ciertos sentidos (olfato, gusto, oído), sistema linfático, respuesta inflamatoria de los tejidos, etc... La importancia fisiológica de estos efectos depende de los niveles de corticosteroides en sangre y de la afinidad de los distintos receptores tisulares por las hormonas.

## 2.- MECANISMO DE ACCION DE LOS GLUCOCORTICOIDES.

Los esteroides adrenales se unen a receptores específicos en el citoplasma de las células de sus tejidos diana. Una vez formados los complejos hormona-receptor, en el citosol, se translocan hasta el núcleo e interaccionan con los sitios aceptores de cromatina. Esta teoría ha sido cuestionada por King (1986) quién demostró que los receptores esteroideos están localizados preferentemente en el núcleo (King 1987). En cualquier caso la interacción hormona-receptor permite la transcripción selectiva de determinados genes, que posteriormente serán traducidos en el citoplasma (Litwack y Singer, 1972; Thompson y Lippman, 1974; Cake y Litwack, 1975; Evans, 1988; Beato, 1989).

A nivel molecular, los avances realizados, en las últimas décadas, sobre la regulación de la expresión genética por estas hormonas han sido espectaculares. Así, por ejemplo, hoy se conoce la organización en dominios funcionales del receptor de glucocorticoides (RG, Fig. 1), así como que el gen que lo codifica se encuentra situado en el cromosoma 5. Recientemente se ha descrito la existencia de dos isoformas para el receptor de glucocorticoides en humanos (Encío y Detera-Wadleigh, 1991). Howard y Distelhorst, (1988), demostraron que en ausencia de hormona, en el RG existe una proteína hsp90 (heat-shock protein) unida selectivamente a la región de unión de la hormona, ejerciendo un efecto inhibitor en el receptor. La presencia de la hormona (glucocorticoides) desplaza a la proteína y su unión con el

**FIGURA 1**  
**ORGANIZACION DE LOS DOMINIOS FUNCIONALES DEL RECEPTOR DE**  
**GLUCOCORTICOIDES (GR).**



RG es necesaria para la activación del receptor como factor de transcripción. Esta unión hormona-receptor (H-R), en el caso del RG permite su desplazamiento hasta el núcleo celular.

El papel principal del complejo H-R es regular la transcripción de determinados genes tras la unión del complejo a determinadas secuencias del ADN, llamadas *elementos de respuesta hormonal* (HRE). Las secuencias de los receptores responsables de la unión al ADN, son similares a las de otros factores de transcripción. En el caso de los RG, esta región C (Fig. 1)., posee 66 aa y contiene dos digitaciones de zinc, que confieren especificidad de unión al ADN. Como se observa en la figura 1, esta región C comparte también la función de localización nuclear. Considerables progresos se han hecho en la identificación exacta de las secuencias de ADN necesarias para la acción de los receptores nucleares. Así, por ejemplo, se sabe que los elementos de respuesta a glucocorticoides, poseen una secuencia conservada de un hexanucleótido, TGTTCT. Mientras que los receptores de esteroides pueden actuar a través de un simple elemento de 13-15 pares de bases, muchos genes regulados por esteroides contienen múltiples secuencias de elementos de respuesta esteroidea (SRE). Algunos de estos son incapaces de funcionar por si solos pero pueden actuar cooperativamente con otros SRE, esta observación fue hecha por primera vez por Jantzen y col., (1987), en sus estudios realizados sobre el gen de la tirosina aminotransferasa en rata, cuya expresión es inducida por glucocorticoides. Cato y col., (1988) así como Ankenbaner y col (1988) demostraron que un

elemento de respuesta a estrógenos (ERE) adyacente a un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) pueden actuar sinérgicamente en la activación de la transcripción del gen de la vitelogenina II, en pollo, de tal manera que el glucocorticoide y el estrógeno producen una respuesta mayor que la suma de sus efectos individuales. Schüle y col., (1988) demostraron que los receptores de glucocorticoides y de progesterona pueden actuar sinérgicamente con otros factores de transcripción. Todos estos datos nos dan una idea del complejo control que existe sobre el mecanismo de inducción de la expresión de genes por hormonas esteroideas, pudiendo existir cooperatividad entre elementos de respuesta a un mismo o diferente tipo de hormona, e incluso de estos con factores de transcripción.

El descubrimiento de que tanto andrógenos como glucocorticoides y progestinas pueden actuar a través del elemento de respuesta a glucocorticoides, induce a pensar en la existencia de mecanismos que regulen la especificidad de acción de una hormona *in vivo*. De esta manera, los niveles de hormona circulante del animal así como su concentración local influirían en los receptores particulares que pueden ser activados. También los niveles relativos de los diferentes receptores serían importantes a la hora de competir por la misma secuencia diana. Por otra parte, es posible que los receptores que reconocen una misma secuencia tengan diferente afinidad por ella. La distinta capacidad de los receptores para interaccionar con determinados factores de transcripción podría ser otro de los mecanismos. Finalmente, la

propia organización de los elementos de respuesta hormonal y de los elementos promotores podría influir en la sensibilidad de un promotor hacia una hormona particular. El conjunto de todos estos mecanismos basados en niveles de receptores y en sus diferentes afinidades, serían responsables de la especificidad de la acción hormonal en concreto, (Ham y Parker, 1989).

En cuanto al mecanismo de transactivación, es decir, el mecanismo por el cual el complejo H-R una vez unido a su elemento respuesta estimula la transcripción de un promotor adyacente, una de las posibilidades sería que el receptor estableciera contactos proteína-proteína con otros factores de transcripción. Otro modelo, propone que la unión del receptor a su elemento respuesta produciría una serie de alteraciones en la estructura de la cromatina que permitiría a otros factores transactivos interaccionar con su secuencia diana que en un principio era inaccesible.

Existen también evidencias que sugieren que procesos post-transcripcionales podrían estar regulados por estas hormonas esteroideas (Shapiro y Brock, 1985), así por ejemplo, se sabe que los glucocorticoides estimulan la transcripción del gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, pero además estabilizan los ARNm protegiéndolos de posibles mecanismos de degradación (Petersen y col., 1989). En otros casos, los glucocorticoides sólo tienen efecto incrementando la transcripción de un gen determinado, como es el caso de la 6-fosfofructo quinasa/fructosa

2,6 bisfosfatasa (Marker y col., 1989), sin afectar a la estabilidad de los ARNm (Andreone y col., 1989; Magnuson y col., 1989). Por último, los glucocorticoides en determinadas condiciones podrían ejercer un papel permisivo en la transcripción y regulación de algunos ARNm, como en el de la piruvato quinasa (Vaulont y col., 1986), en cuyo gen se ha identificado una secuencia parecida a la de un elemento de respuesta a glucocorticoides; sin embargo, hasta ahora, se desconoce la función de este posible elemento regulador.

Hasta ahora nos hemos referido a la acción de los glucocorticoides en la estimulación de enzimas que, como la tirosina aminotransferasa, triptófano oxigenasa y ornitina descarboxilasa, actúan en el catabolismo de proteínas (Litwack y Rosenfield, 1973) y de otros enzimas de la gluconeogénesis. Pero los glucocorticoides también pueden actuar reprimiendo la expresión de determinados genes. Así, se ha visto que estas hormonas son capaces de reprimir los genes de la pro-melanocorticotropina, prolactina y de la subunidad  $\alpha$  de hormonas glucoproteicas de mamíferos. Las secuencias de ADN a las que se unen en este caso los receptores se les llama negativas (Sakai y col., 1988; Akerblom y col., 1988), y se ha visto que son similares a las secuencias positivas consensuadas, lo cual significaría un mecanismo muy fino de control.

### **3.- EFECTOS METABOLICOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES:**

#### **3.1.- SOBRE EL METABOLISMO DE GLUCOSA.**

Los primeros trabajos sobre la influencia de las glándulas suprarrenales en el metabolismo de hidratos de carbono fueron realizados por Bierry y Malloizel en 1908. Estos autores demostraron que los animales adrenalectomizados sufren una profunda hipoglucemia. La disminución de los niveles circulantes de glucosa es el resultado de la alteración, inducida por la carencia de esteroides adrenales, en, al menos, 3 procesos: utilización de glucosa por los tejidos periféricos, síntesis y degradación de glucógeno y gluconeogénesis.

##### **3.1.1.- Utilización de glucosa por los tejidos periféricos.**

La administración de glucocorticoides disminuye la utilización de glucosa por los tejidos periféricos (Baxter y Forsham, 1972). Se han descrito efectos de corticosterona, cortisol, dexametasona y prednisolona inhibiendo la utilización de glucosa en el tejido adiposo (Hausberg, 1958; Jeanrenaud y Renold, 1960; Munck y Koritz, 1962; De Pirro y col., 1981). Respuestas similares se han descrito en dermis de ratón (Overell y col., 1959), células de timo de rata (Morita y Munck, 1964; Wira y Munck, 1970), linfosarcoma de ratón (Rossen y col., 1970) y fibroblastos (Gray y col., 1971).

Algunos autores (Fain, 1964) han sugerido que el rápido aumento de la glucemia observado tras la administración de

glucocorticoides podría ser el resultado de una disminución en el transporte de glucosa. Esta idea estaría de acuerdo con los trabajos de Livingston y Lockwood (1975) y de Olefsky (1975) que describen una inhibición del transporte de glucosa, inducida por dexametasona, en adipocitos de rata. Una disminución del transporte de glucosa también ha sido descrita en adipocitos humanos de pacientes tratados con prednisona (Pagano y col., 1983).

Aunque no puede descartarse un efecto directo de los glucocorticoides sobre el transporte de glucosa en algunos tejidos, la mayoría de los autores se inclinan por un mecanismo indirecto relacionado con cambios en los niveles circulantes de insulina y/o en la alteración de la respuesta normal de ciertos tejidos a la insulina. Es un hecho bien conocido que junto a la hipoglucemia, los animales adrenalectomizados cursan con hipoinsulinemia (Häring y col., 1980). Por otra parte, los glucocorticoides disminuyen la sensibilidad a insulina en distintos tejidos (Plested y col., 1987) lo que explicaría que tanto los animales adrenoprivos (Debodo y col., 1963) como humanos con insuficiencia suprarrenal muestran *in vivo* una hipersensibilidad al tratamiento con insulina (Fraser y col., 1941). Este aumento en la sensibilidad a insulina (ED<sub>50</sub>), parece ser consecuencia de un aumento en la capacidad de unión de la insulina a sus receptores (Kahn y col., 1978; Häring y col., 1980), que se produce tras la adrenalectomía o en pacientes con enfermedad de Addison (Takeda y col., 1987). Esta relación inversa entre los niveles de insulina y capacidad de esta hormona

para unirse a sus receptores se ha demostrado también en otras situaciones como el ayuno (Olefsky, 1976; Kasuga y col., 1977) o la diabetes (Wieringa y Krans, 1978; Davidson y Kaplan, 1977; Schoenle y col., 1977) que se caracterizan por cursar con niveles bajos de insulina. El tratamiento con corticoesteroides produce, por el contrario, una disminución en la unión de insulina con sus receptores. Esta observación se ha realizado en adipocitos, hepatocitos, y también en preparaciones de membranas de hígado de rata (Olefsky y col., 1975; Kahn y col., 1978). No obstante, otros autores (Beck-Nielsen y col., 1980) han descrito un aumento en la capacidad de unión de la insulina con sus receptores en monocitos de sujetos tratados con prednisolona, mientras que Bennet y Cuatrecasas (1972) no encontraron diferencias significativas en la capacidad de unión de insulina a sus receptores, tras la administración de corticosteroides a adipocitos. En cualquier caso, hay que señalar que la relación entre la capacidad de la insulina para unirse a sus receptores y sus efectos biológicos es compleja, y no siempre cambios en la interacción hormona-receptor van acompañados por una alteración en la sensibilidad del tejido diana a la insulina, puesto que también influyen otros factores que actúan a nivel postreceptor. Esto explicaría que no se observen cambios en la sensibilidad a insulina en procesos tales como la oxidación de glucosa, en adipocitos de ratas adrenalectomizadas comparados con células de ratas sometidas a una operación simulada, a pesar de que las ratas adrenoprivas mostraron una capacidad aumentada de unión de insulina a sus receptores (Håring y col., 1980).

En el tejido hepático, la utilización de glucosa depende, en gran parte, de la actividad de glucoquinasa. Se ha observado que los glucocorticoides ejercen una acción permisiva sobre la inducción de la síntesis del enzima mediada por insulina tanto *in vivo* (Sibrowski y Seitz, 1980) como *in vitro* (Schudt, 1979; Katz y col., 1979).

### 3.1.2.- Metabolismo de glucógeno.

Una acción bien establecida de los corticoides adrenales, en el animal intacto, es estimular el almacenamiento hepático de glucógeno (Long y col., 1940; Landau y col., 1965), como puede deducirse de la disminución en el contenido hepático de glucógeno que se produce tras la adrenalectomía (Britton y Silvette, 1937; Landau, 1965). Cuando se somete a ayuno a ratas adrenalectomizadas, estas pierden casi por completo la capacidad para almacenar glucógeno en el hígado (Whitton y Hems, 1976). Esta alteración es, quizás, la más severa que produce la adrenalectomía en el metabolismo hepático. En algunos casos, se ha intentado explicar este efecto por una menor disponibilidad de precursores glucogénicos, consecuencia de una menor tasa de gluconeogénesis, producida por la carencia de esteroides suprarrenales (Margolis y Curnow, 1983). No obstante, todavía no se ha alcanzado un acuerdo en determinar la contribución relativa de las rutas directa e indirecta, es decir a partir de glucosa o de precursores de tres átomos de carbono, a la síntesis de glucógeno (Katz y col., 1976; Geelen y col., 1977; Newgard y col., 1984;

Shulman y col., 1985; Mitrakou y col., 1991). La llamada *paradoja de la glucosa* (Katz y Mc Garry, 1984; Katz y col., 1986; Landau y Wahren, 1988) sigue siendo objeto de controversia, sin que pueda precisarse si la estimulación de la síntesis de glucógeno, inducida por precursores gluconeogénicos, sea debida exclusivamente a su participación como substratos o interviniendo como elementos reguladores (Youn y Bergman, 1990).

La regulación del metabolismo del glucógeno afecta frecuentemente a los dos enzimas claves del proceso: fosforilasa y glucógeno sintasa (Bishop y Larner, 1967; De Wulf y col., 1970). Estos dos enzimas existen en formas activa e inactiva, cuya interconversión está controlada por proteínas quinasas y por proteínas fosfatasas. En el caso de la fosforilasa se conoce un único enzima capaz de causar la fosforilación y la activación: fosforilasa quinasa. Esta proteína fosforila un único residuo por subunidad y puede activarse directamente por los iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Khoo y Steinberg, 1975; Vandenheede y col., 1979; Chrisman y Exton, 1980) o por fosforilación por una proteína quinasa dependiente de AMPc. La glucógeno sintasa, puede ser fosforilada por diversas quinasas en múltiples sitios. El enzima hepático es fosforilado en, al menos, 6 sitios que se encuentran agrupados en un extremo de la molécula (Roach, 1986), por distintos tipos de proteínas quinasas, dependientes de AMPc,  $\text{Ca}^{2+}$  o independientes de estos efectores como la caseína quinasa 1 y 2 ( Revisado en Villar-Palasi y Guinovart, 1986). Del mismo modo, se conocen varias fosfatasas que desfosforilan la glucógeno sintasa y fosforilasa. En los últimos

años se ha hecho un gran esfuerzo por estudiar y clasificar estas proteínas (Ingebritsen y Cohen, 1983; Cohen, 1989). Cohen divide a estas enzimas en dos grupos: Tipo 1 (inactivados por los llamados inhibidores 1 y 2) y Tipo 2. Los de tipo 1 desfosforilan preferentemente a las subunidades tipo  $\beta$  de la fosforilasa quinasa, mientras que las de tipo 2 tienen mayor especificidad para la subunidad  $\alpha$ . Esto da una idea del complejo control al que está sometido el metabolismo de glucógeno.

Un dato bien documentado es la disminución, en animales adrenalectomizados, de la actividad de la fosforilasa total (a+b), sin embargo existen desacuerdos en los cambios de la actividad basal de la fosforilasa "a" después de la adrenalectomía (Shaeffer y col., 1969; Chan y col., 1979; Studer y Borle, 1984). Respecto a la actividad de fosforilasa fosfatasa algunos autores sostienen que no cambia tras la adrenalectomía (Chan y col., 1979) o lo hace moderadamente (Tan y Nuttal, 1976), aunque se ha descrito un aumento en la actividad de este enzima con el tratamiento con glucocorticoides (Laloux y col., 1978).

El efecto de glucocorticoides aumentando el almacenamiento de glucógeno en hígado se ha atribuido a la activación de glucógeno sintasa (Hers y col., 1970; Hornbrook y col., 1966; De Wulf y col., 1970). En hígados de ratas adrenalectomizadas, mantenidas en ayuno, se ha observado una inhibición en la actividad de glucógeno sintetasa (Miller y col., 1973; Gruhner y Segal 1970). Este defecto puede corregirse con insulina y/o

glucosa. Esta observación sugería que el efecto de la adrenalectomía sobre la síntesis de glucógeno podría estar mediado por una deficiencia de insulina (Nichols y Goldberg, 1972). Se sabe que la adrenalectomía disminuye la secreción de insulina por el páncreas (Malaisse y col., 1967) y la concentración de insulina en sangre (Van Lan y col., 1974).

La inactivación de glucógeno sintasa en hígado de ratas adrenalectomizadas, parece ser consecuencia de una disminución en la actividad de las glucógeno sintasas fosfatasas (Tan y Nuttal, 1975; Margolis y Curnow, 1983). De todas las fosfatasas conocidas, la que parece jugar un papel primordial en la regulación del metabolismo del glucógeno es la proteína fosfatasa 1 (PP1) (Cohen, 1989). Esta proteína es responsable del 85-90% de la actividad fosforilasa fosfatasa y del 60-75% de la actividad glucógeno sintasa fosfatasa (Ingebritsen y col., 1983; Alemany y col., 1984). Pues bien, se ha descrito que la forma activa de esta proteína, que está ligada a partículas de glucógeno (PP1-G) está ausente en hígados de ratas diabéticas o adrenalectomizadas mantenidas en ayuno (Bollen y Stalmans, 1984; Bollen y col., 1984,1988). La actividad se restaura tras la administración de insulina y/o glucosa a animales diabéticos, o de glucocorticoides a animales adrenalectomizados (Cohen, 1989). Este efecto de glucocorticoides es sensible a actinomicina D, lo cual sugiere que es necesaria la síntesis de ARN-m. Al menos la síntesis de uno de los componentes de la proteína fosfatasa 1-G está controlada por insulina y por glucocorticoides (Schelling y col., 1988).

El efecto permisivo de los glucocorticoides sobre la respuesta glucogenolítica a glucagón y epinefrina ha sido muy estudiado. Se ha descrito que la fosforilasa hepática, en ratas adrenalectomizadas, es insensible a la estimulación por AMPc o epinefrina administrados *in vivo* (Schaeffer y col., 1969). También en hígado o corazón perfundidos de ratas adrenalectomizadas, la respuesta glucogenolítica a glucagón, AMPc o epinefrina se encuentra alterada (Exton y col., 1970, 1972). Estos resultados sugirieron que el lugar donde se ejercía este efecto permisivo podría estar localizado en una etapa posterior a la producción del mensajero de estas hormonas. Trabajos posteriores parecen confirmar esta teoría y se ha visto que la falta de glucocorticoides altera la capacidad del glucagón para activar la fosforilasa b quinasa (Miller y col., 1971) e incluso pueden estar involucrados cambios en la actividad de la fosforilasa fosfatasa (Rousseau y col., 1978; Chan y col., 1979).

La acción de las catecolaminas sobre glucogenólisis está mediada preferentemente por receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y es por tanto, independiente de la generación de AMPc (Tolbert y Fain, 1974; Kneer y col., 1974; Williamson y col., 1985; Exton, 1988). No obstante, se conoce desde hace bastante tiempo que la epinefrina interaccionando con receptores de tipo  $\beta$  aumenta la actividad de adenilato ciclasa y, por tanto, la producción de AMPc. La adrenalectomía altera la respuesta glucogenolítica a catecolaminas, tanto si se trata de efectos mediados por receptores  $\alpha$  como  $\beta$ . Así, se sabe que la adrenalectomía aumenta la sensibilidad a la

activación  $\beta$ -adrenérgica de epinefrina, mientras que disminuye el componente  $\alpha$ -adrenérgico (Chan y col., 1979). El aumento en la sensibilidad de adenilato ciclasa a la activación por epinefrina o isoproterenol, observado en hígado de ratas adrenalectomizadas (Wolfe y col., 1976, Chan y col., 1979) y la activación de fosforilasa fueron abolidos con el  $\beta$ -bloqueante propranolol, de acuerdo con la idea de que la deficiencia suprarrenal conduce a un incremento de la actividad  $\beta$ -adrenérgica.

La mayor sensibilidad de la adenilato ciclasa a la estimulación por catecolaminas, en ausencia de esteroides suprarrenales, podría estar mediada por un aumento en la afinidad de receptores  $\beta$  por catecolaminas, una mayor eficiencia en el acoplamiento hormona-receptor, o por un aumento de receptores  $\beta$  en el tejido hepático (Wolfe y col., 1976; Guellaen y col., 1978); aunque, en ocasiones, el incremento en el número de receptores  $\beta$  no puede explicar el moderado aumento en la actividad de la adenilato ciclasa. No se han encontrado evidencias concluyentes de que la adrenalectomía conduzca a una mayor eficacia en el acoplamiento hormona-receptor controlando los niveles de las proteínas reguladoras G (García-Sáinz y col., 1989). Otra alternativa que se ha considerado, es que la insuficiencia suprarrenal afecte a la interacción entre receptores  $\beta$  y  $\alpha_2$ -adrenérgicos, ya que se ha visto que los efectos mediados por los receptores  $\alpha_2$  inhiben la actividad de adenilato ciclasa (Atlas y Sabol, 1981). Apoyando esta última hipótesis, El-Refai y Chan

(1986), observaron un aumento considerable de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos en hígado de ratas adrenalectomizadas.

Los cambios producidos por la adrenalectomía en el sistema de la adenilato ciclasa acoplada a receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el tejido hepático no pueden extrapolarse a todos los tejidos. Así, por ejemplo, en miocardio de rata adrenalectomizada se produce una reducción de la sensibilidad de la adenilato ciclasa a catecolaminas, y desacoplamiento sin disminución de la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Davies y col., 1981), así como una menor acumulación de AMPc (Phornchirasilp, Matangkasombut, 1982). En adipocitos y en membranas de pulmón también se ha observado un menor número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Schonhoferr y col., 1972; Mano y col., 1979). En contraste, en cerebro de rata se ha observado un aumento en la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por isoproterenol (Roberts y col., 1981; Mobley y Sulser, 1980). Las razones de esta disparidad de efectos, inducidos por la adrenalectomía, en los distintos tejidos no se conoce por el momento.

La estimulación  $\alpha$ -adrenérgica de glucogenólisis está disminuida en ausencia de esteroides suprarrenales (Chan y col., 1979). Es conocido que la unión de los agentes adrenérgicos a receptores de tipo  $\alpha_1$  desencadena una serie de acontecimientos, mediados por proteínas G, que llevan a la activación de fosfolipasa C, originando un aumento en la generación de 1,4,5 inositoltrisfosfato y diacilglicerol, lo que a su vez origina un

aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico y una activación de proteína quinasa C (Kishimoto y col., 1980).

El efecto de la adrenalectomía sobre la acción  $\alpha$ -adrenérgica podría ejercerse a nivel del acoplamiento hormona-receptor. En este sentido, se ha demostrado que la adrenalectomía reduce la densidad de receptores  $\alpha_1$ , (El-Refai y Chan, 1986; Borle y Studer, 1990), aunque previamente otros autores no habían encontrado diferencias (Guellaen y col., 1978; Preksaitis y col., 1982). La afinidad de los receptores  $\alpha_1$  por los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos está regulada por nucleótidos de guanina (Hoffman y col., 1980; Geynet y col., 1981), pues bien, se ha descrito que la adrenalectomía minimiza el papel de los nucleótidos de guanina en el acoplamiento hormona-receptor y que este efecto es revertido en presencia de dexametasona (Goodhart y col., 1982). Basándose en los efectos de la adrenalectomía sobre la densidad de los receptores  $\alpha_1$  y  $\beta$  en el tejido hepático, algunos autores (Chan y Exton, 1977; Studer y Borle, 1984) han propuesto que tras la adrenalectomía se produce una alteración de la activación  $\alpha$ -adrenérgica de glucogenólisis, que pasaría de ser un efecto predominantemente  $\alpha_1$ -adrenérgico, mediado por  $\text{Ca}^{2+}$  a ser un efecto mixto mediado por adrenorreceptores  $\alpha_1$  y  $\beta$ . De manera similar a lo que sucedía en la glucogenólisis, la estimulación de ureogénesis por epinefrina en hepatocitos de animales adrenalectomizados pasa de estar mediada principalmente por receptores tipo  $\alpha_1$ , a ser una respuesta mediada tanto por  $\alpha_1$  (dependiente de calcio extracelular), como por  $\beta$  adrenorreceptores (Hernández-

Sotomayor y García-Sáinz, 1984). Estos autores propusieron que los glucocorticoides de alguna manera podrían modular la dependencia de calcio de los efectos  $\alpha_1$  adrenérgicos.

Respecto a la influencia de la adrenalectomía sobre los acontecimientos que tienen lugar tras la unión de los  $\alpha$ -agonistas a sus receptores, se ha descrito que el metabolismo del calcio, está alterado en hepatocitos de ratas adrenalectomizadas (Studer y Borle, 1984).

Recientemente Freudenrich y Borle, (1988), estudiando la regulación  $\alpha$ -adrenérgica del metabolismo del calcio en hepatocitos de ratas adrenalectomizadas realizaron las siguientes observaciones: los hepatocitos de ratas adrenoprivas tenían un mayor contenido de calcio, sin embargo en respuesta a epinefrina, se producía un aumento menor en la concentración de calcio libre citosólico, una disminución en el eflujo de calcio, y una menor activación de glucógeno fosforilasa, en comparación con las respuestas producidas en hepatocitos de ratas controles. Por otra parte, hepatocitos de ratas controles y adrenalectomizadas, permeabilizados con saponina, tuvieron idéntica respuesta a la adición de  $IP_3$ , liberando calcio del retículo endoplásmico.

Según estos autores, estos efectos de la adrenalectomía sobre flujos de  $Ca^{2+}$  y su regulación  $\alpha$ -adrenérgica, podrían explicarse por una alteración de la ATPasa dependiente de  $Ca^{2+}$  y de  $Mg^{2+}$  y por una disminución en la generación de  $IP_3$  en respuesta a epinefrina (Borle y Studer 1990). Un efecto de glucocorticoides

induciendo la síntesis de una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  había sido previamente demostrado en vesículas de retículo endoplásmico de hígado (Friedmann y Johnson, 1980).

En los últimos años se han acumulado evidencias acerca de la implicación de la actividad de proteína quinasa C en los efectos mediados por agentes  $\alpha$ -adrenérgicos en el tejido hepático. Así, pueden destacarse las observaciones de Corvera y García-Sáinz (1984), que indican que los ésteres de forbol impiden el efecto  $\alpha_1$ -adrenérgico de activación de glucogenolisis por epinefrina en hepatocitos aislados. La eficacia de distintos ésteres de forbol inhibiendo las acciones  $\alpha$ -adrenérgicas aumenta en paralelo con la activación de proteína quinasa C (Corverá y col., 1986). Por otra parte, diacilgliceroles sintéticos (Cooper, 1985), ésteres de forbol (Rösler y Schoner, 1990) y hormonas que estimulan la hidrólisis de fosfoinosítidos (Hughes y col., 1984; Boockino y col., 1985) también bloquean la acción de los  $\alpha$ -agonistas. Este efecto es impedido en presencia de inhibidores de proteína quinasa C (García-Sáinz y Hernández-Sotomayor, 1987). Estos trabajos sugieren la importancia de la proteína quinasa C en la modulación de la respuesta  $\alpha$ -adrenérgica. Recientemente, se ha descrito un efecto directo de epinefrina y otros agentes movilizadores de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la activación de proteína quinasa C en hepatocitos aislados (Hernández-Sotomayor y García-Sáinz, 1988).

Experimentos recientes de nuestro laboratorio (Urcelay y col., 1990) utilizando tanto un activador de proteína quinasa C

como el 1,2-dioctanoilglicerol (Nishizuka, 1984) como un inhibidor H-7 (Hidaka y col., 1984) han permitido concluir que la activación de proteína quinasa C desempeña un papel esencial en la respuesta a estimulantes  $\alpha$ -adrenérgicos en hígado aislado y perfundido.

A pesar de la relevancia que parece tener la actividad de proteína quinasa C en la modulación de la respuesta  $\alpha$ -adrenérgica, el papel de la adrenalectomía en la activación de este enzima por  $\alpha$ -agonistas, no ha sido estudiado.

### 3.1.3.- Gluconeogénesis.

Se sabe que la hipoglucemia que sufren los animales adrenalectomizados durante el ayuno es debida, en parte, a una disminución en la velocidad del flujo gluconeogénico (Long y col., 1940). Sin embargo, quedan todavía por esclarecer muchos puntos acerca del mecanismo de acción de los esteroides adrenales sobre la ruta gluconeogénica. La gluconeogénesis hepática es un proceso esencial para la vida dado que mantiene el abastecimiento de glucosa al sistema nervioso central en momentos en que la ingestión de alimentos está restringida y las reservas de glucógeno agotadas. Los glucocorticoides tienen un efecto positivo sobre degradación de proteínas en músculo (Goldberg, 1969, 1975; Tomas y col., 1979; Goldberg y col., 1980), impiden la acumulación de proteínas (Henderson y col., 1971; Henderson y Loeb, 1974; Kim y Kim, 1975), lo que se traduce en un aumento en la movilización de aminoácidos como fuente importante de precursores

gluconeogénicos. Además de este efecto de los glucocorticoides incrementando la disponibilidad de aminoácidos para gluconeogénesis, algunos autores han demostrado *in vitro* una estimulación de gluconeogénesis hepática, inducida por glucocorticoides (Haynes, 1964; Uete y Ashmore, 1963; Eisenstein y col., 1964; Sistare y Haynes, 1985; Alan y Titheradge, 1984).

Aunque algunos autores han sugerido que la estimulación de gluconeogénesis por glucocorticoides se puede deber a un incremento en la velocidad de transporte de lactato a través de la membrana plasmática (Metcalf y col., 1990), la idea más generalizada es que el punto de acción de los glucocorticoides sobre la ruta gluconeogénica parece localizarse entre piruvato y fosfoenolpiruvato (Exton y col., 1970). Observaciones previas habían puesto de manifiesto que la adrenalectomía no disminuía la síntesis de glucosa a partir de fructosa (Exton y Park, 1965).

La inducción de la actividad de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa por glucocorticoides está firmemente establecida (Foster y col., 1966; Barnett y Wicks, 1971; Gunn y col., 1975; Krone y col., 1975,1976). El efecto se ejerce a nivel de transcripción (Iynedjian y Hanson, 1977; Schudt, 1980). Al parecer, los glucocorticoides ejercen además un efecto estabilizador del ARNm de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Petersen, Kock y Granner, 1989), protegiéndolo de la degradación.

La piruvato quinasa (PK) regula el flujo a través del ciclo fosfoenolpiruvato/piruvato. La regulación crónica de los ARNm de

la PK hepática por hormonas y factores nutricionales es extremadamente compleja. La actividad de PK, así como los niveles de los ARNm de la PK hepática, disminuyen durante el ayuno y la diabetes, mientras que son restaurados tras una dieta rica en hidratos de carbono y tras la administración de insulina (Miyonaga y col., 1982; Pool y col., 1982). No se ha demostrado un efecto *per se* de glucocorticoides en la regulación de la transcripción del gen que codifica para la PK, pero la presencia de glucocorticoides parece ser necesaria para una normal acumulación de los productos de la transcripción en el citoplasma (Vaulont y col., 1986). Por otra parte, los glucocorticoides ejercen un efecto permisivo sobre la acción de glucagón inhibiendo la transcripción del gen y acelerando la degradación del ARNm (Postle y Bloxham, 1982). También en cultivos primarios de hepatocitos, se requiere la presencia de glucocorticoides y de hormonas tiroideas para la estimulación de la expresión génica de PK por insulina y glucosa (Decaux y col., 1989).

Por otra parte, también existen evidencias de una modulación por glucocorticoides de la actividad del enzima fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6 bisfosfatasa. Este es un enzima bifuncional que cataliza tanto la síntesis como la degradación de la fructosa 2,6 bisfosfato, controlando por tanto la relación entre glucolisis y gluconeogénesis en hígado de mamífero. Es posible que este enzima bifuncional se originase por una fusión de genes (Bazan, Fletterick y Pilkis, 1989). Este enzima disminuye durante el ayuno y la diabetes y es restaurado por una dieta rica en

hidratos de carbono o tras la administración de insulina (Colosia y col., 1988). En animales adrenalectomizados, tanto los niveles de proteína como la de sus ARNm se encuentran disminuidos. Además, la administración de glucocorticoides incrementa los ARNm de dicha enzima (Marker y col., 1989). Este es un efecto directo de los glucocorticoides puesto que su adición a cultivos primarios de hepatocitos incrementa los niveles de ARNm unas 100 veces (Lange y col., 1989). La insulina y la tiroxina actúan sinérgicamente con los glucocorticoides induciendo la transcripción del gen que codifica para este enzima bifuncional.

A pesar de los efectos de glucocorticoides induciendo la síntesis de determinados enzimas de la ruta gluconeogénica, existen bastantes trabajos en la literatura que muestran cómo un aumento en la inducción de los niveles de ciertos enzimas, no siempre da cuenta de la activación de gluconeogénesis por glucocorticoides. Así por ejemplo, Gunn y col., (1975) demostraron que en animales normales, los glucocorticoides estimulan gluconeogénesis antes de que se produzca algún efecto sobre la síntesis de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). A su vez, en animales adrenalectomizados, la restauración de la gluconeogénesis después de un tratamiento con glucocorticoides tiene lugar antes de que la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa pueda ser activada (Exton y col., 1973). Así, los estudios de Haynes y col., (Adam y Haynes, 1969; Wakat y Haynes, 1977) y los de Martín y col., (1984), sugieren que la alteración en la velocidad de carboxilación de piruvato en la mitocondria, serían importantes en

la explicación de los primeros efectos de los glucocorticoides en la gluconeogénesis. El comienzo de esta respuesta, correlacionada cronológicamente con un aumento de gluconeogénesis (Rinard y col., 1969; Wakat y col., 1977), no requiere de una inducción de piruvato carboxilasa y parecería estar mediada por alteraciones en las concentraciones de moléculas efectoras (Martín y col., 1984). El trabajo realizado por Allan y Titheradge (1984) corrobora esta última hipótesis. Estos autores sugieren que la actividad de piruvato carboxilasa se encuentra restringida en el interior de la mitocondria por concentraciones de moléculas efectoras, y los glucocorticoides, junto con otras hormonas gluconeogénicas, actuarían liberando esta restricción al disminuir la concentración intramitocondrial de glutamato y aumentando las de acetil-CoA y ATP.

También Sistare y Haynes (1985), describieron un efecto directo de dexametasona estimulando la velocidad de gluconeogénesis, en una suspensión de hepatocitos de ratas controles y adrenalectomizadas, incubados con una mezcla de lactato y piruvato como precursores gluconeogénicos. Este efecto de dexametasona tampoco podría ser explicado por un aumento de la expresión génica, inducido por el glucocorticoide, ya que el efecto se instauraba muy rápidamente (9 minutos después de la administración de dexametasona) y no fue impedido por inhibidores de la síntesis de ARN y/o proteínas. Por otra parte, se requería aproximadamente entre 2 y 10 veces la concentración de dexametasona efectiva para inducir la síntesis de ciertas enzimas

(Crook y col., 1978; Rousseau y col., 1977). No obstante, la estimulación de gluconeogénesis resultó ser un efecto específico de glucocorticoides ya que otros esteroides como desoxicorticosterona y 5- $\beta$ -dihidrocortisol, así como los antiglucocorticoides 17- $\alpha$ -metiltestosterona, progesterona y cortexolona no produjeron ningún efecto, lo cual sugería la participación del receptor de glucocorticoides en la activación de gluconeogénesis por dexametasona. En base a estas observaciones, Sistare y Haynes propusieron un mecanismo de acción que podría implicar una modificación alostérica del componente de baja afinidad del sitio de unión de la molécula del receptor de glucocorticoides. Teleológicamente, un mecanismo de este tipo podría haberse desarrollado para que pueda producirse una respuesta rápida, a un aumento en los niveles circulantes de corticosterona en situaciones agudas de hipoglucemia y estrés.

Además de estos efectos, al parecer directos, de los glucocorticoides sobre el metabolismo de la glucosa, su efecto permisivo sobre la acción de otras hormonas, es el que les hace jugar un papel clave en la regulación metabólica. Fue Ingle, en 1952, quien observó por primera vez una acción permisiva de los glucocorticoides en la regulación de la gluconeogénesis por glucagón. En la década de los 60 Exton y Einstein independientemente describieron que el glucagón era incapaz de activar el flujo a través de la ruta gluconeogénica en hígados de ratas adrenalectomizadas en ayuno (Exton y col., 1966; Eisenstein y Strack, 1968). Este efecto permisivo de los glucocorticoides en la

respuesta gluconeogénica a glucagón ha sido observado también en cultivos primarios de células parenquimatosas de hígado de rata (Stumpo y Kletzien, 1981).

El control de gluconeogénesis por glucagón es, sin duda, un proceso complejo que implica acciones coordinadas sobre más de una ó dos reacciones claves. De igual modo la interacción glucagón-glucocorticoides no se limita a un único punto de la ruta. La presencia de glucocorticoides parece ser necesaria para la inducción de la actividad de PEPCK por glucagón (Gunn y col., 1975). Por otra parte, se ha descrito que la adrenalectomía impide la fosforilación y por ende la inhibición de actividad de la piruvato quinasa hepática, inducida por glucagón (Postle y Bloxham, 1982). La adrenalectomía también impide la inhibición de la transcripción del gen que codifica para la forma L de la PK inducida por glucagón (Vaulont y col., 1986). Chan (1984), mostró en hígado perfundido y en hepatocitos de ratas adrenalectomizadas, una sensibilidad disminuida a la acción de glucagón inhibiendo la actividad del enzima 6-fosfofructo-1-quinasa. De acuerdo con esta observación, Richards y Uyeda (1982) pudieron apreciar que la adrenalectomía disminuye el contenido hepático de fructosa 2-6 bisfosfato, el activador de 6-fosfofructo-1-quinasa (Claus y col., 1982). La administración de un glucocorticoide sintético, como dexametasona, a ratas adrenalectomizadas restauraba la respuesta gluconeogénica a glucagón (Friedmann y col., 1967). Dexametasona por si sola no incrementaba la producción de glucosa *de novo*. La pregunta que se plantearon a continuación resultaba obvia: por

qué el glucagón no podía activar gluconeogénesis en ausencia de los esteroides adrenales. Dado que el efecto del glucagón sobre gluconeogénesis está mediado por AMPc (Menahan y Wieland, 1967; Exton y Park, 1968; Park y Exton, 1972) se pensó que la activación de la adenilato ciclasa estaría impedida; sin embargo, esta posibilidad fue descartada, cuando se comprobó que la adrenalectomía no disminuía los niveles de AMP cíclico y que estos aumentaban normalmente tras la administración de glucagón (Exton y col., 1970). Por otra parte, tampoco se ha observado ningún impedimento en la activación de las proteínas quinasas dependientes de AMPc (Rousseau y col., 1976). Puesto que el problema no residía en la adenilato ciclasa, otra posibilidad a considerar fue una pérdida de sensibilidad de la ruta gluconeogénica a la activación por AMPc. Esta alternativa pareció confirmarse cuando se estudió la producción de glucosa en presencia de concentraciones crecientes de AMP cíclico en ratas adrenalectomizadas y en ratas intactas tanto alimentadas como mantenidas en ayuno (Exton y col., 1970).

Los glucocorticoides ejercen también una acción permisiva sobre la estimulación de gluconeogénesis por agentes  $\alpha$ -adrenérgicos (Exton y col., 1972, 1976). Los agentes  $\alpha$ -adrenérgicos estimulan gluconeogénesis en el tejido hepático por un mecanismo que no está aún bien caracterizado. No obstante, está bien documentado que la estimulación  $\alpha$ -adrenérgica de la gluconeogénesis requiere la presencia de calcio extracelular y la movilización de calcio de los almacenamientos intracelulares

(Rasmussen y Barret, 1984; Reinhart, 1984 a y b; Kraus-Friedmann, 1986; González-Manchón y col., 1988 b), aunque la interacción de los glucocorticoides con los agentes  $\alpha$ -adrenérgicos, en relación a la regulación de gluconeogénesis ha sido poco estudiada.

### 3.2.- SOBRE EL METABOLISMO DE LIPIDOS.

La regulación del metabolismo lipídico por glucocorticoides tiene lugar fundamentalmente interaccionando con el efecto de otras hormonas, particularmente insulina. Un efecto directo de glucocorticoides sobre lipólisis, solamente se ha descrito *in vitro* y con altas concentraciones de glucocorticoides.

Dosis pequeñas de estas hormonas dan lugar a un bloqueo de la reesterificación de ácidos grasos que parece ser secundario a una inhibición de la utilización de glucosa (Fain y Czech, 1975). Actualmente se piensa que la acción principal de los esteroides sobre el metabolismo lipídico es indirecta y que tiene lugar fundamentalmente modulando o permitiendo la acción de otras hormonas, en particular de la insulina. El efecto de la insulina sobre la movilización de ácidos grasos es bien conocido ( Witters y Trasko, 1979; Schade y col., 1979; Beynen y col., 1981; Burns y col., 1979; Nilsson y col., 1980) y la posible interacción entre la acción de glucocorticoides y de insulina ha sido propuesta desde hace bastante tiempo (Engel 1957; Scow, 1963; Scow y Chernick, 1960, 1970). Los trabajos de Krotkiewski y col., (1970) pusieron de

manifiesto esta interrelación entre corticoides e insulina, estudiando la liberación de glicerol por los adipocitos procedentes de ratas tratadas con dexametasona. A las cuatro horas de la administración del esteroide había aumentado significativamente los niveles de glicerol. Sin embargo, después de catorce días de tratamiento diario con dexametasona, la cantidad de glicerol liberado por los adipocitos fue menor que la de los controles. Simultáneamente a este efecto, observaron que la concentración plasmática de insulina se había duplicado.

Los corticosteroides también parecen interaccionar con otras hormonas en el proceso de lipólisis. Se sabe que la dexametasona en ausencia de glucosa, apenas tiene efecto sobre lipólisis en adipocitos aislados; sin embargo, estimuló significativamente el efecto lipolítico de la hormona de crecimiento (Fain y col., 1965). Además se ha observado que esta respuesta está bloqueada por inhibidores de sintasas de ARN y de síntesis de proteínas (Fain y col., 1965; Fain y Saperstein, 1970).

Por otra parte, se sabe que la acción lipolítica de dexametasona y de hormona de crecimiento *in vitro* es antagonizada por insulina (Fain y col., 1966). Parece ser que una cantidad de insulina insuficiente para estimular el metabolismo de glucosa en adipocitos aislados fue capaz de disminuir la lipólisis mediada por estas hormonas. Concentraciones más altas de insulina bloquean completamente el efecto lipolítico de glucocorticoides y de hormona de crecimiento.

La interacción entre corticosteroides e insulina parece tener lugar también sobre lipogénesis (Ashby y Robinson, 1980). Según estos autores, existe una lipoproteína lipasa, sintetizada en el adipocito y localizada en el endotelio capilar del tejido adiposo, cuya actividad estaría regulada positivamente por una acción combinada de los niveles circulantes de insulina y de corticoides. Según esta hipótesis, tras la ingestión de alimento la concentración plasmática de insulina se eleva activando la síntesis del enzima, con lo cual, se estimula el transporte de triglicéridos hacia el tejido adiposo y los esteroides adrenales potenciarían este efecto. La adrenalina, en este caso, sería el antagonista, ya que se ha observado que inactiva el enzima antes de su liberación por el adipocito.

La relación glucocorticoides/insulina afecta también a la síntesis de fosfatidato fosfohidrolasa, un enzima clave en la síntesis de fosfolípidos y triglicéridos en hígado (Lawson y col., 1982 a,b). Por otra parte, un aumento en los niveles de corticosterona *in vivo* se acompaña de un aumento en la actividad de fosfatidato fosfohidrolasa (Brindley y col., 1979). La actividad de este enzima requiere su translocación desde el citosol a la membrana donde ocurre la síntesis de glicerofosfolípidos (Cascales y col., 1984). Estos autores pusieron de manifiesto que alteraciones de ácidos grasos circulantes, que se producen por ejemplo en la diabetes, el estrés o en la insuficiencia suprarrenal, pueden jugar un papel importante determinando la capacidad del tejido hepático para sintetizar triglicéridos, en función de la disponibilidad de

ácidos grasos, mediante cambios en la actividad del enzima fosfatidato fosfohidrolasa.

El efecto permisivo de los glucocorticoides en la estimulación de lipólisis, inducida por catecolaminas, en el tejido adiposo está bien documentada (Shafrir y Kerpel, 1964; Allen y Beck, 1972; Fernández y Saggerson, 1978; Lacasa y Giudicelli, 1983). La disminución de la respuesta lipolítica en adipocitos de animales adrenalectomizados se revierte tras la administración de glucocorticoides (Maickel y col., 1967; Mazancourt y col., 1990). Existen dudas respecto a la etapa alterada. Corbin y Park (1969) encontraron que la acumulación de AMPc en presencia de epinefrina no varió significativamente en adipocitos de ratas adrenalectomizadas, por esta razón pensaron que la triglicérido lipasa tenía reducida su sensibilidad a la activación por AMPc. De acuerdo con esto, se observó que la adrenalectomía distorsionaba la respuesta lipolítica a la administración de AMPc exógeno. Otros autores, por el contrario, han encontrado una marcada disminución en los niveles de AMPc en adipocitos de ratas adrenalectomizadas (Mazancourt y col., 1989).

Respecto a la influencia de la adrenalectomía en la estimulación de adenilato ciclasa en el tejido adiposo, por catecolaminas existen también datos conflictivos en la literatura. Algunos autores no encontraron cambios en la actividad del enzima (Allen y Beck, 1972; Braun y Hechter, 1970) mientras otros autores han descrito una menor activación de adenilato ciclasa en

respuesta a catecolaminas (Werner y Löw, 1974; Scarpace y col., 1988). La adrenalectomía parece afectar tanto a la actividad de adenilato ciclasa (Mazancourt y col., 1989, 1990) como a la activación del enzima por nucleótidos de guanina (Thotakura y col., 1982).

En 1982 Thotakura y col., observaron en membranas de adipocitos de ratas adrenalectomizadas, una disminución del número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos así como un defecto en la capacidad del GTP para estimular la adenilato ciclasa y, consiguientemente una disminución de la estimulación de la adenilato ciclasa por catecolaminas, en presencia de nucleótidos de guanina. Sin embargo, el mecanismo por el cual la adrenalectomía disminuye la respuesta lipolítica a catecolaminas en el adipocito, no parecía estar relacionado con las alteraciones anteriores, sino con una potenciación del efecto antilipolítico de adenosina, ya que el tratamiento con adenosina deaminasa revertía los efectos de la adrenalectomía. Los niveles celulares de adenosina parecen jugar un papel importante en la disminución de la respuesta lipolítica tras la adrenalectomía (Fernández y Saggerson, 1978; Saggerson, 1980). Asimismo se ha demostrado un aumento en la concentración de adenosina en adipocitos de animales adrenalectomizados (Green y col., 1981). No existe un acuerdo acerca del mecanismo mediante el cual la adenosina disminuye los niveles de AMPc. Algunos autores (Rodbell, 1980) sostienen que la adenosina inhibe la actividad de adenilato ciclasa en presencia de GTP, mientras que otros autores sugieren un efecto de adenosina

incrementando la actividad de AMPc fosfodiesterasa (Thotakura y col., 1982; Allen y Beck, 1972).

Hasta el momento, no existen evidencias experimentales que demuestren, de forma inequívoca, que la disminución en la actividad de adenilato ciclasa observada en el tejido adiposo de animales adrenalectomizados sea mediada por una alteración en la función de proteínas G reguladoras. No obstante, estudios recientes muestran que la adrenalectomía disminuye los niveles estacionarios de las subunidades  $\alpha$ -G<sub>s</sub>,  $\beta$ -G<sub>35/36</sub> de la adenilato ciclasa, a la vez que aumentan las de la  $\alpha$ -G<sub>i</sub> (Ros y col., 1989; Mazancourt y col., 1989). Los glucocorticoides son capaces de incrementar la expresión de la subunidad  $\alpha$  de la G<sub>s</sub> en células GH3 (Chang y Bourne, 1987) y de G<sub>i</sub> y G<sub>s</sub> en células ROS 17/2,8 de osteosarcoma (Rodan y Rodan, 1986). Puesto que se conoce la existencia de receptores de glucocorticoides en adipocitos (Feldman y Loose, 1977), la alteración en los niveles de proteínas G sugiere la posibilidad de que la expresión de algunos componentes del sistema adenilato ciclasa pudiera estar controlada por glucocorticoides. De esta manera, los glucocorticoides, al igual que las hormonas tiroideas, podrían regular diferencialmente los niveles estacionarios de los diferentes componentes de la adenilato ciclasa sensible a hormonas. Cambios en las proporciones de las subunidades  $\alpha:\beta/\gamma$  podrían alterar la respuesta celular a una determinada hormona. La disminución en la cantidad existente en el equilibrio de la subunidad  $\alpha$ -G<sub>s</sub>, junto con los cambios en la actividad catalítica de adenilato ciclasa (Mazancourt y col., 1989) y

posiblemente en la actividad de la fosfodiesterasa (Mangianello, Vanghan 1973; Thotakura y col., 1982), podrían explicar, al menos en parte, la menor acumulación de AMPc y lipólisis en adipocitos de ratas adrenalectomizadas; sin embargo, la escasa correlación entre la acumulación de AMPc (estimulado por el forskolina) y lipólisis, encontrada en adipocitos de ratas adrenalectomizadas sugiere que etapas posteriores al acúmulo de AMPc, como por ejemplo las lipasas, podrían estar regulados por glucocorticoides (Ros, Northup y Malbon 1989).

#### 4.- OBJETIVOS DE ESTA TESIS Y SU JUSTIFICACION.

En términos generales, el objetivo de este trabajo ha sido profundizar en el conocimiento del papel que desempeñan los glucocorticoides en la regulación de la ruta gluconeogénica por ácidos grasos y por catecolaminas. De forma sucinta, los objetivos generales perseguidos en el trabajo experimental objeto de esta tesis han sido:

- 1.- Estudio del papel de los glucocorticoides en la regulación de la gluconeogénesis hepática por ácidos grasos.
- 2.- Estudio del papel de los glucocorticoides en la respuesta metabólica a agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos.

Un hecho clínico bien conocido es que la insuficiencia suprarrenal conlleva una incapacidad para tolerar el ayuno. Períodos cortos de ayuno dan lugar a un cuadro de hipoglucemia que puede comprometer la vida del paciente. Long y col., (1940) demostraron que dicha hipoglucemia es consecuencia de una disminución de la capacidad hepática de producir glucosa. Dado que los glucocorticoides tienen una clara acción proteolítica sobre el tejido muscular (Goldberg, 1969, 1980), la deficiencia de glucocorticoides podría dar lugar a una menor disponibilidad de aminoácidos para la síntesis de glucosa *de novo*. En el animal intacto es posible que este mecanismo tenga importancia cuantitativa; no obstante, estudios con órganos o con células aisladas de animales adreoprivos han permitido demostrar una alteración de la ruta gluconeogénica (Haynes, 1964; Sistare y

Haynes, 1985). La perturbación de dicha ruta estaría localizada en alguna de las etapas que comprenden la transformación de piruvato en fosfoenolpiruvato (Exton y col., 1970). La adrenalectomía no perturba la gluconeogénesis a partir de substratos que inciden en la ruta gluconeogénica a nivel de triosa fosfato (Exton y Park, 1965).

El efecto permisivo de los glucocorticoides sobre la estimulación de gluconeogénesis por glucagón ha sido muy estudiado (Exton y col., 1966; Eisenstein y Strack, 1968). Sin embargo, el papel de los glucocorticoides en la regulación de gluconeogénesis por ácidos grasos o catecolaminas, cuyos niveles plasmáticos también aumentan durante el ayuno, está prácticamente inexplorado. El interés de la influencia de la adrenalectomía en la regulación de gluconeogénesis por ácidos grasos viene justificado por el hecho de que existe un gran número de trabajos en la literatura que sugieren la existencia de una correlación positiva entre niveles plasmáticos de ácidos grasos y tasa de gluconeogénesis hepática. Situaciones fisiológicas o patológicas como el ayuno, hipertiroidismo o la diabetes que se caracterizan por cursar con un aumento de gluconeogénesis van acompañadas de un aumento en la movilización y oxidación de ácidos grasos (Parrilla, 1978; Hales y Hyans, 1964; Cahill y col., 1966). En los animales adrenoprivos parece ocurrir la situación inversa, es decir, junto a una disminución en los niveles circulantes de ácidos grasos (Spirovski y col., 1975; Gauthier y col., 1986) se ha descrito una disminución de la tasa de gluconeogénesis. Sin

embargo, hasta el momento, la posible interacción glucocorticoides-ácidos grasos en el control de la gluconeogénesis no ha sido estudiada.

Los estimulantes  $\alpha$ -adrenérgicos desempeñan un importante papel en el control de gluconeogénesis. Sin embargo, curiosamente, tampoco se ha estudiado con detalle la interacción de glucocorticoides con agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos en la regulación de gluconeogénesis.

En este trabajo hemos prestado particular atención a la relación existente entre la activación del metabolismo energético (respiración hepática) y la estimulación de gluconeogénesis. Para ello, hemos estudiado la respuesta hepática a ácidos grasos y a agentes  $\alpha$ -adrenérgicos en ratas adrenalectomizadas y en ratas sometidas a una operación simulada.

La acción de agentes como ácidos grasos y ciertas hormonas cursa con un incremento de la tasa hepática de consumo de oxígeno (Halestrap y Dunlop, 1986; González-Manchón y col., 1988 a,b; González-Manchón y col., 1989). Sin embargo, el papel que juega la estimulación de respiración en la activación de los procesos biosintéticos no está aún claramente establecido. La idea más generalizada es que un aumento de respiración, independientemente de cual sea la causa que lo origina, estimularía la tasa de gluconeogénesis suministrando energía (Quinlan y Halestrap, 1986; Kraus-Friedman, 1986). Esta hipótesis, aunque apoyada por evidencias experimentales, no está de

acuerdo con el concepto vigente acerca del control de respiración, que apunta a que un incremento en las demandas energéticas es la causa y no la consecuencia del aumento del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria (Tager y col., 1983). Trabajos recientes de nuestro laboratorio (González-Manchón y col., 1988 a) han puesto de manifiesto que la estimulación de respiración hepática inducida por ácidos grasos supera la demanda energética del proceso de gluconeogénesis. Esta descompensación del balance energético no se debe a una acción desacoplante de los ácidos grasos sobre la cadena respiratoria ya que se pudo observar que la administración de un substrato energético, después de haber estimulado la respiración hepática con octanoato, producía un incremento en el consumo de oxígeno que estequiométricamente daba cuenta del aumento de producción de glucosa (González-Manchón y col., 1988 a). La energía derivada de la oxidación de ácidos grasos parece utilizarse fundamentalmente en incrementar la tasa de cetogénesis. La utilización de hígados de ratas adrenoprivas nos ha permitido disociar los efectos de ácidos grasos, incrementando las tasas de respiración y cetogénesis de su acción sobre la ruta gluconeogénica.

Por otra parte, una característica que acompaña la respuesta celular a agentes  $\alpha$ -adrenérgicos es también un aumento de la respiración hepática (Jacob y Diem, 1975; Reinhart y col., 1982). Algunos autores han sugerido que la acción primaria de los agentes  $\alpha$ -adrenérgicos sería la estimulación de la cadena respiratoria (Yamazaki, 1975; Halestrap y col., 1985) y que los

equivalentes de reducción serían suministrados por la estimulación de la oxidación de ácidos grasos inducidos por estos agentes (Quinlan y Halestrap, 1986). Tampoco en el caso de la estimulación  $\alpha$ -adrenérgica parece existir una relación causa-efecto entre el aumento de respiración y la estimulación de gluconeogénesis. La administración de fenilefrina a hígados aislados y perfundidos en ausencia de sustratos produce un aumento considerable de respiración hepática cuando la tasa de gluconeogénesis es prácticamente despreciable (González-Manchón y col., 1988 b). La estimulación del metabolismo energético, inducido por fenilefrina, pudiera estar relacionado con los movimientos de iones a través de la membrana plasmática que se producen en respuesta al agonista  $\alpha$ -adrenérgico (Althaus-Salzman y col., 1980; Haüssinger y col., 1987; Reinhart y col., 1984). Dado que la integridad celular requiere el mantenimiento de gradientes electroquímicos, a través de la membrana plasmática, parece lógico pensar que la estimulación de flujos iónicos, inducida por fenilefrina, conlleve la activación de algunos sistemas de bombeo iónico con el consiguiente consumo energético. Por esta razón, hemos prestado atención a la respuesta ionotrópica a fenilefrina en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas.

Los trabajos de Rasmussen y Tenenhouse, (1968) y los de Exton y col., (1972), sugirieron la posibilidad de que la acción permisiva de los glucocorticoides pudiera estar relacionada con el mantenimiento del ambiente iónico intracelular, induciendo la síntesis de las proteínas encargadas del transporte de iones a

través de las membranas celulares, de manera que se preservara la sensibilidad de los procesos fisiológicos a AMPc. Estos autores se basaron en los efectos conocidos de los esteroides adrenales sobre el transporte de calcio en el intestino (Harrison y Harrison, 1960), en el movimiento de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en muchos tipos celulares, y en el hecho de que cambios en la distribución de estos iones pueden alterar los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Reuter y Seitz, 1968; Blaustein y Hodgkin, 1969) y afectar por este mecanismo la acción de hormonas mediadas por un aumento en la concentración celular de AMPc (Rasmussen, 1970). Curiosamente, estos trabajos tuvieron escasa repercusión y no tenemos constancia de que se haya propuesto un mecanismo similar para explicar los efectos permisivos de los glucocorticoides sobre la acción  $\alpha$ -adrenérgica. En la última década se ha avanzado considerablemente en el conocimiento del mecanismo de acción de los agentes  $\alpha$ -adrenérgicos. La unión de los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos da lugar a una serie de acontecimientos, mediados por proteínas G, que conducen a un aumento en la hidrólisis de fosfoinosítidos y a un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico. Paralelamente se produce una redistribución de los iones  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}^+$  y un aumento en la tasa de consumo de oxígeno.

La carencia de esteroides suprarrenales puede influir en uno ó más puntos de esta secuencia de acontecimientos. Nuestro trabajo se ha centrado fundamentalmente en el estudio de la influencia de la adrenalectomía sobre las respuestas respiratoria,

presora e ionotrópica de fenilefrina en relación al papel de los  $\alpha$ -agonistas en el control de la gluconeogénesis hepática.

Hasta el momento, no existe apenas ningún estudio acerca del posible papel de los glucocorticoides en la respuesta ionotrópica hepática a  $\alpha$ -agonistas. Recientemente Borle y Studer, (1990) han descrito una perturbación en los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por fenilefrina en hepatocitos de ratas adrenalectomizadas, que pudiera estar mediada por una alteración en la ATP-asa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{Mg}^{2+}$ . La relación entre perturbación de flujos de  $\text{Ca}^{2+}$ , y posiblemente de otros iones, en respuesta a agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos en animales adreoprivos y los cambios en las respuestas energética y metabólica, hasta el momento, no han sido estudiados.

## 5.- PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Para la realización de este trabajo hemos utilizado como modelo experimental una preparación de hígado perfundido. El aislamiento de un órgano y el estudio de su actividad funcional facilita la posibilidad de obtener información en condiciones controladas.

El hígado contiene distintos tipos celulares cuya localización respecto a la vasculatura hepática varía y que están especializados en la realización de distintas funciones. Las células parenquimatosas constituyen el 80-90% del hígado (Blomhoff, 1987) y participan fundamentalmente en el metabolismo de hidratos de carbono, aminoácidos, lípidos y xenobióticos. De ahí que la mayoría de los estudios de regulación del metabolismo de hidratos de carbono se haya centrado en la maquinaria metabólica de este tipo de células. Sin embargo, en los últimos años se ha venido prestando atención al hecho de que la interacción entre los distintos tipos celulares y la vasculatura hepática puede jugar un papel relevante en la regulación del metabolismo de hidratos de carbono en determinadas condiciones fisiológicas o patofisiológicas. Así, por ejemplo, algunos agentes como prostaglandina E<sub>2</sub>, factor estimulador de plaquetas (PAF) o tromboxanos, producen una respuesta glucogenolítica a concentraciones similares a las halladas en condiciones patofisiológicas como el trauma (Meren y col., 1987; Buxton y col., 1987; Fisher y col., 1987), pero no producen efecto alguno en suspensiones de hepatocitos aislados (Buxton y col.,

1987; Fisher y col., 1987). El mecanismo de acción de estos agentes podría estar relacionado con un efecto vasoconstrictor (Buxton y col., 1986; Hill y Olson, 1987). El flujo sanguíneo a través de la vasculatura hepática es sensible a regulación hormonal y neural (Lautt y Greenway, 1976; Reilly y col., 1981). Ello ha llevado a considerar que la distribución intrahepática de sangre, en respuesta a ciertos estímulos, pueda ser también un elemento regulador del metabolismo hepático.

La utilización del hígado aislado y perfundido, en circuito abierto, ofrece la ventaja, que creemos esencial para nuestros objetivos, de poder mantener condiciones estacionarias en el suministro de substratos, a concentraciones fisiológicamente relevantes. Por otra parte, la posibilidad de determinar diferencias arteriovenosas en la concentración de substratos permite realizar estudios estequiométricos precisos.

En todos los experimentos realizados con hígado perfundido hemos llevado a cabo un registro continuo de la presión parcial de oxígeno, que consideramos de gran ayuda para determinar cuando la preparación alcanza una tasa estacionaria de respiración.

De forma rutinaria los hígados fueron perfundidos durante 25-30 min. antes de comenzar la administración de substratos y hormonas. La forma original de administración de substratos en algunos de estos experimentos ha proporcionado interesantes resultados. Nos referimos a la administración incrementando su concentración de forma lineal mediante formadores de gradientes,

diseñados especialmente para este fin. Esta forma de administración de substratos ha resultado ser más eficaz que la administración de concentraciones fijas hasta alcanzar situaciones estacionarias, debido a la reproductibilidad y gran cantidad de información que se puede obtener en un solo experimento.

En este trabajo hemos estudiado la influencia de la adrenalectomía sobre las acciones metabólicas de octanoato y de fenilefrina. En la elección de octanoato, un ácido graso de cadena media, para la realización de este estudio se ha tenido en cuenta no solamente su solubilidad sino también que no se transforma prácticamente en triacilglicerol (Fritz, 1961), no interacciona con el enzima fructosa bisfosfatasa (Baxter y col., 1972) y que no requiere carnitina palmitoiltransferasa para su transporte a través de la membrana mitocondrial (Aas, 1971).

Para la caracterización de la respuesta  $\alpha$ -adrenérgica en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas se ha utilizado un equipo de perfusión que permite la detección simultánea de presión portal,  $pO_2$ ,  $pK^+$ ,  $pCa^{2+}$  y  $pH$ , según se describe en el apartado de Métodos. La dificultad de detectar variaciones de magnitud micromolar en un medio con alto contenido en sales y que presenta una concentración de  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  de 1mM y 6mM, respectivamente, pudo resolverse utilizando electrodos selectivos conectados a amplificadores que permiten medir con precisión señales de microvoltios. Las señales analógicas del electromanómetro y de los electrómetros utilizados como

detectores de iones fueron digitalizados en un conversor analógico digital dotado de un multiplexor, y enviados a un ordenador mediante una puerta de comunicación IEE488 (GPIB). Este sistema ha permitido la obtención de datos de gran interés al permitir relacionar los efectos hemodinámicos e ionotrópicos, inducidos por fenilefrina, con la actividad metabólica del tejido hepático. Hay que destacar que se han podido detectar cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^{+}$  en el efluente hepático sin necesidad de alterar la composición iónica del medio de perfusión ni de añadir agentes quelantes como se venía haciendo hasta el momento.

## **MATERIALES Y METODOS**

### 1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

En este trabajo hemos utilizado ratas macho raza Wistar, de 160-190 gramos de peso, mantenidas hasta su uso, en condiciones controladas de luz (ciclos de 12 horas de luz-oscuridad), temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad en el animalario del Centro de Investigaciones Biológicas. Según se indique, los animales fueron alimentados *ad libitum*, con pellets para rata Panlab o sometidos a ayuno durante 48 horas antes de su utilización experimental.

### 2.- REACTIVOS.

La mayor parte de los reactivos utilizados fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Luis, Mo, U.S.A.) y en Merck (Darmstadt, Alemania). Los enzimas fueron adquiridos en Boehringer (Mannheim, Alemania). El glucocorticoide administrado a los animales (Hemissuccinato sodico de 6-metilprednisolona) era de los laboratorios Hoechst Iberica, S.A. Barcelona, el resto de los glucocorticoides y mineralocorticoides utilizados fueron de Sigma Chemical.

### 3.- MANIPULACION DE ANIMALES, TRATAMIENTO Y TOMA DE BIOPSIAS.

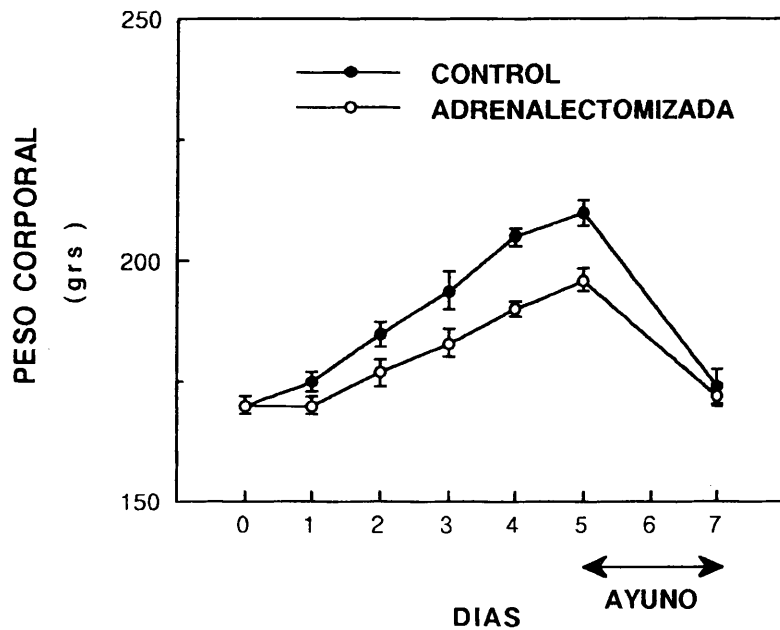
La adrenalectomía se realizó una semana antes de la fecha prevista para la realización del experimento. Para ello, una vez anestesiada la rata con éter, se afeita la zona a operar y se hacen dos incisiones dorsales, a ambos lados de la columna vertebral, por

debajo del reborde costal. Una vez extraídas las cápsulas suprarrenales se dan dos puntos de sutura en la capa muscular y otros dos o tres en la piel. Las cápsulas fueron examinadas con lupa, para comprobar que no habían sufrido ningún tipo de rotura o desgarro en el proceso de extirpación de las mismas. A los animales adrenalectomizados se les administró en el agua de bebida una solución de NaCl al 0,9 %. Los animales utilizados como control fueron sometidos a una operación simulada, en la que se les practicaron las dos incisiones dorsolaterales, sin extirparles las cápsulas, y se procedió de igual manera en la sutura.

Tras la intervención quirúrgica, los animales fueron pesados diariamente. La figura 2 recoge el efecto de la adrenalectomía sobre el desarrollo corporal. Mientras en las ratas sometidas a una operación simulada no se observó impedimento alguno en su desarrollo corporal, las ratas adrenalectomizadas mostraron una menor tasa de ganancia de peso, que las ratas controles.

La tabla I, recoge alguno de los efectos característicos que produce la extirpación de las glándulas suprarrenales. De acuerdo con observaciones previas (Hers y col., 1970; Landau, 1965) la adrenalectomía conlleva una disminución, en los niveles circulantes de glucosa y en el contenido hepático de glucógeno, más acusada cuando los animales son sometidos a un período de ayuno de 48 horas. Paralelamente, de acuerdo con los trabajos de Vanlan y col., 1974, los niveles de insulina disminuyen en aproximadamente un 50% en ratas adrenalectomizadas

**FIGURA 2**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL DESARROLLO**  
**CORPORAL.**



Ratas de aproximadamente 170 gramos de peso fueron adrenalectomizadas (-o-) o sometidas a una operación simulada (-•-) según se describe en Métodos. Los animales fueron pesados diariamente durante, los cinco días siguientes a la intervención quirúrgica y después de un período de ayuno de 48 horas. Los resultados son la media de, al menos, 40 observaciones  $\pm$  el error estándar de la media.

TABLA I

**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE GLUCOSA E INSULINA Y EL CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO.**

AYUNO (días)	GRUPO	NIVELES PLASMATICOS DE		CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO (mg/g de tejido)
		GLUCOSA (mM)	INSULINA ( $\mu$ U/ml)	
0	CONTROL	12 $\pm$ 0,3	42 $\pm$ 3	55 $\pm$ 4
	ADX	10 $\pm$ 0,3*	25 $\pm$ 5**	42 $\pm$ 4
2	CONTROL	6,6 $\pm$ 0,5	15 $\pm$ 3	3 $\pm$ 0,6
	ADX	3,5 $\pm$ 0,2***	8 $\pm$ 0,8****	0,3 $\pm$ 0,07***

\*p<0,01      \*\*p<0,001      Respecto al control en ratas alimentadas.  
 \*\*\*p<0,01      \*\*\*\*p<0,001      Respecto al control en ratas mantenidas  
 en ayuno durante 48 horas.

Ratas controles y adrenalectomizadas fueron sacrificadas 7 días después de la intervención quirúrgica. Para la determinación del contenido hepático de glucógeno se tomaron biopsias hepáticas ligando el lóbulo correspondiente para prevenir pérdidas de sangre. Inmediatamente después se tomaron muestras de sangre de la aorta, en su bifurcación ilíaca para la determinación de los niveles de glucosa e insulina en plasma. Los resultados son la media de 3-13 observaciones  $\pm$  el error estándar de la media.

alimentadas *ad libitum* o sometidas a un período de ayuno de 48 horas.

En algunos casos, las ratas adrenalectomizadas fueron tratadas *in vivo* con dosis sustitutivas de glucocorticoides o mineralocorticoides, la prednisolona fue administrada por vía intramuscular 24 y 12 horas antes del comienzo del experimento. En cada inyección se puso 1mg del corticoide disuelto en 0,1ml de agua destilada. La dexametasona y la aldosterona fueron administradas subcutáneamente y la dosis elegida fue de 0,1mg/Kg de peso corporal. Las dos hormonas fueron diluídas en suero salino y la cantidad total que se debía inyectar se dividió en dos dosis iguales diarias, incluyendo la mañana del día del experimento. Las dosis diarias de glucocorticoides y mineralocorticoides fueron elegidas de forma que se aproximasen a los niveles fisiológicos de su producción. La dexametasona fue elegida porque no se une virtualmente a sitios de unión de mineralocorticoides ni tiene actividad mineralocorticoide (Feldman y col., 1972; Hierholzer y Lange, 1974). La dosis elegida de aldosterona es equivalente a la de secreción de dicha hormona en ratas con una dieta normal (Bastl, Binder y Hayselett, 1980).

La tabla II muestra cómo el tratamiento con prednisolona y dexametasona a ratas adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48 horas, fue efectivo incrementando los niveles de glucosa y el contenido hepático de glucógeno.

**TABLA II**

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO *IN VIVO* CON  
GLUCOCORTICOIDES Y ALDOSTERONA A RATAS  
ADRENALECTOMIZADAS SOBRE LOS NIVELES DE  
GLUCOGENO Y DE GLUCOSA.**

TRATAMIENTO	GLUCOSA (mM)	GLUCOGENO mg/g tejido
-----	3,52±0,18	0,32±0,08
PREDNISOLONA	5,1±0,66*	10,6±2,9*
DEXAMETASONA	nd	13,5±3,1*
ALDOSTERONA	nd	0,59±0.26**

\*p < 0,01

\*\* ns

Ratas adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48 h., fueron tratadas con dosis sustitutivas de prednisolona, dexametasona o aldosterona, según se describe en Métodos. La determinación de los niveles plasmáticos de glucosa y del contenido hepático de glucógeno se efectuó como se describe en Métodos. Cada valor es la media de 7-13 observaciones ± el error estándar de la media.

Cuando fue necesaria la toma de biopsias hepáticas, se procedió anestesiando la rata vía intraperitoneal (Nembutal, 50mg/kg peso) y tras realizar una incisión abdominal media, se cortó uno de los lóbulos hepáticos que fue inmediatamente congelado con unas pinzas con bloques de aluminio en su extremo distal (Wollenberger y col., 1960), diseñadas y construídas en el Servicio de Instrumentacion del Centro de Investigaciones Biologicas (C.S.I.C.), enfriadas previamente en nitrógeno líquido. Las biopsias se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

#### **4.- PERFUSION HEPATICA.**

El modelo experimental utilizado fue el hígado aislado y perfundido. Este método consiste en la perfusión del sistema vascular hepático con una solución tampón en la que se disuelven los substratos y/o agentes cuya acción se quiera estudiar. Posteriormente se analiza el efluente determinando las tasas de utilización y/o producción de los distintos metabolitos.

##### **4.1.- MEDIO DE PERFUSION.**

La solución tampón fue Krebs-Ringer bicarbonato (Krebs y Henseleit, 1932), equilibrado, mediante un oxigenador termostatzado, con una fase gaseosa de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5,v/v) para conseguir un pH de 7,4 y una temperatura de 36°C. Esta solución tampón fue preparada inmediatamente antes de su uso con agua

calidad reactivo, tiene una osmolaridad de 303 mosm y su composición es la siguiente: NaCl 124,76 mM, NaHCO<sub>3</sub> 19,04 mM, H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> 1,19 mM, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,19mM, KCl 4,79 mM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM. En los experimentos realizados con medio de perfusión libre de sodio se añadió la cantidad necesaria de cloruro de colina para mantener la osmolaridad del medio.

Los distintos substratos se administraron diluídos en el medio de perfusión, alternando su administración mediante llaves de paso intercaladas entre la bomba peristáltica y el fluido de perfusión.

En algunos experimentos la concentración de substrato se incrementó de forma lineal mediante un formador de gradientes.

#### 4.2.- TECNICA OPERATORIA.

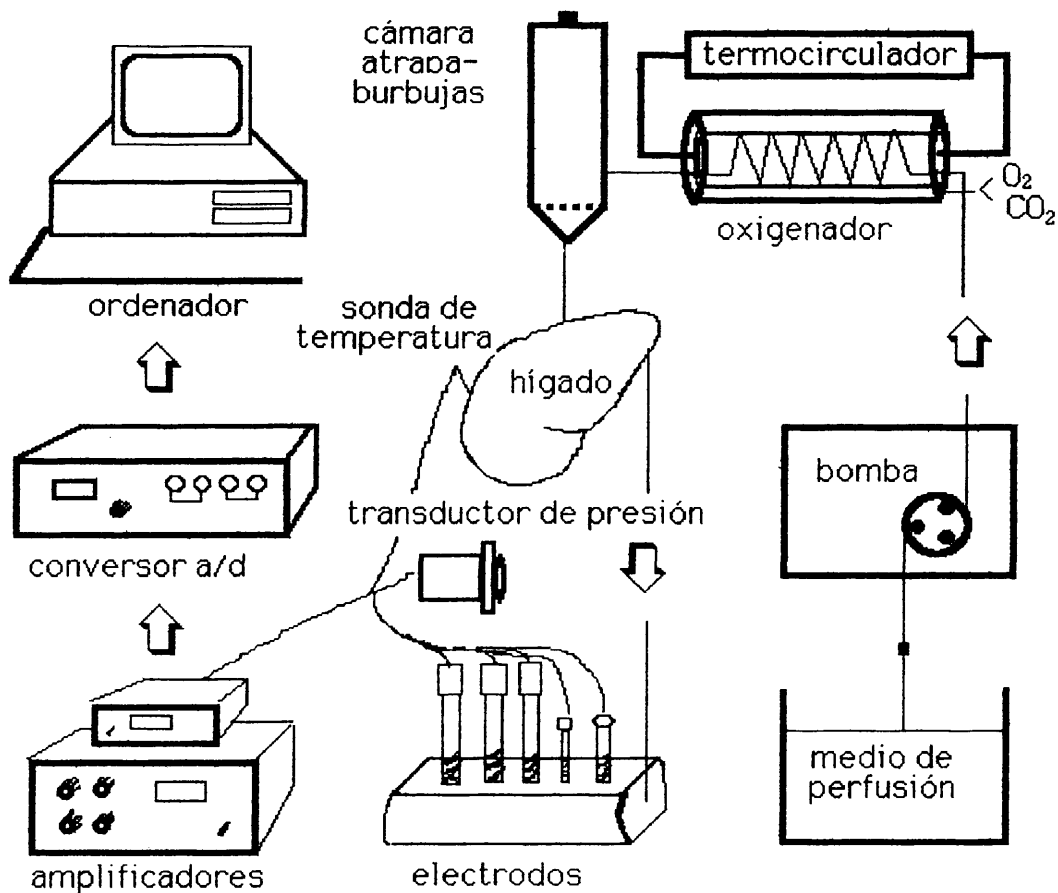
Una vez anestesiada la rata con (Nembutal 50 mg/Kg peso.) se practica una incisión abdominal media, y se retiran las vísceras al lado izquierdo del animal para exponer la vena porta. Después, se colocan ligaduras en las venas porta y cava inferior por encima de las venas renales. A continuación se procede a la canulación de la vena porta mediante una pequeña incisión para introducir el catéter por el que fluye el tampón a una velocidad aproximada de 30 ml/min. Inmediatamente después de ligar el catéter se seccionan los vasos abdominales a la altura de la bifurcación pélvica para conseguir el drenaje rápido de sangre y evitar la edematización del órgano. Después de la disección del tracto

gastrointestinal, se abre la cavidad torácica y se canula la vena cava inferior a través de una incisión practicada en la aurícula derecha. Entonces se ata fuertemente la ligadura colocada en la cava inferior por encima de las venas renales, con lo que el fluido de perfusión que sale del hígado es recogido a través de la segunda cánula. Para evitar manipulaciones innecesarias, el hígado fue mantenido *in situ* durante la perfusión. Los principales criterios seguidos para evaluar el estado de las preparaciones fueron las determinaciones de presión portal y de consumo de oxígeno.

#### 4.3.- EQUIPO DE PERFUSION HEPATICA.

El sistema de perfusión está representado esquemáticamente en la figura 3. La bomba peristáltica (Masterflex Computerized Drive, Cole-Parmer Inst. Co.) permite la progresión del fluido de perfusión a través del circuito, así como la regulación de la velocidad del flujo. El oxigenador consta de dos cilindros concéntricos, separados por una cámara por la que circula continuamente la mezcla gaseosa con la que se equilibra el medio de perfusión. Este fluye a través de un tubo de silastic enrollado sobre el cilindro interno. El silastic es un material permeable sólo a los gases, consiguiéndose una perfecta oxigenación del medio de perfusión. Por el cilindro interno del oxigenador circula agua a temperatura controlada por un termocirculador (Haake D8-L Mess-Technik Grubh Co.).

**FIGURA 3**  
**DISPOSICION ESQUEMATICA DE LOS DISTINTOS ELEMENTOS DEL**  
**SISTEMA DE PERFUSION HEPATICA UTILIZADO.**



Las características de los distintos elementos de los sistemas de perfusión y de adquisición de datos han sido descritos en el apartado 4 de Métodos.

Una vez oxigenado y atemperado, el fluido de perfusión pasa por una cámara de metacrilato cuya función es filtrar y atrapar posibles burbujas. El medio de perfusión penetra en la cámara en la parte media a fin de que las burbujas asciendan y de la parte inferior de la cámara parte el catéter que llega a la vena porta. El efluente hepático se hace pasar a través de células de flujo continuo donde se encuentran adaptados los electrodos selectivos para  $pCa^{2+}$ ,  $pK^+$  y  $pH$ , con una referencia común, y un electrodo de platino tipo Clark para determinación de  $pO_2$ . Estos electrodos tienen una resistencia interna muy alta que dificulta la detección de pequeñas variaciones de voltaje. El problema de medir cambios iónicos en el medio fisiológico requería un equipo que permitiera la apreciación de variaciones de muy pequeña intensidad sobre la base de niveles iónicos fisiológicos, es decir, un equipo preparado para discernir débiles incrementos frente a una señal de fondo mucho mayor. Con los amplificadores (Single channel meter SOM-1 Recording p10N meter MIC-101, Biomedical Inst. Group, University of Pennsylvania) de una elevada impedancia de entrada, se midieron de forma fiable y precisa las variaciones de  $pK^+$  y de  $pCa^{2+}$  en el efluente hepático.

La presión portal se midió con un electromanómetro (HSE elektro-manometer type 302 Hugo Sachs Elektronik K9), con salida analógica que permitió el registro continuo de la señal.

Las señales analógicas de cada parámetro, se digitalizaron mediante un conversor analógico/digital (HP 3421A, Data

Adquisition Control Unit, Hewlett Packard). Las señales del conversor se enviaron a un ordenador personal con una puerta de comunicación HPIB (IEE488) y procesador con adaptaciones de "hojas de cálculos" comerciales para calcular y representar gráficamente los valores de los distintos parámetros.

#### 4.4.- MEDIDA DEL CONSUMO DE OXIGENO.

El consumo de oxígeno se determina calculando la diferencia de concentración arteriovenosa. Dicha diferencia se establece refiriendo los valores de concentración venosa, registrados durante el experimento, a los de concentración arterial fijados mediante calibración previa con gases de concentración de oxígeno conocida: carbógeno(95% de O<sub>2</sub>) y aire (21% de O<sub>2</sub>).

El consumo de oxígeno se calculó según la fórmula:

$$\text{consumo O}_2 = (A-V) \times F \times 1200/PC \quad (\mu\text{atom}/100\text{gPCxh})$$

siendo: A: concentración de O<sub>2</sub> arterial (mM)

V: concentración de O<sub>2</sub> venosa (mM)

F: flujo hepático (ml/min)

P.C.: peso corporal (grs)

#### 4.5.- MEDIDA DE LAS CONCENTRACIONES DE K<sup>+</sup> Y Ca<sup>2+</sup>.

Las concentraciones de calcio y potasio libres en el efluente hepático se calculan previa calibración de los electrodos selectivos para dichos iones en el rango de variaciones en el que habitualmente oscila en las condiciones experimentales. Es decir, sobre la base de concentraciones de ambos iones presentes en el medio de perfusión (tampón Krebs-Ringer bicarbonato o, en su caso, libre de calcio) se añadieron concentraciones crecientes de los mismos. Así, se obtuvo, en representación semilogarítmica de los mV. registrados frente al logaritmo de las miliosmolaridades respectivas, una recta de calibración a partir de la cual se determinó la pendiente.

De modo que la fórmula empleada en los cálculos fue:

$$[\text{ion}] = 10 [\log c + (y-m)/a] \quad (\text{mM})$$

siendo: c: concentración del ión correspondiente  
en el tampón (mM)

y: registro en mV en cada momento

m: mV. correspondientes al logc sobre la  
recta de calibración

a: pendiente de la recta de calibración

#### 4.6.- MEDIDA DEL pH DEL EFLUENTE HEPATICO.

En este caso, la relación entre voltaje registrado y unidades de pH es lineal con pendiente negativa que varía dependiendo de

la temperatura. El fluido de perfusión debe ajustarse a un pH de 7,4 y la calibración del electrodo se realiza en torno a este punto, en el rango de variación obtenido al eliminar paulatinamente el oxígeno de un tampón oxigenado (95% de O<sub>2</sub>) hasta equilibrar dicho tampón con aire (21% de O<sub>2</sub>). De esta forma se calculan la pendiente y ordenada en el origen de la recta de calibración de tal forma que:

$$\text{pH} = y - b/a \quad (\text{unidades de pH})$$

siendo:    y:   registro en mV. en cada instante  
          a:   pendiente de la recta de calibración  
          b:   ordenada en el origen

El registro simultáneo de O<sub>2</sub>, pH, [K<sup>+</sup>], [Ca<sup>2+</sup>] y presión es continuo a lo largo de toda la perfusión a un ritmo de 10 datos de cada parámetro por minuto. Las fórmulas anteriormente citadas permiten, previa elaboración de un programa basado en el lenguaje de macros de la hoja de cálculo Lotus 1-2-3, la transformación instantánea de voltajes a unidades de uso común.

## **5.- METODOS ANALITICOS.**

### **5.1.- DETERMINACION DE GLUCOSA, INSULINA Y ACIDOS GRASOS EN PLASMA.**

Para la determinación de los niveles plasmáticos de glucosa, ácidos grasos libres e insulina se tomaron muestras de sangre de la aorta en su bifurcación iliaca con una jeringuilla heparinizada.

Después de sedimentar las células centrifugando a 8000 rpm. durante 10 minutos, la concentración de glucosa se determinó enzimáticamente según se ha descrito (Bergmeyer, 1965). El contenido de ácidos grasos libres en plasma fue determinado por el método de Dole (1960).

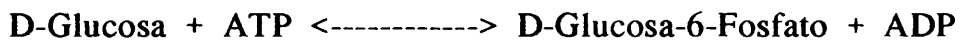
La determinación de los niveles plasmáticos de insulina se realizó mediante radioinmunoensayo según modificaciones del método de Taylor, 1976 (Wilson y Miles, 1977, Starr 1979). La insulina utilizada en la confección de la curva estándar fue insulina de rata. La insulina marcada con  $I^{125}$  (actividad específica de aproximadamente  $300\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) procede de humanos. El suero anti-insulina se obtuvo en cobaya contra insulina humana. La precipitación del complejo antígeno-anticuerpo se logra con un segundo anticuerpo. Estos componentes fueron obtenidos en Sorin Biomédica (Vercelli, Italia). La especificidad del antisuero utilizado es del 100% para insulina de rata y la sensibilidad del método se sitúa en torno a  $\pm 2,5\mu\text{U}/\text{ml}$ .

## 5.2.- DETERMINACION DE INTERMEDIARIOS.

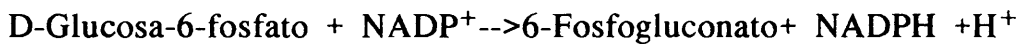
Los metabolitos fueron medidos espectrofotométricamente mediante reacciones que, de alguna forma, acaban produciendo cambios en el estado de óxido-reducción del sistema de nucleótidos de nicotinamida. Todos los metabolitos fueron medidos según métodos previamente descritos (Bergemeyer, 1965; Williamson y Corkey, 1968).

### 5.2.1.- Determinación de glucosa.

El ensayo para la medida de glucosa se basa en que la hexoquinasa cataliza la fosforilación de glucosa por ATP en presencia de iones  $Mg^{2+}$  según la ecuación:



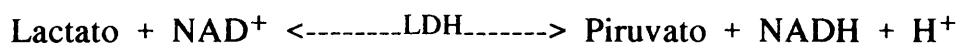
La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato por  $NADP^+$  según la ecuación:



El equilibrio de esta reacción está desplazado completamente hacia la formación de NADPH, lo que produce un aumento de absorción a 340 nm que permite la valoración cuantitativa de glucosa. El tampón utilizado para el ensayo fue trietanolamina 50mM, cloruro magnésico 10mM, EDTA 5mM, pH 7,4 conteniendo ATP 5mM y NADP 6,5 mM.

### 5.2.2.- Determinación de lactato y de piruvato.

Las concentraciones de lactato y piruvato se determinaron enzimáticamente mediante lactato deshidrogenasa. La medida de lactato se basa en que la enzima lactato deshidrogenasa cataliza la oxidación de lactato actuando  $NAD^+$  como aceptor de hidrógeno según la ecuación:

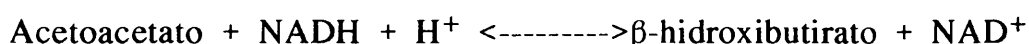


Según exista un exceso de  $\text{NAD}^+$  o de  $\text{NADH}$  se podrá medir de forma cuantitativa lactato o piruvato respectivamente. Obviamente, puesto que el  $\text{H}^+$  es un reactivo, el pH del medio influye decisivamente en la marcha de la reacción. A pH 7,4, el equilibrio está desplazado hacia la formación de lactato, y la disminución de absorción producida por la desaparición de  $\text{NADH}$  permite la valoración cuantitativa de piruvato. Ya que la reacción es termodinámicamente desfavorable en el sentido de formación de piruvato, para la determinación de lactato se utiliza un tampón alcalino, con el fin de eliminar protones y desviar el equilibrio hacia la formación de piruvato y  $\text{NADH}$ .

Para la determinación de lactato se utilizó un tampón glicina 0,5M-hidrazina 0,4M, pH 9,5, conteniendo  $\text{NAD}^+$  0,8mM y, para la de piruvato, un tampón de trietanolamina 50mM, pH 7,4, conteniendo  $\text{MgCl}_2$  10mM, EDTA 5 mM y  $\text{NADH}$  0,1 mM.

### 5.2.3.- Determinación de cuerpos cetónicos.

La determinación de  $\beta$ -hidroxibutirato y acetoacetato se realizó enzimáticamente, utilizando la reacción catalizada por la  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa, según se ha descrito previamente (Williamson y Corkey, 1969). La  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa cataliza la reacción:



El tampón del ensayo fue trietanolamina 50mM, coluro magnésico 10mM, EDTA 5mM, pH 7,4 conteniendo NADH 9mM para la medida de acetoacetato y Tris 0,1M, hidracina 0,4M, pH 8,5 conteniendo  $\text{NAD}^+$  0,8mM para la medida de  $\beta$ -hidroxibutirato.

### 5.3.- DETERMINACION DEL CONTENIDO HEPATICO DE GLUCOGENO.

El glucógeno hepático se extrajo del tejido mediante ebullición con una solución al 30% de hidróxido potásico y posterior precipitación con etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La glucosa producida por la hidrólisis ácida del precipitado de glucógeno, se cuantificó enzimáticamente según se ha descrito en el apartado 5.2.1. Conocida la concentración de glucosa y sabiendo que 5  $\mu$ moles de glucosa equivalen a 1 mg de glucógeno, se hicieron los cálculos oportunos, (Good, Kramer y Somogyi, 1933).

### 5.4- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LACTICO DESHIDROGENASA (LDH) HEPATICA.

Una vez tomada la biopsia según se ha descrito en el apartado 3, se homogeneizó en 20 volúmenes de tampón Tris 0,1M, pH 7,5. Alícuotas de este extracto se utilizaron para la valoración de la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa. La actividad se determinó en ambas direcciones. Para ello se utilizaron dos tipos de tampones:  $\text{H}_2\text{KPO}_4$  0,1M pH 7,4 y NADH 2mg/ml, en el sentido de desaparición de piruvato y glicina 0,5M-hidrazina 0,4M, pH 9,5 y  $\text{NAD}^+$  0,8mM en el sentido de formación

de piruvato. Se colocó en la cubeta 1,8ml del tampón y 20 $\mu$ l del extracto hepático y la reacción se inició al añadir respectivamente piruvato 5mM o lactato 5mM, según fuese el caso. Los cálculos se hicieron a partir del registro gráfico de la pendiente del inicio de la reacción y teniendo en cuenta el contenido en proteínas del extracto utilizado, cuantificado por el método de Lowry (1951), expresándose en  $\mu$ moles/min x mg proteína.

#### 5.5.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HEPATICA DE PROTEINA QUINASA C (PKC).

La actividad de proteína quinasa C se determinó en biopsias hepáticas de ratas sometidas a una operación simulada y adrenalectomizadas. El método consta de las siguientes etapas: cinco minutos después de anestesiar las ratas con nembutal sódico, se hace una incisión abdominal amplia y tras apartar las asas intestinales a la izquierda del animal se toma una biopsia, previa ligadura del lóbulo correspondiente para evitar pérdidas de sangre. Posteriormente, se inserta una jeringuilla en la vena porta, a través de la cual se inyecta lentamente (20 segundos) 0,03mg de fenilefrina disueltos en 0,2ml de solución salina; un minuto después de la administración de fenilefrina se toma una segunda biopsia.

Las biopsias hepáticas fueron homogeneizadas con 4 volúmenes de tampón A: Tris-HCl 20mM pH 7,5, 2mM EDTA, 0,5mM EGTA, 2mM ditiotreitól, 0,25M sacarosa, conteniendo

20 $\mu$ g/ml de inhibidor de tripsina, 2mM de PMSF y 0,04mM leupeptina. La preparación de la fracción soluble y particulada se realizó según métodos descritos (Piccoletti y col.,1990). Después de centrifugar el homogenado a 4000 rpm durante 10 min, el sobrenadante post-nuclear fue centrifugado a 100.000xg durante 1h a 4°C. El sobrenadante es la fracción citosólica y el sedimento constituye la fracción de membranas. El sedimento se disolvió con tampón A conteniendo Triton X-100 0,5% y se incubó en hielo durante 1 hora, después de lo cual se centrifugó a 100.000xg durante 1 hora para eliminar el material insoluble. Se pasaron a través de columnas de DEAE-celulosa (1,5cm x 0,7cm), previamente equilibradas con el buffer A-sacarosa, 0,5ml, de cada una de las fracciones obtenidas, es decir, citosólica y particulada. Tras lavar con 10ml del buffer A-sacarosa, para eliminar inhibidores endógenos (Schwantke y Le Peuch, 1984), la PKC se eluyó de la columna en 1ml de buffer A-sacarosa suplementado con 100mM NaCl. Experimentos preliminares realizados con un gradiente de NaCl, indicaron que la mayor parte de la actividad de proteína quinasa C se recoge en esta fracción. La concentración de proteína en las dos fracciones, se determinó mediante el método de Lowry (1951),

La actividad de proteína quinasa C se determinó midiendo la incorporación de  $^{32}\text{P}$  a partir de [ $\gamma^{32}\text{ATP}$ ] en Histona de timo de ternera (Tipo III S, Sigma) (Kikkawa y col., 1982). La mezcla de reacción (200 $\mu$ l) contenía 11mM Tris-HCl pH 7,5, 7,5mM  $\text{MgCl}_2$ , 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 $\mu$ g de histona, 25 $\mu$ g de fosfatidilserina, 1 $\mu$ g de

dioctanoilglicerol, 0,05mM ATP, 0,25 $\mu$ Ci  $^{32}$ P y 50 $\mu$ l de la preparación enzimática. La actividad basal se obtuvo reemplazando el CaCl<sub>2</sub> y los fosfolípidos con 5mM EGTA. Después de un período de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, se paró la reacción añadiendo 2ml de tricloroacético al 5% conteniendo 10mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 4°C y 200 $\mu$ g de albúmina bovina. El material precipitado en frío, insoluble en ácido, se recogió por filtración en membranas de fibra de vidrio (whatman GF/A) de 2,5 cm de diámetro. A continuación los filtros se lavaron repetidas veces con tricloroacético al 5% conteniendo 10mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y 5mM ATP y un último lavado con etanol/éter etílico (1:1,v/v). Una vez secos, los filtros fueron transferidos a viales con 2ml de líquido de centelleo (quickzint, Zinsser Analytic) y la radiactividad determinada en un contador de centelleo líquido. La actividad de proteína quinasa C se determinó en triplicado en ausencia y en presencia de CaCl<sub>2</sub> y fosfolípidos.

## **6.- ESTIMACION DEL FLUJO A TRAVES DEL CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS.**

Para la estimación del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos hemos seguido el método descrito por Williamson y col., 1969. El flujo a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos se puede calcular a partir de las medidas de consumo de oxígeno, corregidas por la producción no mitocondrial de NADH y FADH, así como por la producción de cuerpos cetónicos. En ausencia de substratos se asume que la respiración basal se debe a la oxidación

de ácidos grasos endógenos de 16 átomos de carbono. La oxidación completa de 1 mol de palmitato requiere 46 átomos de oxígeno, de ellos el 70% se consumen en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La oxidación de un mol de acetil-CoA requiere 4 átomos de oxígeno. Cada mol de acetoacetato generado a partir de ácidos grasos endógenos o de octanoato requiere 3,5 ó 3 equivalentes de oxígeno respectivamente, la formación de  $\beta$ -hidroxibutirato requiere 2,5 ó 2 equivalentes de oxígeno según proceda de palmitato o de octanoato. Se asume un valor del cociente P/O de 3.

#### **7.- TRATAMIENTO ESTADISTICO.**

La evaluación estadística de los resultados se realizó determinando las desviaciones estándar y la significación de la diferencia entre los distintos grupos según el método de la t de Student (Crow y col., 1960).

## **RESULTADOS**

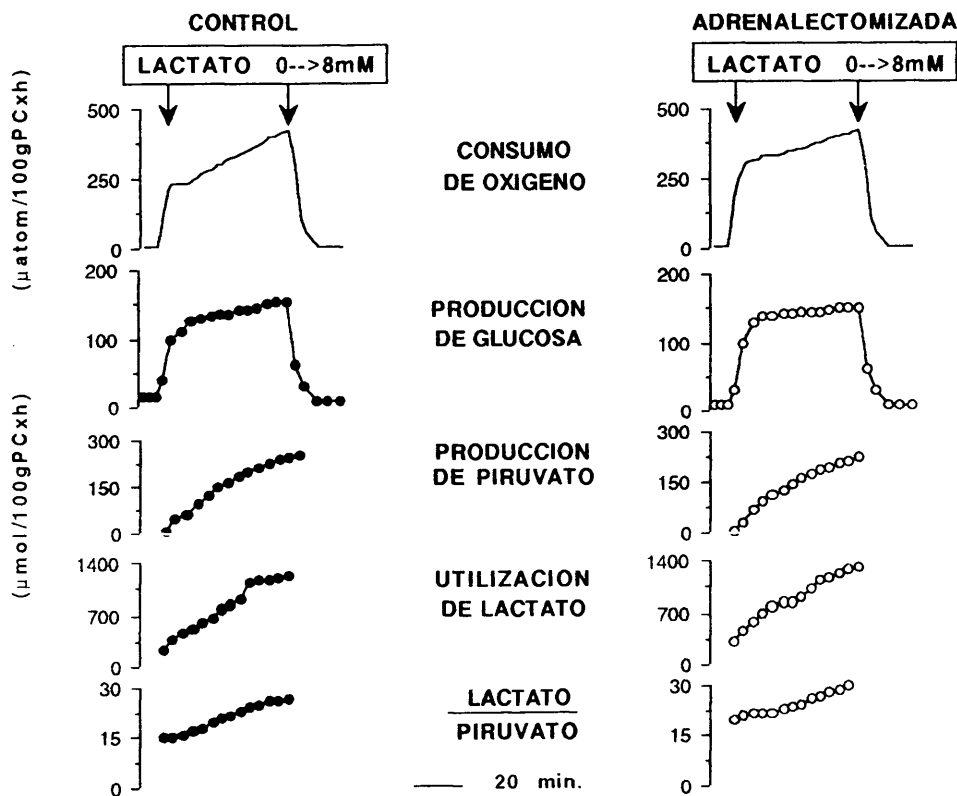
## **1.- METABOLISMO HEPATICO DE LACTATO Y DE PIRUVATO EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.**

### **1.1.- EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL METABOLISMO HEPATICO DE LACTATO.**

La figura 4 muestra el efecto de la adrenalectomía sobre las tasas de respiración y de gluconeogénesis a partir de concentraciones crecientes de lactato. En esta figura se han representado también las tasas de utilización de lactato y de producción de piruvato, así como las variaciones en el cociente lactato/piruvato en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas. En estos experimentos, la concentración de lactato se incrementó de forma lineal desde 0 hasta 8 mM una vez alcanzada una tasa estacionaria de respiración en ausencia de substratos.

En primer lugar, hay que destacar que el estrés quirúrgico no produjo cambios apreciables en el metabolismo hepático de lactato. En efecto, nuestros resultados, obtenidos en ratas sometidas a una operación simulada (panel izquierdo de la Figura 4) están de acuerdo con observaciones previas de nuestro laboratorio (González-Manchón y col., 1989) realizadas en ratas controles. La administración de concentraciones crecientes de lactato da lugar a un incremento progresivo en la tasa de respiración hepática, que da cuenta estequiométricamente del aumento de la producción de glucosa. La producción de glucosa en función de la concentración de lactato muestra una cinética de saturación típica. La concentración de lactato con la que se consigue la " $v_{max}$ " es de

**FIGURA 4**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LOS INCREMENTOS DE**  
**RESPIRACION Y TASAS METABOLICAS INDUCIDOS POR**  
**CONCENTRACIONES CRECIENTES DE LACTATO EN HIGADO AISLADO**  
**Y PERFUNDIDO.**



Hígados aislados de ratas controles y adrenalectomizadas sometidos a ayuno durante 48 h, fueron perfundidos como se describe en Métodos. Alcanzada una tasa basal estacionaria de consumo de oxígeno, la concentración de sustrato se incrementó de forma lineal desde 0 hasta 8mM, mediante un formador de gradientes, y fueron tomadas alícuotas del efluente a intervalos de 2min para la determinación de los distintos metabolitos. Los resultados son valores promedio de, al menos, 4 experimentos.

aproximadamente 1mM, y se encuentra, pues, dentro de los márgenes de concentración de lactato en condiciones fisiológicas (Parrilla, 1978 b; Hers y Hue, 1983; Groen y col., 1986). La tasa de utilización de lactato muestra un comportamiento bifásico, alcanza un máximo a una concentración de lactato de aproximadamente 1mM, coincidiendo con la curva de saturación de glucosa que se mantiene hasta una concentración de lactato próxima a 3mM, a partir de la cual se observa un incremento lineal en la velocidad de utilización de substrato.

La comparación entre los resultados obtenidos en ratas controles y adrenalectomizadas revela que el incremento de respiración, inducido por el gradiente de concentración de lactato, no se ve afectado por la adrenalectomía, así como tampoco se afecta significativamente la tasa de producción de glucosa ni la de utilización de lactato. En hígados de ratas adrenalectomizadas, la tasa de producción de piruvato es menor, lo que tiene como consecuencia un aumento del estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico, expresado por las variaciones de la relación lactato/piruvato en el efluente hepático. En la tabla III, se han recogido los incrementos en las tasas de utilización de lactato y de producción de glucosa y piruvato en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas en respuesta a concentraciones crecientes de lactato. Con objeto de simplificar, únicamente se presentan los resultados correspondientes a las concentraciones de lactato 1, 5 y 7mM respectivamente. Cabe destacar de estos resultados que, en estas condiciones, tanto en hígados de ratas controles como

TABLA III

## EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL METABOLISMO HEPATICO DE LACTATO.

[LACTATO] (mM)	GRUPO	$\Delta$ LACTATO	$\Delta$ PIRUVATO	$\Delta$ GLUCOSA	L/P
		( $\mu$ mol/100gPCxh)			
1 m M	CONTROL	-480 $\pm$ 55	56 $\pm$ 7	97 $\pm$ 4	15 $\pm$ 3
	ADX	-397 $\pm$ 28	42 $\pm$ 3	108 $\pm$ 9	21 $\pm$ 2
5 m M	CONTROL	-966 $\pm$ 31	200 $\pm$ 17	144 $\pm$ 11	22 $\pm$ 1
	ADX	-955 $\pm$ 81	172 $\pm$ 10	144 $\pm$ 10	27 $\pm$ 3
7 m M	CONTROL	-1184 $\pm$ 41	250 $\pm$ 22	170 $\pm$ 15	26 $\pm$ 1
	ADX	-1160 $\pm$ 78	220 $\pm$ 11	152 $\pm$ 12	30 $\pm$ 2

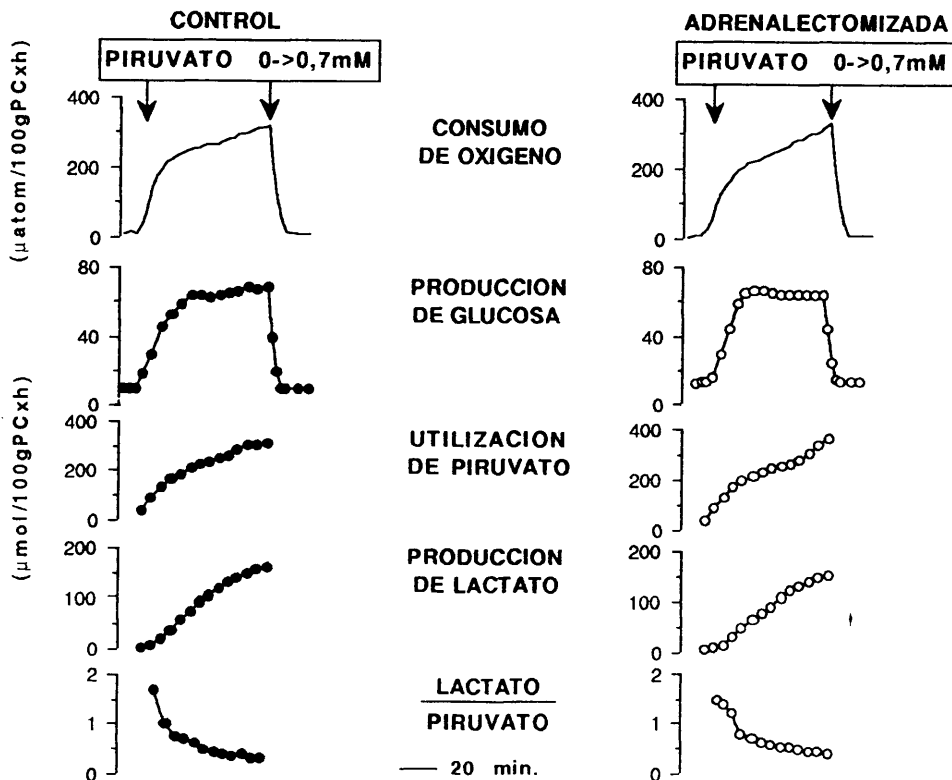
Los datos han sido tomados de las figuras 12,17,18,20 y 22. Los resultados son valores promedio de, al menos 4 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media.

adrenalectomizadas, las producciones de glucosa y de piruvato dan cuenta solamente de aproximadamente el 50% de la utilización de lactato.

#### 1.2.- EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL METABOLISMO HEPATICO DE PIRUVATO.

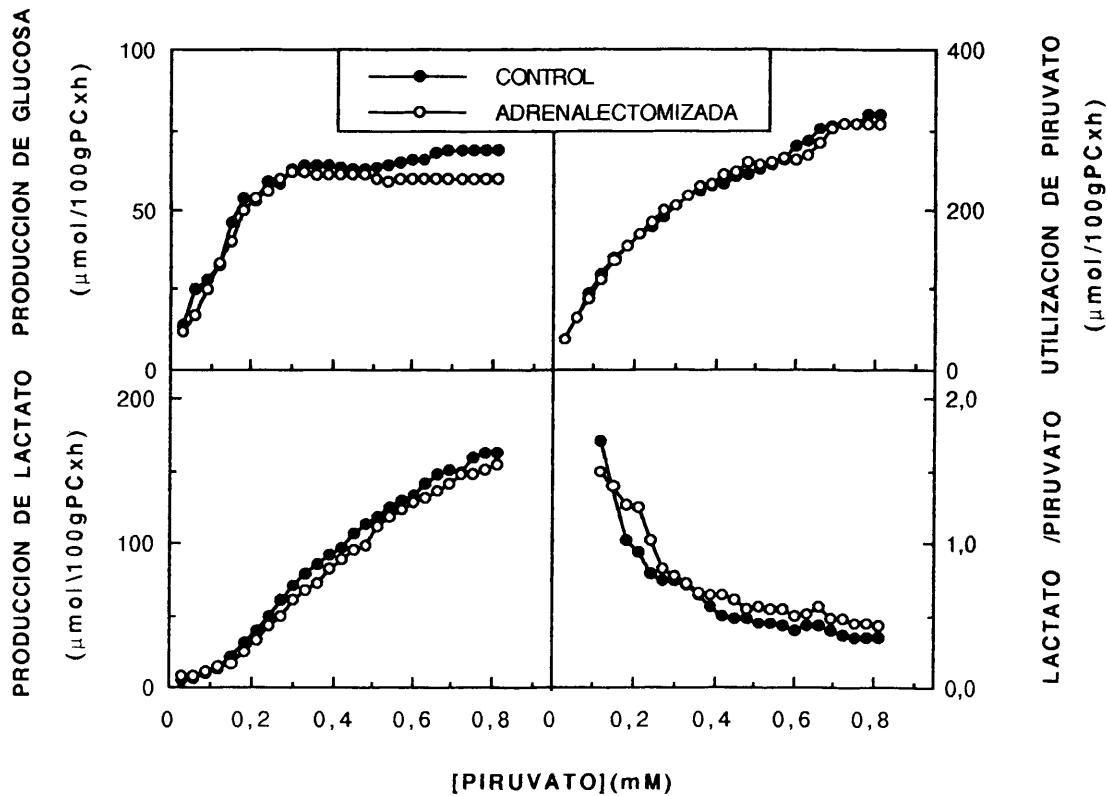
En la figura 5, se han representado los incrementos en el consumo de oxígeno y en la tasa de producción de glucosa, en función del tiempo, en respuesta a la administración de concentraciones crecientes de piruvato en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas. La gráfica muestra también las tasas de utilización de piruvato y de producción de lactato, y el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico, expresado por el cociente lactato/piruvato. Estos experimentos se llevaron a cabo, igual que los descritos anteriormente, incrementando de forma lineal la concentración de sustrato. En la figura 6 se ha representado de forma comparativa el efecto de la adrenalectomía sobre las distintas tasas metabólicas y sobre los cambios en la relación lactato/piruvato en función de la concentración de piruvato. Puede apreciarse que la producción de glucosa a partir de piruvato es un proceso que se satura a concentraciones de piruvato próximas a 0,3mM. La cinética de producción de glucosa a partir de piruvato no muestra cambios apreciables en hígados de ratas adrenalectomizadas. Tampoco se detectaron diferencias significativas en las tasas de utilización de piruvato y de producción de lactato ni en el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico.

**FIGURA 5**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LOS INCREMENTOS DE**  
**RESPIRACION Y TASAS METABOLICAS INDUCIDOS POR**  
**CONCENTRACIONES CRECIENTES DE PIRUVATO EN HIGADO**  
**AISLADO Y PERFUNDIDO.**



Hígados aislados de ratas controles y adrenalectomizadas sometidos a ayuno durante 48 h, fueron perfundidos como se describe en Métodos. Alcanzada una tasa basal estacionaria de consumo de oxígeno, la concentración de sustrato se incrementó de forma lineal desde 0 hasta 0,7mM, mediante un formador de gradientes, y fueron tomadas alícuotas del efluente a intervalos de 2 min para la determinación de los distintos metabolitos. Los resultados son valores promedio de, al menos, 4 experimentos.

**FIGURA 6**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LAS TASAS**  
**METABOLICAS INDUCIDAS POR CONCENTRACIONES CRECIENTES DE**  
**PIRUVATO EN HIGADO AISLADO Y PERFUNDIDO.**



Hígados aislados de ratas sometidas a ayuno durante 48 horas, fueron perfundidos como se describe en Métodos. Las gráficas representadas, han sido elaboradas con los datos de la figura.5.

## 2.- METABOLISMO DE ACIDOS GRASOS EN HIGADOS DE ANIMALES ADRENOPRIVOS.

La tabla IV muestra el efecto de la adrenalectomía sobre los niveles de ácidos grasos libres en plasma. De acuerdo con observaciones previas (Gauthier y col., 1986), puede observarse cómo 4 días después de practicar la adrenalectomía bilateral, se reduce en aproximadamente un 30% los niveles de ácidos grasos circulantes.

En la figura 7 se han representado los incrementos de respiración inducidos por diferentes concentraciones de octanoato en el medio de perfusión, en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, mantenidas en ayuno durante 48 horas. Puede observarse que los incrementos en el consumo de oxígeno, en respuesta a la administración de octanoato, son similares en ambos tipos de ratas. En estos experimentos se utilizaron hígados distintos para cada una de las concentraciones de octanoato utilizadas, determinando la tasa de consumo de oxígeno a los 20 minutos de la administración de octanoato, una vez alcanzada una tasa estacionaria de respiración. Resultados similares se obtuvieron cuando se administró a una misma preparación cantidades crecientes de octanoato. En las figuras 8 y 9 se muestran las tasas de respiración hepática y cetogénesis en respuesta a concentraciones crecientes de octanoato en el medio de perfusión en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, respectivamente. La comparación entre ambas figuras revela, en primer lugar, que la respiración hepática endógena es

TABLA IV

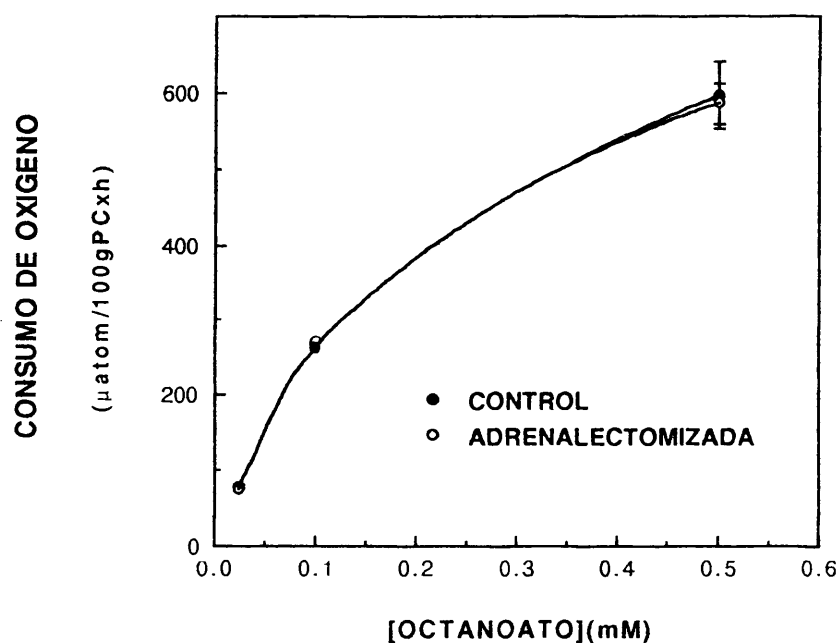
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL CONTENIDO DE  
ACIDOS GRASOS LIBRES EN PLASMA**

ACIDOS GRASOS LIBRES EN PLASMA		
	$\mu\text{Eq/l}$	% DEL CONTROL
CONTROL	520 $\pm$ 47	100
ADX	358 $\pm$ 22*	71

\*p<0,01

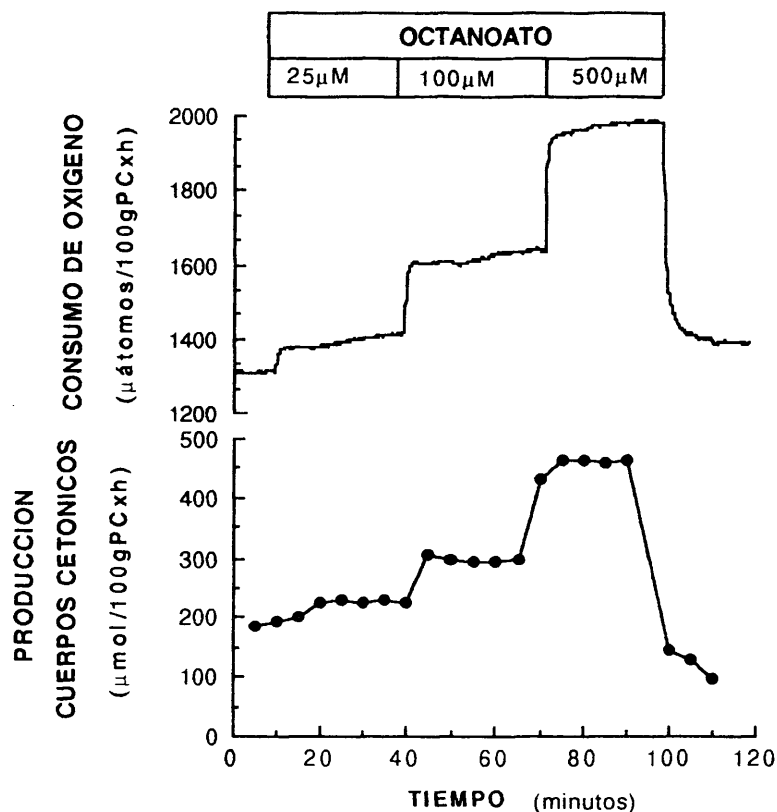
La determinación de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres se realizó según se describe en Métodos. Cada valor es la media de, al menos, 8 observaciones  $\pm$  el error estándar de la media. El valor de p fue calculado por el método de la t de Student.

**FIGURA 7**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LOS INCREMENTOS DE RESPIRACION HEPATICA INDUCIDOS POR CONCENTRACIONES CRECIENTES DE OCTANOATO EN EL MEDIO DE PERFUSION.**



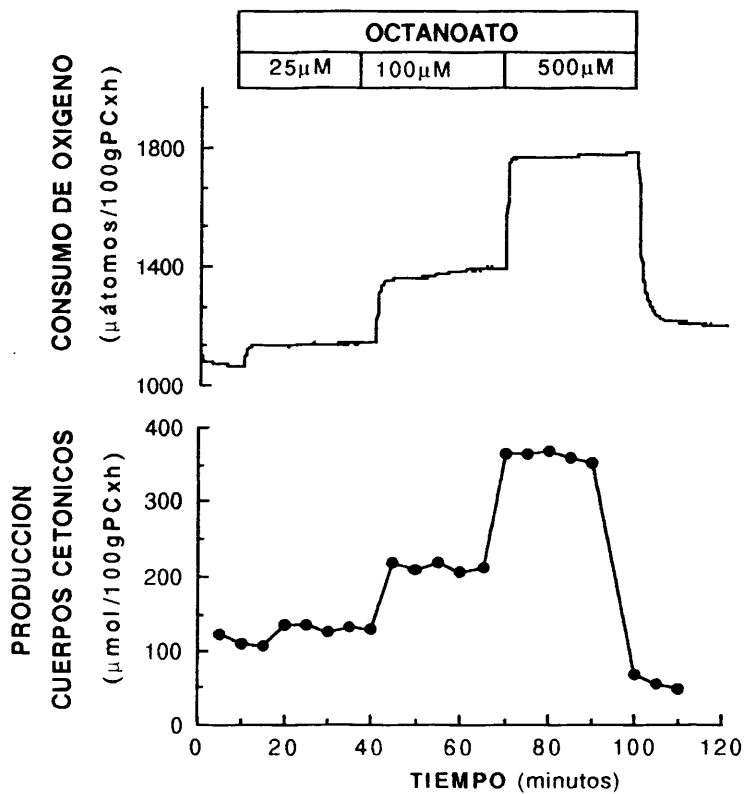
Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48 horas, fueron perfundidos según se describe en Métodos. La figura representa los incrementos de consumo de oxígeno producidos por cada una de las concentraciones de octanoato cuando se consigue una tasa estacionaria de respiración. Cada valor es la media de, al menos, 4 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media.

**FIGURA 8**  
**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CONCENTRACIONES**  
**CRECIENTES DE OCTANOATO SOBRE LAS TASAS DE RESPIRACION Y**  
**DE CETOGENESIS EN HIGADOS DE RATAS CONTROLES.**



Hígados de ratas controladas, sometidas a un período de ayuno de 48 horas, fueron perfundidos según se describe en Métodos. Después de que se alcanzara una tasa basal estacionaria de respiración hepática, la concentración de octanoato se incrementó de forma escalonada. Cada 5 minutos se tomaron alícuotas del efluente hepático para la determinación de cuerpos cetónicos.

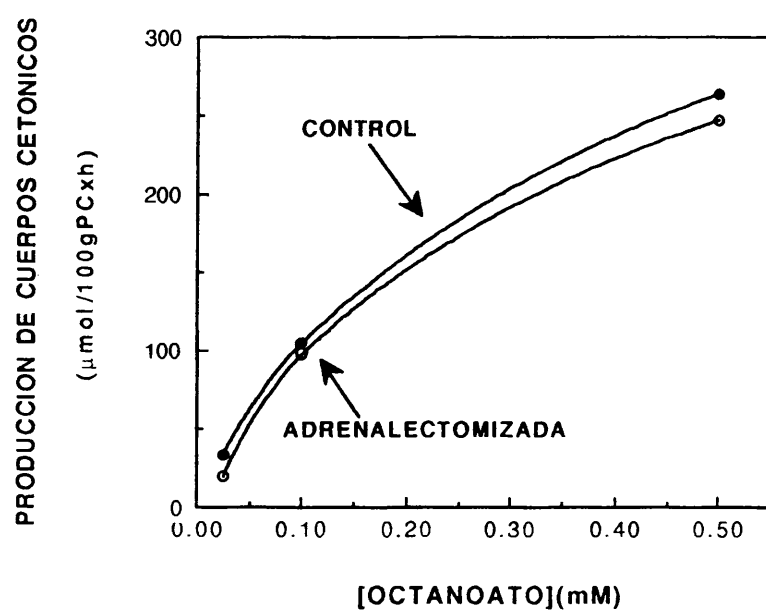
**FIGURA 9**  
**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CONCENTRACIONES**  
**CRECIENTES DE OCTANOATO SOBRE LAS TASAS DE RESPIRACION Y**  
**DE CETOGENESIS EN HIGADOS DE RATAS ADRENALECTOMIZADAS.**



Hígados de ratas adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48 horas, fueron perfundidos según se describe en Métodos. Después de que se alcanzara una tasa basal estacionaria de respiración hepática, la concentración de octanoato se incrementó de forma escalonada. Cada 5 minutos se tomaron alícuotas del efluente hepático para la determinación de cuerpos cetónicos.

aproximadamente un 20% menor en ratas adrenalectomizadas. También se observa una disminución de la tasa de cetogénesis endógena, consecuencia probablemente de la menor disponibilidad de ácidos grasos circulantes (Tabla IV). A pesar de ello, los incrementos de respiración, inducidos por las distintas concentraciones de octanoato, son idénticas en ambos grupos de ratas. Así mismo, la tasa de producción de cuerpos cetónicos a partir de octanoato no muestra cambios apreciables en hígados de ratas adrenoprivas, como se puede apreciar en la figura 10, en la que se muestra la tasa de producción de cuerpos cetónicos, en función de la concentración de octanoato, una vez sustraída la tasa de cetogénesis endógena, en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas. Estos resultados demuestran que la oxidación hepática de ácidos grasos no se ve afectada por la adrenalectomía.

**FIGURA 10**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA PRODUCCION DE CUERPOS CETONICOS INDUCIDOS POR CONCENTRACIONES CRECIENTES DE OCTANOATO EN EL MEDIO DE PERFUSION.**



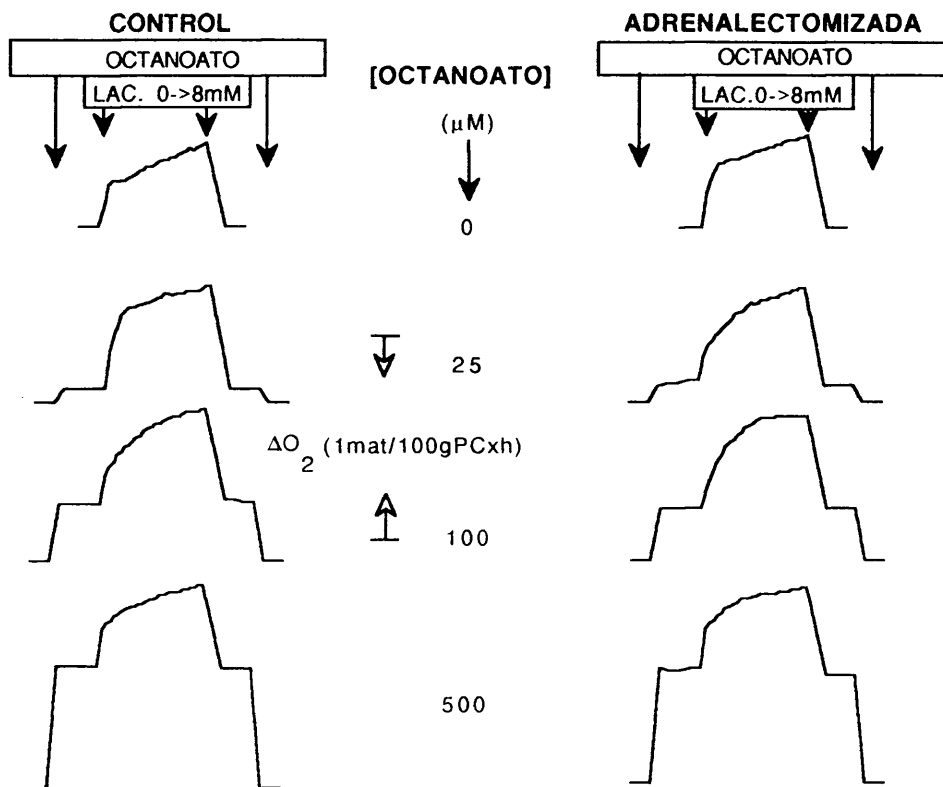
Los datos han sido tomados de las figuras 8 y 9 para los animales control y adrenalectomizados respectivamente.

### **3.- REGULACION DEL METABOLISMO HEPATICO DE LACTATO POR ACIDOS GRASOS EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.**

#### **3.1.- EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE OCTANOATO SOBRE LAS TASAS DE RESPIRACION Y GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE LACTATO EN HIGADOS PERFUNDIDOS DE RATAS CONTROLES Y ADRENALECTOMIZADAS.**

La figura 11 muestra los cambios de respiración producidos por un gradiente lineal de concentraciones de lactato sódico desde 0 hasta 8 mM en hígados perfundidos procedentes de ratas controles y adrenalectomizadas. El incremento inicial de respiración es debido a la presencia de cantidades crecientes de octanoato. Una vez que se alcanzó una tasa estacionaria de consumo de oxígeno en presencia de octanoato, la concentración de lactato en el medio de perfusión fue incrementada de forma lineal a una velocidad de  $0,15 \mu\text{moles/ml} \times \text{minuto}$ . En la parte izquierda de la figura, que corresponde a hígados de ratas controles, puede observarse que el incremento de respiración, inducido por el gradiente de concentración de lactato, y determinado por el área de la curva correspondiente, es mayor en presencia de una concentración de octanoato de  $25 \mu\text{M}$  en el medio de perfusión. Este incremento disminuye progresivamente a medida que aumenta la concentración de octanoato, hasta alcanzar valores similares a los que produce el gradiente de concentración de lactato en ausencia del ácido graso. Por el contrario, en hígados de ratas adrenalectomizadas (parte derecha de la Fig. 11), el

**FIGURA 11**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LOS INCREMENTOS DE**  
**CONSUMO DE OXIGENO PRODUCIDOS EN RESPUESTA A**  
**CONCENTRACIONES CRECIENTES DE LACTATO EN AUSENCIA Y EN**  
**PRESENCIA DE OCTANOATO.**



Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidos a un período de ayuno de 48 horas, fueron perfundidos según se describe en Métodos. Después de alcanzar una tasa estacionaria de respiración hepática en ausencia o en presencia de las concentraciones indicadas de octanoato, la concentración de lactato se incrementó de forma lineal a una velocidad de 0,15 mM/min mediante un formador de gradientes. Cada trazado representa la media de, al menos, 4 experimentos.

incremento de respiración, inducido por el gradiente de concentración de lactato, no se ve afectado significativamente por la presencia de octanoato en el medio de perfusión. La valoración cuantitativa de estos resultados, es decir, la integración de los valores de respiración obtenidos con el gradiente de concentración de lactato en presencia de las distintas concentraciones de octanoato en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas está reflejada en la tabla V. Puede observarse cómo la adrenalectomía impide la estimulación de respiración inducida por concentraciones bajas de octanoato en presencia de lactato como precursor gluconeogénico.

La figura 12 representa las tasas de producción de glucosa en función de la concentración de lactato en el medio de perfusión en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de octanoato en hígados perfundidos de ratas controles y adrenalectomizadas. Los resultados obtenidos en hígados de ratas sometidas a una operación simulada están de acuerdo con observaciones previas de nuestro laboratorio (González-Manchón y col., 1989). Es decir, la administración de octanoato produce un incremento de la velocidad máxima de producción de glucosa que es inversamente proporcional a la concentración de octanoato en el medio de perfusión. La administración de una concentración baja de octanoato, 25  $\mu\text{M}$ , produce un desplazamiento de la curva de saturación hacia la izquierda y un aumento considerable de la velocidad máxima de producción de glucosa. Los efectos de concentraciones crecientes de octanoato son un desplazamiento

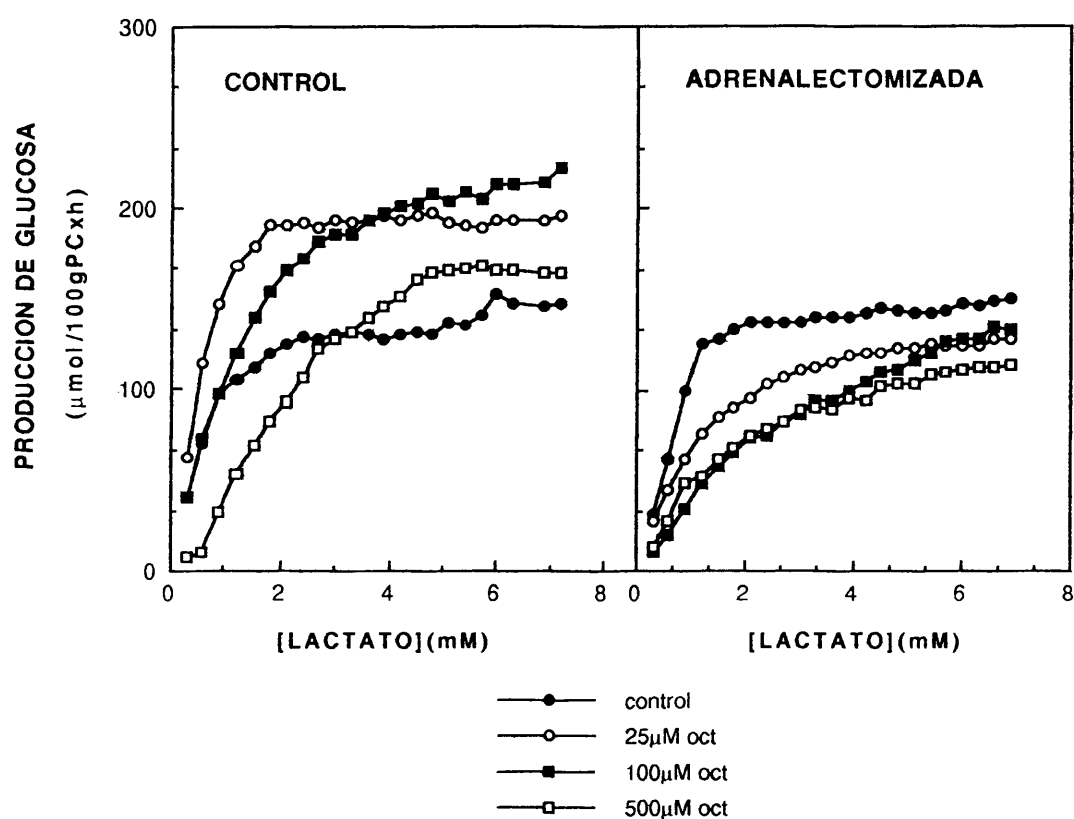
TABLA V

**EFEECTO DE LA ADMINISTRACION DE OCTANOATO SOBRE LA TASA DE RESPIRACION HEPATICA INDUCIDA POR UN GRADIENTE DE CONCENTRACION DE LACTATO.**

[OCTANOATO] ( $\mu$ M)	INCREMENTOS DE RESPIRACION	
	CONTROL	ADX
	Unidades arbitarias	
0	85 $\pm$ 9	107 $\pm$ 7
25	118 $\pm$ 4	101 $\pm$ 12
100	103 $\pm$ 6	110 $\pm$ 13
500	84 $\pm$ 5	96 $\pm$ 18

Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48 h., fueron perfundidos según se describe en la figura 11. Los resultados, valores promedio de 3-6 observaciones, han sido determinados calculando el área, con el programa Wingz, de los trazados de oxígeno en función de la concentración de lactato, en ausencia y en presencia de las concentraciones indicadas de octanoato.

**FIGURA 12**  
**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CONCENTRACIONES DE**  
**OCTANOATO SOBRE LA TASA DE PRODUCCION DE GLUCOSA A**  
**PARTIR DE LACTATO EN HIGADOS AISLADOS Y PERFUNDIDOS DE**  
**RATAS CONTROLES Y ADRENALECTOMIZADAS.**

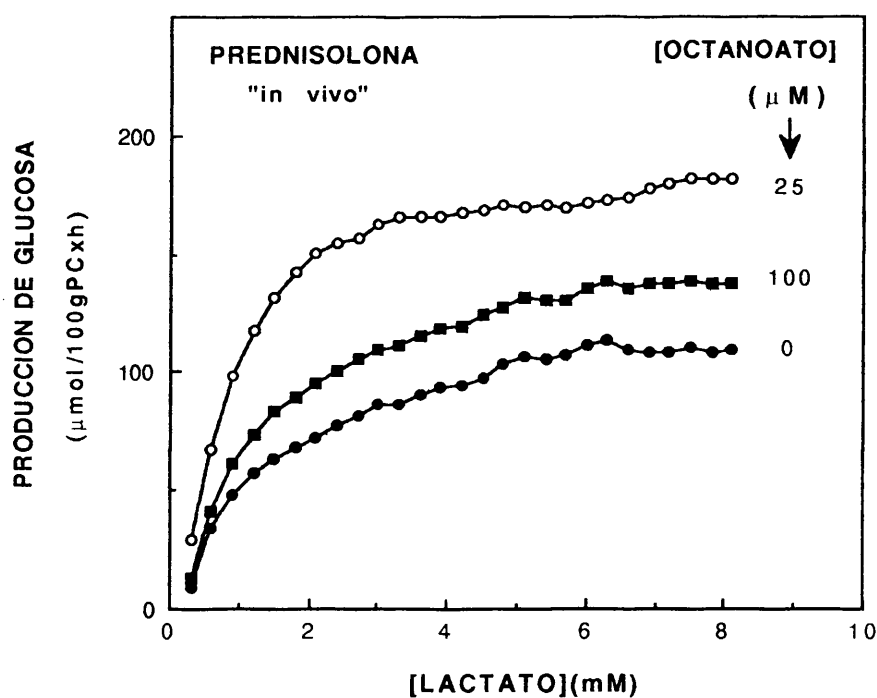


Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la figura 11. Los resultados son valores promedio de, 3-6 experimentos.

progresivo de la curva de saturación hacia la derecha que, probablemente refleja cambios de afinidad por el substrato de la primera etapa reguladora de la vía, junto a una disminución progresiva de la velocidad de producción de glucosa.

Los resultados obtenidos con hígados de ratas adrenalectomizadas difieren notablemente de los anteriores. Deben destacarse tres hechos: primero, que la adrenalectomía no produce efectos apreciables sobre la velocidad máxima de producción de glucosa a partir de lactato, segundo, la presencia de concentraciones crecientes de octanoato en el medio de perfusión tiene efectos similares a los observados en los hígados de ratas controles, es decir, una disminución progresiva de la velocidad máxima de la respuesta, y un desplazamiento de las curvas de saturación hacia la derecha a medida que se incrementa la concentración de octanoato y por último, el incremento de la velocidad máxima de producción de glucosa producido por octanoato no se observa en los hígados de ratas adrenalectomizadas. Estos resultados sugieren, pues, que se requiere la presencia de los glucocorticoides adrenales para que los ácidos grasos puedan inducir un incremento del flujo gluconeogénico. En apoyo de esta idea puede observarse (Fig. 13) cómo el tratamiento *in vivo* de ratas adrenalectomizadas con dosis sustitutivas de un glucocorticoide de síntesis como prednisolona, es capaz de restaurar parcialmente el efecto de octanoato estimulando la velocidad de producción de glucosa.

**FIGURA 13**  
**EFFECTO DEL TRATAMIENTO *IN VIVO* CON PREDNISOLONA A RATAS**  
**ADRENALECTOMIZADAS SOBRE LA RESPUESTA GLUCONEOGENICA**  
**A OCTANOATO EN HIGADOS PERFUNDIDOS CON CONCENTRACIONES**  
**CRECIENTES DE LACTATO.**

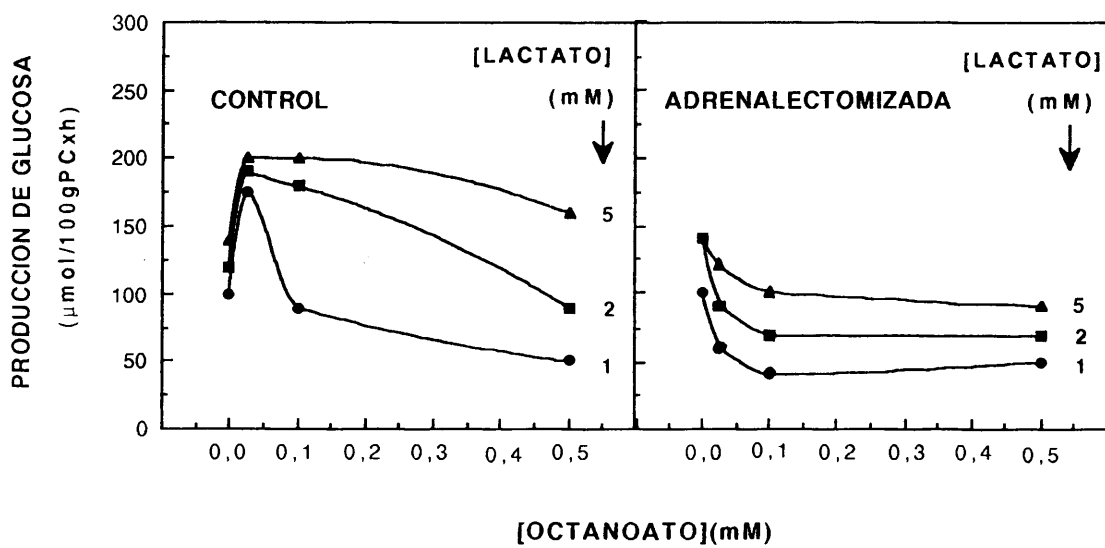


Ratas adrenalectomizadas fueron tratadas *in vivo* con prednisolona como se describe en Métodos. Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la figura 11. Cada 2 minutos se tomaron alícuotas del efluente hepático para la determinación de glucosa. Los resultados son valores promedio de, al menos, 3 experimentos.

La figura 14 representa los incrementos en la tasa de producción de glucosa inducidos por concentraciones de lactato de 1, 2 ó 5 mM en función de la concentración de octanoato en el medio de perfusión en hígados perfundidos de ratas controles y adrenalectomizadas. Puede observarse cómo en hígados de ratas adrenalectomizadas, se produce una disminución progresiva de la tasa de producción de glucosa en función de la concentración de octanoato en el medio de perfusión. En hígados de ratas controles, por el contrario, se observa un incremento máximo de la velocidad de producción de glucosa en presencia de la concentración más baja de octanoato para las tres concentraciones de lactato. A medida que aumenta la concentración de octanoato, este incremento tiende a desaparecer. Únicamente en el caso de la concentración más alta de sustrato, 5 mM, los valores de producción de glucosa se mantienen por encima de los del control incluso a las concentraciones más altas de octanoato.

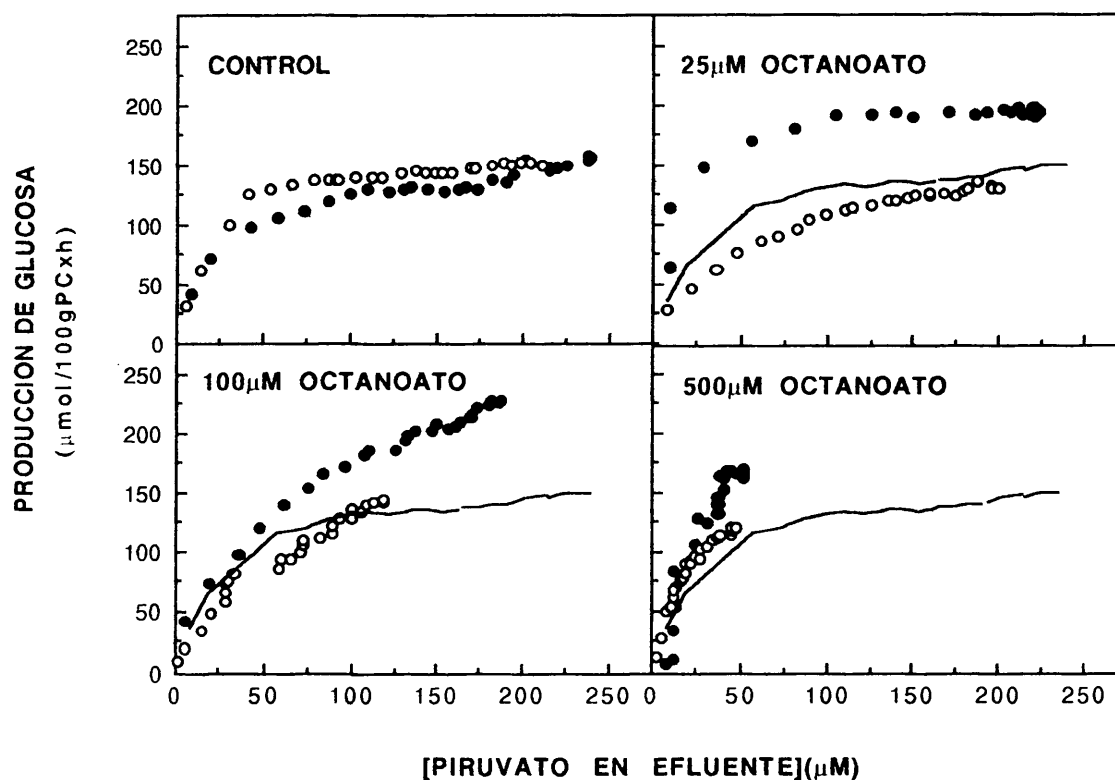
Estos resultados podrían ser debidos a una inhibición de la disponibilidad de piruvato debida al incremento en la generación de NADH producido por la oxidación de octanoato. Por esta razón, en la figura 15 se ha representado, de forma comparativa, las tasas de producción de glucosa, en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, en función de la concentración de piruvato en el efluente. Asumimos que la concentración de piruvato en el efluente es un reflejo de la disponibilidad de piruvato para ser transportado al interior de la mitocondria (González-Manchón y col., 1989). Puede observarse en la figura 15 cómo la velocidad

**FIGURA 14**  
**INCREMENTOS EN LA TASA DE GLUCONEOGENESIS INDUCIDOS POR**  
**LACTATO (1,2,5 mM) EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE**  
**OCTANOATO EN EL MEDIO DE PERFUSION, EN HIGADOS DE RATAS**  
**CONTROLES Y ADRENALECTOMIZADAS.**



Los incrementos de gluconeogénesis han sido tomados de los experimentos realizados con gradientes de concentración de lactato representados en la figura 12.

**FIGURA 15**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA (o) SOBRE LA PRODUCCION DE**  
**GLUCOSA A PARTIR DE LACTATO EN FUNCION DE LA**  
**CONCENTRACION DE PIRUVATO EN EL EFLUENTE HEPATICO, EN**  
**AUSENCIA Y EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE**  
**OCTANOATO.**



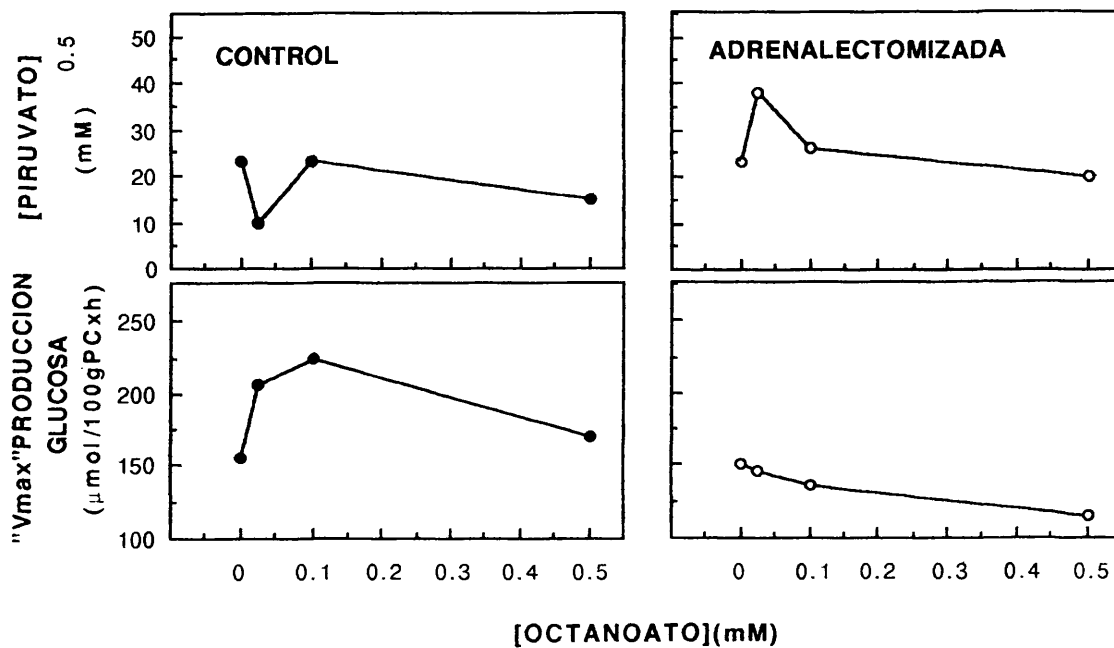
Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la figura 11. La figura representa la producción de glucosa en función de la concentración de piruvato determinada en alícuotas del efluente hepático tomadas a intervalos de 2 minutos. La línea continua representa la tasa de producción de glucosa de hígados, de ratas controles, perfundidos en ausencia de octanoato. Los resultados son valores promedio de, al menos, tres observaciones.

máxima de producción de glucosa, en hígados de ratas sometidas a una operación simulada, está aumentada respecto al control para cualquier concentración de octanoato en el medio de perfusión. Por el contrario, en hígados de ratas adrenalectomizadas, los valores de velocidad máxima de producción de glucosa son inferiores a los del control (línea de puntos) con cualquier concentración de octanoato.

La figura 16 muestra los datos cinéticos calculados a partir de los experimentos de la figura anterior. En hígados de ratas controles, la velocidad máxima de producción de glucosa está aumentada respecto al control para cualquier concentración de octanoato; sin embargo, en hígados de ratas adrenalectomizadas, la velocidad máxima decrece, de forma prácticamente lineal, a medida que aumenta la concentración de octanoato en el medio de perfusión. El efecto más llamativo es el que se observa tras la administración de una concentración de octanoato de  $25 \mu\text{M}$ , sobre la concentración de piruvato con la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima, mientras que en los controles disminuye este valor, en hígados de ratas adrenalectomizadas el efecto es el opuesto. La administración de concentraciones de octanoato de  $100$  ó  $500 \mu\text{M}$  no parecen alterar significativamente el valor de  $[\text{Piruvato}]_{0,5}$  tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas.

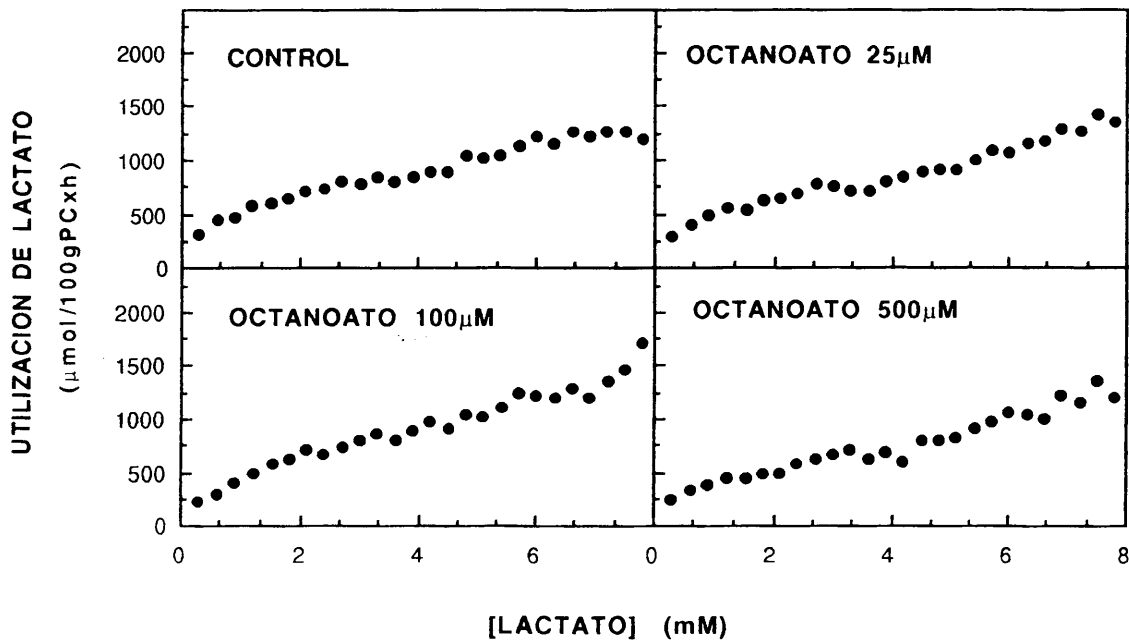
En las figuras 17 y 18, aparecen representadas las tasas de utilización de lactato en función de la concentración de este substrato en el medio de perfusión y en presencia de las distintas

**FIGURA 16**  
**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE OCTANOATO SOBRE "v<sub>max</sub>" DE PRODUCCION DE GLUCOSA Y [S]<sub>0,5</sub> PARA PIRUVATO EN HIGADOS AISLADOS Y PERFUNDIDOS DE RATAS CONTROLES Y ADRENALECTOMIZADAS.**



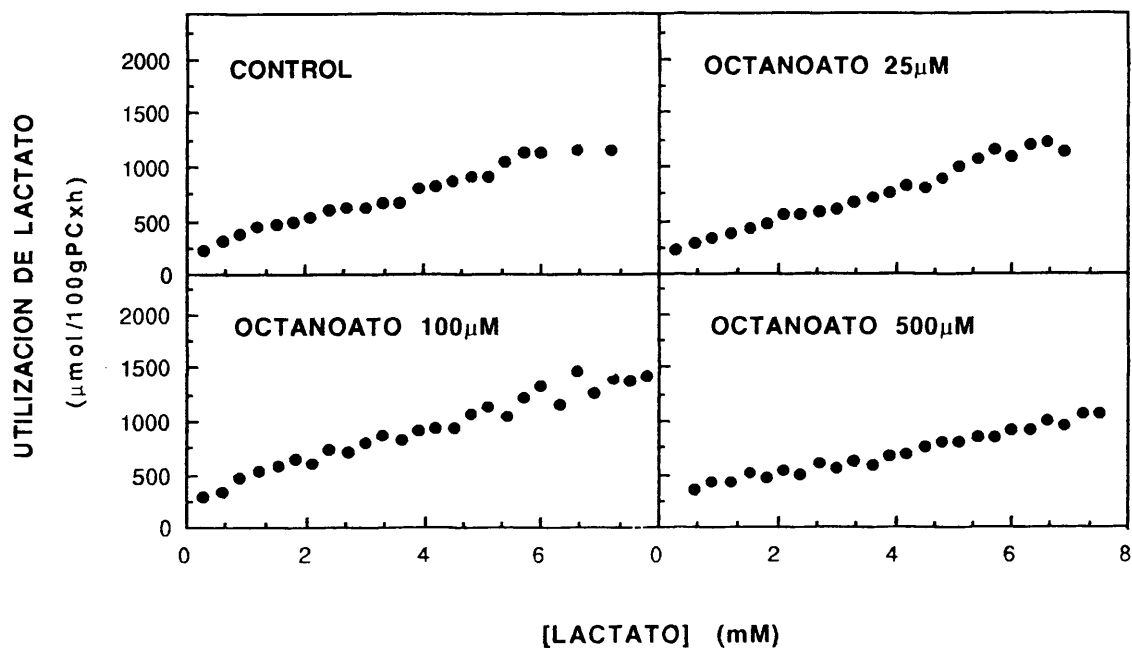
Los cálculos han sido elaborados a partir de los datos de las figuras 12 y 15 . Para ello se hicieron representaciones del tipo de Lineaweaver-Burk y se determinó la ecuación de cada una de las rectas por el método de los mínimos cuadrados.

**FIGURA 17**  
**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE OCTANOATO SOBRE LA TASA DE**  
**UTILIZACION DE LACTATO EN HIGADOS AISLADOS Y PERFUNDIDOS**  
**DE RATAS CONTROLES.**



Hígados de ratas controles, sometidas a un período de ayuno de 48 horas, fueron perfundidos según se describe en Métodos. La concentración de lactato se incrementó de forma lineal a una velocidad de 0,15 mM/min. y se tomaron alícuotas del efluente hepático a intervalos de 2 minutos. Los resultados son valores promedio de, al menos, tres observaciones.

**FIGURA 18**  
**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE OCTANOATO SOBRE LA TASA DE UTILIZACION DE LACTATO EN HIGADOS AISLADOS Y PERFUNDIDOS DE RATAS ADRENALECTOMIZADAS.**

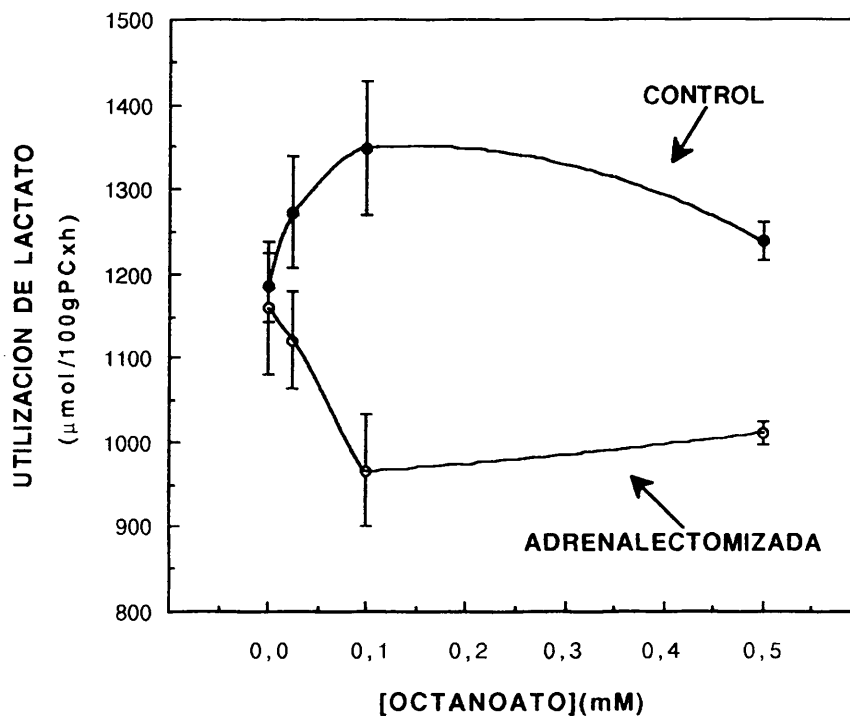


Hígados aislados de ratas adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48 horas, fueron perfundidos según se describe en Métodos. La concentración de lactato se incrementó de forma lineal a una velocidad de 0,15 mM/min. y se tomaron alícuotas del efluente hepático a intervalos de 2 minutos. Los resultados son valores promedio de 3-6 experimentos.

concentraciones de octanoato, en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas respectivamente. El perfil cualitativo de la respuesta es similar en ambos casos. La tasa de utilización de lactato, tanto en ausencia como en presencia de las distintas concentraciones de octanoato, muestra un comportamiento bifásico, alcanza una saturación a concentraciones de lactato de aproximadamente 1 mM, coincidiendo con la curva de saturación de producción de glucosa (Fig. 12); pero a concentraciones superiores a 3 mM, se observa un incremento lineal en la velocidad de utilización de lactato. En presencia de concentraciones crecientes de octanoato, existe una correlación entre la tasa de utilización de lactato y la de producción de glucosa, tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas.

La figura 19 refleja el efecto de la adrenalectomía sobre la tasa de utilización de lactato en función de la concentración de lactato en el medio de perfusión. En esta figura se han representado los valores correspondientes a una concentración de lactato de 7 mM. Puede observarse como, en hígados de ratas controles, la administración de concentraciones crecientes de octanoato hasta 0,1 mM produce un aumento progresivo en la tasa de utilización de lactato. Por encima de esta concentración de octanoato, se produce una disminución en la tasa de utilización de lactato, aunque ésta se mantiene en valores superiores a los basales. Por el contrario, en hígados de ratas adrenalectomizadas, la tasa de utilización de lactato disminuye a medida que aumenta la concentración de octanoato en el medio de perfusión.

**FIGURA 19**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA TASA DE UTILIZACION**  
**DE LACTATO EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES**  
**CRECIENTES DE OCTANOATO.**

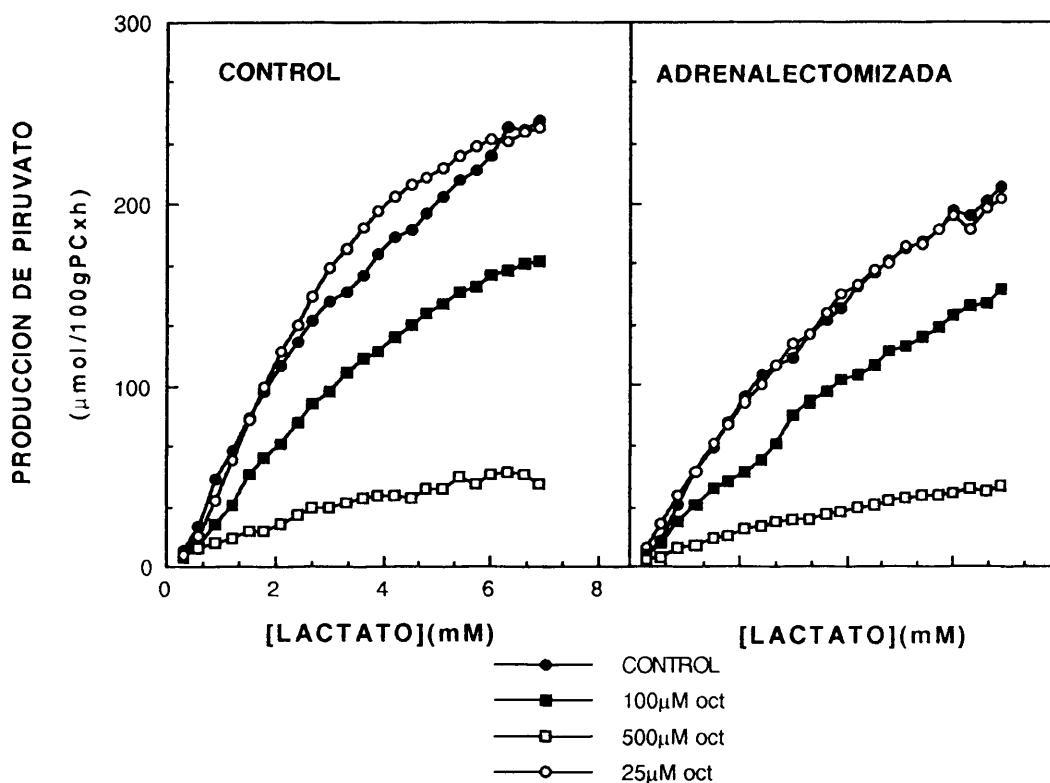


Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la figura 11. En esta figura se han representado los valores de utilización de lactato a partir de una concentración de lactato de 7mM. en el medio de perfusión. Cada valor es la media de 3-4 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media.

En la figura 20 aparece representado el efecto de la adrenalectomía sobre las tasas de producción de piruvato, en función de la concentración de lactato, en ausencia y en presencia de octanoato en el medio de perfusión. La tasa de producción de piruvato en hígados de ratas adrenalectomizadas es ligeramente inferior a la de los controles, tanto en ausencia como en presencia de cualquiera de las concentraciones de octanoato utilizadas. En la figura 21 se han representado los valores de producción de piruvato, correspondientes a una concentración de lactato de 7 mM, en función de la concentración de octanoato en el medio de perfusión, en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas. En ambos casos, se aprecia, (Fig. 21) que la tasa de producción de piruvato es inversamente proporcional a la concentración de octanoato en el medio de perfusión.

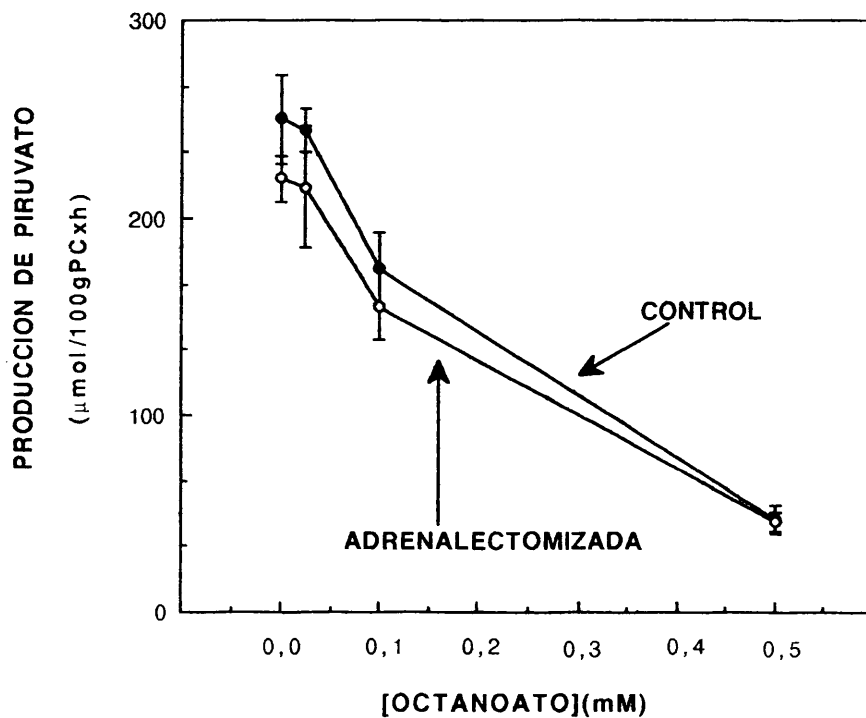
En la figura 22 se han representado los valores del cociente lactato/piruvato en el efluente hepático, en función de la concentración de lactato en el medio de perfusión, en ratas controles y adrenalectomizadas. Cada una de las curvas corresponde a la concentración indicada de octanoato en el medio de perfusión. Puede apreciarse que, tanto en ratas controles como adrenalectomizadas, con concentraciones de octanoato hasta 0,1 mM, se produce una caída inicial en el cociente lactato/piruvato en función de la concentración de lactato en el medio de perfusión, sin que existan diferencias significativas en estos incrementos cuando la concentración de octanoato en el medio de perfusión no supera el valor de 0,1 mM. En presencia de una concentración de

**FIGURA 20**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA TASA DE PRODUCCION**  
**DE PIRUVATO A PARTIR DE LACTATO EN AUSENCIA Y EN**  
**PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE OCTANOATO.**



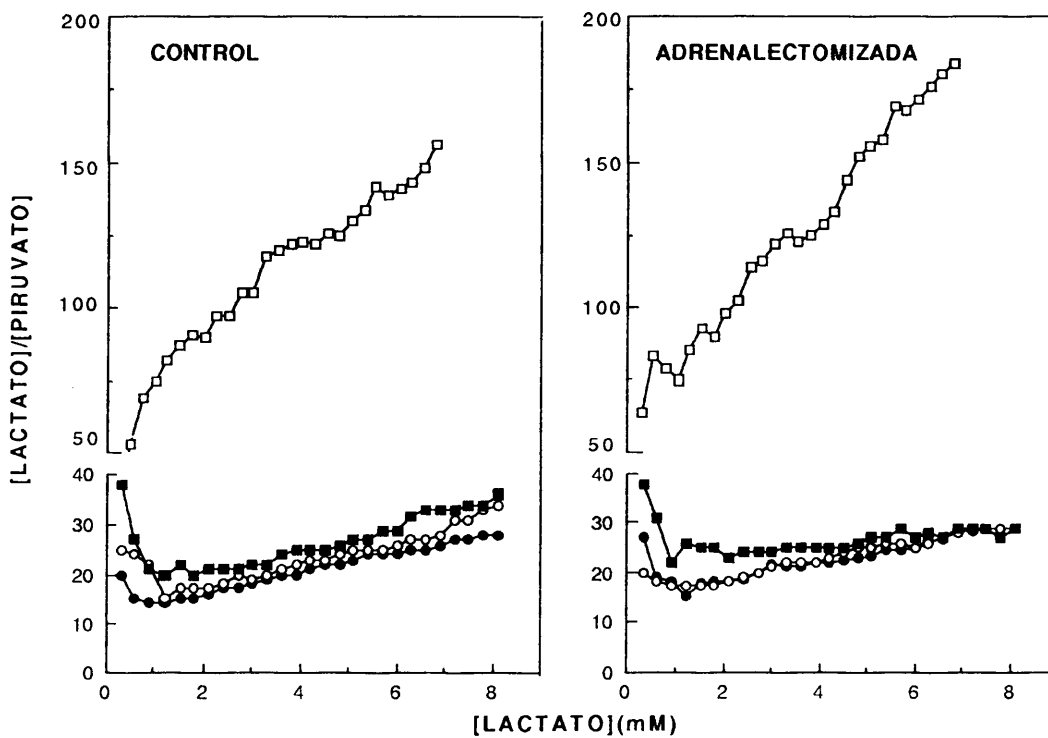
Hígados aislados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48 horas, fueron perfundidos según se describe en Métodos. La concentración de lactato se incrementó de forma lineal a una velocidad de  $0,15 \text{ mM}/\text{min}$ . y se tomaron alícuotas del efluente hepático a intervalos de 2 minutos. Cada valor es la media de, al menos 3 experimentos.

**FIGURA 21**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA TASA DE PRODUCCION DE PIRUVATO A PARTIR DE LACTATO EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE OCTANOATO EN EL MEDIO DE PERFUSION.**



Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la figura 11. En esta figura se han representado los valores de producción de piruvato a partir de una concentración de lactato de 7mM. en el medio de perfusión. Cada valor es la media de 3-4 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media.

**FIGURA 22**  
**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CONCENTRACIONES**  
**CRECIENTES DE OCTANOATO SOBRE LAS VARIACIONES DEL**  
**COCIENTE LACTATO/PIRUVATO EN EL EFLUENTE HEPATICO EN**  
**FUNCION DE LA CONCENTRACION DE LACTATO EN EL MEDIO DE**  
**PERFUSION EN RATAS CONTROLES Y ADRENALECTOMIZADAS.**



Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48 horas, fueron perfundidos, según se describe en Métodos. Después de alcanzar una tasa estacionaria de respiración en ausencia (-●-) o en presencia de octanoato: 25 $\mu$ M (-○-), 100 $\mu$ M(-■-) ó 500 $\mu$ M(-□-), se incrementó la concentración de lactato de forma lineal a una velocidad de 0,15 mM/min. y se tomaron alícuotas del efluente a intervalos de dos minutos. Cada valor es la media de, al menos, 3 experimentos.

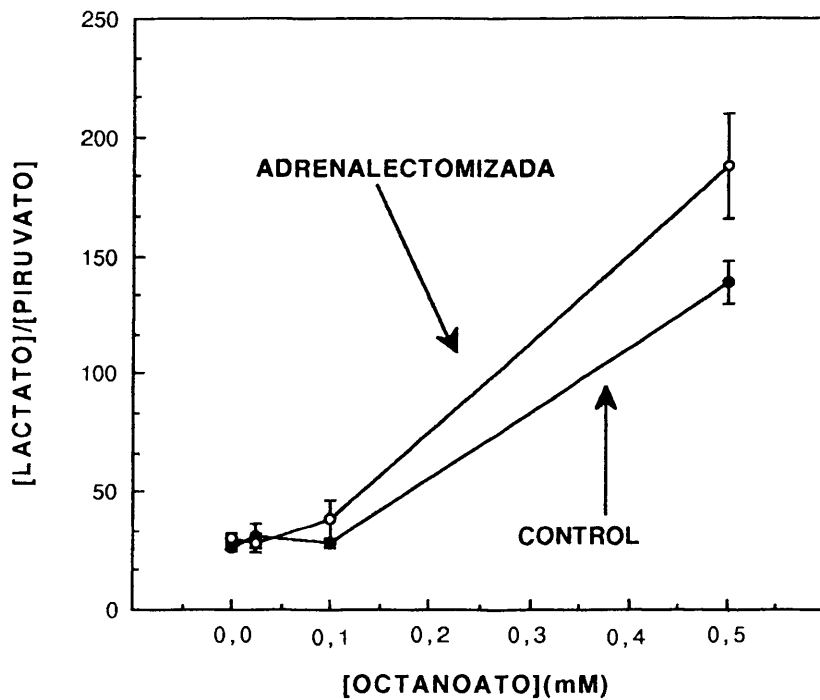
octanoato de 0,5 mM, se produce un aumento en el estado de reducción del sistema NAD citosólico incluso a las concentraciones más bajas de lactato.

En la figura 23 se ha representado de forma comparativa los incrementos en el estado redox citosólico, en función de la concentración de octanoato, en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas para una concentración de lactato de 7 mM. Puede apreciarse que el incremento lineal que se produce en el cociente lactato/piruvato con concentraciones superiores a 0,1 mM octanoato, es mayor en las ratas adrenalectomizadas. Estos resultados indican que la ausencia de glucocorticoides tiene como consecuencia un aumento en el estado de reducción del sistema NAD<sup>+</sup> citosólico.

### 3.2.- INFLUENCIA DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL EFECTO DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE OCTANOATO SOBRE GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE CONCENTRACIONES ESTACIONARIAS DE LACTATO.

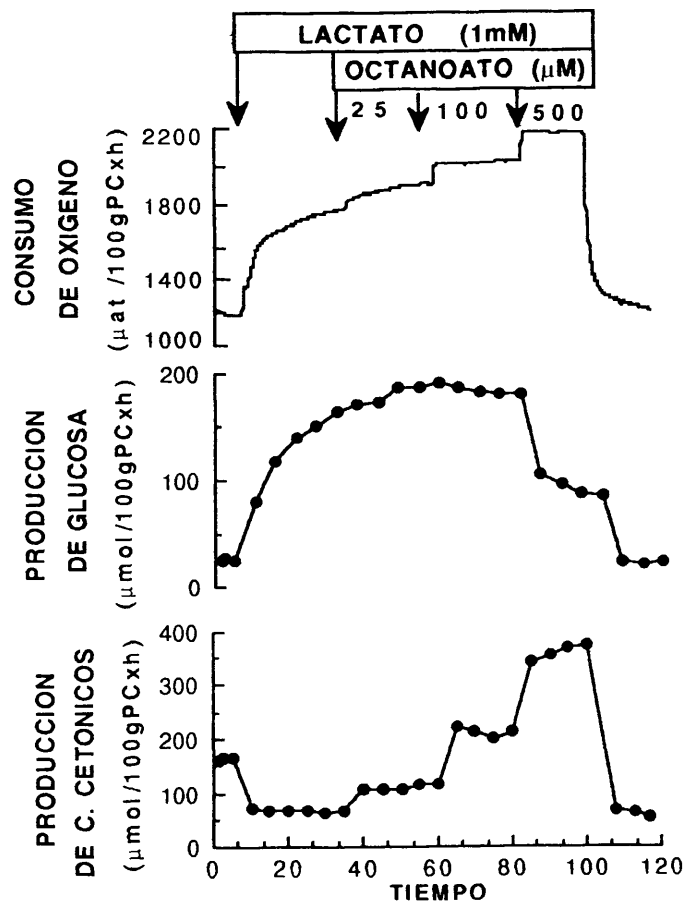
En la figura 24, se muestra el registro de consumo de oxígeno y las tasas de producción de glucosa y de cuerpos cetónicos en hígados perfundidos de ratas controles, con objeto de relacionar los incrementos observados en respiración con las demandas energéticas de los principales procesos biosintéticos de un animal en ayuno. En estos experimentos, la concentración de octanoato se incrementó de forma escalonada desde 25 $\mu$ M hasta 500 $\mu$ M después de que se hubiera alcanzado una tasa estacionaria de

**FIGURA 23**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LAS VARIACIONES DEL**  
**COCIENTE LACTATO/PIRUVATO PRODUCIDAS POR OCTANOATO EN**  
**HIGADOS PERFUNDIDOS CON LACTATO.**



Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48 horas, fueron perfundidos según se describe en la figura 11. En esta figura, se han representado los valores de la relación lactato/piruvato correspondientes a una concentración de lactato 7mM. en el medio de perfusión. Cada valor es la media de 3-4 experimentos  $\pm$  el error estándar de la media.

**FIGURA 24**  
**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CONCENTRACIONES**  
**CRECIENTES DE OCTANOATO SOBRE LAS TASAS DE RESPIRACION,**  
**GLUCONEOGENESIS Y CETOGENESIS EN HIGADOS DE RATAS**  
**CONTROLES PERFUNDIDOS EN PRESENCIA DE LACTATO.**



Hígados de ratas controles, sometidas a un período de ayuno de 48 h., fueron perfundidos según se describe en Métodos. Después de que se alcanzara una tasa estacionaria de consumo de oxígeno en presencia de lactato 1mM, la concentración de octanoato se incrementó de forma escalonada. Cada 5 minutos se tomaron alícuotas del efluente hepático para la determinación de los distintos metabolitos. Los resultados son la media de dos experimentos.

respiración con una concentración de lactato de 1mM. Puede observarse cómo inmediatamente después de la administración de lactato se produce un incremento progresivo del consumo de oxígeno hasta alcanzar una tasa estacionaria de respiración aproximadamente a los 20 minutos de su administración. Paralelamente aumenta la tasa de gluconeogénesis y disminuye la producción de cuerpos cetónicos en un 60%. La administración de concentraciones crecientes de octanoato produce incrementos paralelos en las tasas de respiración y cetogénesis que son función de la concentración de octanoato en el medio de perfusión. A pesar de los incrementos de respiración que se producen tras la administración de cantidades crecientes de octanoato, la tasa de gluconeogénesis sólo aumenta discretamente con 25 $\mu$ M octanoato y disminuye significativamente en presencia de una concentración de octanoato de 500 $\mu$ M.

Asumiendo un gasto de 6 moles de ATP por mol de glucosa sintetizado y un cociente P/O = 3, podemos comprobar con nuestros resultados, que el incremento en el consumo de oxígeno que produce la administración de una concentración estacionaria de lactato 1mM, aproximadamente 500  $\mu$ átomos de oxígeno/100gPCxh, excede la demanda de energía impuesta por el aumento en la tasa de producción de glucosa. En efecto, la tasa observada de producción de glucosa a partir de lactato, 188  $\mu$ moles/100gPCxh requeriría la utilización de 1128  $\mu$ moles de ATP es decir 376  $\mu$ átomos de oxígeno, lo cual representa

aproximadamente el 75% del incremento en la tasa de consumo de oxígeno inducido por la presencia de lactato

En la tabla VI se han recogido los resultados obtenidos sobre los incrementos producidos en la tasa de consumo de oxígeno tras la administración de lactato 1mM y concentraciones crecientes de octanoato, y la estimación del gasto de energía que se requiere para la síntesis de glucosa y de cuerpos cetónicos en las distintas condiciones. Puede observarse que existe un ajuste preciso entre los incrementos de respiración y las demandas energéticas impuestas por los procesos de gluconeogénesis y cetogénesis. Resulta evidente de estos resultados que la energía obtenida de la oxidación de octanoato no se invierte en incrementar el flujo gluconeogénico, en estas condiciones, sino fundamentalmente en incrementar la tasa de formación de cuerpos cetónicos.

Para la estimación de la utilización de equivalentes de oxígeno para la síntesis de cuerpos cetónicos, hemos asumido que la administración de lactato ejerce su efecto anticetogénico fundamentalmente sobre la tasa de cetogénesis endógena. Esta idea se apoya en los resultados que se muestran en la figura 25 donde se ha representado la tasa de producción de cuerpos cetónicos en función de la concentración de octanoato en el medio de perfusión en ausencia y en presencia de una concentración de lactato de 1mM. Puede observarse que el proceso de cetogénesis a partir de octanoato sigue una cinética de saturación típica. El patrón de cetogénesis es similar en ausencia y en presencia del

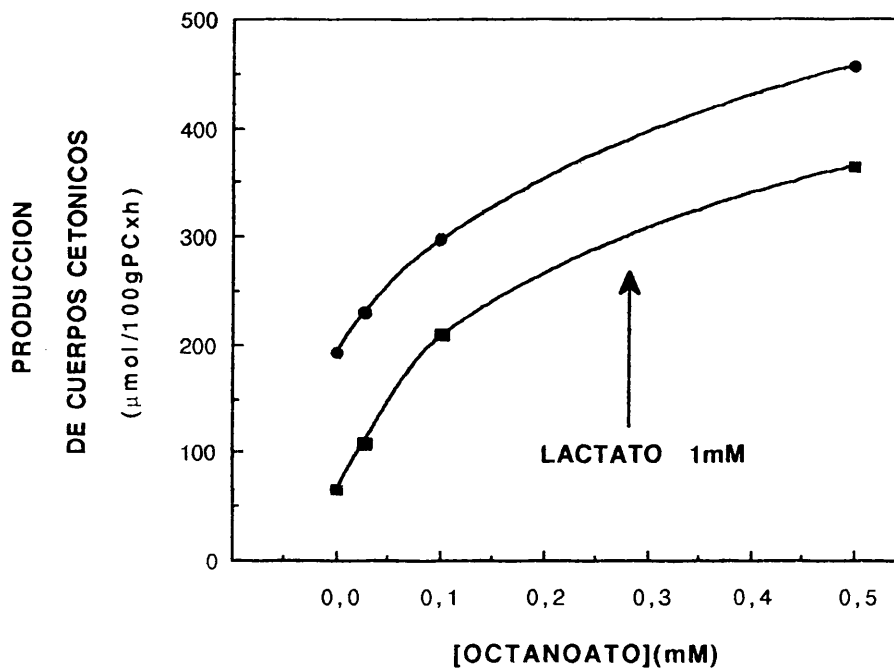
TABLA VI

**RELACION ENTRE CONSUMO DE OXIGENO Y GASTO  
ENERGETICO EN HIGADOS DE RATAS CONTROLES.**

CONDICION	$\Delta$ CONSUMO DE OXIGENO	UTILIZACION DE EQUIVALENTES DE OXIGENO PARA LA SINTESIS DE:	
		GLUCOSA	CUERPOS CETONICOS
		( $\mu$ atom/100gPCxh)	
LACTATO (1mM)	511	376	---
+ OCTANOATO (25 $\mu$ M)	642	418	120
+ OCTANOATO (100 $\mu$ M)	773	374	381
+ OCTANOATO (500 $\mu$ M)	916	192	778

Los datos del consumo de oxígeno, síntesis de glucosa y producción de cuerpos cetónicos han sido tomados de la figura 24. Para la estimación del gasto energético, se ha asumido un valor para la relación fosfato/oxígeno de 3, y un gasto de 2 y 3 equivalentes de oxígeno para la síntesis de  $\beta$ -hidroxibutirato y acetoacetato respectivamente. Los resultados mostrados son la media de dos experimentos.

**FIGURA 25**  
**EFFECTO DE LA PRESENCIA DE LACTATO EN EL MEDIO DE PERFUSION**  
**SOBRE LA TASA DE PRODUCCION DE CUERPOS CETONICOS A PARTIR**  
**DE OCTANOATO.**



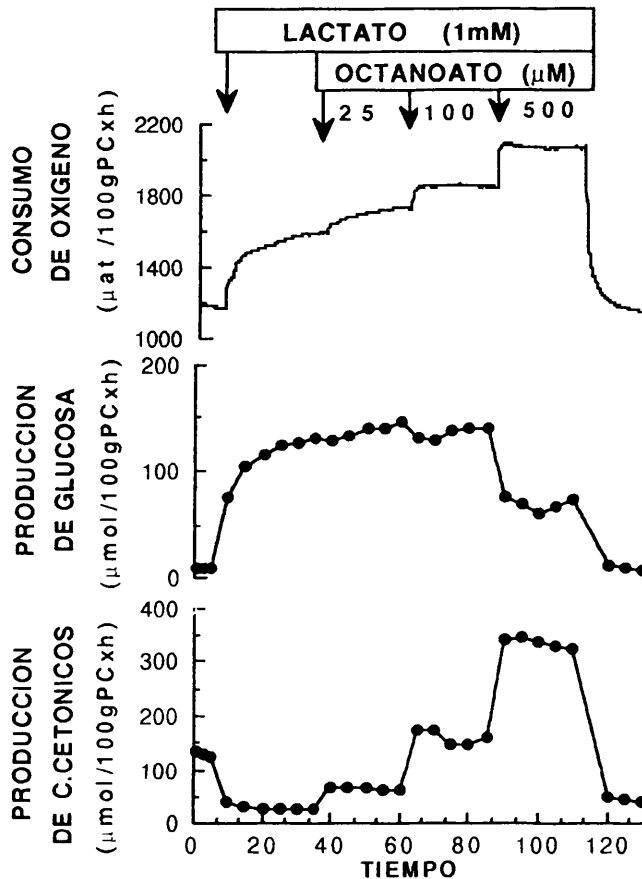
Hígados de ratas controles, sometidas a un período de ayuno de 48 horas, fueron perfundidos en ausencia y en presencia de una concentración de lactato de 1mM. Después de que se alcanzara una tasa estacionaria de respiración, la concentración de octanoato se incrementó de forma escalonada. Los resultados mostrados corresponden a valores estacionarios de producción de cuerpos cetónicos alcanzados después de la administración de las concentraciones indicadas de octanoato y son la media de dos experimentos.

precursor gluconeogénico, la tasa de formación de cuerpos cetónicos a partir de octanoato disminuye, en presencia de lactato, en una cantidad constante e idéntica a la que induce la presencia de lactato en ausencia del ácido graso.

En la figura 26 aparecen representadas las tasas de consumo de oxígeno y de producción de glucosa y cuerpos cetónicos en hígados de ratas adrenalectomizadas, perfundidos con lactato 1mM y concentraciones crecientes de octanoato. El patrón de respuesta es muy similar al observado en hígados de ratas sometidas a una operación simulada (Fig. 24). En ausencia de octanoato, el incremento de consumo de oxígeno tras la administración del lactato 1mM es aproximadamente un 30% menor que en las ratas controles y en igual porcentaje disminuye la tasa de síntesis de glucosa a partir de lactato. Esta inhibición de la tasa de gluconeogénesis contrasta con la ausencia de cambios en la velocidad de producción de glucosa, en hígados de ratas adrenalectomizadas, cuando se incrementó la concentración de lactato, de forma progresiva hasta valores de 7mM. Esta variabilidad pudiera ser debida al hecho de que la obtención de una tasa estacionaria de producción de glucosa a partir de una determinada concentración de sustrato es función del tiempo.

Los efectos de la administración de concentraciones crecientes de octanoato, en presencia de una concentración estacionaria de lactato 1mM en el medio de perfusión, sobre las

**FIGURA 26**  
**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CONCENTRACIONES**  
**CRECIENTES DE OCTANOATO SOBRE LAS TASAS DE RESPIRACION,**  
**GLUCONEOGENESIS Y CETOGENESIS EN HIGADOS DE RATAS**  
**ADRENALECTOMIZADAS PERFUNDIDOS EN PRESENCIA DE LACTATO.**



Hígados de ratas adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48 h., fueron perfundidos según se describe en Métodos. Después de que se alcanzara una tasa estacionaria de consumo de oxígeno en presencia de lactato 1mM., la concentración de octanoato se incrementó de forma escalonada. Cada 5 minutos se tomaron alícuotas del efluente hepático para la determinación de los distintos metabolitos. Los resultados son la media de dos experimentos.

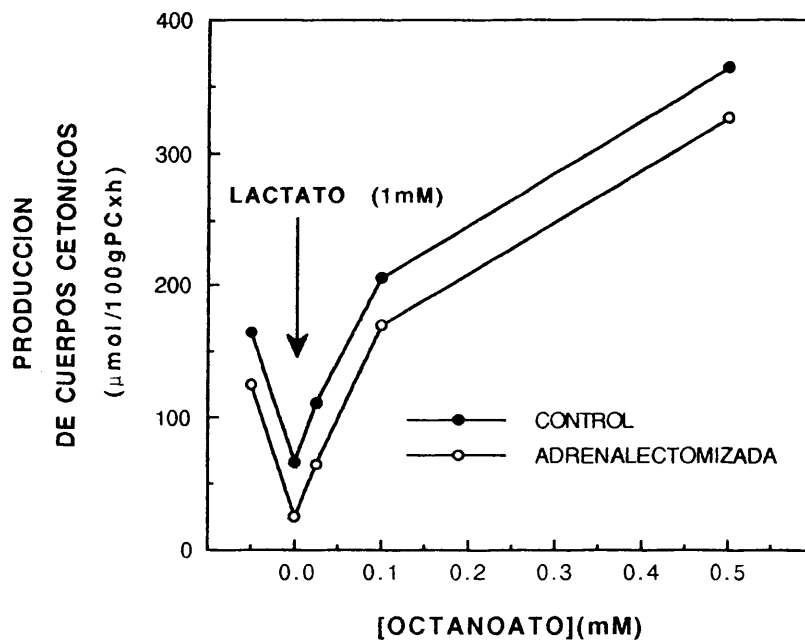
tasas de respiración y de gluconeogénesis no difieren significativamente de los observados en hígados de ratas controles.

La tasa de cetogénesis endógena en hígados de ratas adrenalectomizadas, como ya habíamos comentado (Fig. 9) está disminuída respecto a los controles, sin embargo, tanto el efecto anticetogénico de lactato como la tasa de producción de cuerpos cetónicos a partir de octanoato no se ven alterados por la adrenalectomía ( Fig. 27 ).

La tabla VII muestra la relación existente entre consumo de oxígeno y gasto energético en hígados de ratas adrenalectomizadas. De nuevo puede observarse un ajuste preciso entre los incrementos de respiración observados y las demandas energéticas impuestas por los procesos de síntesis.

En la tabla VIII se han recogido, de forma comparativa, los datos obtenidos sobre el efecto de la administración de concentraciones crecientes de octanoato, en presencia de una concentración estacionaria de lactato 1mM en el medio de perfusión, sobre la actividad metabólica en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas. En estas condiciones experimentales, tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas, la tasa de producción de glucosa y la de piruvato dan cuenta del total de la utilización de lactato en contraste con los resultados obtenidos cuando se incrementaba gradualmente la concentración de lactato en el medio de perfusión en ausencia y en presencia de concentraciones estacionarias de

**FIGURA 27**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA TASA DE PRODUCCION**  
**DE CUERPOS CETONICOS A PARTIR DE OCTANOATO.**



Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48 horas., fueron perfundidos según se ha descrito en las figuras 24 y 26 . Después de que se alcanzara una tasa estacionaria de respiración en presencia de lactato 1mM , la concentración de octanoato se incrementó de forma escalonada. Los resultados, media de dos experimentos, corresponden a valores estacionarios de producción de cuerpos cetónicos alcanzados después de la administración de lactato y de las concentraciones indicadas de octanoato.

TABLA VII

**RELACION ENTRE CONSUMO DE OXIGENO Y GASTO  
ENERGETICO EN HIGADOS DE RATAS ADRENALECTOMIZADAS**

CONDICION	$\Delta$ CONSUMO DE OXIGENO	UTILIZACION DE EQUIVALENTES DE OXIGENO PARA LA SINTESIS DE:	
		GLUCOSA	CUERPOS CETONICOS
		( $\mu$ atom/100gPCxh)	
LACTATO (1mM)	350	256	---
+ OCTANOATO (25 $\mu$ M)	491	284	99
+ OCTANOATO (100 $\mu$ M)	677	278	432
+ OCTANOATO (500 $\mu$ M)	958	132	813

Los datos del consumo de oxígeno, síntesis de glucosa y producción de cuerpos cetónicos han sido tomados de la figura 26. Para la estimación del gasto energético, se ha asumido un valor para la relación fosfato/oxígeno de 3, y un gasto de 2 y 3 equivalentes de oxígeno para la síntesis de  $\beta$ -hidroxibutirato y acetoacetato respectivamente. Los resultados mostrados son la media de dos experimentos.

**TABLA VIII**  
**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE OCTANOATO SOBRE LA ACTIVIDAD METABOLICA EN**  
**HIGADOS DE RATAS CONTROLES Y ADRENALECTOMIZADAS PERFUNDIDOS CON LACTATO 1mM.**

CONDICION	GRUPO	UTILIZACION DE LACTATO	PRODUCCION DE GLUCOSA	PRODUCCION DE PIRUVATO	L/P	B/A
LACTATO	CONTROL	421	( $\mu$ moles/100gPCxh) 188	60	11	0,22
	ADX	328	128	60	12	0,25
+OCTANOATO (25 $\mu$ M)	CONTROL	478	209	63	11	0,29
	ADX	377	159	62	12	0,36
+OCTANOATO (100 $\mu$ M)	CONTROL	422	187	58	12	0,44
	ADX	340	139	53	15	0,54
+OCTANOATO (500 $\mu$ M)	CONTROL	201	96	12	77	0,95
	ADX	150	66	15	82	1,03

Las condiciones experimentales son iguales a las descritas en las figuras 24 y 26, según se trate de ratas controles o adrenalectomizadas respectivamente. La tasa de utilización de lactato y producción de los distintos metabolitos se determinó en el intervalo 15-25 minutos después de la adición de lactato y de las concentraciones indicadas de octanoato. Los resultados son medias de dos experimentos. (L/P=[lactato]/[piruvato]; B/A=( $[\beta$ -hidroxibutirato]/[acetacetato])).

octanoato. Las diferencias más notorias entre los dos grupos de ratas son, fundamentalmente, una menor tasa de gluconeogénesis a partir de 1mM lactato y un mayor estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico y mitocondrial en hígados de ratas adrenalectomizadas.

### 3.3.- EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL FLUJO A TRAVES DEL CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS.

El principal objetivo de los experimentos que vamos a comentar fue estudiar la influencia de la adrenalectomía sobre el flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Resultados previos de nuestro laboratorio sugerían que la energía que se invierte en incrementar la tasa de gluconeogénesis deriva de un incremento en el flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (González-Manchón y col., 1989). Por esta razón, creímos de interés explorar si la ausencia de estimulación de gluconeogénesis, en respuesta a la administración de octanoato, en hígados de ratas adrenalectomizadas, pudiera estar causada por una perturbación en el flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, inducida por la carencia de esteroides adrenales. El flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos se puede estimar a partir de las medidas del consumo de oxígeno, corregidas por la producción, no mitocondrial de  $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$ , así como por la producción de cuerpos cetónicos, si se asume la simplificación de que la respiración basal, es decir, en ausencia de substratos, se

debe a la oxidación de ácidos grasos endógenos de 16 átomos de carbono (Williamson y col., 1969; Corkey y col., 1982).

En las tablas IX y X aparece recogida la actividad metabólica de hígados de ratas controles y adrenalectomizadas respectivamente, perfundidos con lactato 5mM en ausencia y en presencia de una concentración de octanoato de 0,1mM. La comparación entre las dos tablas revela, una vez más, que la presencia de octanoato no es capaz de aumentar la velocidad de producción de glucosa a partir de lactato en hígados de ratas adrenalectomizadas, en contraste con un 50% de estimulación, inducida por octanoato, del flujo gluconeogénico en hígados de ratas controles, perfundidos en idénticas condiciones. En ausencia de substratos, el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  mitocondrial, expresado por el cociente  $\beta$ -hidroxi-butirato/acetoacetato, se encuentra más oxidado en hígados de ratas adrenalectomizadas (tabla X). En estas condiciones, se observa de nuevo, una disminución en la tasa de cetogénesis endógena. Cuando los hígados son perfundidos en presencia de lactato y/o octanoato, se produce un aumento tanto en el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico como mitocondrial, de mayor cuantía en hígados de ratas adrenoprivas. Tras la administración conjunta de lactato y octanoato se observa un ligero aumento en la tasa de cetogénesis en hígados de ratas adrenalectomizadas respecto a los controles (tablas IX y X) pero la diferencia no fue estadísticamente significativa.

TABLA IX

**RESPUESTA METABOLICA A LACTATO Y OCTANOATO DE  
HIGADOS PERFUNDIDOS DE RATAS CONTROLES.**

ADICIONES	—	LACTATO (5mM)	OCTANOATO (0,1mM)	OCTANOATO + LACTATO
		(µatom/100gPCxh)		
CONSUMO DE OXIGENO	1031±51	1413±18	1301±71	1672±128
		(µmol/100gPCxh)		
PRODUCCION DE GLUCOSA	—	137±12	—	205±20
PRODUCCION DE PIRUVATO	—	158±2	—	160±13
UTILIZACION DE LACTATO	—	680±70	—	757±42
PRODUCCION DE β-OH-BUTIRATO	20±2	13±1	91±8	61±9
PRODUCCION DE ACETOACETATO	119±11	11±2	133±7	64±6
[LACTATO] [PIRUVATO]	—	18±3	—	24±2
[β-OH-BUTIRATO] [ACETOACETATO]	0,17±0,02	0,63±0,2	0,68±0,03	1,04±0,1

Hígados de ratas controles fueron perfundidos con Krebs-Ringer hasta que se alcanzó una tasa basal estacionaria de respiración, después de la cual se administraron los substratos a las concentraciones indicadas. En los experimentos de administración conjunta de octanoato y lactato este último substrato se añadió después de perfundir el tejido durante 25 min. con octanoato. Las tasa metabólicas fueron calculadas a los 20-30 min. después de la administración de los substratos. Los resultados son la media de 4 experimentos ± el error estándar.

TABLA X

**RESPUESTA METABOLICA A LACTATO Y OCTANOATO DE HIGADOS PERFUNDIDOS DE RATAS ADRENALECTOMIZADAS.**

ADICIONES	—	LACTATO (5mM)	OCTANOATO (0,1mM)	OCTANOATO + LACTATO
		(µatom/100gPCxh)		
CONSUMO DE OXIGENO	925±22	1343±28	1305±52	1651±85
		(µmol/100gPCxh)		
PRODUCCION DE GLUCOSA	—	98±8	—	95±16
PRODUCCION DE PIRUVATO	—	179±6	—	141±7
UTILIZACION DE LACTATO	—	616±76	—	672±34
PRODUCCION DE β-OH-BUTIRATO	8±0,8	8±2	96±8	81±6
PRODUCCION DE ACETOACETATO	99±11	9±0,3	138±3	78±5
[LACTATO] [PIRUVATO]	—	23±1	—	30±2
[β-OH-BUTIRATO] [ACETOACETATO]	0,1±0,001	0,73±0,1	0,75±0,02	1,13±0,03

Hígados de ratas adrenalectomizadas fueron perfundidos con Krebs-Ringer hasta que se alcanzó una tasa basal estacionaria de respiración, después de la cual se administraron los substratos a las concentraciones indicadas. En los experimentos de administración conjunta de octanoato y lactato este último substrato se añadió después de perfundir el tejido durante 25 min. con octanoato. Las tasas metabólicas fueron calculadas a los 20-30 min. después de la administración de los substratos. Los resultados son la media de 4 experimentos ± el error estándar.

La estimación del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas aparece recogida en las tablas XI y XII respectivamente. Puede observarse, en primer lugar, que la adrenalectomía no produce alteración alguna en el flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas, la administración de lactato incrementa el flujo a través del ciclo (50% y 35% respectivamente), mientras que la administración de octanoato produce una estimulación de, aproximadamente el 20%, en el flujo a través del ciclo de Krebs. La diferencia más significativa entre ambos grupos de ratas se encuentra en el hecho de que mientras en los hígados de ratas controles, la administración conjunta de octanoato y lactato tiene efectos aditivos estimulando el flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos, en hígados de ratas adrenalectomizadas, tiene lugar una inhibición, de aproximadamente, el 13%, en el flujo a través del ciclo. La inhibición del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos, en estas condiciones, no resulta, sin embargo, en una disminución de la producción de energía, ya que la oxidación de lactato y octanoato genera una considerable cantidad de ATP a través de la producción de equivalentes de reducción tanto en el compartimento citosólico como mitocondrial.

TABLA XI

**EFEECTO DE OCTANOATO SOBRE EL FLUJO A TRAVES DEL  
CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS EN HIGADOS  
PERFUNDIDOS DE RATAS CONTROLES.**

ADICIONES	---	LACTATO	OCTANOATO	OCTANOATO
		(5mM)	(0,1mM)	+ LACTATO
(µatom/100gPCxh)				
CONSUMO DE OXIGENO	1031	1413	1301	1671
CONSUMO MITOCONDRIAL*	897	1279	1167	1538
EQUIVALENTES DE OXIGENO PARA:				
- SINTESIS DE β-OH-BUTIRATO	50	33	192	129
- SINTESIS DE ACETOACETATO	417	39	459	198
- TOTAL CUERPOS CETONICOS	467	72	651	327
- LACTATO--->PIRUVATO	----	158	---	160
- LACTATO--->ACETILCoA	----	496	---	374
- OXIDACION DE LACTATO EN EL CICLO DE ATC	----	274	---	410
- ACIDOS GRASOS-->CO <sub>2</sub>	430	279	516	267
- ACIDOS GRASOS-->ACETILCoA	129	84	155	80
- OXIDACION DE AG EN EL CICLO DE LOS ATC	301	195	361	187
RESPIRACION INDEPENDIENTE DEL CICLO	596	810	806	941
RESPIRACION DEPENDIENTE DEL CICLO	301	469	361	597
(µmol/100gPCxh)				
FLUJO A TRAVES DEL CICLO DE ATC	75	117	90	149
% DEL CONTROL	100	156	120	199

(\* Aproximadamente el 13% de la respiración basal no es sensible a cianuro).

La estimación del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos se realizó a partir de los datos recogidos en la Tabla IX, según Williamson y col., 1969.

TABLA XII

**EFFECTO DE OCTANOATO SOBRE EL FLUJO A TRAVES DEL  
CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS EN HIGADOS  
PERFUNDIDOS DE RATAS ADRENALECTOMIZADAS.**

ADICIONES	—	LACTATO	OCTANOATO	OCTANOATO
		(5mM)	(0,1mM)	+ LACTATO
(µatom/100gPCxh)				
CONSUMO DE OXIGENO	925	1343	1305	1651
CONSUMO MITOCONDRIAL*	805	1223	1184	1530
EQUIVALENTES DE OXIGENO PARA:				
- SINTESIS DE β-OH-BUTIRATO	20	20	196	166
- SINTESIS DE ACETOACETATO	346	32	463	238
- TOTAL CUERPOS CETONICOS	366	52	659	404
- LACTATO--->PIRUVATO	----	179	—	141
- LACTATO--->ACETILCoA	----	482	—	682
- OXIDACION DE LACTATO EN EL CICLO DE ATC	----	196	—	190
- ACIDOS GRASOS-->CO <sub>2</sub>	439	314	525	113
- ACIDOS GRASOS-->ACETILCoA	132	94	157	34
- OXIDACION DE AG EN EL CICLO DE LOS ATC	307	220	368	79
RESPIRACION INDEPENDIENTE DEL CICLO	498	807	816	1261
RESPIRACION DEPENDIENTE DEL CICLO	307	416	368	269
(µmol/100gPCxh)				
FLUJO A TRAVES DEL CICLO DE ATC	77	104	92	67
% DEL CONTROL	100	135	119	87

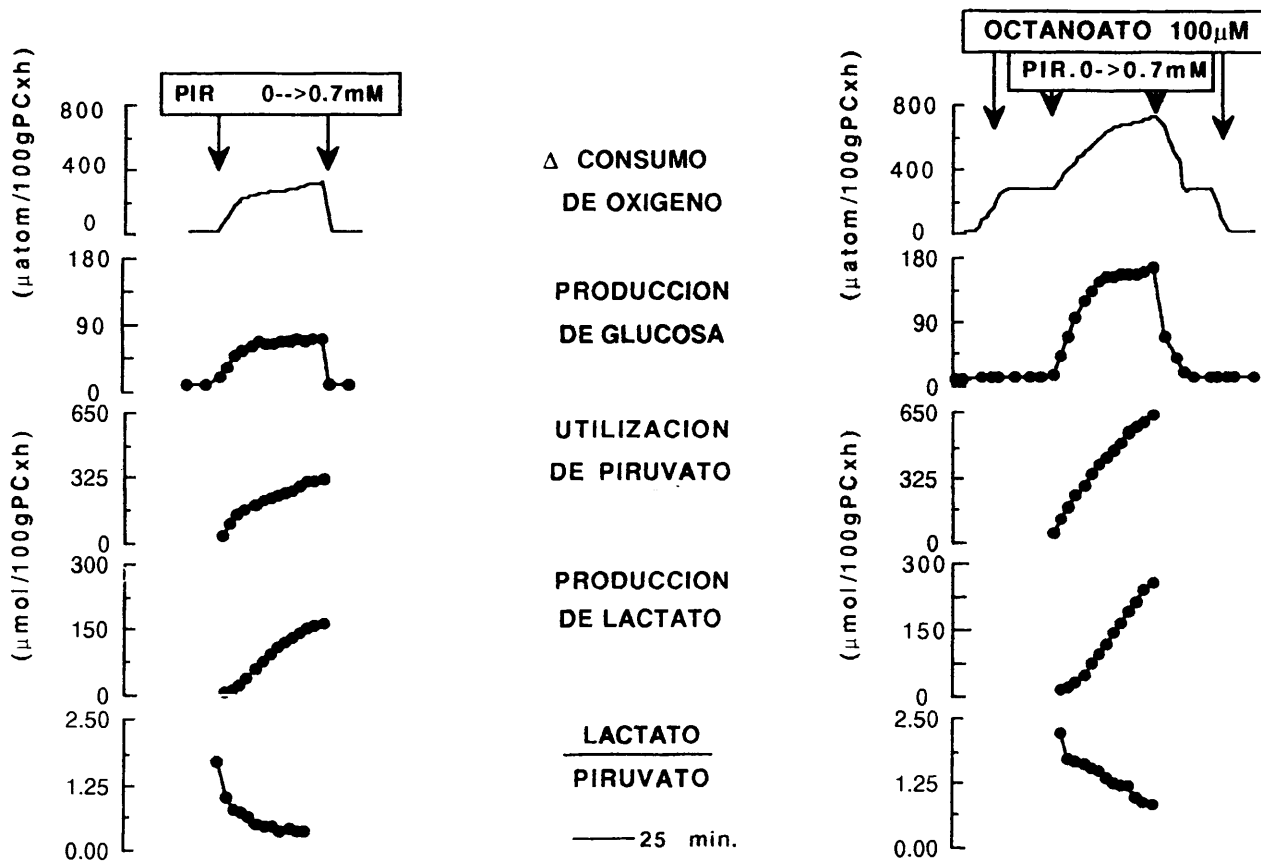
(\* Aproximadamente el 13% de la respiración basal no es sensible a cianuro).

La estimación del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos se realizó a partir de los datos recogidos en la Tabla X, según Williamson y col., 1969.

#### 4.- INFLUENCIA DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA REGULACION DEL METABOLISMO HEPATICO DE PIRUVATO POR ACIDOS GRASOS.

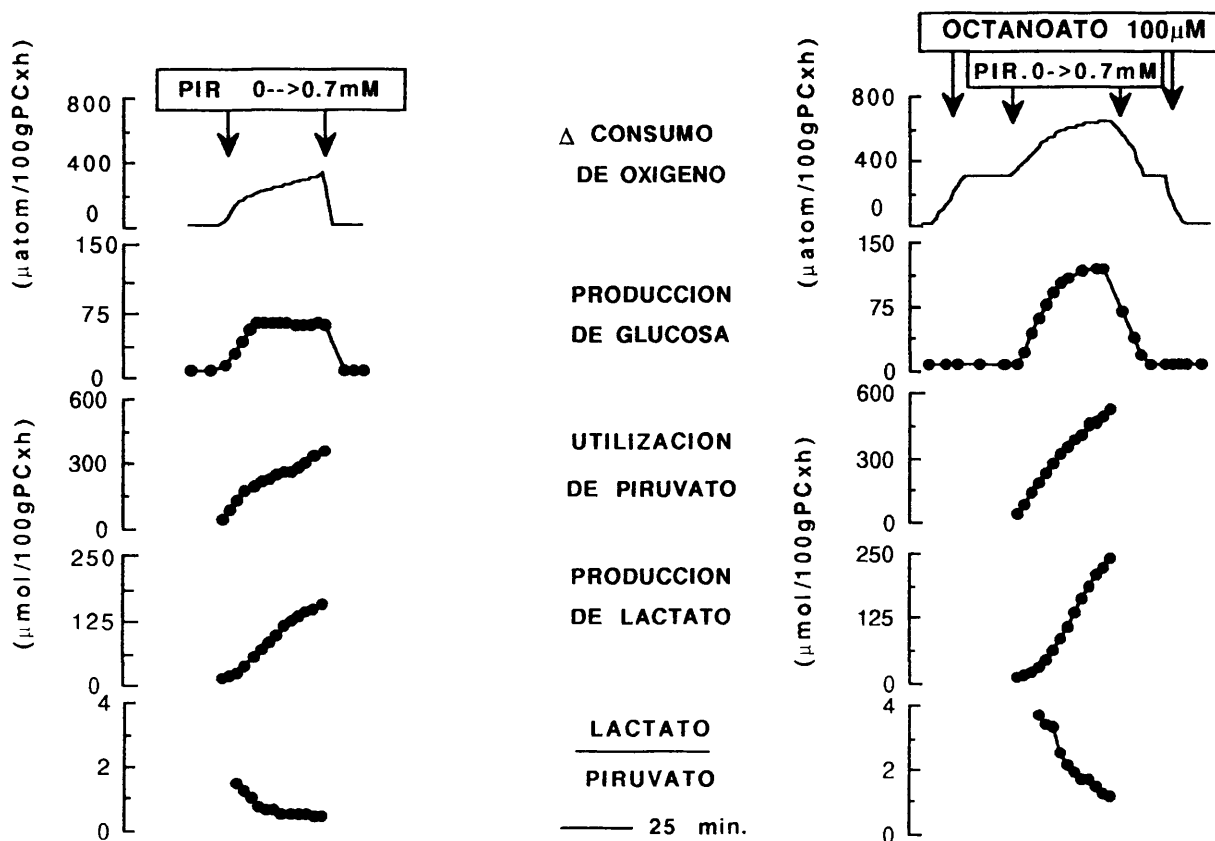
Las figuras 28 y 29 muestran las tasas de respiración y de producción de glucosa en ausencia y en presencia de octanoato, en hígados perfundidos de ratas controles y adrenalectomizadas respectivamente. Estos experimentos se llevaron a cabo incrementando la concentración de sustrato de forma lineal. En estas gráficas también aparecen representadas las tasas de utilización de piruvato y de producción de lactato y el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico expresado por el cociente lactato/piruvato. Se aprecia que, tanto en hígados perfundidos de ratas controles como adrenalectomizadas, la producción de glucosa a partir de piruvato es un proceso que se satura a concentraciones de sustrato de aproximadamente 0,3 mM, y no se aprecian cambios significativos en la velocidad de producción de glucosa a partir de piruvato en hígados de ratas adrenalectomizadas respecto a los controles. Cuando estos experimentos se realizan equilibrando previamente la preparación con octanoato, como se aprecia en la parte derecha de las figuras 28 y 29, la adición de concentraciones crecientes de piruvato, da lugar a un mayor incremento en las tasas de producción de glucosa y de utilización de sustrato, tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas. Paralelamente, se observa un incremento en el consumo de oxígeno, probablemente para dar cuenta de la mayor demanda de energía para la síntesis de glucosa. La comparación de los trazados de consumo de oxígeno, en ausencia y

**FIGURA 28**  
**EFFECTO DE OCTANOATO SOBRE LOS INCREMENTOS DE RESPIRACION**  
**Y TASAS METABOLICAS INDUCIDOS POR CONCENTRACIONES**  
**CRECIENTES DE PIRUVATO EN HIGADO AISLADO Y PERFUNDIDO DE**  
**RATAS CONTROLES.**



Hígados aislados de ratas controles, sometidas a ayuno durante 48 h., fueron perfundidos según se describe en Métodos. Alcanzada una tasa basal estacionaria de respiración, el sustrato y/o el ácido graso fueron añadidos a las concentraciones indicadas. La concentración de piruvato se incrementó de forma lineal mediante un formador de gradientes, a una velocidad de 0,03  $\mu\text{moles}/\text{ml} \times \text{min.}$  y fueron tomadas alícuotas del efluente hepático a intervalos de dos minutos. Los datos representados son valores promedio de, al menos, 3 experimentos.

**FIGURA 29**  
**EFFECTO DE OCTANOATO SOBRE LOS INCREMENTOS DE RESPIRACION**  
**Y TASAS METABOLICAS INDUCIDOS POR CONCENTRACIONES**  
**CRECIENTES DE PIRUVATO EN HIGADO AISLADO Y PERFUNDIDO DE**  
**RATAS ADRENALECTOMIZADAS.**



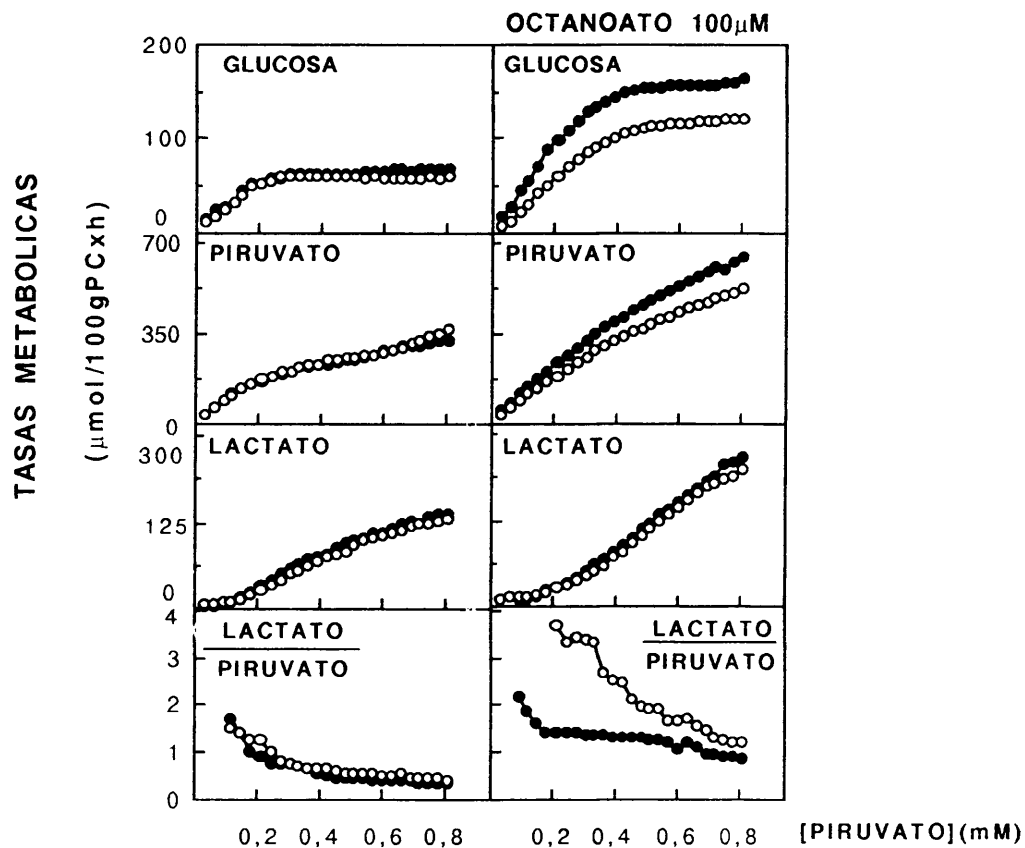
Hígados aislados de ratas adrenalectomizadas, sometidas a ayuno durante 48 h., fueron perfundidos según se describe en Métodos. Alcanzada una tasa basal estacionaria de respiración, el substrato y/o el ácido graso fueron añadidos a las concentraciones indicadas. La concentración de piruvato se incrementó de forma lineal mediante un formador de gradientes, a una velocidad de  $0,03 \mu\text{moles/ml} \times \text{min.}$  y fueron tomadas alícuotas del efluente hepático a intervalos de dos minutos. Los datos representados son valores promedio de, al menos, 3 experimentos.

en presencia de octanoato, indica que el incremento de respiración en respuesta a la administración de cantidades crecientes de piruvato es mayor en presencia de octanoato tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas.

La figura 30 recoge de forma comparativa la tasa de producción de glucosa a partir de piruvato, en ausencia y en presencia de octanoato, en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas. Puede observarse que la adrenalectomía no produce efectos apreciables en la cinética de producción de glucosa a partir de piruvato. Por otra parte, la adrenalectomía no impide el efecto de octanoato incrementando el flujo gluconeogénico a partir de piruvato, si bien la estimulación es menor, a diferencia de lo que ocurre cuando se utiliza un precursor gluconeogénico más reducido como es lactato. La estimulación de gluconeogénesis, a partir de piruvato, por octanoato, tiene lugar preferentemente a concentraciones de sustrato por encima de 0,3 mM.

La tasa de utilización de piruvato, en ausencia y en presencia de octanoato, en hígados perfundidos de ratas controles y adrenalectomizadas aparece representada en la figura 30. En ausencia de octanoato, no se observan cambios en la tasa de utilización de piruvato en los dos grupos de ratas. En presencia de octanoato, la tasa de utilización de piruvato es menor en hígados de ratas adrenalectomizadas, lo que está de acuerdo con una menor tasa de producción de glucosa en estas condiciones.

**FIGURA 30**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA (o) SOBRE LAS TASAS METABOLICAS INDUCIDAS POR CONCENTRACIONES CRECIENTES DE PIRUVATO EN PRESENCIA O AUSENCIA DE OCTANOATO EN HIGADO AISLADO Y PERFUNDIDO.**



Hígados aislados de ratas control y adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno durante 48 h., fueron perfundidos según se describe en Métodos. Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en las figuras 28 y 29. Cada 2 minutos se tomaron alícuotas del efluente hepático para la determinación de los metabolitos. Los resultados son valores promedio de al menos 3 experimentos.

En la figura 30 aparece representada la tasa de producción de lactato, en función de la concentración de piruvato en el medio de perfusión, en ausencia y en presencia de octanoato, en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas. De nuevo, se aprecia cómo la tasa de producción de lactato no se ve afectada por la adrenalectomía, si bien disminuye ligeramente cuando los hígados de ratas adrenalectomizadas son perfundidos en presencia de octanoato.

La figura 30 muestra el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico, expresado por los valores del cociente lactato/piruvato. Puede observarse que la adrenalectomía, tanto en ausencia como en presencia de octanoato produce un aumento en los valores del cociente lactato/piruvato en todo el rango de concentraciones de sustrato. Estos resultados indican que la ausencia de glucocorticoides conlleva un aumento en el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico, independientemente de que se utilice como precursor gluconeogénico un sustrato más oxidado o más reducido que la glucosa, como son el piruvato y el lactato, respectivamente.

## 5.- INFLUENCIA DEL ESTADO REDOX DEL SISTEMA NAD<sup>+</sup> CITOSOLICO EN LA RESPUESTA GLUCONEOGENICA A ACIDOS GRASOS EN HIGADOS DE RATAS CONTROLES Y ADRENALECTOMIZADAS.

Los resultados presentados hasta el momento muestran que la consecuencia más importante de la extirpación de las suprarrenales es la incapacidad del tejido hepático para responder a la estimulación de gluconeogénesis por ácidos grasos cuando se utiliza como precursor gluconeogénico un substrato más reducido que la glucosa como es el lactato. Por el contrario, cuando se utiliza un precursor más oxidado, como piruvato, la administración de octanoato sí produce su característico efecto aumentando la velocidad máxima de la ruta gluconeogénica, si bien el porcentaje de estimulación es menor en hígados de ratas adrenalectomizadas.

La incapacidad de octanoato para estimular el proceso de gluconeogénesis a partir de lactato no parece estar relacionada con variaciones en la tasa de oxidación del ácido graso, ya que se pudo comprobar que la tasa de oxidación de octanoato no difiere significativamente en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, tanto en ausencia de substratos como en presencia de lactato o piruvato.

En todos los experimentos llevados a cabo en hígados de ratas adrenalectomizadas, perfundidos tanto con lactato como con piruvato, se observó sistemáticamente un aumento en el estado de reducción del sistema NAD<sup>+</sup> citosólico, expresado por los cambios en la relación lactato/piruvato (Figs. 22 y 29).

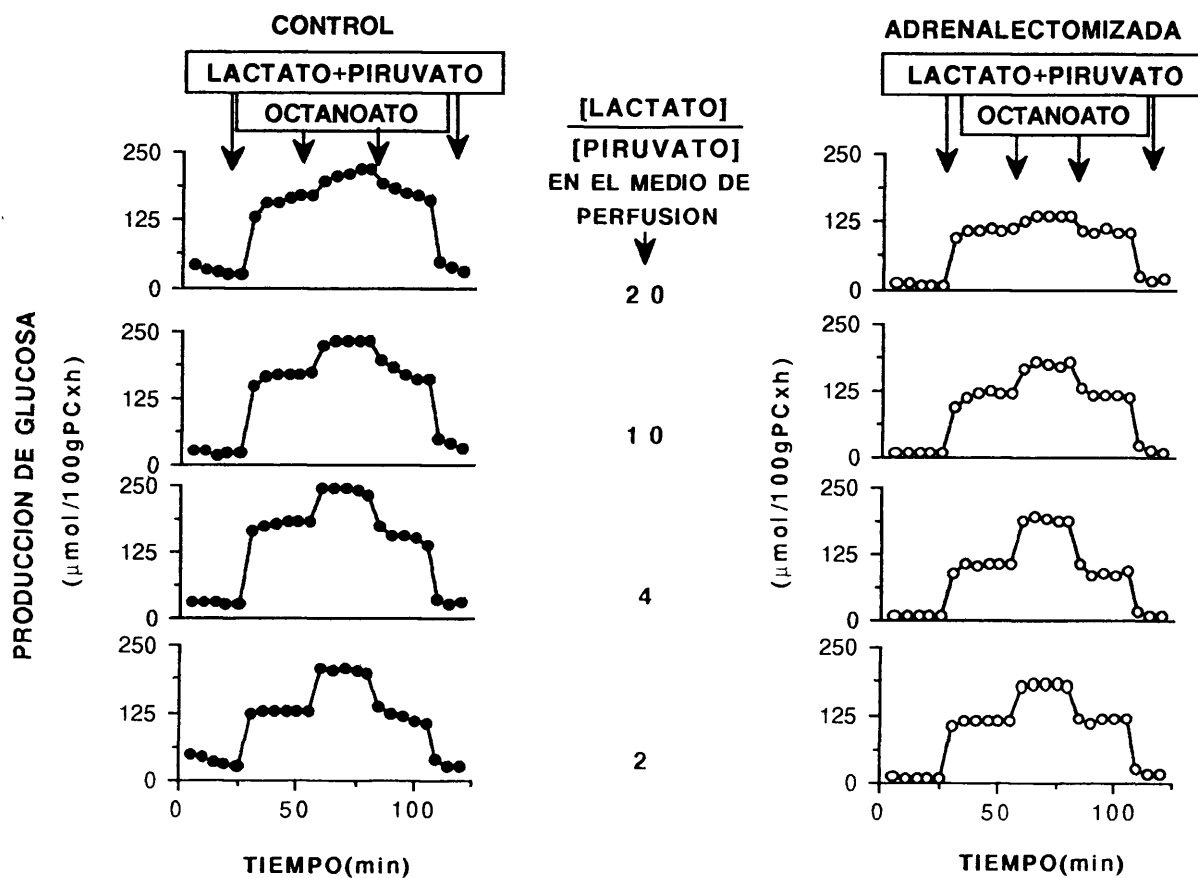
Frecuentemente, se ha atribuido a los cambios en el estado redox del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico, la causa de la alteración de numerosas funciones celulares (Williamson y col., 1969, 1980; Parrilla y col., 1976; Martín-Requero y col., 1979; Sugano y col., 1980)). Asimismo, algunos autores han sugerido que la estimulación de gluconeogénesis hepática por determinadas hormonas depende del estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico (Sistare y Haynes, 1985 a; Soler y col., 1991). Por esta razón, el objetivo de los experimentos siguientes fue investigar el papel del estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico sobre el flujo gluconeogénico en hígados perfundidos de ratas controles y adrenalectomizadas y la posible dependencia de la estimulación de gluconeogénesis por ácidos grasos de este parámetro.

Para ello, hemos estudiado el efecto de octanoato sobre la tasa de gluconeogénesis en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas en dos situaciones experimentales distintas: 1) en primer lugar se ha modificado, dentro de unos amplios márgenes, el valor del cociente lactato/piruvato; 2) en segundo lugar, se ha estudiado el efecto de octanoato sobre el proceso de gluconeogénesis en situaciones en las que se mantenía constante el valor del cociente lactato/piruvato en torno a un valor de 10, que es el que prevalece en condiciones fisiológicas (Williamson y col., 1967; Bücher y col., 1972).

La figura 31 muestra el efecto de octanoato sobre la tasa de gluconeogénesis en hígados de ratas controles y

FIGURA 31

EFFECTO DE OCTANOATO SOBRE LA TASA DE GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE DISTINTAS MEZCLAS DE LACTATO Y PIRUVATO EN HIGADOS DE RATAS CONTROLES Y ADRENALECTOMIZADAS.

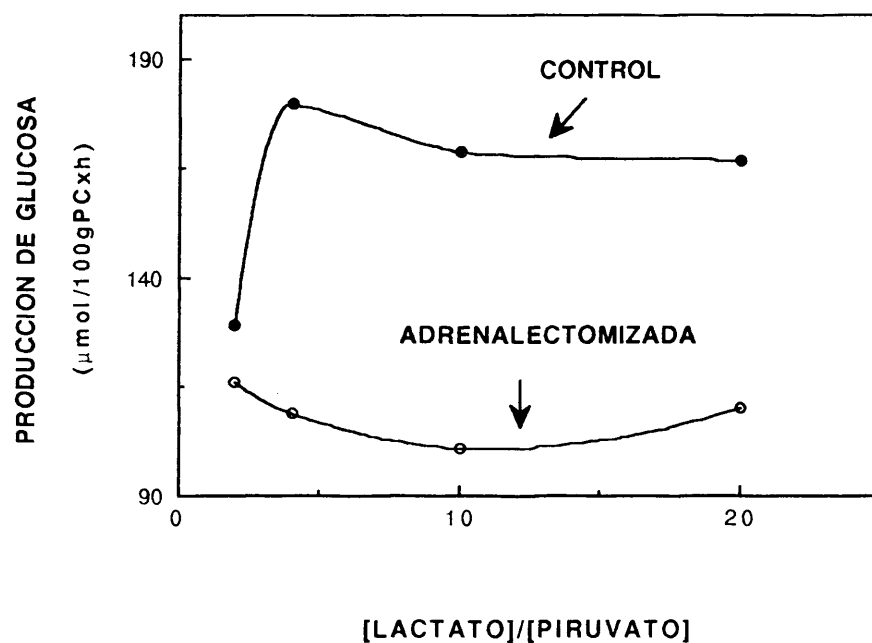


Hígados aislados, de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidos a un período de ayuno de 48 h., fueron perfundidos según se describe en Métodos. Alcanzada una tasa basal estacionaria de respiración se añadieron los substratos lactato y piruvato. La concentración utilizada de lactato fue 2mM en todos los casos, mientras que la concentración de piruvato fue respectivamente 0,1, 0,2, 0,5 y 1mM con objeto de obtener los valores de la relación lactato/piruvato en el medio de perfusión indicados en la figura. La concentración de octanoato fue de  $100\mu\text{M}$ . Cada 5 min. se tomaron alícuotas del efluente para la determinación de glucosa. Los datos son la media de 3 observaciones.

adrenalectomizadas, perfundidos con concentraciones estacionarias de lactato y piruvato. La concentración de lactato fue 2 mM en todos los experimentos, mientras que la concentración de piruvato fue respectivamente 0,1, 0,2, 0,5 y 1 mM con objeto de estudiar las variaciones en el estado redox citosólico sobre la tasa de gluconeogénesis, así como su influencia en la estimulación del proceso de gluconeogénesis por ácidos grasos. En primer lugar, puede observarse que la tasa de gluconeogénesis a partir de mezclas de lactato y piruvato se encuentra disminuida en aproximadamente un 40% en hígados de ratas adrenalectomizadas respecto a los controles, excepto cuando se utilizan mezclas de lactato y piruvato 2:1 en cuyo caso, los valores de producción de glucosa fueron similares en ambos grupos de ratas. Por otra parte, la figura 31 muestra que la adición de octanoato al medio de perfusión, una vez alcanzada una tasa estacionaria de producción de glucosa en respuesta a las distintas mezclas de los substratos lactato y piruvato, produjo una estimulación del flujo gluconeogénico en todos los casos, tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas.

El efecto del aumento del cociente lactato/piruvato en el medio de perfusión sobre la tasa de producción de glucosa en hígados perfundidos de ratas controles y adrenalectomizadas aparece recogido de forma comparativa en la figura 32. En los controles se observa un incremento en la tasa de producción de glucosa de aproximadamente un 30% al aumentar el valor del cociente lactato/piruvato por encima de 2, por el contrario, la tasa de gluconeogénesis a partir de mezclas de lactato y piruvato, en

**FIGURA 32**  
**EFFECTO DEL AUMENTO DEL COCIENTE LACTATO/PIRUVATO EN EL**  
**MEDIO DE PERFUSION SOBRE LA TASA DE GLUCONEOGENESIS EN**  
**HIGADO AISLADO Y PERFUNDIDO. INFLUENCIA DE LA**  
**ADRENALECTOMIA.**



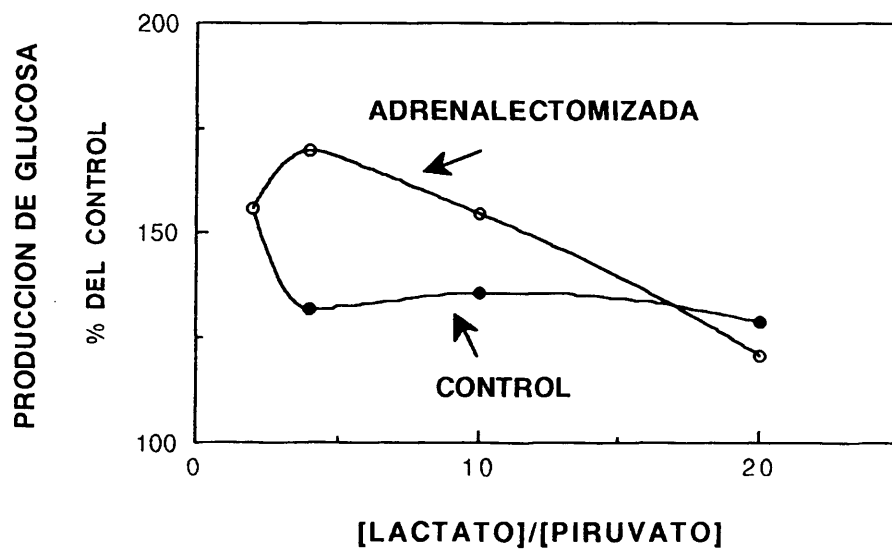
Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la figura 31. La tasa de producción de glucosa se determinó en el intervalo 20-30 min. después de la administración de lactato y piruvato.

hígados perfundidos de ratas adrenalectomizadas, no se vio afectada por las variaciones del cociente lactato/piruvato.

La figura 33 recoge el efecto del aumento del cociente lactato/piruvato sobre la estimulación de gluconeogénesis por octanoato. En los controles, la máxima estimulación, inducida por octanoato, se observa con la mezcla de substratos que proporciona un estado redox más oxidado, por encima de un valor del cociente lactato/piruvato de 2, el efecto estimulador de octanoato se estabiliza en torno a un 30%, y no parece depender de variaciones del estado redox citosólico, dentro de los márgenes estudiados. En los hígados de ratas adrenalectomizadas, la situación parece ser la inversa, es decir, la estimulación de gluconeogénesis a partir de mezclas de lactato y piruvato, inducida por octanoato, no varía significativamente al aumentar el estado redox citosólico desde 2 hasta 10, sin embargo, a partir de este valor, se observa una disminución importante en el porcentaje de estimulación del flujo gluconeogénico, inducido por octanoato.

En la figura 34 se muestra el efecto de octanoato sobre las variaciones en el cociente lactato/piruvato, halladas en el efluente hepático, de hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, perfundidos con distintas mezclas de lactato y piruvato. Puede observarse que la adición de octanoato al medio de perfusión produjo un aumento en el estado redox citosólico, expresado por los cambios en la relación lactato/piruvato, en todas las situaciones estudiadas, tanto en hígados de ratas controles como

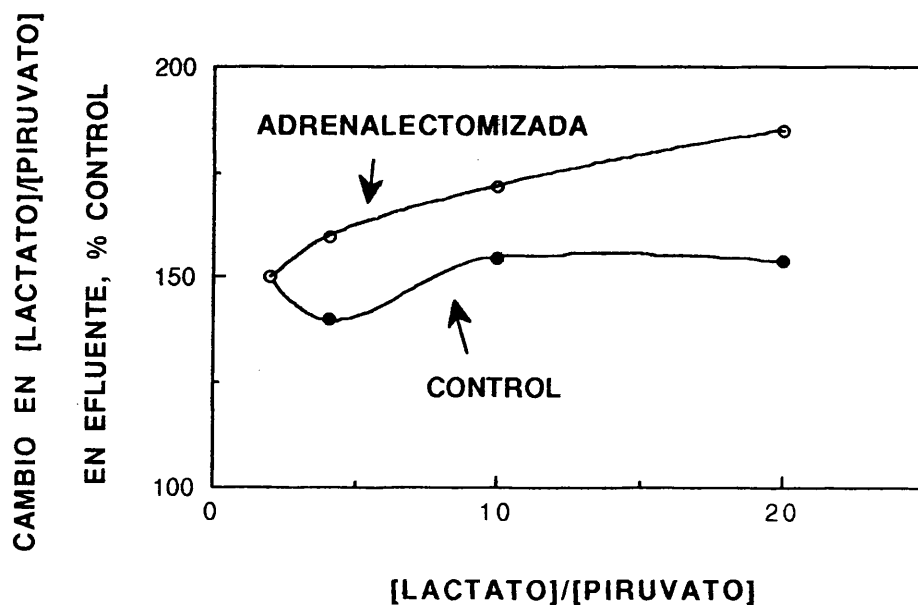
**FIGURA 33**  
**EFFECTO DEL AUMENTO DEL COCIENTE LACTATO/PIRUVATO SOBRE**  
**LA ESTIMULACION DE GLUCONEOGENESIS INDUCIDA POR**  
**OCTANOATO EN HIGADOS DE RATAS CONTROLES Y**  
**ADRENALECTOMIZADAS.**



Hígados aislados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno durante 48 h., fueron perfundidos como se describe en Métodos. Los valores representados han sido tomados de la figura 31, una vez alcanzada una tasa estacionaria de producción de glucosa tras la adición de octanoato 100 $\mu$ M.

FIGURA 34

EFFECTO DEL AUMENTO DEL COCIENTE LACTATO/PIRUVATO EN EL MEDIO DE PERFUSION SOBRE LAS VARIACIONES EN LA RELACION LACTATO/PIRUVATO EN EL EFLUENTE HEPATICO PRODUCIDA POR LA ADMINISTRACION DE OCTANOATO. INFLUENCIA DE LA ADRENALECTOMIA.



Las condiciones experimentales se han descrito en la figura 31. Los valores de la relación lactato/piruvato se determinaron en alícuotas del efluente hepático tomadas cada 5 minutos. Los datos representan las variaciones del cociente lactato/piruvato, inducidas por la administración de octanoato  $100\mu\text{M}$ , y se han expresado como % de los valores obtenidos en ausencia de octanoato.

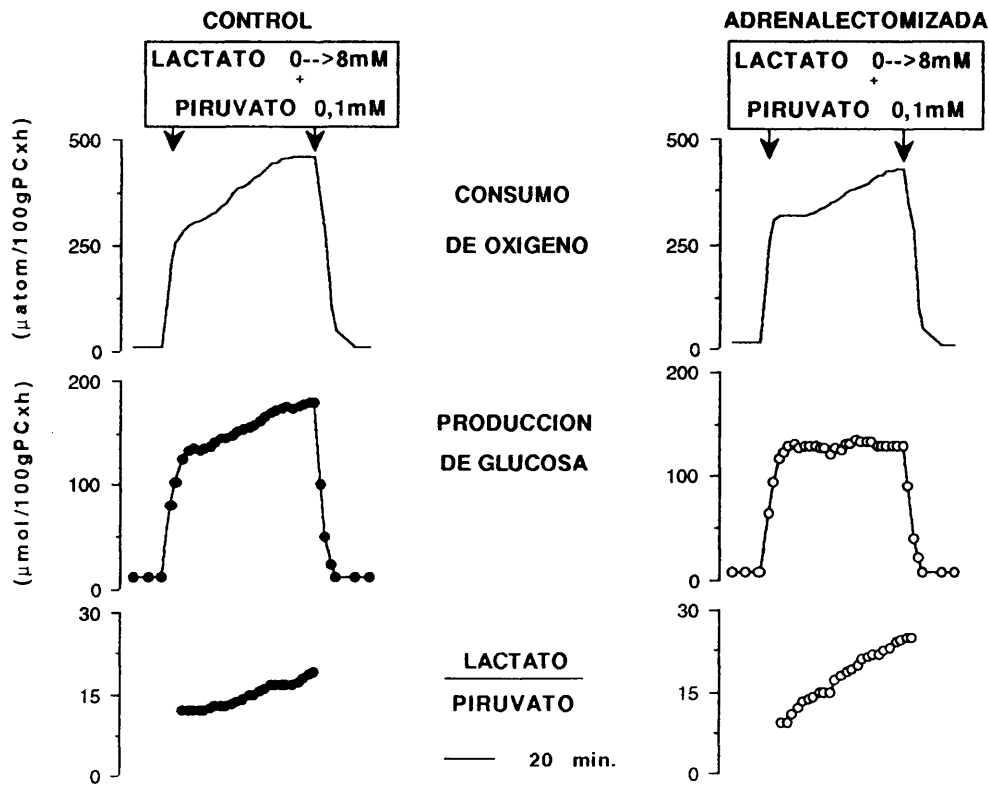
adrenalectomizadas. Ahora bien, mientras que en los controles el cambio en el cociente lactato/piruvato, en respuesta a octanoato, fue de la misma intensidad en todos los casos, en los hígados de ratas adrenalectomizadas, el cambio en el cociente lactato/piruvato, inducido por octanoato, aumentó de forma lineal a medida que se incrementaba el valor inicial de la relación lactato/piruvato en el medio de perfusión del tejido hepático (Fig. 34). El cambio de mayor intensidad en el estado redox citosólico, inducido por octanoato, se produjo precisamente en la situación en la que la estimulación del flujo gluconeogénico fue menor. Estos resultados sugieren, por tanto, la existencia de una relación inversa entre el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico y la capacidad de los ácidos grasos para estimular el flujo gluconeogénico en hígados de ratas adrenalectomizadas. Ahora bien, en estos experimentos, las variaciones en el cociente lactato/piruvato se consiguieron modificando la concentración de piruvato en el medio de perfusión al tiempo que se mantuvo constante la concentración de lactato. Por, tanto, estos resultados no nos permiten determinar si la disminución en la capacidad de octanoato para estimular el flujo gluconeogénico que se observa en condiciones de alto valor de la relación lactato/piruvato en hígados de ratas adrenalectomizadas, es consecuencia de un aumento en el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico, de una disminución en la disponibilidad de piruvato, o de una combinación de ambos factores. Por esta razón, hemos estudiado la influencia de variaciones en la relación lactato/piruvato, manteniendo constante la concentración de piruvato en el medio

de perfusión, en la tasa de gluconeogénesis a partir de lactato en ausencia o en presencia de octanoato.

Las figuras 35 y 36 recogen el efecto de la adrenalectomía sobre las tasas de respiración y de producción de glucosa, así como las variaciones del cociente lactato/piruvato encontradas en el efluente hepático en hígados perfundidos en ausencia o en presencia de octanoato, respectivamente. En estos experimentos, la concentración de lactato se incrementó de forma lineal desde 0 hasta 8 mM, mientras que la concentración de piruvato se mantuvo constante, 0,1 mM, durante todo el experimento. La administración de los substratos gluconeogénicos se realizó una vez que se había alcanzado una tasa estacionaria de respiración en ausencia o en presencia, respectivamente, de una concentración de octanoato de 0,1 mM. Con este diseño experimental se consigue incrementar de forma lineal, desde 3 hasta 80, el valor de la relación lactato/piruvato en el medio de perfusión.

En la figura 35 se aprecia que los incrementos de respiración y de gluconeogénesis, en respuesta a lactato, en presencia de una concentración de piruvato de 0,1 mM en el medio de perfusión, no difieren significativamente de los encontrados en ausencia de piruvato, tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas (Fig. 4). La diferencia más acusada entre los dos grupos de ratas se encuentra en los cambios que se producen en la relación lactato/piruvato en el efluente hepático. Mientras que en hígados de ratas controles, y a pesar de haber

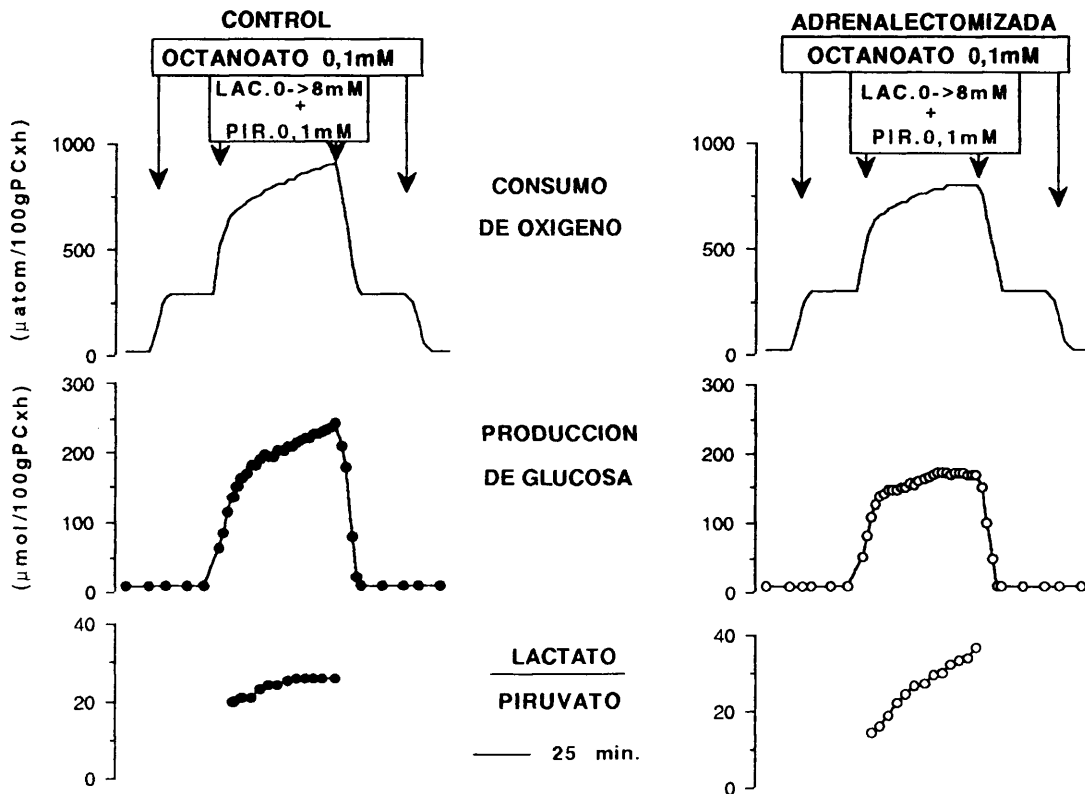
**FIGURA 35**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LOS INCREMENTOS DE RESPIRACION, PRODUCCION DE GLUCOSA Y COCIENTE LACTATO/PIRUVATO, EN HIGADO AISLADO Y PERFUNDIDO CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE LACTATO EN PRESENCIA DE UNA CONCENTRACION ESTACIONARIA DE PIRUVATO.**



Hígados aislados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidos a un período de ayuno durante 48 h., fueron perfundidos como se describe en Métodos. Alcanzada una tasa basal estacionaria de consumo de oxígeno, la concentración de lactato se incrementó de forma lineal desde 0 hasta 8mM, mediante un formador de gradientes, manteniendo una concentración estacionaria de piruvato de 0,1mM. Cada 2min. se tomaron alícuotas del efluente hepático para la determinación de los distintos metabolitos.

FIGURA 36

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE OCTANOATO SOBRE LOS INCREMENTOS DE RESPIRACION, COCIENTE LACTATO/PIRUVATO Y PRODUCCION DE GLUCOSA EN HIGADO AISLADO Y PERFUNDIDO CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE LACTATO EN PRESENCIA DE UNA CONCENTRACION ESTACIONARIA DE PIRUVATO. INFLUENCIA DE LA ADRENALECTOMIA.



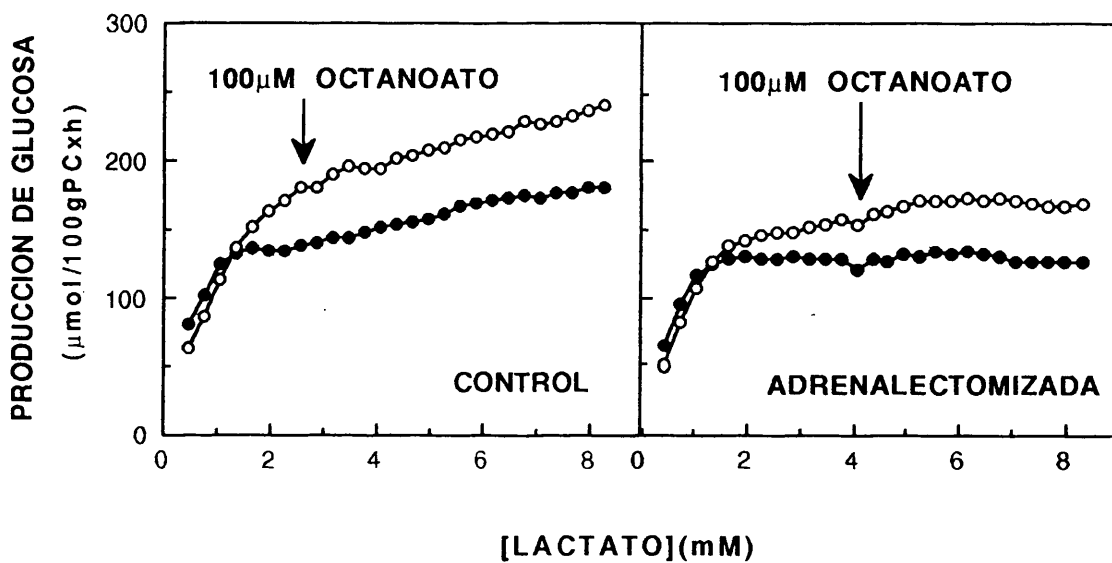
Hígados aislados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48h., fueron perfundidos según se describe en Métodos. Alcanzada una tasa basal estacionaria de consumo de oxígeno, se administró octanoato 0,1mM, una vez estabilizada de nuevo la respiración se incrementó de forma lineal la concentración de lactato desde 0 hasta 8mM mediante un formador de gradientes, manteniendo una concentración estacionaria de piruvato 0,1mM, y fueron tomadas alícuotas del efluente hepático cada 2min. para la determinación de los metabolitos.

incrementado linealmente la relación lactato/piruvato en el medio de perfusión del tejido, los cambios que se observan en el cociente lactato/piruvato en el efluente hepático son escasos, manteniéndose en valores próximos a los que prevalecen en condiciones fisiológicas (Williamson y col., 1967; Bücher y col., 1972). Por el contrario, los hígados de ratas adrenalectomizadas parecen tener una menor capacidad de tamponar el sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico, ya que como se puede observar en el panel derecho de la figura 35, los valores de la relación lactato/piruvato en el efluente hepático aumentan de forma lineal a medida que se incrementa el valor de este cociente en el medio de perfusión.

Cuando estos experimentos se llevan a cabo equilibrando previamente la preparación con octanoato, como se aprecia en la figura 36, la administración de concentraciones progresivamente crecientes de lactato en presencia de una concentración de piruvato de 0,1 mM, dio lugar a un mayor incremento en la tasa de consumo de oxígeno y en la de producción de glucosa que en ausencia del ácido graso, tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas. En estas condiciones, se observa, de nuevo, un aumento lineal en el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico en hígados de ratas adrenalectomizadas.

En la figura 37 se ha recogido de forma comparativa el efecto de octanoato sobre la tasa de gluconeogénesis en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, perfundidos con concentraciones crecientes de lactato en presencia de una concentración constante

**FIGURA 37**  
**INFLUENCIA DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL EFECTO DE**  
**OCTANOATO EN LA TASA DE GLUCONEOGENESIS EN HIGADOS**  
**PERFUNDIDOS CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE LACTATO EN**  
**PRESENCIA DE PIRUVATO 0,1mM.**



Hígados aislados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a un período de ayuno de 48 horas., fueron perfundidos según se describe en Métodos. Los datos han sido tomados de las figuras 35 y 36.

de piruvato. Puede apreciarse que, tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas, la administración de octanoato, en estas condiciones, produce una clara estimulación del flujo gluconeogénico. Dicha estimulación es apreciable sobre todo cuando consideramos la velocidad máxima de producción de glucosa. Lo más destacable de estos resultados es el hecho de que en hígados de ratas adrenalectomizadas, la presencia de una concentración baja de piruvato (0,1 mM) en el medio de perfusión, si bien no produce cambios apreciables en la tasa de producción de glucosa a partir de concentraciones crecientes de lactato (Figuras 35 y 36) permite, en cambio, que el tejido hepático responda incrementando la velocidad de producción de glucosa tras la administración de octanoato. Hay que señalar, no obstante, que la capacidad de respuesta del tejido hepático a la estimulación de gluconeogénis por octanoato es menor en ratas adrenalectomizadas.

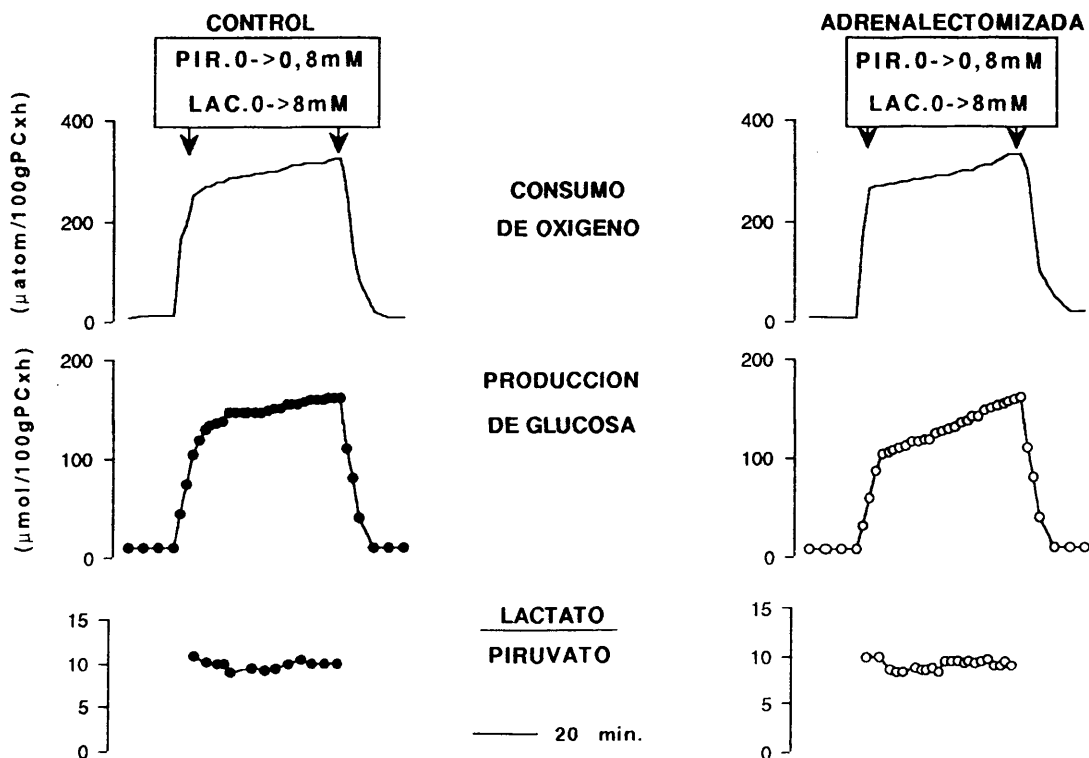
Por último, se ha estudiado el efecto de octanoato sobre el flujo gluconeogénico en condiciones en las que se ha mantenido constante, y en el valor que prevalece en condiciones fisiológicas, la relación lactato/piruvato en el medio de perfusión del tejido hepático. Para ello, los hígados de ratas controles y adrenalectomizadas fueron perfundidos con concentraciones progresivamente crecientes de lactato y de piruvato manteniendo la relación entre ambos substratos en 10:1.

Las figuras 38 y 39 muestran la influencia de la adrenalectomía sobre las tasas de respiración, gluconeogénesis y cambios en la relación lactato/piruvato en hígados perfundidos en ausencia y en presencia de octanoato respectivamente. Puede observarse en la figura 38 que la adrenalectomía no produjo cambios significativos en las tasas de consumo de oxígeno y de producción de glucosa. En estas condiciones, el estado redox citosólico, expresado por los cambios en el cociente lactato/piruvato en el efluente hepático, se mantiene prácticamente constante a lo largo de la duración de los experimentos, tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas.

Cuando estos experimentos se realizaron en presencia de una concentración estacionaria de octanoato de 0,1 mM (Fig. 39), se observó un mayor incremento en la tasa de consumo de oxígeno y en la producción de glucosa en los hígados procedentes de los dos grupos de ratas. En estas condiciones, la administración de octanoato incrementó ligeramente el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico en los hígados de las ratas controles; sin embargo, la adición de octanoato produjo un aumento significativo del cociente lactato/piruvato en el efluente hepático, fundamentalmente cuando se utilizan las concentraciones más bajas de substratos.

La figura 40 muestra de forma comparativa el efecto de octanoato sobre la velocidad de producción de glucosa a partir de

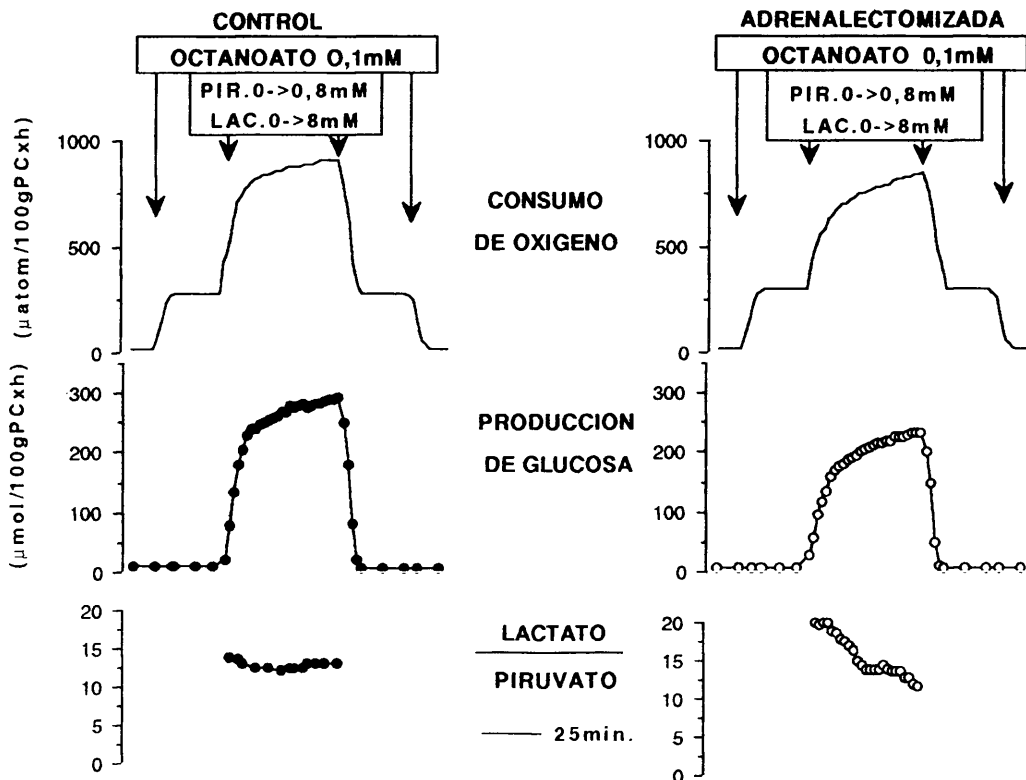
**FIGURA 38**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LOS INCREMENTOS DE RESPIRACION, COCIENTE LACTATO/PIRUVATO Y PRODUCCION DE GLUCOSA, EN HIGADO AISLADO Y PERFUNDIDO CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE LACTATO Y PIRUVATO.**



Hígados aislados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidos a un período de ayuno de 48 h., fueron perfundidos según se describe en Métodos. Alcanzada una tasa basal estacionaria de consumo de oxígeno, la concentración de lactato y piruvato se incrementó de forma lineal desde 0 hasta 8mM y desde 0 hasta 0,8mM respectivamente, con un formador de gradientes. Se tomaron alícuotas cada 2 min. para la determinación de los distintos metabolitos.

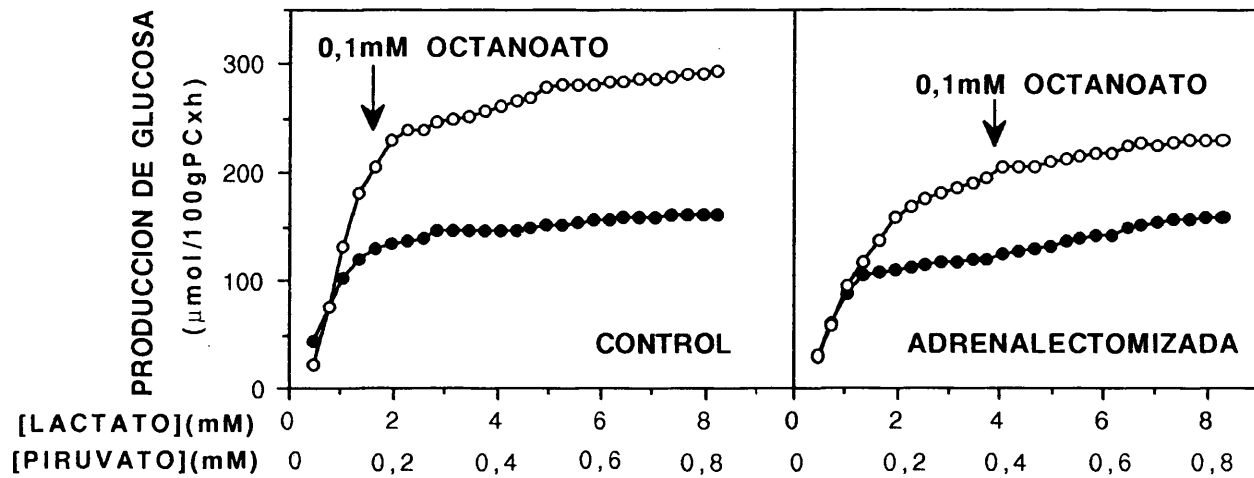
FIGURA 39

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE OCTANOATO SOBRE LOS INCREMENTOS DE RESPIRACION, COCIENTE LACTATO/PIRUVATO Y PRODUCCION DE GLUCOSA, EN HIGADO AISLADO Y PERFUNDIDO CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE LACTATO Y PIRUVATO. INFLUENCIA DE LA ADRENALECTOMIA.



Hígados aislados de ratas, controles y adrenalectomizadas, sometidos a ayuno durante 48 horas, fueron perfundidos como se describe en Métodos. Alcanzada una tasa basal estacionaria de consumo de oxígeno, se administró octanoato 0,1mM y una vez estabilizada de nuevo la preparación, la concentración de lactato y piruvato se incrementó de forma lineal, con un formador de gradientes a una velocidad de 0,15mM/min y 0,015mM/min respectivamente. Se tomaron alícuotas cada 2 min. para la determinación de los distintos metabolitos.

**FIGURA 40**  
**INFLUENCIA DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE EL EFECTO DE**  
**OCTANOATO EN LA TASA DE GLUCONEOGENESIS EN HIGADOS**  
**PERFUNDIDOS CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE LACTATO Y**  
**PIRUVATO.**



Hígados aislados de ratas control y adrenalectomizadas, sometidas a ayuno durante 48 h., fueron perfundidos según se describe en Métodos. Los datos han sido tomados de las figuras 38 y 39.

lactato y piruvato (10:1) en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas. La administración de octanoato produjo una clara estimulación del flujo gluconeogénico tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas, aunque también en estas condiciones se aprecia una menor capacidad de respuesta a la estimulación de gluconeogénesis por octanoato en hígados de ratas adrenalectomizadas (Fig. 40).

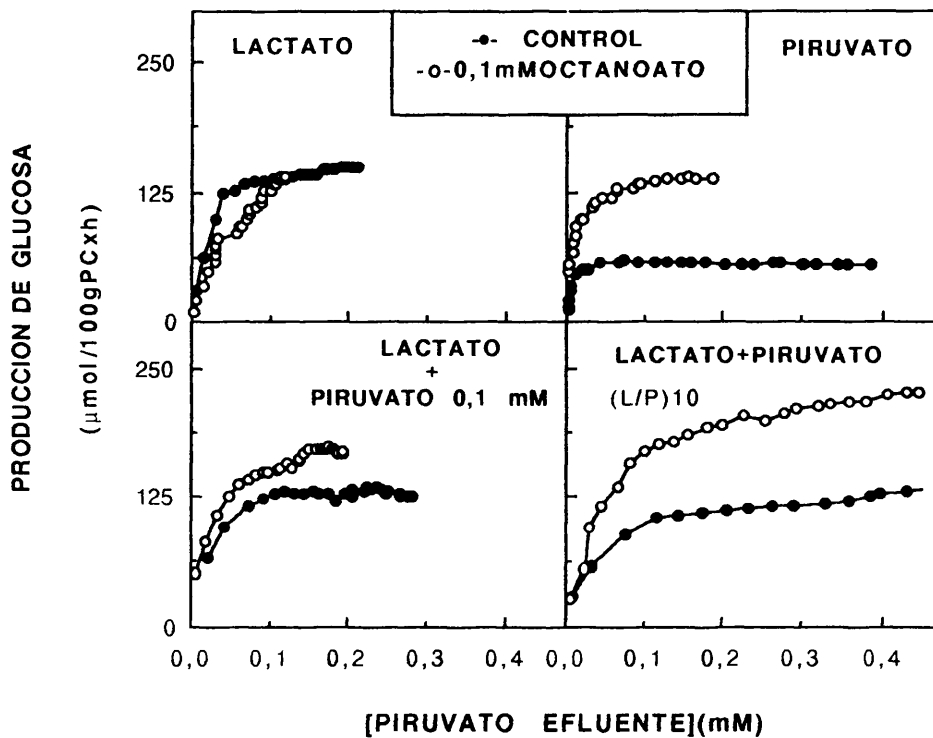
En resumen, nuestros resultados muestran que la adrenalectomía no impide el efecto de octanoato estimulando la velocidad máxima del proceso de gluconeogénesis cuando se utiliza una combinación de lactato y piruvato como precursores. Hay que señalar, no obstante, que sistemáticamente se ha observado una menor capacidad de respuesta del tejido hepático de ratas adrenalectomizadas para incrementar el flujo gluconeogénico tras la administración de octanoato. La menor estimulación de gluconeogénesis, inducida por octanoato, en hígados de ratas adrenalectomizadas perfundidos con piruvato o con mezclas de lactato y piruvato va acompañada de un mayor aumento en el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico en respuesta al ácido graso.

Por otra parte, el hecho de que la adrenalectomía impida el efecto de octanoato estimulando la tasa de gluconeogénesis a partir de lactato, pero no a partir de piruvato o de mezclas de ambos substratos, no parece ser debido a una menor disponibilidad de piruvato, para la síntesis de glucosa, cuando se utiliza lactato como

precursor gluconeogénico. En efecto, cuando se representa la tasa de producción de glucosa en función de la concentración de piruvato que se alcanza en el efluente hepático en las diferentes condiciones estudiadas (Fig. 41), puede observarse que el octanoato es capaz de estimular el flujo gluconeogénico cuando los hígados de ratas adrenalectomizadas son perfundidos con piruvato o con lactato más piruvato, incluso en los márgenes de concentración de piruvato en el efluente hepático que se encuentran cuando los hígados son perfundidos con lactato como único precursor gluconeogénico.

Nuestros resultados sugieren, pues, que el efecto diferencial de octanoato sobre el proceso de gluconeogénesis hepática en ratas adrenalectomizadas a partir de un precursor más reducido que la glucosa, como es el lactato, o más oxidado, como piruvato, no es debido a diferencias en la disponibilidad de piruvato en ambos casos, sino que el mantenimiento del estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico, dentro de ciertos márgenes, parece ser esencial para permitir el efecto de octanoato estimulando el flujo gluconeogénico.

**FIGURA 41**  
**PRODUCCION DE GLUCOSA EN DISTINTAS SITUACIONES**  
**EXPERIMENTALES EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE**  
**PIRUVATO EN EL EFLUENTE HEPATICO, EN HIGADO AISLADO Y**  
**PERFUNDIDO DE RATAS ADRENALECTOMIZADAS. EFECTO DE LA**  
**PRESENCIA DE OCTANOATO.**



Hígados aislados de ratas adrenalectomizadas, sometidas a ayuno durante 48 h, fueron perfundidos según se describe en Métodos. Los valores de producción de glucosa han sido tomados de las figuras (15, 30, 37 y 40) y se han representado en función de la concentración de piruvato hallada en alícuotas tomadas del efluente a intervalos de 2 minutos.

## **6.- RESPUESTA METABOLICA HEPATICA A ESTIMULANTES $\alpha$ -ADRENERGICOS EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.**

Los agentes  $\alpha$ -adrenérgicos, al igual que los ácidos grasos producen, entre otros efectos, un aumento de la respiración hepática y una estimulación de gluconeogénesis. Hasta el momento se conoce que los glucocorticoides ejercen una acción permisiva sobre los efectos glucogenolíticos y gluconeogénicos de los agentes  $\alpha$ -adrenérgicos. Sin embargo, los conocimientos sobre la interacción de glucocorticoides y agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos son escasos y se ignora si los glucocorticoides son esenciales en la estimulación hormonal del metabolismo energético. Por ello, hemos intentado caracterizar la respuesta metabólica hepática a estimulantes  $\alpha$ -adrenérgicos, como fenilefrina, en animales adrenoprivos.

### **6.1.- EFECTO DEL ESTADO DE NUTRICION EN LA RESPUESTA METABOLICA A FENILEFRINA EN HIGADO PERFUNDIDO.**

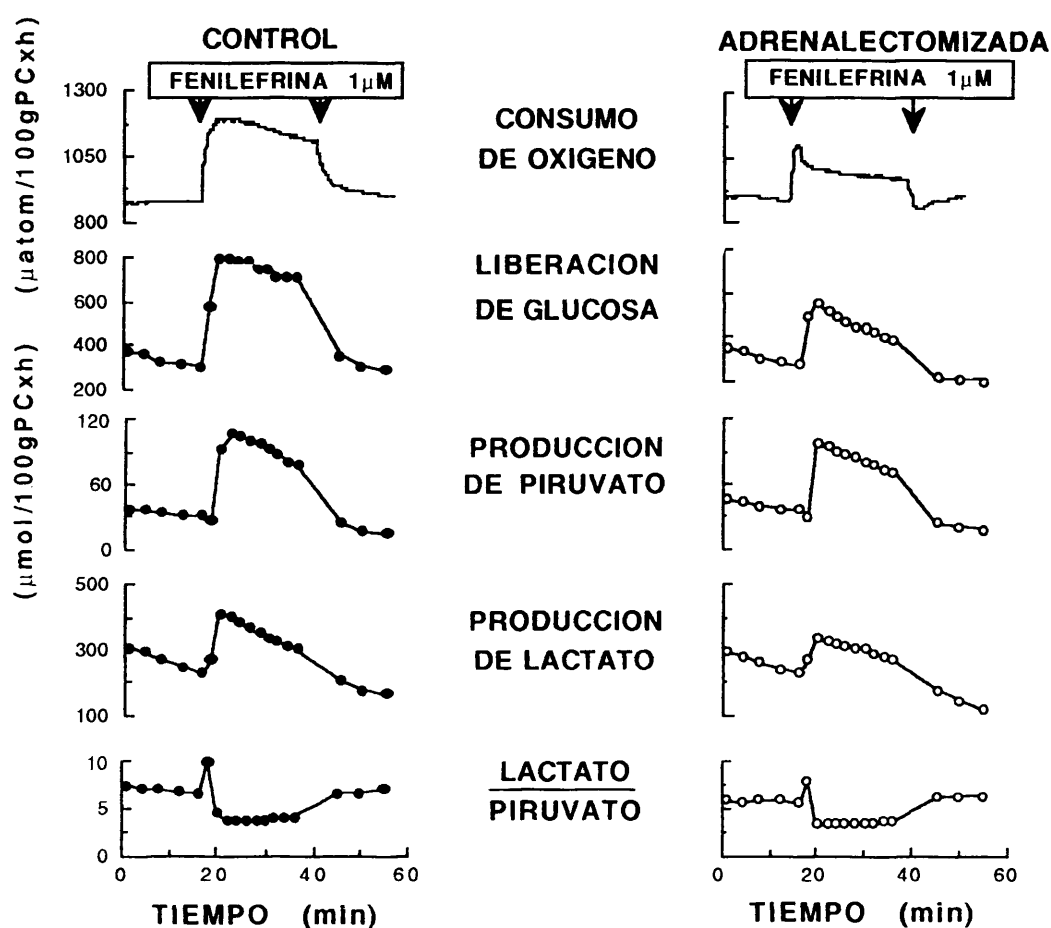
La respuesta respiratoria del tejido hepático a la administración de fenilefrina ha sido bien caracterizada en nuestro laboratorio (González-Manchón y col., 1988 b). La administración de fenilefrina a hígados aislados y perfundidos produce un incremento notable de respiración, de naturaleza bifásica. La primera fase es de instauración rápida y de corta duración, mientras que en la segunda fase se produce un incremento sostenido de respiración. La primera fase es independiente del

estado de nutrición del animal mientras que la segunda fase muestra una dependencia del estado de nutrición, de la disponibilidad de energía y de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (González-Manchón y col., 1988 b). Por estas razones, hemos estudiado en primer lugar, la influencia del estado de nutrición en la respuesta hepática a fenilefrina en ratas sometidas a una operación simulada y en ratas adrenalectomizadas.

#### **6.1.1.- Efecto de la adrenalectomía sobre la respuesta hepática a fenilefrina en ratas alimentadas *ad libitum*.**

La figura 42 muestra el efecto de fenilefrina sobre las tasas de consumo de oxígeno, glucogenolisis y las de producción de lactato y piruvato en hígados perfundidos de ratas sometidas a una operación simulada (panel izquierdo) y adrenalectomizadas (panel derecho). En primer lugar, puede observarse que el estrés quirúrgico no altera la respuesta del tejido a la administración de fenilefrina. En efecto, los resultados obtenidos en hígados de ratas sometidas a una operación simulada son similares a los obtenidos en nuestro laboratorio con hígados de ratas controles (González-Manchón y col., 1988 b). El incremento de respiración, inducido por fenilefrina se acompaña de un aumento en las tasas de glucogenolisis y glucolisis como lo refleja los aumentos en los niveles de glucosa y de lactato y piruvato respectivamente en el efluente hepático. Asimismo, la administración de fenilefrina produce una elevación transitoria del cociente lactato/piruvato del

**FIGURA 42**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA RESPUESTA**  
**METABOLICA A FENILEFRINA EN HIGADOS DE RATAS**  
**ALIMENTADAS AD LIBITUM.**

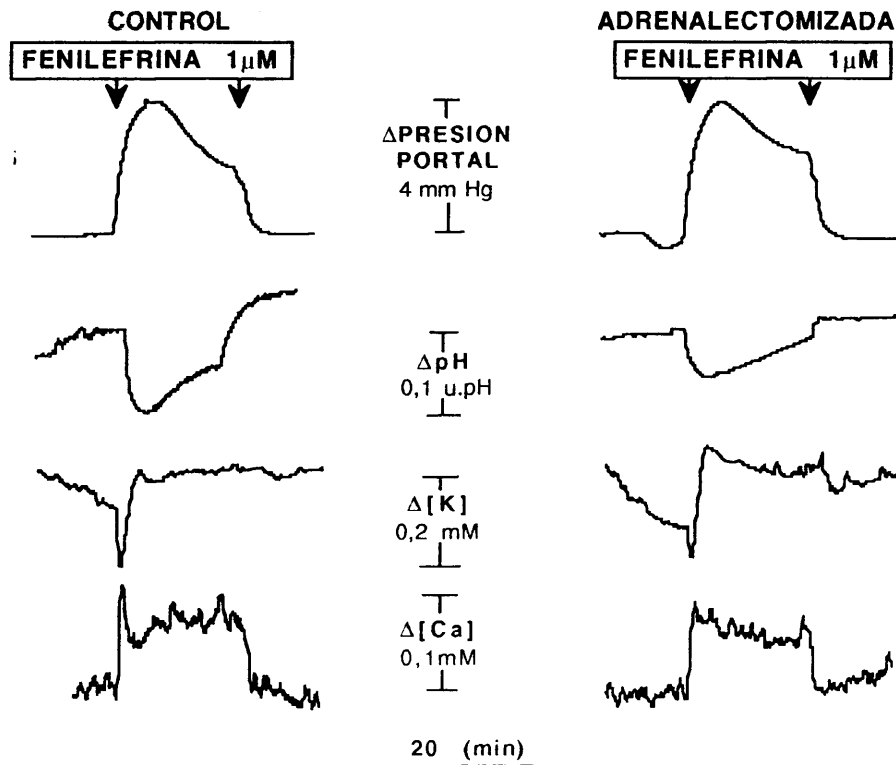


Hígados de ratas alimentadas *ad libitum*, sometidas a una operación simulada o adrenalectomizadas fueron perfundidos con tampón Krebs-Ringer pH 7,4 según se describe en Métodos. Después de que se alcanzara una tasa basal estacionaria de respiración, se administró fenilefrina  $1\mu\text{M}$ . La determinación de los distintos metabolitos se realizó en alícuotas, del efluente hepático, tomadas a los tiempos indicados en la figura. Los registros de consumo de oxígeno corresponden a experimentos representativos de cada situación. Los resultados de las distintas tasas metabólicas son valores promedio de al menos 6 experimentos.

efluente hepático. Como puede observarse en el panel derecho de la figura 42, los hígados de animales adrenalectomizados conservan el perfil bifásico de la respuesta respiratoria, pero ambas fases se encuentran considerablemente disminuidas. También, disminuyen significativamente las tasas de producción de glucosa, lactato y piruvato.

Además de estos efectos, la administración de fenilefrina da lugar a un aumento de la presión portal y a cambios significativos en la concentración de los iones  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  en el efluente hepático. En la figura 43 hemos recogido las respuestas ionotrópica y presora a fenilefrina en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, alimentadas *ad libitum*. En esta figura aparecen representados sendos experimentos tipo. En primer lugar, se aprecia que la administración de fenilefrina produce un aumento de la presión portal que no se ve afectado por la ausencia de esteroides adrenales. El incremento en la presión portal tras la estimulación adrenérgica ha sido previamente descrita (Reilly, 1981; Moy y col., 1991), y se ha atribuido a la constricción de las vénulas sinusoidales portales que regulan el flujo hepático. De forma similar a la respuesta respiratoria, la respuesta ionotrópica, inducida por fenilefrina consta de dos fases, la fase aguda se caracteriza por una captación rápida de potasio y una disminución en el pH del efluente hepático que se acompañan de un eflujo rápido de  $Ca^{2+}$ . En la fase sostenida de la respuesta se observa una tendencia a disminuir la acidificación del medio extracelular, una liberación de  $K^+$  y una ligera captación de  $Ca^{2+}$ , si bien la

**FIGURA 43**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LAS RESPUESTAS**  
**PRESORA E IONOTROPICA A FENILEFRINA EN HIGADOS DE RATAS**  
**ALIMENTADAS *AD LIBITUM*.**



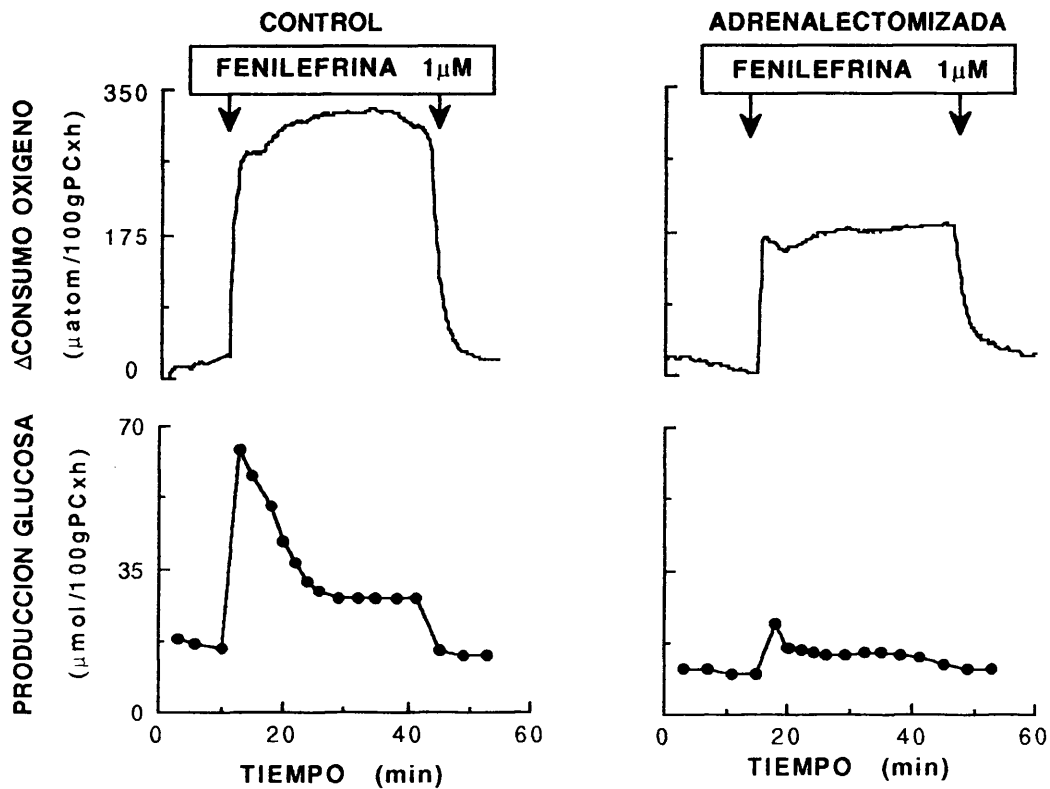
Hígados de ratas alimentadas *ad libitum*, sometidas a una operación simulada o adrenalectomizadas fueron perfundidos con tampón Krebs-Ringer pH 7,4 según se describe en Métodos. Después de que se alcanzara una tasa basal estacionaria de respiración, se administró fenilefrina 1 μM. Los registros representados en la figura corresponden a experimentos representativos.

concentración de este ion permanece por encima de los valores basales. En hígados de ratas adrenalectomizadas (Fig. 43, panel derecho), la respuesta ionotrópica, inducida por fenilefrina, no cambia cualitativamente, sin embargo, se observa una menor salida de protones al medio extracelular, así como una menor captación de  $K^+$  en la fase aguda de la respuesta, seguida de una mayor liberación de este ion durante la fase sostenida; por último, se aprecia una disminución en la  $[Ca^{2+}]$  en el efluente hepático tanto en la fase aguda como sostenida de la estimulación por fenilefrina.

#### **6.1.2.- Efecto de la adrenalectomía sobre la respuesta hepática a fenilefrina durante el ayuno.**

La figura 44 muestra el efecto de la administración de fenilefrina a hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, perfundidos en ausencia de substratos. En hígados de ratas sometidas a una operación simulada, la administración de fenilefrina, en estas condiciones experimentales, produce la característica respuesta respiratoria de tipo bifásico que se acompaña de un aumento en la liberación de glucosa al medio de perfusión. El incremento de respiración, inducido por fenilefrina, en la fase aguda de la respuesta es de igual magnitud al producido por el agonista en los hígados de ratas alimentadas (compárese con la Fig. 42). En los hígados de ratas adrenalectomizadas se observa una disminución considerable de la tasa de consumo de oxígeno así como inhibición dramática de la producción de glucosa ( Fig. 44, panel derecho).

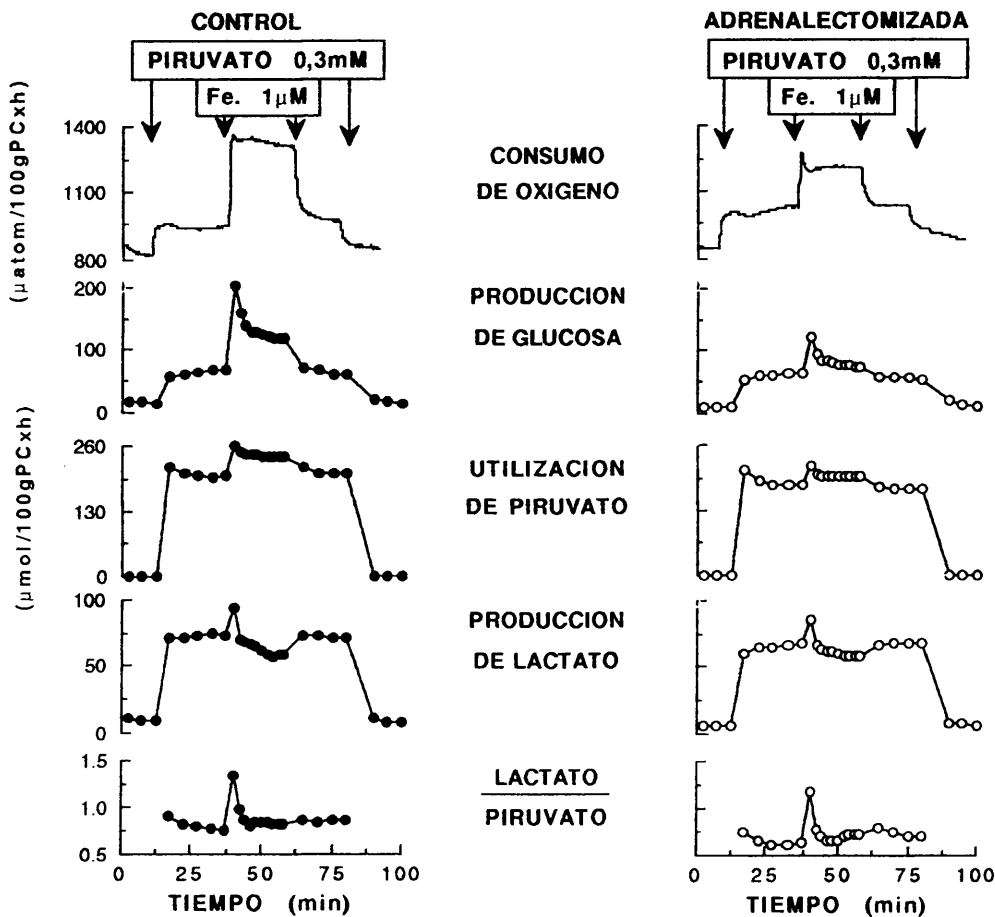
**FIGURA 44**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA RESPUESTA**  
**METABOLICA A FENILEFRINA EN HIGADOS AISLADOS DE RATAS**  
**SOMETIDAS A AYUNO.**



Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a ayuno durante 48 horas, fueron perfundidos con tampón Krebs-Ringer pH 7,4 según se describe en Métodos. Alcanzada una tasa basal estacionaria de respiración, se administró fenilefrina 1 μM. La determinación de glucosa se realizó en alícuotas del efluente hepático tomadas a los tiempos indicados en la figura. Los registros de consumo de oxígeno corresponden a experimentos representativos de cada situación. Los resultados de la producción de glucosa son valores promedio de al menos 4 experimentos.

La figura 45 muestra el efecto de la administración de fenilefrina a hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a ayuno, perfundidos en presencia de una concentración de piruvato 0,3 mM. Los resultados obtenidos en hígados de ratas sometidas a una operación simulada (parte izquierda de la Fig. 45) están de acuerdo con observaciones previas de nuestro laboratorio (González-Manchón y col., 1988 b). De nuevo, puede apreciarse la naturaleza bifásica del incremento de respiración inducido por fenilefrina. Se observa también un aumento simultáneo en la tasa de producción de glucosa. En la fase rápida de la estimulación adrenérgica, se produce un notable incremento en la tasa de producción de glucosa, del que no puede dar cuenta el aumento observado en la tasa de utilización de piruvato, lo cual, sugiere que este aumento transitorio en los niveles de glucosa es consecuencia de la estimulación de glucogenolisis, inducida por fenilefrina. La fase sostenida de respiración coincide con un aumento en la tasa de gluconeogénesis a partir de piruvato. Esta respuesta a fenilefrina se encuentra considerablemente disminuida en ratas adrenalectomizadas tanto en la fase aguda como en la sostenida de respiración y de producción de glucosa (parte derecha de la Fig. 45). De nuevo se observa que la adrenalectomía no perturba la tasa de gluconeogénesis a partir de piruvato, sino que interfiere específicamente con la respuesta del tejido hepático a la estimulación adrenérgica.

**FIGURA 45**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA RESPUESTA**  
**METABOLICA A FENILEFRINA EN HIGADOS PERFUNDIDOS EN**  
**PRESENCIA DE PIRUVATO.**



Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a ayuno durante 48 horas, fueron perfundidos con tampón Krebs-Ringer pH 7,4 hasta que se alcanzó una tasa basal estacionaria de respiración. Piruvato y fenilefrina fueron añadidos disueltos en el medio de perfusión a las concentraciones indicadas en la figura, en los momentos señalados con flechas. Los registros de consumo de oxígeno corresponden a experimentos representativos de cada situación. La determinación de los distintos metabolitos, se realizó en alícuotas del efluente hepático tomadas a los tiempos indicados en la figura. Los resultados son valores promedio de, al menos, 6 experimentos.

La relación entre consumo de oxígeno y gasto energético, en estas condiciones experimentales, aparece recogida en la tabla XIII. Tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas, la administración de piruvato va acompañada de un incremento en la tasa de consumo de oxígeno superior al necesario para dar cuenta de la tasa de producción de glucosa a partir de este substrato. En estas condiciones no se observan diferencias significativas entre los dos tipos de ratas. La administración de fenilefrina a hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, perfundidos en presencia de piruvato, produce, en ambos casos, un estímulo de respiración que excede considerablemente al coste energético del aumento observado en la tasa de gluconeogénesis. No obstante, en los hígados de ratas adrenalectomizadas, el consumo de oxígeno que no puede justificarse para la síntesis de glucosa es significativamente menor que en los controles. Estos resultados sugieren que algún otro proceso dependiente de energía pudiera estar disminuido en los hígados de ratas adrenalectomizadas.

La caracterización de la respuesta ionotrópica y presora de fenilefrina en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas se recoge en la figura 46. Tampoco en estas condiciones experimentales se observaron diferencias significativas en el incremento de la presión portal, inducido por fenilefrina, en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas. El patrón de los flujos de  $H^+$  y  $Ca^{2+}$  en respuesta a la fenilefrina es similar al inducido por el agonista en hígados de ratas alimentadas (Fig. 43).

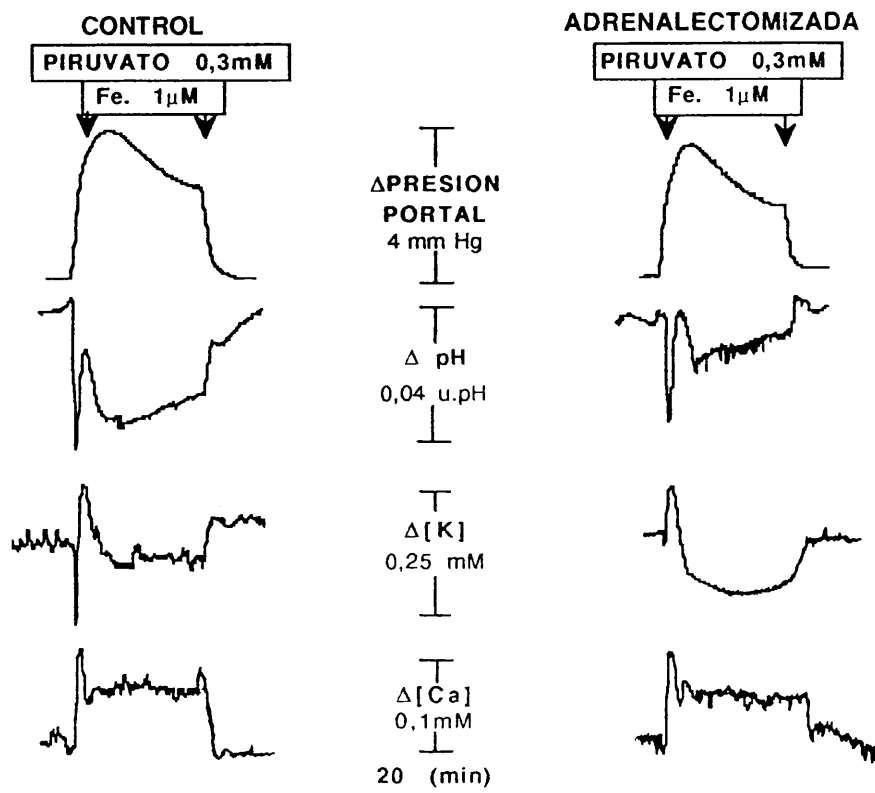
TABLA XIII

**RELACION ENTRE CONSUMO DE OXIGENO Y GASTO ENERGETICO  
EN HIGADOS, PERFUNDIDOS CON PIRUVATO, DE RATAS  
CONTROLES Y ADRENALECTOMIZADAS MANTENIDAS EN  
AYUNO.**

ADICIONES	GRUPO	PRODUCCION	$\Delta$ CONSUMO	EQUIVALENTES
		DE GLUCOSA	DE OXIGENO	OXIGENO PARA SINTESIS DE GLUCOSA
		( $\mu$ mol/100gPCxh)	( $\mu$ atom/100gPCxh)	
PIRUVATO	CONTROL	67 $\pm$ 5	200 $\pm$ 20	134
0,3 mM	ADX	64 $\pm$ 2	228 $\pm$ 13	128
PIRUVATO	CONTROL	121 $\pm$ 7	612 $\pm$ 23	242
+ FE. 1 $\mu$ M	ADX	77 $\pm$ 2	335 $\pm$ 19	154

Las condiciones experimentales son idénticas a las de la figura 45. Las tasas de producción de glucosa y de consumo de oxígeno se han calculado a los 20-25 min. de la administración de piruvato (0,3mM) y a los 20 min. de la administración de fenilefrina (1 $\mu$ M). Para la estimación del gasto energético se ha asumido un valor de la relación P:O de 3. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  error estándar de al menos 7 experimentos. (ADX: adrenalectomizada).

**FIGURA 46**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LAS RESPUESTAS**  
**PRESORA E IONOTROPICA A FENILEFRINA EN HIGADOS**  
**PERFUNDIDOS EN PRESENCIA DE PIRUVATO.**



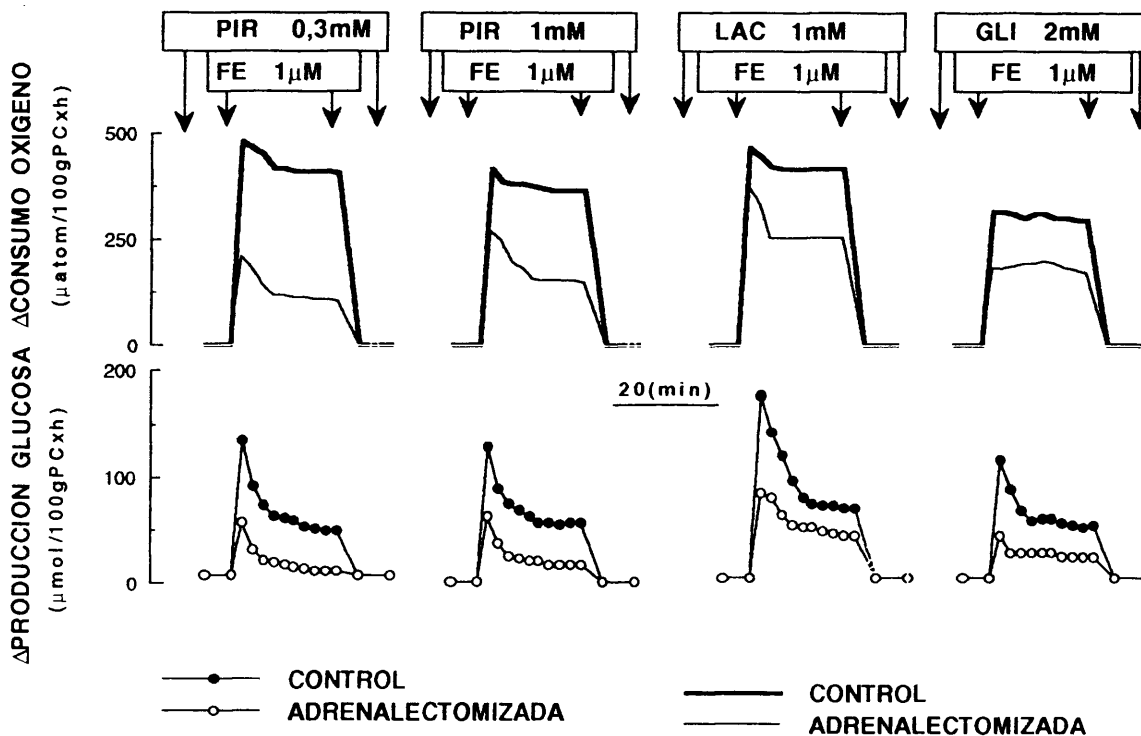
Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a ayuno durante 48 horas, fueron perfundidos con tampón Krebs-Ringer pH 7,4 hasta que se alcanzó una tasa basal estacionaria de respiración. Piruvato y fenilefrina fueron añadidos disueltos en el medio de perfusión a las concentraciones indicadas en la figura, en los momentos señalados con flechas. Los registros representados en la figura corresponden a experimentos representativos.

En estas condiciones, se produce inicialmente una ligera captación de  $K^+$  seguida de un aumento rápido y transitorio de los niveles de  $K^+$  en el efluente hepático al que sigue una captación lenta de este ión por el tejido hepático, llegando a alcanzar unos niveles estacionarios de  $K^+$  en el medio extracelular similares a los valores basales. Comparativamente, en hígados de ratas adrenalectomizadas, la administración de fenilefrina conlleva una menor salida de protones en las fases aguda y sostenida de la respuesta y un aumento en la captación de potasio en la fase sostenida. La salida rápida de calcio y los niveles de  $Ca^{2+}$  en el medio extracelular durante la fase sostenida de la respuesta, se encuentran ligeramente disminuidos.

El efecto de la adrenalectomía disminuyendo la estimulación de la tasa de gluconeogénesis, inducida por fenilefrina, no parece depender de la naturaleza del substrato utilizado, en contraste con lo que se observa respecto a la acción permisiva de los glucocorticoides sobre el efecto de octanoato estimulando la velocidad de gluconeogénesis. Así, la figura 47 muestra que en los hígados de ratas adrenalectomizadas, también disminuye la estimulación de gluconeogénesis, en respuesta a fenilefrina, a partir de un substrato reducido, como lactato, o de un precursor que entra en otro punto de la ruta gluconeogénica como es el glicerol. La figura 47 muestra también que la respuesta no se restaura aumentando la disponibilidad de piruvato desde 0,3 hasta 1 mM.

FIGURA 47

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE FENILEFRINA SOBRE LAS TASAS DE RESPIRACION Y GLUCONEOGENESIS EN HIGADOS, DE RATAS CONTROLES Y ADRENALECTOMIZADAS, PERFUNDIDOS CON DISTINTOS PRECURSORES GLUCONEOGENICOS.

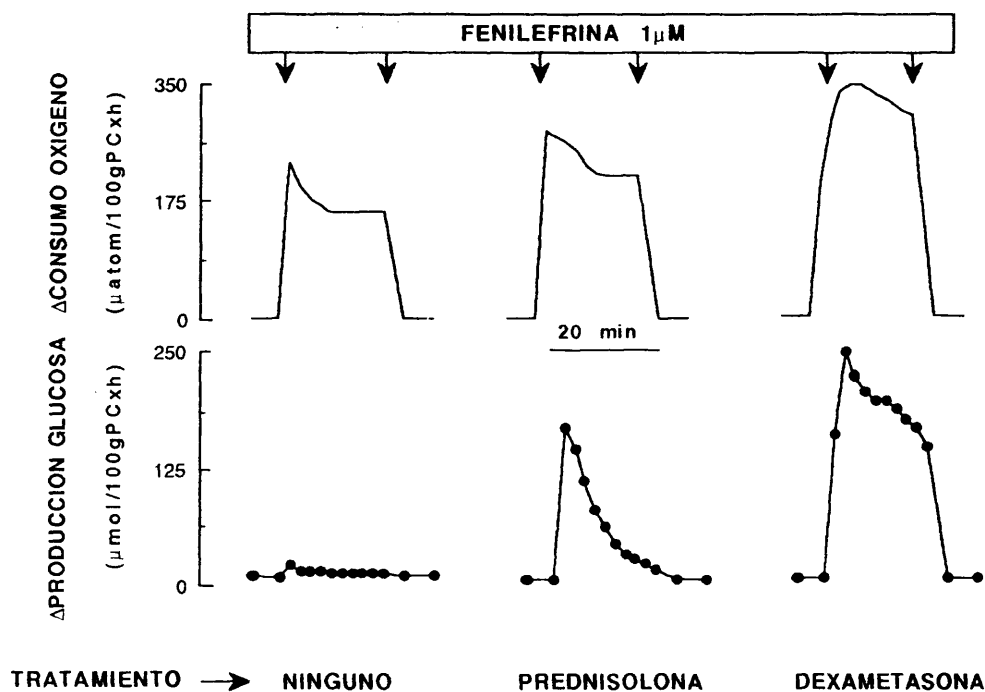


Hígados de ratas sometidas a una operación simulada y adrenalectomizadas y mantenidas en ayuno durante 48 horas, fueron perfundidos con tampón Krebs-Ringer pH 7,4. Una vez alcanzada una tasa basal estacionaria de respiración, se añadieron los distintos substratos gluconeogénicos y la fenilefrina a las concentraciones indicadas en la figura. Para la determinación de glucosa se tomaron alícuotas del efluente hepático a los tiempos indicados en la figura. Los resultados son valores promedio de al menos 3 experimentos.

## 6.2.- EFECTO DEL TRATAMIENTO *IN VIVO* CON GLUCOCORTICOIDES SOBRE LOS EFECTOS DE FENILEFRINA EN RESPIRACION Y PRODUCCION DE GLUCOSA.

La figura 48 muestra el efecto del tratamiento de ratas adrenalectomizadas con dosis sustitutivas de glucocorticoides tales como la prednisolona y dexametasona sobre los efectos de fenilefrina en las tasas de respiración y producción de glucosa en hígados de ratas sometidas a ayuno durante 48 horas y perfundidos en ausencia de substratos. Puede observarse que el tratamiento con cualquiera de estos glucocorticoides es capaz de potenciar los efectos del agonista adrenérgico en hígados de ratas adrenalectomizadas. La respuesta a fenilefrina que se observa en estas condiciones supera en magnitud a la que se produce en hígados de ratas controles, no sometidas a tratamiento. y perfundidos en las mismas condiciones experimentales. El tratamiento con prednisolona permite alcanzar una tasa de producción de glucosa similar a la observada en hígados de ratas controles no sometidas a tratamiento. En el caso del tratamiento, con dexametasona, se observan, tras la administración de fenilefrina, niveles muy altos de glucosa en el efluente hepático. El contenido hepático de glucógeno continúa siendo alto, en hígados de ratas adrenalectomizadas tratadas con dexametasona, a pesar del período de ayuno de 48 horas, al que fueron sometidas. Ello se debe probablemente a los efectos de prednisolona y dexametasona sobre el metabolismo hepático de glucógeno (Tabla II) y/o a un efecto directo de dexametasona incrementando la actividad de la fosforilasa (Gómez-Muñoz y col., 1989). El alto contenido hepático

**FIGURA 48**  
**EFFECTO DEL TRATAMIENTO *IN VIVO* CON GLUCOCORTICOIDES A**  
**RATAS ADRENALECTOMIZADAS SOBRE LA RESPUESTA HEPATICA**  
**A FENILEFRINA.**



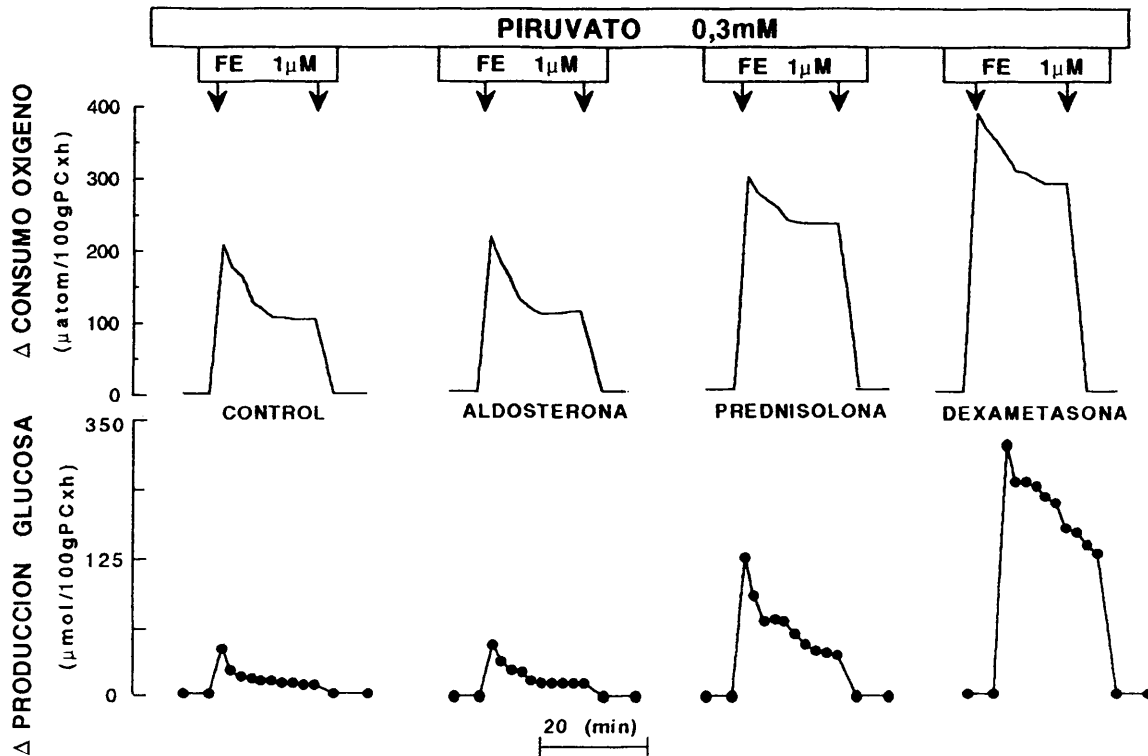
Ratas adrenalectomizadas fueron sometidas a un período de ayuno de 48 horas. Los animales se dividieron en tres grupos. El primero de ellos no recibió ningún tratamiento. Los otros dos grupos fueron tratados con prednisolona y dexametasona respectivamente, según se describe en el apartado de Métodos. Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la figura.44. Los resultados son valores promedio de al menos 3 experimentos.

de glucógeno, que se observa tras el tratamiento con glucocorticoides, especialmente en el caso de dexametasona, hace que la respuesta a fenilefrina, en estas condiciones se asemeje a la que induce el  $\alpha$ -agonista en hígados de ratas alimentadas *ad libitum*. De forma similar, el tratamiento *in vivo* de ratas adrenalectomizadas con prednisolona y dexametasona permite restaurar la respuesta respiratoria de fenilefrina en hígados de ratas mantenidas en ayuno durante 48 horas, perfundidos en presencia de piruvato como precursor gluconeogénico (Fig. 49). La figura 49 muestra también como la administración de un mineralocorticoide como la aldosterona a ratas adrenalectomizadas no permite restaurar la respuesta respiratoria y gluconeogénica de fenilefrina. Estos resultados sugieren pues, que la acción de glucocorticoides es un requisito imprescindible para que los agentes  $\alpha$ -adrenérgicos produzcan sus efectos característicos en el metabolismo hepático.

### 6.3.- EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA EN LA ACTIVACION $\alpha$ Y $\beta$ ADRENERGICA.

Algunos autores han descrito que la adrenalectomía tiene como consecuencia una disminución importante en el número de receptores  $\alpha_1$  mientras que aumenta la densidad de los receptores  $\beta$  en el tejido hepático (El-Refai y Chan, 1986; Studer y Borle, 1984; Borle y Studer, 1990). Estos resultados explicarían el aumento en la sensibilidad de adenilato ciclasa a la activación por epinefrina o isoproterenol observado en hígados de ratas adreoprivas (Wolfe

**FIGURA 49**  
**EFFECTOS DE ALDOSTERONA, PREDNISOLONA Y DEXAMETASONA EN LA RESPUESTA METABOLICA A FENILEFRINA EN HIGADOS DE RATAS ADRENALECTOMIZADAS.**



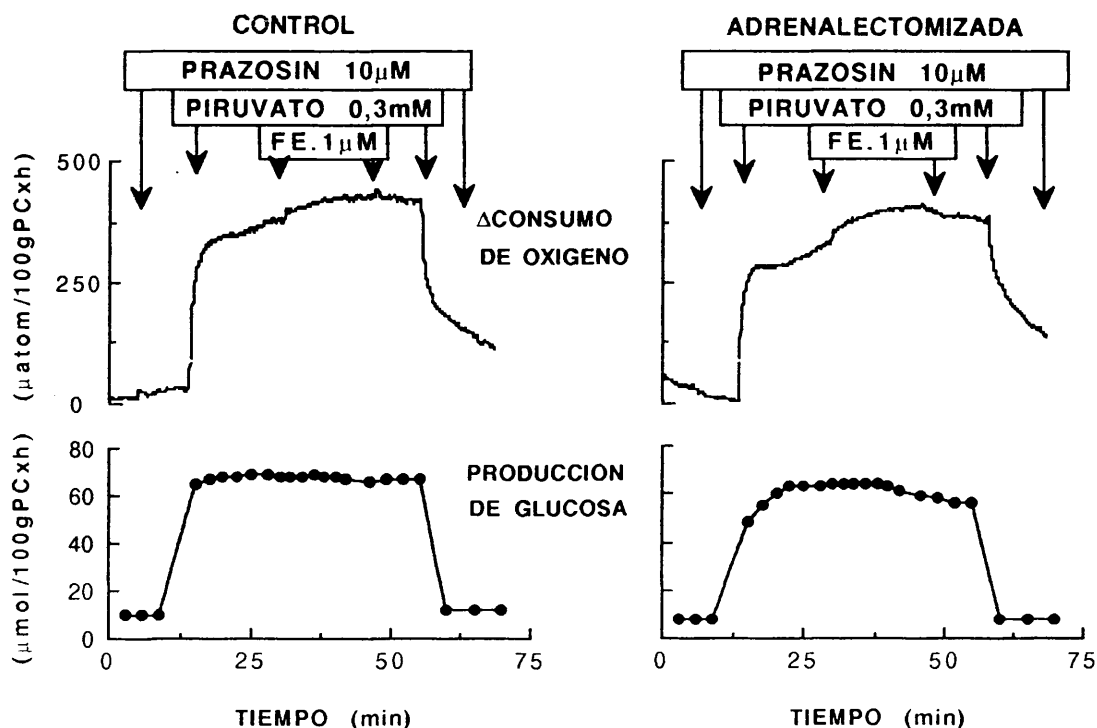
Para la realización de estos experimentos se utilizaron ratas adrenalectomizadas, mantenidas en ayuno durante 48 horas. Los distintos tratamientos se aplicaron según se describe en Métodos. Las condiciones experimentales son idénticas a las descritas en la figura 45. Los resultados son valores promedio de, al menos, 3 experimentos.

y col., 1976; Chan y col., 1979). Por otra parte, resultados recientes de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto la participación de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  en la respuesta hepática a fenilefrina (Ayuso y col., 1990). Con estos antecedentes, cabría esperar que las respuestas respiratoria y gluconeogénica del tejido hepático tras la administración de fenilefrina, fueran relativamente menos sensible a la acción de bloqueantes  $\alpha$  adrenérgicos en los hígados de ratas adrenaectomizadas que en los controles. Por el contrario, la inactivación de los receptores  $\beta$  afectaría preferentemente a la acción de fenilefrina en hígados de ratas adrenaectomizadas.

Sin embargo, los resultados de la figura 50 muestran que la administración del antagonista  $\alpha_1$ , prazosín, impide por completo los efectos de fenilefrina sobre las tasas de consumo de oxígeno y de producción de glucosa, tanto en hígados de ratas controles como adrenaectomizadas. De igual manera, la adición al medio de perfusión de un antagonista  $\beta$ -adrenérgico como el propranolol (Fig. 51) disminuye dramáticamente el incremento de respiración, inducido por fenilefrina, e impide la estimulación de gluconeogénesis en ambos tipos de ratas.

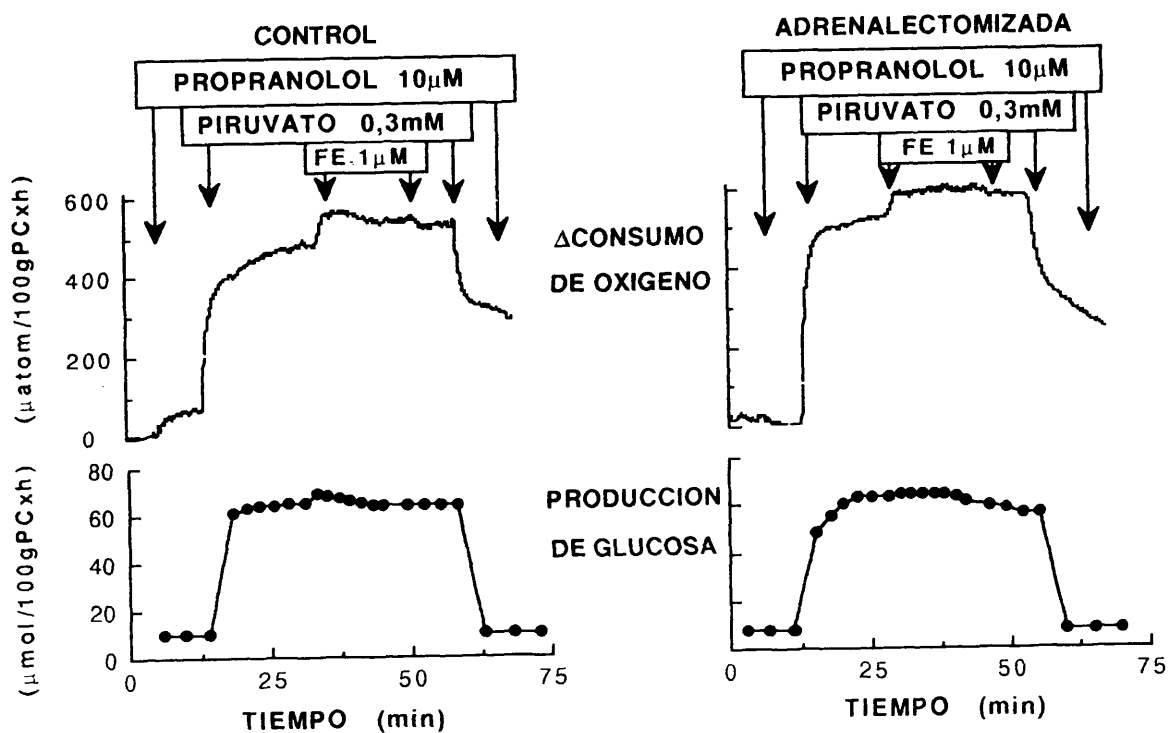
Por otra parte, la figura 52 muestra cómo la presencia de un agonista  $\beta$  como es el isoproterenol disminuye dramáticamente los efectos de fenilefrina sobre respiración y gluconeogénesis tanto en hígados de ratas controles como adrenaectomizadas. Además, como se aprecia en el panel derecho de la figura 52, la

**FIGURA 50**  
**EFFECTO DEL PRAZOSIN SOBRE LA RESPUESTA METABOLICA A**  
**FENILEFRINA EN HIGADOS PERFUNDIDOS EN PRESENCIA DE**  
**PIRUVATO.**



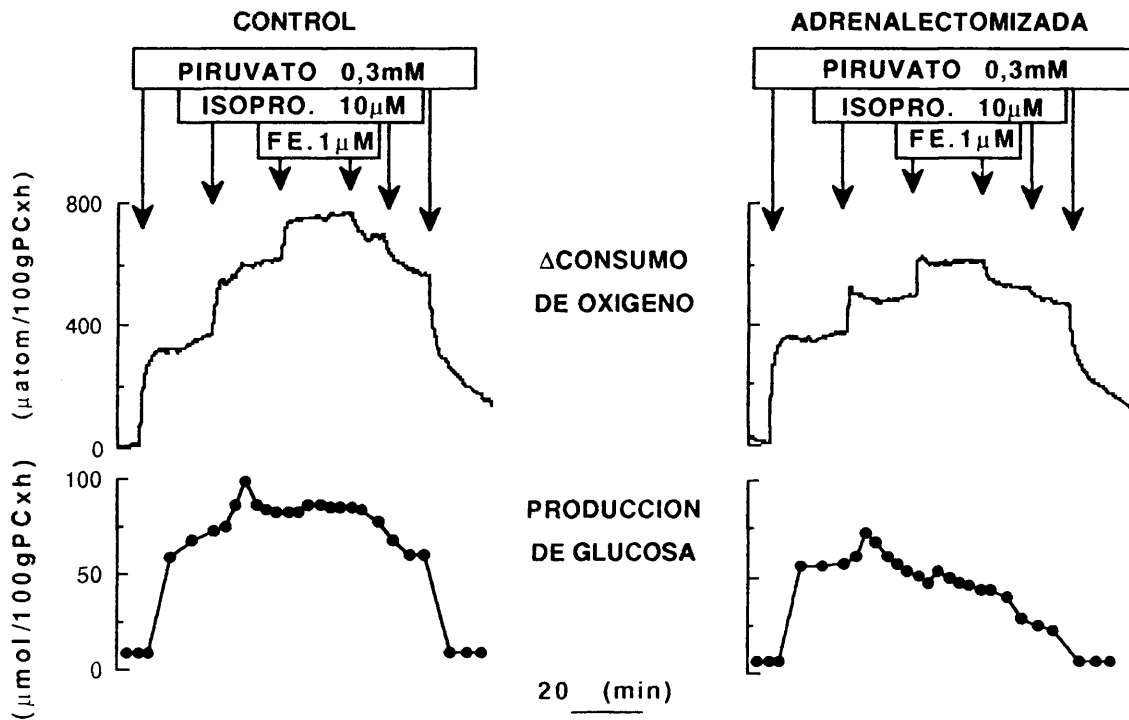
Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas ayuno durante 48 horas, fueron perfundidos con tampón Krebs-Ringer pH 7,4 hasta que se alcanzó una tasa basal estacionaria de respiración. Prazosín, piruvato y fenilefrina fueron añadidos disueltos en el medio de perfusión a las concentraciones indicadas en la figura, en los momentos señalados con flechas. La determinación de la producción de glucosa se realizó en alícuotas del efluente hepático tomadas a los tiempos indicados en la figura. El registro de oxígeno y la producción de glucosa representados en la figura, corresponden a un experimento tipo.

**FIGURA 51**  
**EFFECTO DEL PROPRANOLOL SOBRE LA RESPUESTA METABOLICA A**  
**FENILEFRINA EN HIGADOS PERFUNDIDOS EN PRESENCIA DE**  
**PIRUVATO.**



Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a ayuno durante 48 horas, fueron perfundidos con tampón Krebs-Ringer pH 7,4 hasta que se alcanzó una tasa basal estacionaria de respiración. Propranolol, piruvato y fenilefrina fueron añadidos disueltos en el medio de perfusión a las concentraciones indicadas en la figura, en los momentos señalados con flechas. La determinación de la producción de glucosa se realizó en alícuotas del efluente hepático tomadas a los tiempos indicados en la figura. El registro de oxígeno y la producción de glucosa representados en la figura, corresponden a un experimento tipo.

**FIGURA 52**  
**EFFECTO DEL ISOPROTERENOL SOBRE LA RESPUESTA METABOLICA A**  
**FENILEFRINA EN HIGADOS PERFUNDIDOS EN PRESENCIA DE**  
**PIRUVATO.**



Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a ayuno durante 48 horas, fueron perfundidos con tampón Krebs-Ringer pH 7,4 hasta que se alcanzó una tasa basal estacionaria de respiración. Piruvato, isoproterenol y fenilefrina fueron añadidos disueltos en el medio de perfusión a las concentraciones indicadas en la figura, en los momentos señalados con flechas. La determinación de la producción de glucosa se realizó en alícuotas del efluente hepático tomadas a los tiempos indicados en la figura. El registro de oxígeno y la producción de glucosa representados en la figura, corresponden a un experimento tipo.

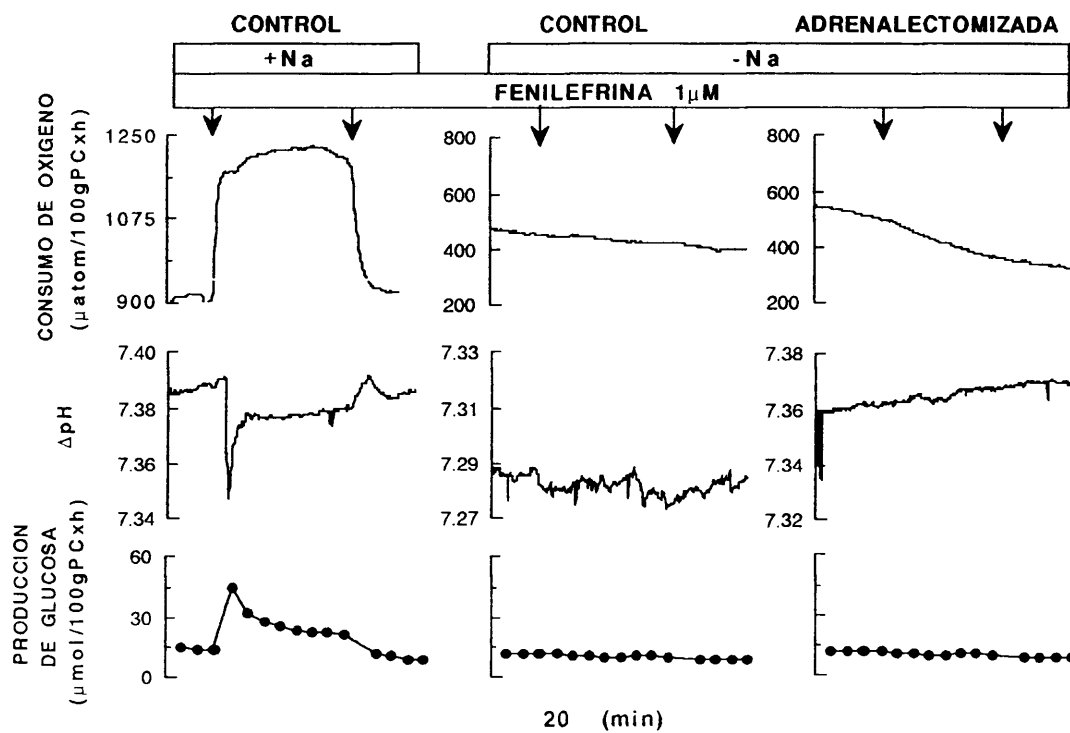
adrenalectomía conlleva también una atenuación de la respuesta del tejido hepático a estimulantes  $\beta$  adrenérgicos.

Estos resultados sugieren, pues, que es necesaria la integridad de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  en la membrana plasmática para que pueda producirse una respuesta completa a fenilefrina. Estos resultados, no obstante, no permiten atribuir la inhibición de la respuesta adrenérgica, en hígados de ratas adrenalectomizadas, a una posible alteración en la densidad de los adrenorreceptores, inducida por la ausencia de esteroides adrenales.

## 7.- EFECTO DE LA SUSTITUCION DE CLORURO DE SODIO POR CLORURO DE COLINA, EN EL MEDIO DE PERFUSION, SOBRE LA RESPUESTA HEPATICA A FENILEFRINA.

En la respuesta hepática a fenilefrina destacan un incremento en la tasa de respiración, que se acompaña por una acidificación del medio extracelular. Esta acidificación del medio extracelular podría deberse a una mayor producción de lactato junto con una activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Puesto que los animales adrenalectomizados presentan una disminución en la respuesta respiratoria acompañada de una menor acidificación del medio extracelular, y no se aprecian cambios en la tasa de producción de lactato, en hígados de ratas mantenidas en ayuno (Fig. 45), podría pensarse que los cambios en el pH del efluente hepático, serían debidos a diferencias en la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Por esta razón, decidimos explorar que papel juega el contenido de  $\text{Na}^+$  en la respuesta hepática a fenilefrina. Para ello, sustituimos en el medio de perfusión el cloruro de sodio por cloruro de colina, manteniendo la miliosmolaridad del medio. En la figura 53 puede apreciarse que la ausencia de sodio produce una abolición de la respuesta respiratoria, de la acidificación del medio extracelular y del aumento en la producción de glucosa, inducidos por fenilefrina. Estos resultados sugieren la importancia del mantenimiento de la composición iónica del medio extracelular para la expresión de los efectos inducidos por fenilefrina, así como que la regulación de los flujos de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana plasmática es esencial para la acción de este agonista.

**FIGURA 53**  
**EFFECTO DE LA SUSTITUCION DE CLORURO DE SODIO POR CLORURO DE COLINA, EN EL MEDIO DE PERFUSION, SOBRE LA RESPUESTA HEPATICA A FENILEFRINA.**



Hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, sometidas a ayuno durante 48 horas, fueron perfundidos con tampón Krebs-Ringer pH 7,4 o con un tampón isoosmótico en el que se sustituyó el cloruro de sodio por una concentración equimolecular de cloruro de colina. Alcanzada una tasa basal estacionaria de respiración, se administró fenilefrina  $1\mu\text{M}$ . Los registros de consumo de oxígeno y pH corresponde a experimentos representativos de cada situación. Los resultados de la producción de glucosa son valores promedio de, al menos 3 experimentos.

## 8.- ACTIVIDAD PROTEINA QUINASA C EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.

Como se ha recogido en la Introducción de este trabajo, la implicación de proteína quinasa C en la respuesta adrenérgica en el tejido hepático está bien documentada. Por ello, consideramos de interés estudiar la posibilidad de que la alteración de la respuesta a fenilefrina, observada en hígados de ratas adrenalectomizadas pudiera deberse a una alteración en la actividad de esta proteína.

La tabla XIV muestra el efecto de fenilefrina sobre la actividad de proteína quinasa C en la fracción citosólica y de membranas de hígados de ratas controles y adrenalectomizadas. En la mayor parte de los tejidos estudiados, la activación de este enzima implica la translocación de la proteína hacia la membrana plasmática (Kraft y col., 1983; Berridge, 1987; Exton, 1988; Piccoletti y col., 1990; Trilivas y col., 1991). Puede observarse, en primer lugar, que la adrenalectomía no altera la actividad basal total de proteína quinasa C (citosólica+membrana); sin embargo, produce una alteración en la proporción relativa de la actividad de la quinasa en ambas fracciones. En los hígados de ratas controles, en ausencia de fenilefrina, la actividad citosólica representa el 58% del total, mientras que disminuye hasta un 43% tras la adrenalectomía. La distribución de la actividad basal de PKC en el tejido hepático contrasta con la encontrada en otros tipos celulares, en los que se ha descrito que la actividad basal de PKC es mayoritariamente citosólica (Kaku y col., 1991). La administración

TABLA XIV

EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA ACTIVIDAD DE  
PROTEINA QUINASA C.

		TIEMPO DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE FENILEFRINA (min)	
GRUPO		0	2
ACTIVIDAD DE PROTEINA QUINASA C (pmol ATP/mg proteína x min)			
FRACCION CITOSOLICA	CONTROL	127	86
	ADRENALECTOMIA	104	117
FRACCION DE MEMBRANAS	CONTROL	89	126
	ADRENALECTOMIA	135	91

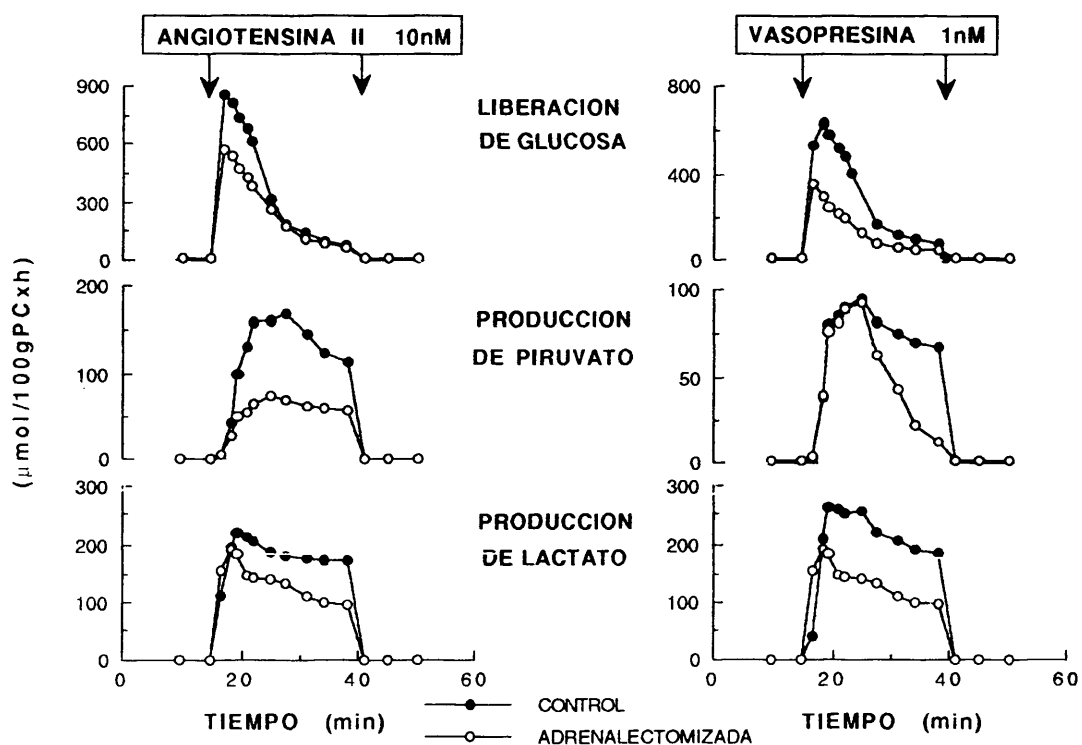
La actividad de proteína quinasa C, en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, alimentadas *ad libitum* fue determinada según se describe en Métodos. A tiempo cero se tomó una biopsia ligando el lóbulo hepático correspondiente para prevenir hemorragias. Inmediatamente después fueron administrados 0,03mg de fenilefrina en la vena porta y dos minutos después fue tomada la segunda biopsia hepática. Los resultados son la media de 2 experimentos en los que la actividad de proteína quinasa C en la fracción soluble y de membranas fue determinada por triplicado.

de fenilefrina produjo una estimulación superior al 40% de la actividad de proteína quinasa C de membranas en hígados de ratas controles. Por el contrario, en hígados de ratas adrenalectomizadas se observa una disminución en dicha actividad en la fracción de membranas en iguales condiciones.

#### 9.- RESPUESTA METABOLICA A VASOPRESINA Y ANGIOTENSINA II EN HIGADOS DE ANIMALES ADRENOPRIVOS.

La figura 54 muestra los efectos de la administración de angiotensina II y vasopresina sobre glucogenolisis en hígados perfundidos de ratas controles y adrenalectomizadas. La administración de angiotensina II o de vasopresina produce un aumento considerable en la tasa de liberación de glucosa, que alcanza un máximo entre 1 y 3 minutos después de su administración, para luego disminuir progresivamente. Puede observarse que la adrenalectomía produce también una disminución apreciable en la respuesta glucogenolítica de estas hormonas peptídicas. Angiotensina II y vasopresina comparten con fenilefrina efectores intracelulares. Por tanto, y a menos que se postulara una disminución en el número de receptores para estas hormonas, inducida por la adrenalectomía, parece lógico concluir que la atenuación de la respuesta metabólica a fenilefrina, observada en hígados de ratas adrenalectomizadas no se debe a la disminución en el número de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos sino que reside en la cascada *proteínas-G-->fosfolipasa-C-->hidrólisis de fosfoinosítidos-->proteína quinasa C*.

**FIGURA 54**  
**EFFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA RESPUESTA**  
**METABOLICA A ANGIOTENSINA II Y VASOPRESINA EN HIGADOS**  
**DE RATAS ALIMENTADAS *AD LIBITUM*.**



Hígados de ratas alimentadas *ad libitum*, sometidas a una operación simulada o adrenalectomizadas fueron perfundidos con tampón Krebs-Ringer pH 7,4, según se describe en Métodos. Después de que se alcanzara una tasa basal estacionaria de respiración, se administró angiotensina II o vasopresina a las concentraciones indicadas en la figura. La determinación de los distintos metabolitos se realizó en alícuotas, del efluente hepático, tomadas a los tiempos indicados en la figura. Los resultados de las distintas tasas metabólicas son valores promedio de al menos dos experimentos.

## **DISCUSSION**

## 1.- METABOLISMO HEPATICO DE ACIDOS GRASOS EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.

La insuficiencia suprarrenal conlleva una disminución en los niveles circulantes de ácidos grasos (Gauthier y col., 1986). En nuestras condiciones experimentales, el contenido de ácidos grasos libres en plasma disminuyó en, aproximadamente, un 30% a los cuatro días de haberse practicado la adrenalectomía bilateral (Tabla III). Consecuentemente con el hecho de que la oxidación de ácidos grasos es proporcional a su concentración plasmática (Soler-Argilaga y col., 1974), y junto con el hecho de que la adrenalectomía no afecta a la actividad de la carnitina palmitoiltransferasa (CPT-I), (Saggerson y Carpenter, 1981), la tasa de respiración hepática, en ausencia de substratos, disminuyó en aproximadamente la misma proporción en hígados de ratas adrenoprivas (Fig. 9). Estos resultados sugieren que la adrenalectomía disminuye la tasa de movilización de ácidos grasos y no los mecanismos implicados en su oxidación.

Cuando se administra un ácido graso exógeno, como octanoato, tanto a hígados aislados de ratas sometidas a una operación simulada y a hígados de ratas adrenalectomizadas, no se observaron diferencias significativas en las tasas de consumo de oxígeno y de producción de cuerpos cetónicos. Esto ocurre tanto si el octanoato es administrado en ausencia de otros substratos (Figs. 8 y 9) como en presencia de un precursor gluconeogénico (Figs. 24 y 26). Por otra parte, el conocido efecto anticetogénico de lactato (Fig. 27) se produce en ambos tipos de ratas. Por tanto, parece

lógico concluir que, en nuestras condiciones experimentales, la adrenalectomía no parece perturbar la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales responsables de la oxidación de ácidos grasos.

## **2.- GLUCONEOGENESIS A PARTIR DE LACTATO O DE PIRUVATO EN HIGADOS DE ANIMALES ADRENOPRIVOS.**

Los resultados de las figuras 4 y 5 muestran que la adrenalectomía no perturba la tasa de gluconeogénesis hepática a partir de concentraciones progresivamente crecientes de lactato o de piruvato. Estos resultados contrastan con trabajos previos que describen una menor tasa de gluconeogénesis en hígados de ratas adrenalectomizadas, (Exton y col., 1972, 1973, 1976; Friedmann y col., 1967). La causa de esta discrepancia podría estar en la utilización de distintos modelos experimentales o en la forma de administrar los precursores gluconeogénicos. Así, por ejemplo, hemos podido observar una inhibición de la velocidad de producción de glucosa a partir de lactato en hígados de ratas adrenoprivas cuando los hígados son perfundidos con una concentración estacionaria de sustrato (Fig. 26). Esta variabilidad pudiera ser debida al hecho de que la obtención de una tasa estacionaria de producción de glucosa a partir de una determinada concentración de sustrato es función del tiempo. Resultados similares se obtuvieron en nuestro laboratorio, estudiando la dependencia de la tasa basal de gluconeogénesis de la presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular (González-Manchón y col., 1990).

### 3.- INTERACCION GLUCOCORTICOIDES-ACIDOS GRASOS EN LA REGULACION DE GLUCONEOGENESIS.

La adrenalectomía impide o disminuye la estimulación de la " $v_{max}$ " del proceso de gluconeogénesis hepática dependiendo de la naturaleza del precursor gluconeogénico.

La administración de octanoato a hígados aislados de ratas sometidas a una operación simulada (Fig. 12, panel izquierdo) produjo efectos similares a los descritos previamente en hígados de ratas controles (González-Manchón y col., 1989). En primer lugar, la administración de octanoato puede inhibir o estimular la tasa de gluconeogénesis dependiendo de la concentración de substrato disponible. Esta observación puede explicar la discrepancia de los trabajos que describen tanto estimulación de gluconeogénesis (Johnson y col., 1972; Williamson y col., 1966; Siess y Wieland 1975) como inhibición de la producción de glucosa inducida por ácidos grasos (Jomain-Baun y Hauson, 1975; Zablucki y col., 1983; Wolfe y Shaw, 1984). Por otra parte, la interacción de octanoato con la ruta gluconeogénica da lugar a dos fenómenos bien diferenciados: un aumento de la velocidad máxima del proceso, que es inversamente proporcional a la concentración del ácido graso, y un desplazamiento de las curvas de saturación hacia la derecha, que probablemente refleja cambios de afinidad por el substrato a nivel de la primera etapa reguladora de la vía, es decir, el transporte de piruvato a través de la membrana mitocondrial.

La administración de concentraciones de octanoato por encima de 0,1 mM, a hígados de ratas sometidas a una operación simulada da lugar a una disminución de la producción de piruvato a partir de lactato (Fig. 20, panel izquierdo) que puede llegar a ser del 80% cuando se utiliza una concentración de octanoato de 0,5 mM. Dado que estos valores son un reflejo aproximado de los niveles intracelulares de piruvato y que, como se puede apreciar en la figura 15, las concentraciones de este substrato se encuentran dentro de los límites en los que su entrada a la mitocondria se supone limitante (Halestrap, 1978 a, b; Patel y col., 1984; Martín-Requero y col., 1986), el hecho de que se siga observando un aumento de la velocidad máxima de producción de glucosa con una concentración de piruvato mucho menor sólo puede explicarse si el transporte de piruvato a través de la membrana mitocondrial ha sido activado.

En presencia de concentraciones de octanoato capaces de aumentar considerablemente el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico (Fig. 22, panel izquierdo), la etapa que controla el flujo gluconeogénico pudiera ser la catalizada por el enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, ya que la concentración citosólica de oxalacetato ( $=10 \mu\text{M}$ ) está dentro del rango de la  $K_m$  de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa para este intermediario, y que un aumento del estado de reducción, inducido por la oxidación de ácidos grasos, daría lugar a una disminución en los niveles estacionarios de oxalacetato en el citosol.

La administración de concentraciones crecientes de octanoato a hígados de ratas adrenalectomizadas (Fig. 12, panel derecho) permite dissociar dos aspectos característicos del efecto del ácido graso sobre la tasa de gluconeogénesis a partir de lactato. En primer lugar, la adrenalectomía impide el incremento de la velocidad máxima de producción de glucosa, inducido por octanoato, aunque se sigue observando una relación inversa entre " $v_{max}$ " y concentración del ácido graso. En segundo lugar, el característico desplazamiento de la curva de saturación en función de la concentración de octanoato se observa también en hígados de ratas adrenalectomizadas.

El tratamiento *in vivo* de ratas adrenalectomizadas con un glucocorticoide de síntesis como prednisolona (Fig. 13), pero no con mineralocorticoides (resultados no mostrados) restauró parcialmente la capacidad del octanoato para estimular la producción de glucosa.

Nuestros resultados sugieren que los cambios cinéticos, inducidos por octanoato, responden a un mecanismo independiente de la presencia o no de glucocorticoides; sin embargo, en consonancia con su papel permisivo en la acción gluconeogénica de algunas hormonas (Friedmann y col., 1967; Exton y col., 1972), los glucocorticoides serían un requerimiento esencial para incrementar la capacidad máxima de la ruta gluconeogénica en respuesta a ácidos grasos, sobre todo a partir de substratos más reducidos que la glucosa.

No existen apenas en la literatura evidencias acerca de la implicación de los glucocorticoides en la regulación de gluconeogénesis por agentes no hormonales. Shackelford y col.,(1986) describieron que la disminución de gluconeogénesis que produce la endotoxina y por ende, la incapacidad de los sujetos afectados por salmonelosis de mantener niveles adecuados de glucosa en sangre, es consecuencia de la inhibición de la inducción de ciertas enzimas hepáticas por glucocorticoides, entre ellos fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. En relación a la interacción glucocorticoides-ácidos grasos, el único precedente es un trabajo de nuestro laboratorio (Ayuso y col., 1986) que describía que, mientras la administración de octanoato *in vivo* a ratas alimentadas *ad libitum* estimulaba la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Alanina en glucosa, la adrenalectomía impedía este efecto. Nuestros resultados demuestran, de forma inequívoca que la presencia de glucocorticoides es imprescindible para que se produzca una estimulación del flujo gluconeogénico a partir de lactato en respuesta a la oxidación de ácidos grasos. Cuando se utiliza como precursor gluconeogénico un substrato más oxidado que la glucosa, como es piruvato, la adrenalectomía no impide la respuesta hepática a octanoato incrementando la velocidad máxima de producción de glucosa (Fig. 29). Tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas, el efecto de octanoato sobre la velocidad de producción de glucosa se aprecia a concentraciones de substrato por encima de 0,3 mM, es decir cuando el transporte de este metabolito a través de la membrana mitocondrial deja de ser limitante para su posterior metabolismo.

El efecto diferencial de octanoato sobre la velocidad de gluconeogénesis a partir de piruvato o de lactato en animales adrenoprivos podría ser explicado por la ausencia de estimulación del transportador mitocondrial de piruvato inducida por octanoato. El efecto de la oxidación de ácidos grasos sobre el transporte mitocondrial de piruvato está bien documentado (Scholz y col., 1978; Dennis y col., 1978; Patel y col., 1984; Demaugre y col., 1984). Una posible disminución en la velocidad de transporte de piruvato a través de la membrana mitocondrial afectaría fundamentalmente a la tasa de gluconeogénesis a partir de lactato, ya que en estas condiciones, la baja disponibilidad de piruvato hace que su transporte a través de la membrana mitocondrial sea la etapa limitante de gluconeogénesis (Martín-Requero y col., 1986 b), sin embargo nuestros resultados no apoyan esta idea. Los datos de la figura 15, muestran que en hígados de ratas adrenalectomizadas, de forma similar a lo que ocurre en los hígados de ratas controles, a medida que aumenta la concentración de octanoato, menor es la concentración de piruvato que se requiere para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de producción de glucosa, lo cual sugiere una estimulación del transporte de piruvato a través de la membrana mitocondrial, en estas condiciones. Por otra parte, en los experimentos realizados con mezclas de lactato y piruvato (Figs. 37 y 40), el octanoato es capaz de estimular la tasa de gluconeogénesis, en hígados de ratas adrenalectomizadas, aunque la concentración de piruvato sea aún limitante para su transporte (Fig. 41). Por tanto, podemos concluir

que no hay evidencias de que la extirpación de las glándulas suprarrenales impida el efecto estimulador de octanoato sobre el transporte de piruvato a través de la membrana mitocondrial.

La tasa de oxidación de octanoato, tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas, no se ve afectada por la naturaleza del precursor gluconeogénico. Por tanto, también hay que excluir una desigual activación del enzima piruvato carboxilasa por su activador alostérico, acetil-CoA (Utter y Scrutton, 1969; Scrutton y Grilliths, 1981), en el caso de que se utilice lactato o piruvato como precursor gluconeogénico.

El distinto comportamiento de octanoato sobre la velocidad de gluconeogénesis, en hígados de ratas adrenalectomizadas, según se utilice un precursor más oxidado o más reducido que la glucosa podría estar relacionado con la distinta forma en que el oxalacetato generado dentro de la mitocondria es transportado al citosol. La producción de glucosa a partir de lactato, conlleva el transporte de oxalacetato como aspartato (Krebs y col., 1967) mientras que en la gluconeogénesis a partir de piruvato, la salida de esqueletos carbonados ocurre como malato (Williamson y col., 1969). Por tanto, cabría pensar en la posibilidad de que la adrenalectomía pudiera perturbar el flujo a través de aspartato aminotransferasa o afectara directamente al transporte de aspartato a través de la membrana mitocondrial. Adicionalmente, hay que considerar que el aumento en el estado redox citosólico (Fig. 22), de mayor intensidad que el que se produce en los hígados de ratas controles

tras la oxidación de octanoato podría disminuir aún más la disponibilidad de oxalacetato en el citosol y limitar el flujo a través de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, un enzima que, por otra parte, es inducido por glucocorticoides (Gunn y col., 1975).

Por último, hay que considerar la posibilidad de que, en hígados de ratas adrenalectomizadas, pudiera estar limitada la generación de energía que hiciera posible un estímulo del flujo gluconeogénico en condiciones en que la disponibilidad de substrato es baja. El hecho de que la adrenalectomía no impida el efecto estimulador de octanoato sobre la tasa de producción de glucosa cuando aumenta la disponibilidad de piruvato, condiciones en las que se produce un aumento en el flujo a través de piruvato carboxilasa con la consiguiente elevación de los niveles de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos apoya esta posibilidad.

La estimación del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas (Tablas XI y XII) muestra que, en hígados de ratas controles, la administración de lactato, octanoato o una mezcla de ambos substratos produce un aumento del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, (Tabla IX). En hígados de ratas adrenalectomizadas, la administración conjunta de octanoato y lactato resulta en un 13% de inhibición del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En estas condiciones, el octanoato no

es capaz de aumentar la tasa de producción de glucosa a partir de lactato.

En todos los experimentos llevados a cabo en hígados de ratas adrenalectomizadas, hemos observado sistemáticamente un mayor estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  (Figs. 23, 36 y 39). Puesto que la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  es un importante modulador de la actividad del ciclo (Williamson y Cooper, 1980; Hansford, 1980), ésta pudiera ser la causa de la inhibición del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, observada en hígados de ratas adrenalectomizadas, perfundidos en presencia de lactato y octanoato.

#### 4.- ESTADO REDOX DEL SISTEMA NAD<sup>+</sup> HEPATICO EN ANIMALES ADRENOPRIVOS.

Es un hecho conocido que, en condiciones normales, existe un gradiente de potencial de óxido-reducción entre el citosol y la mitocondria, más negativo en el interior de la mitocondria que en el citosol (Williamson y col., 1967) y cuya preservación es indispensable para el mantenimiento de la función celular. El hecho de que la membrana mitocondrial sea impermeable a los nucleótidos de nicotinamida hace que el transporte de equivalentes de reducción tenga que realizarse a través de aniones, substratos de deshidrogenasas en ambos compartimentos (Crane y Löw, 1976), lo que frecuentemente origina una redistribución de metabolitos cuando la célula se ve sometida a determinados estímulos (Parrilla y col., 1976). Existen numerosos trabajos en la literatura que describen cómo perturbaciones en el estado redox del sistema NAD<sup>+</sup> van asociados con alteraciones en la tasa de gluconeogénesis (Hohorst y col., 1961; Wieland y Loffler, 1963; Parrilla, 1978 a). Sin embargo, el papel de los cambios en el estado redox del sistema NAD<sup>+</sup> citosólico, en el control de gluconeogénesis, ha sido objeto de controversia durante años (Hohorst y col., 1961; Wieland y Loffler, 1963; Hawkins y col., 1973 y Parrilla, 1978 a), debido fundamentalmente al hecho de que el enzima gliceraldehido deshidrogenasa parece mantener la concentración de sus reactantes próximos al equilibrio (Greembaum y col., 1971). Más recientemente distintos autores, Sugano (1980), y Sistare y col.,(1985), han vuelto a poner de

actualidad esta cuestión al demostrar que el potencial de óxido-reducción citosólico juega un papel importante en la respuesta gluconeogénica del hígado a hormonas como el glucagón y angiotensina II.

El estudio de la influencia de cambios en el estado redox del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico sobre la tasa de gluconeogénesis en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas (Fig. 32) muestra cómo en hígados de ratas controles un aumento pequeño en el cociente lactato/piruvato es capaz de producir una estimulación considerable de la tasa de gluconeogénesis. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por otros autores (Sugano y col., 1980) quienes pudieron demostrar que la tasa de gluconeogénesis a partir de lactato, disminuía progresivamente a medida que se añadían cantidades crecientes de piruvato al medio de perfusión. En hígados de ratas adrenalectomizadas, por el contrario, cambios en la relación lactato/piruvato desde 2 hasta 20, no produjeron ninguna alteración en la tasa de gluconeogénesis. El análisis de la influencia del estado redox en la efectividad de octanoato para estimular la tasa de gluconeogénesis revela también un comportamiento distinto de los hígados de ratas controles y adrenalectomizadas (Fig. 33). En los controles, la máxima estimulación de gluconeogénesis, inducida por octanoato, se obtiene con la mezcla de sustratos que proporciona un estado redox más oxidado. Por encima de un valor del cociente lactato/piruvato de 2, la estimulación de gluconeogénesis se mantiene constante y no parece depender de cambios en el estado

de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$ , al menos dentro de los márgenes estudiados. En estas condiciones, la administración de octanoato produjo un aumento del cociente lactato/piruvato de igual intensidad independientemente de la proporción de lactato y piruvato en el medio de perfusión (Fig. 34). En los animales adrenalectomizados, la situación es bien diferente (Fig. 33), la eficacia de octanoato estimulando la tasa de gluconeogénesis disminuye considerablemente a partir de un valor del cociente lactato/piruvato superior a 10, ello explicaría la incapacidad absoluta del ácido graso para estimular la velocidad de producción de glucosa cuando se utiliza lactato como único precursor gluconeogénico. En estas condiciones, el cambio en la relación lactato/piruvato en el efluente hepático, inducido por octanoato, aumentó de forma lineal, a medida que se incrementaba el valor de este cociente en el medio de perfusión del tejido hepático (Fig. 34). Resultados similares se observaron cuando se aumentó, de forma lineal, la relación lactato/piruvato, manteniendo constante la concentración de piruvato en el medio de perfusión (Fig. 36). Estos resultados sugieren la existencia de una relación inversa entre el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico y la capacidad del ácido graso para estimular el flujo gluconeogénico en hígados de ratas adrenalectomizadas. El mantenimiento del estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico, dentro de ciertos límites, parece ser esencial para permitir el efecto de los ácidos grasos estimulando la capacidad máxima de la ruta gluconeogénica.

Aparentemente, los hígados de ratas adrenalectomizadas poseen una menor capacidad para reoxidar el exceso de oferta de equivalentes de reducción al citosol, que ocurre durante la oxidación de ácidos grasos. Las causas del mayor estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico, inducido por la adrenalectomía, no se conocen. Nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en la actividad de lactato deshidrogenasa en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas. En efecto, la actividad de lactato deshidrogenasa, en la dirección de formación de lactato fue de  $1,16 \pm 0,1$  y  $1,03 \pm 0,02$   $\mu\text{moles}/\text{min} \times \text{mg}$  de proteína en los controles y adrenalectomizadas respectivamente. El estudio de la influencia de la adrenalectomía sobre la actividad de las distintas *lanzaderas* que intervienen en la transferencia de electrones entre el citosol y la mitocondria aportaría probablemente, alguna luz a esta cuestión. Finalmente, hay que considerar la posibilidad de que las diferencias en el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  sean consecuencia de cambios en el pH intracelular secundarios a perturbaciones en el equilibrio iónico.

## 5.- METABOLISMO ENERGETICO EN HIGADOS DE ANIMALES ADRENOPRIVOS.

La utilización de hígados perfundidos de ratas adrenalectomizadas ofrece un modelo experimental interesante para estudiar ciertos aspectos relacionados con la estimulación del metabolismo energético y gluconeogénesis. La estimulación de gluconeogénesis por ácidos grasos depende de su oxidación mitocondrial (Ruderman y col., 1974; Tutwiler y Delleigne, 1979). Como se ha discutido previamente, la adrenalectomía no perturba la oxidación de octanoato, sin embargo impide la estimulación de producción de glucosa a partir de lactato. Por otra parte, tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas, se observa una relación recíproca entre la capacidad del ácido graso para incrementar el consumo de oxígeno y la velocidad máxima de producción de glucosa. Estos resultados confirman la idea de que la oxidación de ácidos grasos no soporta el coste energético de la producción de glucosa (González-Manchón y col., 1989).

La energía generada de la oxidación de ácidos grasos se invierte fundamentalmente en incrementar la formación de cuerpos cetónicos (Tablas VI y VII) independientemente de si se estimula o no el flujo gluconeogénico. Existe un gran número de trabajos en la literatura dedicados al estudio de los factores que determinan la regulación de la formación de cuerpos cetónicos en hígado. Según algunos autores (Siess y col., 1984), la tasa de cetogénesis vendría determinada por los niveles de oxalacetato. Una disminución en los niveles de este metabolito como

consecuencia de una menor síntesis o por una mayor utilización cuando se incrementa el flujo gluconeogénico daría lugar a un incremento en la tasa de formación de cuerpos cetónicos. Nuestros resultados muestran, sin embargo, que la tasa de cetogénesis parece ser independiente de los niveles estacionarios de oxalacetato. En efecto, la tasa de producción de cuerpos cetónicos es idéntica en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas tanto en ausencia como en presencia de lactato (Figs. 10 y 27). Por otra parte, nuestros resultados tampoco apoyan la idea de que la velocidad de cetogénesis sea controlada por el potencial de fosforilación (Wilson y col., 1974; Erecinska y col., 1977) puesto que no se observaron diferencias en la tasa de cetogénesis en situaciones en las que las demandas de ATP del tejido hepático son claramente distintas (Tablas VI y VII).

Nuestros resultados apoyan trabajos previos (Berry col., 1983) que indican que la oxidación de ácidos grasos hasta acetil-CoA y formación de cuerpos cetónicos no depende del potencial de fosforilación. Estos autores pudieron demostrar, estudiando el efecto de varios inhibidores de la cadena respiratoria en el catabolismo de ácidos grasos, la distinta sensibilidad de los procesos de generación de acetil-CoA y su utilización para la síntesis de cuerpos cetónicos y la oxidación de acetil-CoA en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, mientras el primero no se veía afectado por variaciones significativas en los niveles de ATP, el segundo era fuertemente inhibido. En nuestras condiciones experimentales, también pudimos observar una disociación de los

dos procesos del catabolismo de ácidos grasos. El análisis comparativo de los procesos involucrados en la utilización de oxígeno en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas, perfundidos con lactato y octanoato (Tablas XI y XII) permite comprobar que en hígados de ratas adrenoprivas, se produce una inhibición del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, mientras que la formación de cuerpos cetónicos no se ve significativamente alterada respecto a los hígados de ratas controles. En estas condiciones, y a pesar de que no disminuye la producción total de energía, no se produce la estimulación de gluconeogénesis por octanoato. Estos resultados apoyan, pues, la idea de que es la energía derivada de un incremento del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos la que está soportando el coste energético de la producción de glucosa.

El significado fisiológico del aparente dispendio de la energía derivada de la oxidación de ácidos grasos en la formación de cuerpos cetónicos, junto con la incapacidad de los ácidos grasos para elevar el potencial de fosforilación (Brock y col., 1980; Akerboom y col., 1978), no se conoce. Algunos autores (Berry y col., 1983) han sugerido un posible papel calorigénico de los ácidos grasos en hígado, a semejanza de lo que ocurre en el tejido adiposo marrón. De acuerdo con esta idea está la observación de que la tasa de cetogénesis está incrementada en ratas aclimatadas al frío (Maekubo y col., 1977). El hecho de que el proceso de cetogénesis proceda independientemente de las demandas de energía, se ha interpretado en el sentido de que puede constituir un mecanismo

para la rápida transformación de ácidos grasos en compuestos solubles que puedan ser utilizados por otros tejidos.

En resumen, nuestros resultados muestran que el incremento de respiración, inducido por ácidos grasos no soporta el coste energético de la síntesis de glucosa, sino que, fundamentalmente, la energía derivada de su oxidación se utiliza para incrementar la formación de cuerpos cetónicos. Otros procesos dependientes de energía como el mantenimiento de un estado redox mitocondrial más reducido (Berry 1980) o la utilización de ATP debida a la activación de la ATPasa  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  de la membrana plasmática (Plomp y col., 1983) y el incremento en el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial (Nobes y col., 1990) podrían contribuir también al incremento de respiración inducido por octanoato.

## 6.- RESPUESTA HEPATICA A ESTIMULANTES $\alpha$ -ADRENERGICOS, DE HIGADOS DE ANIMALES ADRENOPRIVOS.

La administración de fenilefrina produce, en el tejido hepático, una variedad de efectos cuyo significado aún no se conoce con precisión. Particularmente, la relación existente entre las acciones hemodinámica e ionotrópica y los efectos metabólicos dista mucho de estar aclarada. La adrenalectomía tiene como consecuencia una atenuación de la mayoría de los efectos inducidos por fenilefrina en el tejido hepático. La acción permisiva de los glucocorticoides en algunos efectos de catecolaminas como la estimulación de glucogenolisis y gluconeogénesis ha sido descrita previamente (Exton y col., 1972); no obstante, que sepamos, no se había estudiado de forma sistemática la influencia de la adrenalectomía en una serie de parámetros sensibles a la estimulación adrenérgica.

La caracterización de la respuesta a fenilefrina en hígados de ratas adrenalectomizadas ha permitido en primer lugar apreciar una disminución en los efectos de fenilefrina sobre glucogenolisis, glucolisis, gluconeogénesis y respiración hepática, así como una atenuación de la respuesta ionotrópica en ausencia de cambios en el efecto vasopresor de fenilefrina (Figs. 42 y 43). De forma similar también se ha observado una disociación entre los efectos metabólicos y hemodinámicos que produce la estimulación eléctrica periportal en hígados perfundidos en presencia de un

vasodilatador como el nitroprusido sódico (Haüssinger y col., 1987).

El estrés quirúrgico no altera la respuesta hepática a estimulantes adrenérgicos. Los resultados obtenidos en hígados de ratas sometidas a una operación simulada están de acuerdo con resultados previos de nuestro laboratorio (González-Manchón y col., 1988 b) así como de otros autores (Jakob y Diem, 1975; Haüssinger y col., 1987) que estudiaron aspectos parciales de la respuesta adrenérgica. La administración de fenilefrina a hígados aislados y perfundidos provoca una serie de respuestas de naturaleza bifásica, con una primera fase de instauración rápida y de corta duración y una fase sostenida que perdura mientras se mantenga el agonista en el medio de perfusión. La ausencia de esteroides suprarrenales altera la intensidad de las dos fases de la respuesta. La 1ª fase se caracteriza por un aumento en el consumo de oxígeno y en la producción de glucosa que va acompañada por una captación de  $K^+$  y una liberación de  $H^+$  y  $Ca^{2+}$  al medio extracelular. Esta primera fase es independiente del estado de nutrición y de la presencia de substratos oxidables. En la 2ª fase se observa un aumento sostenido de respiración y de producción de glucosa tanto a partir de las reservas de glucógeno como sintetizada *de novo* a partir de precursores gluconeogénicos (Figs. 42 y 45). En esta fase disminuyen ligeramente los niveles de  $Ca^{2+}$  en el efluente hepático, manteniéndose por encima de los valores basales. Se produce una liberación neta de  $K^+$  al medio extracelular que es cualitativamente distinta según el estado de nutrición del

animal (Figs. 43 y 46), y se mantiene la acidificación del medio extracelular.

Los efectos más notorios de la insuficiencia suprarrenal en la respuesta adrenérgica son los siguientes: 1) disminución de la estimulación de respiración inducidos por fenilefrina; 2) menor estimulación de glucogenolisis, glucolisis y gluconeogénesis; 3) disminución del eflujo de  $H^+$ ; 4) disminución del influjo de  $K^+$  en la fase aguda de la respuesta ; 5) no se observan diferencias significativas en la respuesta presora portal y 6) disminución del eflujo de  $Ca^{2+}$  inducidos por fenilefrina.

El eflujo inicial de  $Ca^{2+}$  ocurre inmediatamente después de la llegada del agonista al hígado y refleja, probablemente, la movilización de un depósito intracelular de  $Ca^{2+}$  (Blackmore y col., 1982; Reinhart y col., 1982,1984). Simultáneamente se produce un aumento en la concentración del mensajero intracelular inositol 1,4,5 trisfosfato (Berridge e Irvine, 1984; Williamson y col., 1985). Al cabo de unos minutos, los niveles de  $Ca^{2+}$  en el efluente hepático disminuyen hasta que se alcanza una nueva situación estacionaria que se mantiene mientras dura el aporte de fenilefrina. Esta fase sostenida depende de la presencia de  $Ca^{2+}$  en el medio extracelular (Reinhart y col., 1984 a), lo cual sugiere que se activa la entrada de este ión. Al retirar la fenilefrina del medio de perfusión, se restablecen los niveles basales de  $Ca^{2+}$  (Figs. 43 y 46). Estos resultados están de acuerdo con observaciones previas que sugerían que los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$ , movilizados

por los  $\alpha$ -agonistas no son restituidos hasta que se retira el agente adrenérgico (Blackmore y col., 1982; Reinhart y col., 1982, Joseph y Williamson 1983). Aparentemente el aumento en los niveles de  $IP_3$  sería la causa de que no puedan ser restituidos los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Prentki y col., 1985). En resumen, la estimulación adrenérgica resulta en una salida neta de  $Ca^{2+}$ , la cual implica que la estimulación de la tasa de eflujo de  $Ca^{2+}$ , inducida por fenilefrina excede al incremento en la tasa de entrada de calcio desde el medio extracelular. Este efecto de fenilefrina aumentando los niveles de  $Ca^{2+}$  en el efluente hepático, parece afectarse por la ausencia de esteroides suprarrenales (Figs. 43 y 46), de acuerdo con los resultados de Studer y Borle, 1984 y Borle y Studer, 1990, que describían un efecto de la adrenalectomía disminuyendo la tasa de eflujo de  $Ca^{2+}$  y un aumento en la tasa de entrada de  $Ca^{2+}$  en hepatocitos aislados.

Coincidiendo con la fase aguda de salida de  $Ca^{2+}$  al efluente hepático, se produce una captación de  $K^+$  de intensidad variable dependiendo de las condiciones experimentales (Figs. 43 y 46), a la que sigue una posterior liberación de  $K^+$ . Una redistribución de  $K^+$  en respuesta a agentes adrenérgicos ha sido descrita por otros autores en hígado aislado y perfundido (Althaus-Salzman y col., 1980; Häüssinger y col., 1987; Reinhart y col., 1984 a, b). Esta captación de  $K^+$  podría estar mediada por una estimulación dependiente de  $Ca^{2+}$  de la ATP-asa de  $Na^+/K^+$  de la membrana plasmática (Capiod y col., 1982). Puesto que también se ha descrito una inhibición por  $Ca^{2+}$  de la ATP-asa  $Na^+/K^+$  (Sarkadi y Tosteson,

1980) se ha propuesto la hipótesis de que la activación de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  por agentes movilizadores de  $\text{Ca}^{2+}$  podría ser el resultado del desplazamiento de un "pool" inhibidor de  $\text{Ca}^{2+}$  en la cara interna de la membrana plasmática en el microambiente de la bomba (Capiod y col., 1982). También Becker y Jacob, 1982, postularon que la captación inicial de  $\text{K}^+$  inducida por fenilefrina estaba mediada por la ATP-asa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , ya que este efecto de fenilefrina era impedido en presencia de ouabaína. Sin embargo, y puesto que la respuesta respiratoria y glucogenolítica no se veían afectadas concluyeron que la activación de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  no era esencial para la transducción del mensaje hormonal.

Nuestros resultados, obtenidos en hígados de ratas adrenalectomizadas, alimentadas *ad libitum*, muestran que la extirpación de las glándulas suprarrenales induce una menor captación de  $\text{K}^+$  seguida de una mayor liberación de este ión en la fase sostenida de la respuesta. Estos resultados son compatibles con una disminución de la ATP-asa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la membrana plasmática inducida por la adrenalectomía (Miner y col., 1980). Estos autores mostraron una disminución en la actividad de la ATP-asa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en hígados de ratas adrenalectomizadas. El tratamiento con dosis sustitutivas de glucocorticoides, pero no de mineralocorticoides revertía parcialmente la inhibición. El efecto de los glucocorticoides se ejerce sobre la " $v_{\text{max}}$ " de la ATP-asa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  sin afectar a la  $K_m$ . Estos resultados sugieren la posibilidad de una acción genómica de los glucocorticoides activando la expresión del gen de la ATP-asa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

Después de la captación inicial de  $K^+$ , tiene lugar una liberación de este ión al medio extracelular. Esta salida de  $K^+$  parece aumentar en los animales adrenaoprivos (Fig. 43). La liberación de  $K^+$  se ha atribuido a una estimulación de canales de  $K^+$  secundaria a un aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  libre citosólico. Puesto que se ha descrito que la adrenalectomía disminuye el incremento en los niveles de  $Ca^{2+}$  libre citosólico, inducidos por epinefrina en hepatocitos aislados (Freudenrich y Borle, 1988) no parece razonable pensar en una mayor actividad de los canales de  $K^+$  en hígados de ratas adrenalectomizadas. El aumento aparente en la liberación de potasio cuando disminuye la captación inicial de este ión refleja, probablemente, el hecho de que normalmente los procesos de captación y liberación de  $K^+$  se solapan en el tiempo.

La fenilefrina produce una acidificación del efluente hepático, que se mantiene mientras este presente el agonista. La salida de  $H^+$  pudiera estar causada por una estimulación del intercambiador  $Na^+/H^+$  o por un incremento en la liberación de lactato al medio extracelular, ya que este metabolito es cotransportado con un protón (Fafournoux y col., 1985).

La adrenalectomía disminuye notablemente el efecto de fenilefrina estimulando la extrusión de protones al medio extracelular, tanto en hígados de ratas alimentadas (Fig. 43) como en hígados de ratas sometidas a un período de ayuno (Fig. 46). Puesto que en esta última condición no se observaron cambios

apreciables en la tasa de producción de lactato en hígados de ratas adrenalectomizadas (Fig. 45), que pudieran dar cuenta de la menor acidificación del medio extracelular, inducida por fenilefrina, parece lógico concluir que la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  debe jugar un papel importante en la transducción del mensaje hormonal. Esta idea se apoya en los resultados de la figura 53, que muestran cómo la eliminación de  $\text{Na}^+$  del medio de perfusión impide los efectos de fenilefrina sobre la liberación de protones al efluente hepático y sobre las tasas de respiración y de producción de glucosa tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas. La eliminación de  $\text{Na}^+$  del medio de perfusión produce, sin embargo, una inhibición importante de la tasa de respiración endógena que cuestiona la integridad del órgano en estas condiciones. No obstante, estos resultados son consistentes con observaciones recientes de nuestro laboratorio que muestran que la inhibición selectiva del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  por amilorida impide los efectos tanto agudos como sostenidos, mediados por fenilefrina, sin afectar a ningún parámetro funcional en ausencia del agonista.

No se dispone de evidencias de un efecto de la adrenalectomía sobre la actividad y/o niveles del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en el tejido hepático, sin embargo se ha demostrado que los glucocorticoides, pero no los mineralocorticoides, estimulan la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tanto en vesículas obtenidas de membranas de los túbulos proximales de riñón como en células intactas del mismo tejido (Kinsella y col., 1984; Bidet y col., 1987)

en consonancia con el papel de los glucocorticoides sobre la excreción de ácido en el animal intacto (Hulter y col., 1980, 1981). La dexametasona activa la " $v_{max}$ " del intercambiador (Freiberg y col., 1982). Este efecto se impide en presencia de actimomicina D y cicloheximida, indicando por tanto que se requiere la síntesis de ARN y de proteínas. La acción de los glucocorticoides sobre la actividad del intercambiador  $Na^+/H^+$  es compatible, por tanto, con un aumento en el número de intercambiadores.

Los resultados de la tabla XIV muestran que la adrenalectomía impide la activación de proteína quinasa C. Dado que la actividad del intercambiador  $Na^+/H^+$  es estimulada por proteína quinas C en una variedad de tipos celulares (Moolenaar y col., 1984; Frelin y col., 1988), cabe pensar que la disminución observada en la extrusión de protones, en respuesta a fenilefrina, en hígados de ratas adrenoprivas pudiera estar causada por la menor actividad de proteína quinas C, sin que pueda excluirse un efecto de la adrenalectomía sobre la inducción de la síntesis de las moléculas del intercambiador  $Na^+/H^+$ .

El estudio sistemático de los efectos metabólicos, ionotrópicos y presores de fenilefrina en hígados de ratas controles y adrenalectomizadas nos permite postular la existencia de una serie de acontecimientos desencadenados tras la unión de fenilefrina a sus receptores de membrana y cuya secuencia temporal podría ser la siguiente: la activación del intercambiador  $Na^+/H^+$  inducida por fenilefrina, parece ser una de las etapas iniciales del proceso, la

entrada de  $\text{Na}^+$  en intercambio con  $\text{H}^+$  hace que se pongan en marcha los mecanismos necesarios para que los iones  $\text{Na}^+$  puedan ser transportados al exterior de la célula. En la fase aguda de la respuesta la actividad de la ATP-asa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  puede contribuir al eflujo de  $\text{Na}^+$ , sin embargo, la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  de la fase sostenida de la respuesta sugiere que la salida de  $\text{Na}^+$  ocurre fundamentalmente a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  saldrían posteriormente de las células mediante la ATP-asa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática. Los movimientos de iones en contra del gradiente electroquímico, junto con la estimulación de procesos biosintéticos darían cuenta del incremento de respiración inducido por el agonista. La atenuación de la respuesta adrenérgica en hígados de ratas adrenaoprivas parece ser el resultado de una menor actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

La disminución en el número y/o afinidad de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, inducida por la adrenalectomía, no parece jugar un papel relevante en la atenuación de la respuesta hepática a fenilefrina, como han sugerido algunos autores (El-Refai y Chan, 1986). En primer lugar, la ocupación previa de receptores  $\beta$ -adrenérgicos por isoproterenol disminuye la respuesta a fenilefrina tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas (Fig. 52). Asimismo la respuesta a isoproterenol también está disminuída en hígados de ratas adrenalectomizadas. Por otra parte, la utilización de antagonistas de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  produjo una abolición de los efectos de fenilefrina tanto en hígados de ratas controles como adrenalectomizadas,

sugiriendo que la diversidad de respuestas a fenilefrina es el resultado de la interacción simultánea del agonista con distintos tipos de receptores. Estos resultados están de acuerdo con observaciones previas (Saz y col., 1989) que mostraban que la fenilefrina es capaz de estimular la actividad hepática de fosforilasa aún en condiciones sobresaturantes de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando presumiblemente la activación  $\alpha_1$ -adrenérgica no conduciría a un ulterior aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico.

Por último, el hecho de que la adrenalectomía produzca también una atenuación de la respuesta hepática a otros agentes movilizadores de  $\text{Ca}^{2+}$  como angiotensina II y vasopresina (Fig. 54) sugiere que la ausencia de glucocorticoides afecta a nivel postreceptor en uno o más puntos de la secuencia: *proteínas G* → *fosfolipasa C* → *hidrólisis de fosfoinosítidos* → *proteína quinasa C*.

La incapacidad de la fenilefrina para estimular proteína quinasa C en hígados de ratas adrenalectomizadas (Tabla XIV) podría deberse a una disminución en la generación de diacilglicerol, inducida por el agonista. Borle y Studer, (1990) observaron que la acumulación de  $\text{IP}_3$  en respuesta a epinefrina, en hepatocitos aislados disminuía en un 50% en hepatocitos obtenidos de ratas adrenalectomizadas. La menor formación de  $\text{IP}_3$  se acompaña de un incremento menor en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico (Freudenrich y Borle, 1988). Estos mismos autores descartaron un defecto en la movilización intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en hepatocitos de ratas adrenalectomizadas, ya que no encontraron

diferencias significativas en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenamientos intracelulares, en respuesta a  $\text{IP}_3$ , en hepatocitos, permeabilizados con saponina, de ratas controles y adrenalectomizadas.

#### 7.- PAPEL DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA REGULACION DE GLUCONEOGENESIS POR FENILEFRINA.

La adrenalectomía disminuye selectivamente la estimulación de gluconeogénesis a partir de piruvato, así como el incremento de respiración inducidos por fenilefrina (Fig. 45). La fase aguda y transitoria de la respuesta energética y metabólica también se encuentra afectada por la carencia de esteroides suprarrenales, aunque sigue observándose un incremento transitorio de producción de glucosa y el característico aumento, producido por fenilefrina, en el estado de reducción del sistema  $\text{NAD}^+$  citosólico.

El tratamiento *in vivo* con dosis sustitutivas de glucocorticoides, pero no de aldosterona, a ratas adrenalectomizadas permite la restauración de la respuesta respiratoria y gluconeogénica (Fig. 49). Por el contrario, la adición de dexametasona al medio de perfusión (resultados no mostrados) no tuvo ningún efecto sobre la tasa de gluconeogénesis a partir de piruvato, tanto en ausencia como en presencia de fenilefrina, pudiendo descartar, por tanto, un efecto directo de los

glucocorticoides sobre la ruta gluconeogénica como se había descrito previamente (Sistare y Haynes, 1985; Martín y col., 1984).

A diferencia del papel permisivo de los glucocorticoides en la regulación de gluconeogénesis por octanoato, la influencia de la adrenalectomía disminuyendo el efecto gluconeogénico de fenilefrina no depende de la naturaleza del precursor, puesto que también se observó una disminución en la velocidad de producción de glucosa a partir de lactato o de glicerol (Fig. 47).

El mecanismo mediante el cual la fenilefrina estimula el proceso de gluconeogénesis a partir de substratos que entran en la vía a nivel de piruvato no está completamente elucidado. La acción hormonal se ejerce en algún punto de las etapas comprendidas entre la transformación de piruvato a fosfoenolpiruvato (Ochs y Lardy, 1983). Los efectos de fenilefrina disminuyendo los niveles intramitocondriales de glutamato (Siess y col., 1978), o la activación global de las deshidrogenasas mitocondriales (McCormack, 1985) originando un aumento del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y elevando por tanto el potencial de fosforilación favorecerían la carboxilación de piruvato (Halestrap, 1989; González-Manchón, 1988 b). Otros efectos de fenilefrina que podrían explicar la estimulación de gluconeogénesis son la activación de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa mediada por un aumento en el eflujo de Fe a través de la membrana mitocondrial secundario a la elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico inducido por el agonista (Merryfield y Lardy, 1982) y un aumento

en la velocidad del transporte de piruvato a través de la membrana mitocondrial (Thomas y Halestrap, 1981) o la inhibición de piruvato quinasa (Hue y col., 1978). La menor estimulación de gluconeogénesis por fenilefrina en hígados de ratas adrenalectomizadas no parece ser debida a una disminución de la actividad del transportador de piruvato a través de la membrana mitocondrial, inducido por la adrenalectomía, ya que el efecto de fenilefrina sobre la tasa de gluconeogénesis a partir de concentraciones suprafisiológicas de piruvato ( $>0,3\text{mM}$ ), cuando su entrada a la mitocondria no es limitante (Halestrap, 1978 a y b; Pande y Parvin, 1978) también está disminuido en hígados de ratas adrenalectomizadas (Fig. 47).

La ausencia de esteroides adrenales parece incapacitar al tejido hepático para responder a determinados estímulos con un incremento del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbixílicos (Tabla XII). Cabe pensar, por tanto, que la adrenalectomía pudiera impedir el efecto de fenilefrina incrementando el flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbixílicos (Taylor y col., 1986) Esta circunstancia podría crear una situación desfavorable para que pueda incrementarse el flujo a través de piruvato carboxilasa, en respuesta a la administración de fenilefrina. Esta idea se apoya también en los resultados de (Allan y Titheradge, 1984) quienes postularon que los glucocorticoides facilitarían la activación de piruvato carboxilasa por determinadas hormonas, al permitir un aumento en los niveles de las moléculas efectoras de este enzima, acetyl-CoA y ATP (Scrutton y Griffiths, 1981; Stucki y col., 1972).

Adicionalmente, hay que considerar el papel de los glucocorticoides sobre la inducción de Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Gunn y col., 1975). La actividad de este enzima en hígados de ratas adrenoprivas parece ser suficiente para permitir una tasa basal normal de gluconeogénesis a partir de lactato o piruvato, sin embargo, el flujo a través de este enzima podría ser limitante para responder a un estímulo aumentando el flujo a través de la vía.

Por otra parte, dado que la estimulación de gluconeogénesis se acompaña de un incremento paralelo en la tasa de respiración hepática (Fig. 45), algunos autores han sugerido que la estimulación de gluconeogénesis, inducida por fenilefrina es secundaria al incremento de respiración (Halestrap y Dunlop, 1986; Kraus-Friedman, 1986; Pryor y col., 1987) de acuerdo con la idea generalizada de que un aumento de respiración, independientemente de cual sea la causa que lo origine, estimularía el proceso de gluconeogénesis suministrando energía (Quinlan y Halestrap, 1986). Otros autores, sin embargo, sostienen que es la demanda de energía la causa de que se produzca un aumento de respiración (Tager y col., 1983). En este sentido, trabajos recientes de nuestro laboratorio (González-Manchón y col., 1988 a) han podido demostrar que, si bien un aumento de respiración es imprescindible para que aumente el flujo gluconeogénico, no existe una relación estequiométrica entre ambos procesos. La misma conclusión puede alcanzarse analizando los resultados de la tabla XIII. Tanto en hígados de ratas controles

como adrenalectomizadas, el incremento en el consumo de oxígeno, producido por fenilefrina, excede el que se necesitaría para satisfacer los requerimientos de ATP para la estimulación de la síntesis de glucosa a partir de piruvato.

Por otra parte, la administración de fenilefrina a hígados, de ratas alimentadas o sometidas a un período de ayuno, perfundidos en ausencia o en presencia de substratos, produce en todos los casos un aumento considerable de respiración (Figs. 42, 44 y 45) independientemente de que las demandas de energía para los procesos biosintéticos sean muy distintas en cada caso. En cada una de estas situaciones experimentales, la fenilefrina produce cualitativamente la misma respuesta ionotrópica. El movimiento de iones (fundamentalmente  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$ ) en contra del gradiente electroquímico daría cuenta de una buena parte del incremento en el consumo de oxígeno inducido por el agonista. Estos resultados, junto con el hecho de que tampoco el incremento de respiración, inducido por la oxidación de ácidos grasos soporte el coste energético de la producción de glucosa, sugieren que, entre todos los procesos celulares dependientes de energía, el proceso de gluconeogénesis, contrariamente a lo que se venía admitiendo, no ocupa un lugar prioritario.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- 1.- *Los glucocorticoides no son esenciales para el mantenimiento de una tasa basal, no estimulada, de gluconeogénesis a partir de lactato o piruvato.*
- 2.- *La oxidación hepática de ácidos grasos hasta acetyl-CoA no está afectada por la carencia de glucocorticoides.*
- 3.- *La presencia de glucocorticoides, es decir, la normosuficiencia suprarrenal es un requisito imprescindible para que el tejido hepático pueda responder a agentes estimuladores del metabolismo energético incrementando el flujo gluconeogénico.*
- 4.- *La insuficiencia suprarrenal impide selectivamente la estimulación de gluconeogénesis a partir de lactato, inducida por octanoato.*
- 5.- *En hígados de ratas adrenalectomizadas, parece existir una relación inversa entre el estado de reducción del sistema  $NAD^+$  citosólico y la capacidad de los ácidos grasos para estimular gluconeogénesis, lo cual indica que el mantenimiento del estado de reducción del sistema  $NAD^+$  citosólico dentro de ciertos márgenes es esencial en la respuesta gluconeogénica.*

- 6.- *La administración conjunta de lactato y octanoato a hígados de ratas adrenalectomizadas produce una inhibición acusada del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.*
- 7.- *La utilización de hígados de ratas adrenalectomizadas ha permitido disociar los efectos de octanoato sobre respiración y gluconeogénesis. La energía derivada de la oxidación de ácidos grasos se emplea fundamentalmente en la producción de cuerpos cetónicos. El coste energético de gluconeogénesis parece recaer en la estimulación del flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.*
- 8.- *La integridad de las glándulas suprarrenales es requisito indispensable para la obtención de una respuesta hepática normal a la estimulación adrenérgica.*
- 9.- *La adrenalectomía atenúa las respuestas respiratoria e ionotrópica hepáticas a fenilefrina sin alterar la respuesta presora.*
- 10.- *La adrenalectomía perturba asimismo la respuesta glucogenolítica a vasopresina y a angiotensina II. Estos resultados sugieren que los glucocorticoides alteran las respuestas hormonales hepáticas a nivel post-receptor.*

- 11.- *La administración de bloqueantes  $\alpha$  o  $\beta$  adrenérgicos, así, como la ocupación previa de receptores  $\beta$  por isoproterenol, produjo una disminución de la respuesta hepática a fenilefrina. Estos resultados permiten concluir que la diversidad de respuestas a fenilefrina es el resultado de la interacción del agonista con varios tipos de receptores y que, por tanto, la descripción de fenilefrina como un agonista  $\alpha_1$  puro no se ajusta a la realidad de su mecanismo de acción.*
- 12.- *La adrenalectomía no altera la actividad total de proteína quinasa C (citosólica y membranosa) hepática, pero impide su activación por fenilefrina.*
- 13.- *La abolición de la respuesta hepática a fenilefrina en ausencia de  $\text{Na}^+$  en el medio extracelular indica que el influjo de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana plasmática es una de las etapas iniciales en la transducción del mensaje hormonal.*
- 14.- *En ausencia de  $\text{Na}^+$  no se observaron cambios de pH en el efluente hepático en respuesta a fenilefrina, lo cual sugiere que la activación del intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a nivel de la membrana plasmática es un componente esencial del mecanismo de acción de fenilefrina.*

- 15.- *La atenuación de la respuesta  $\alpha$ -adrenérgica inducida por la adrenalectomía podría ser el resultado de una menor activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  mediada por proteína quinasa C.*
- 16.- *La alteración de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  en respuesta a fenilefrina, en hígados de ratas adrenalectomizadas sugiere que la adrenalectomía afecta al funcionamiento general de los sistemas de transporte iónico a través de la membrana plasmática.*

## **BIBLIOGRAFIA**

**BIBLIOGRAFIA**

- AAS, M. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 231, 32-47.
- ADAM, P.A.J. Y HAYNES, R.C.Jr. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 6444-6450.
- AKERBLOM, I.E., SLATER, E.P., BEATO, M., BAXTER, J.D. Y MELLON, P.L. (1988) *Science* 241, 350-352.
- AKERBOOM, P.M., BOOKELMAN, H., ZUURENDONK, P.F., VAN DER MEER, R. Y TAGER, J.M. (1978) *Eur. J. Biochem.* 84, 413-420.
- ALEMANY, S. , TUNG, H.Y.L., SHENOLIKAR, S., PILKIS, S.J. Y COHEN, P.(1984) *Eur. J. Biochem.* 141, 51-56.
- ALLAN, E.H. Y TITHERADGE, M.A. (1984) *Biochem. J.* 219, 117-123.
- ALLEN, D.O. Y BECK, R.R. (1972) *Endocrinology* 91, 504-510.
- ALTHAUS-SALZMANN, M., CARAFOLI, E. Y JAKOB, A. (1980) *Eur. J. Biochem.* 106, 241-248.
- ANDREONE, T.L., PRINTZ, R.L., PILKIS, S.J., MAGNUSON, M.A. Y GRANNER, D.K. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 363-369.
- ANKENBAUER, W., STRÄHLE, U. Y SCHÜTZ, G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7526-7530.
- ASHBY, P. Y ROBINSON, D.S. (1980) *Biochem. J.* 188, 185-192.
- ATLAS, D. Y SABOL, S.L. (1981) *Eur. J. Biochem.* 113, 521-529.
- AYUSO, M.S., URCELAY, E., GONZALEZ-MANCHON, C., RIVAS, T. PEREZ-SALA, D., MENAYA, J., MARTIN-REQUERO, A. Y PARRILLA, R. (1990) "Perspectivas actuales en la Regulación del Metabolismo" S.L. 3.1 XVII Congreso Nacional de Bioquímica, Oviedo.
- BAKER, P.F., BLAUSTEIN, M.P., HODGKIN, A.L. Y STEINHARDT, R.A. (1969) *J. Physiol.* 200, 431-458.
- BARNETT, C.A. Y WICKS, W.D. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 7201-7206.
- BASTL, CH.P., BINDER, H.J. Y HAYSLETT, J.P. (1980) *Am. J. Physiol.* 238, F181-F186.

- BAXTER, J.D. Y FORSHAM, R.H. (1972) *Am. J. Med.* 53, 573-589.
- BAXTER, R.C., CARLSON, C.W. Y POGELL, B.M. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 2969-2971.
- BAZAN, R., FLETTERICK, R. Y PILKIS, S.J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9642-9646.
- BEATO, M. (1989) *Cell* 56, 335-344.
- BECK-NIELSEN, H., De PIRRO, R., Y PEDERSEN, O. (1980) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50, 1-4.
- BECKER, J. Y JACOB, A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 128, 293-296.
- BENNETT, G.V. Y CUATRECASAS, P. (1972) *Science* 176, 805-806.
- BERRIDGE, M.J. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56, 154-193.
- BERRIDGE, M.J., Y IRVINE, R.F. (1984) *Nature (Lond.)* 312, 315-321.
- BERRY, M.N. (1980) *FEBS Lett.* 117, K106-K120.
- BERRY, M.N., CLARK, D.G., GRIVELI, A.R. Y WALLACE, P.G. (1983) *Eur. J. Biochem.* 131, 205-214.
- BEYNEN, A.C., VAN DER MOLEN, A.J. Y GEELLEN, M.J.H. (1981) *Horm. Metab. Res.* 13, 183-184.
- BIDET, M. MEROT, J. Y TAUC, M. POUJEOL, M. (1987) *Am. J. Physiol.* 253, F945-F951.
- BIERRY, H. Y MALLOIZEL, L. (1908) *C. R. Soc. Biol.* 65, 232-242.
- BISHOP, J.S. Y LARNER, J. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 1355-1356.
- BLACKMORE, P.F., HUGHES, B.P. SCHUMAN, E.A. Y EXTON, J.H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 190-197.
- BLOMHOFF, R. (1987) *Nutrition Rev.* 45, 257-263.

- BOCCKINO, S.B., BLACKMORE, P.F. Y EXTON, J.H. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14201-14207.
- BOLLEN, M. Y STALMANS, W. (1984) *Biochem. J.* 217, 427-434.
- BOLLEN, M., DuPERE, F., GORIS, J., MERLEVEDE, W. Y STALMANS, W. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 57-63.
- BOLLEN, M., KEPPENS, S. Y STALMANS, W. (1988) *Diabetologia* 31, 711-713.
- BORLE, A.B. Y STUDER, R.K. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 19495-19501.
- BRAUN, T. Y HECHTER, O. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 66, 995-1001.
- BRINDLEY, D.N., COOLING, J., BURDITT, S.L., PRITCHARD, P.H., PAWSON, S. Y STURTON, R.G. (1979) *Biochem. J.* 180, 195-199.
- BRITTON, S.W. Y SILVETTE, H. (1932) *Am. J. Physiol.* 100, 701-713.
- BRITTON, S.W. Y SILVETTE, H. (1937) *Am. J. Physiol.* 118, 594-599.
- BROCKS, D.G., SIESS, E.A. Y WIELAND, O.H. (1980) *Eur. J. Biochem.* 113, 39-43.
- BROWN-SEQUARD, C.E. (1856) *Compt. Rend.* 43,422-425.
- BÜCHER, T., BRAUSER, B., CONZE, A., KLEIN, F., LANGGUTH, O. Y SIES, H. (1972) *Eur. J. Biochem.* 27, 301-317.
- BURNS. T.W., TERRY B.E., LANGLEY, P.E. Y ROBISON, G.A. (1979) *Diabetes* 28, 957-961.
- BUXTON, D.B., FISHER, R.A., BRISENO, D.L., HANAHAH, D.J. Y OLSON, M.S. (1987) *Biochem. J.* 243, 493-498.
- BUXTON, D.B., FISHER, R.A., HANAHAH, D.J. Y OLSON, M.S. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 644-649.
- CAHILL, G.F., HERRERA, A., MORGAN, A.P., SOEDNER, J.S., STEINKE, J., LEVY, P.L., REICHARD, G.A., KIPNIS, D.M. (1966) *J. Clin. Invest.* 45, 1751-1769.

- CAKE, M.H. Y LITWACK, G. (1975) *Biochem. Actions. Horm.* 3, 317-390.
- CAPIOD, T., BERTHON, B., POGGIOLI, J., BURGESS, G.M. Y CLARET, M. (1982) *FEBS Lett.* 141, 49-52.
- CASCALES, C., MANGIAPANE, E.H. Y BRINDLEY, D.N. (1984) *Biochem. J.* 219, 911-916.
- CATO, A.C.B., HEITLINGER, E., PONTA, H., KLEIN-HITPASS, L., RYFFEL, G.U., BAILLY, A., RAUCH, C. Y MILGROM, E. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8, 5323-5330.
- CHAN, T.M. (1984) *The J. of Biological Chemistry* 259, 7426-7432.
- CHAN, T.M. Y EXTON, J.H. (1977) *Fed. Proc.* 36, 384.
- CHAN, T.M., STEINER, K.E. Y EXTON, J.H. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11374-11378.
- CHANG, F.-H. Y BOURNE, H.R. (1987) *Endocrinology (Baltimore)* 121, 1711-1715.
- CHRISMAN, T.D. Y EXTON, J.H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3270-3273.
- CLAUS, T.H., SCHLUMPF, J.R., EL-MAGHRABI, M.R. Y PILKIS, S.J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7541-7548.
- COHEN, P. (1989) *Ann. Rev. Biochem.* 58, 453-508.
- COHOE, B.A. (1922) *Endocrinology and Metabolism, Vol.II*, p.317.
- COLOSIA, A.D., MARKER, A.J., LANGE, A.J., EL-MAGHRABI, M.R., GRANNER, D.K., TAULER, A., PILKIS, J. Y PILKIS, S.J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 18669-18677.
- COOPER, R.H., COLL,K.E. Y WILLIAMSON, J.R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3281-3288.
- CORBIN, J.D. Y PARK, C.R. (1969) *Federation Proc.* 28, 702.

- CORKEY, B.E., MARTIN-REQUERO, A. Y WILLIAMSON, J.R. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 9688-9676.
- CORVERA, S. Y GARCIA-SAINZ, J.A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1128-1133.
- CORVERA, S., SCHWARZ, K.R., GRAHAM, R.M. Y GARCIA-SAINZ, J.A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261,520-526.
- CRANE, F.L. Y LÖW, H. (1976) *FEBS Lett.* 68, 153-156.
- CROOK, R.B., LOUIE, M., DEUEL, T.F. Y TOMKINS, G.M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6125-6131.
- CROW, E.L., DAVIS, F.A. Y MAXFIELD (1960) *Statistic Manual*, Dover Publications, In. New York.
- DAVIDSON, M.B. Y KAPLAN, S.A. (1977) *J. Clin. Invest.* 59, 22-30.
- DAVIES, A.O., De LEAN, A. Y LEFKOWITZ, R.J. (1981) *Endocrinology* 108, 720-722.
- De PIRRO, R., GREEN, A., YUNG-CHIN KAO, M. Y OLEFSKY, J.M. (1981) *Diabetologia* 21, 149-153.
- De WULF, H., STALMANS, W. Y HERS, H.G. (1970) *Eur. J. Biochem.* 15, 1-8.
- DEBODO, R.C., STEELE, R., ALTSZULER, N., DUNN, A. Y BISHOP, J.S. (1963) *Recent Prog. Horm. Res.* 19, 445-482.
- DECAUX, J.F., ANTOINE, B. Y KAHN, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 11584-11590.
- DEMAUGRE, F., BUCH, A., CEPANEC, C., MONCION, A. Y LEROUX, J.P. (1984) *Biochem. J.* 222, 343-350.
- DENNIS, S.C., DEBRYSERE, M., SCHOLZ, R. Y OLSON, M.S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2229-2237.
- EISENSTEIN, A.B. Y STRACK, I. (1968) *Endocrinology* 83, 1337.
- EISENSTEIN, A.B., BERG, E., GOLDENBERG, D. Y JENSEN, B. (1964) *Endocrinology* 74, 123-127.

- EL-REFAI, M.F. Y CHAN, T.M. (1986) *Biochem. J.* 237, 527-531.
- ENCIO, I.J. Y DETERA-WADLEIGH, S. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 7182-7188.
- ENGEL, F.L. (1957) *Am. J. Clin. Nutr.* 5, 417-430.
- ERECINSKA, M., STUBBS, M., MIYATA, Y., DITRE, C.M. Y WILSON, D.F. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 462, 20-35.
- EVANS, R.M. (1988) *Science* 240, 889-895.
- EXTON, J.H. (1988) *Hepatology* 8, 152-166.
- EXTON, J.H. Y PARK, C.R. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 955.
- EXTON, J.H. Y PARK, C.R. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 4189-4196.
- EXTON, J.H., FRIEDMANN, N., WANG, E.H.A., BRINEAUX, J.P. CORBIN, J.D. Y PARK, C.R. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3579-3588.
- EXTON, J.H., HARPER, S.C., TUCKER, A.L., FLAGG, J.L. Y PARK, C.R. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 329, 41-57.
- EXTON, J.H., JEFFERSON, L.S., BUTCHER, R.W. Y PARK, C.R. (1966) *Am. J. Med.* 40, 709.
- EXTON, J.H., MALLETT, L.E., JEFFERSON, L.S., WONG, E.H.A., FRIEDMANN, N., MILLERT, T.B.Jr. Y PARK, C.R. (1970) *Recent Progress in Hormone Research* 26, 411-461.
- EXTON, J.H., MILLER, T.B., HARPER, S.C. Y PARK, C.R. (1976) *Am. J. Physiol.* 230, 163-170.
- FAFOURNOUX, P., DEMIGNE, C. Y REMESEY, C. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 292-299.
- FAIN, J.N. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 958-962.
- FAIN, J.N. Y CZECH, M.P. (1975) "Handbook of Physiology" Vol. VI, chp. 12, pp. 169-178.

FAIN, J.N. Y SAPERSTEIN, R. (1970) "Adipose Tissue Regulation and Metabolic Functions" (Jeanrenaud, B. y Hepp, D., eds.) Stuttgart, Thieme, pp. 20-27.

FAIN, J.N., KOVACEV, V.P. Y SCOW, R.O. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 3522-3529.

FAIN, J.N., KOVACEV, V.P. Y SCOW, R.O. (1966) *Endocrinology* 78, 773-778.

FELDMAN, D. Y LOOSE, D. (1977) *Endocrinology* 100, 398-404.

FERNANDEZ, B.M. Y SAGGERSON, E.D. (1978) *Biochem. J.* 174, 111-118.

FISHER, R.A., ROBERTSON, S.M. Y OLSON, M.S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 4631-4638.

FOSTER, D.O., RAY, P.D. Y LARDY, H.A. (1966) *Biochemistry* 5, 555-562.

FRASER, R., ALBRIGHT, F. Y SMITH, P.H. (1941) *J. Clin. Endocrinol.* 1, 297-303.

FREIBERG, J.M., KINSELLA, J. Y SACKTOR, B. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4932-4936.

FRELIN, C., VIGNE, P., LADOUX, A. Y LAZDUNSKI, M. (1988) *Eur. J. Biochem.* 174, 3-14.

FREUDENRICH, C.C. Y BORLE, A.B. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 8604-8610.

FRIEDMANN, N. Y JOHNSON, F.D. (1980) *Life Sci.* 27, 837-842.

FRIEDMANN, N., EXTON, J.H. Y PARK, C.R. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 113-119.

FRITZ, I.B. (1961) *Physiol. Rev.* 41, 52-129.

GARCIA-SAINZ, J.A. Y HERNANDEZ-SOTOMAYOR, S.M.T. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163, 417-421.

- GARCIA-SAINZ, J.A., HUERTA-BAENA, M.E. Y MALBON, C.C. (1989) *Am. J. Physiol.* 256, C384-C389.
- GAUTHIER, C., EL-TAYEB, K., VRANIC, M. Y LICKLEY, H.L.A. (1986) *Am. J. Physiol.* 250, E393-E401.
- GEELLEN, M.J.H., PRUDEN, E.L. Y GIBSON, D.M. (1977) *Life Sci.* 20, 1027-1034.
- GEYNET, P., FERRY, N., BORSODI, A. Y HANOUNE, J. (1981) *Biochem. Pharmacol.* 30, 1665-1675.
- GOLDBERG, A.L. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 3223-3229.
- GOLDBERG, A.L. (1975) "Intracellular Protein Catabolism" (Hanson, H. y Bohley, P. eds.) *Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig*, pp. 548-555.
- GOLDBERG, A.L., TISCHLER, M., DEMARTINO, G. Y GRIFFIN, G. (1980) *Federation Proc.* 39, 31-36.
- GOMEZ-MUÑOZ, A., HALES, P., BRINDLEY, D.N. Y SANCHO, M.J. (1989) *Biochem. J.* 262, 417-423.
- GONZALEZ-MANCHON, C., MENAYA, J., AYUSO, M.S. Y PARRILLA, R. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1051, 215-220.
- GONZALEZ-MANCHON, C., SAYUSO, M. Y PARRILLA, R. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 271, 1-9.
- GONZALEZ-MANCHON, C., SAYUSO, M., Y PARRILLA, R. (1988 a) *Biochim. Biophys. Acta.* 972, 192-199.
- GONZALEZ-MANCHON, C., SAZ, J.M., SAYUSO., M. Y PARRILLA, R. (1988 b) *Arch. Biochem. Biophys.* 265, 258-266.
- GOODHART, M., FERRY, N., GEYNET, P. Y HANOUNE, J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 11577-11583.
- GRAY, J.G., PRATT, W.B. Y ARONOW, L. (1971) *Biochemistry* 10, 277-284.
- GREEMBAUM, A.L., GUMAA, K.A. Y McLEAN, P. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 617-663.

- GREEN, A., FISHER, M. Y NEWSHOLME, E.A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 676, 125-128.
- GROEN, A.K., CARLO, W.T., VAN ROERMUD, VERVOORN, R.C. Y TAGER J.M. (1986) *Biochem. J.* 237, 379-389.
- GRUHNER, K. Y SEGAL, H.L. (1970) *Biochim. Biophys. Acta.* 222, 508-514.
- GUELLAEN, G., YATES-AGGERBECK, M., VAUQUELIN, G., STROSBERG, D. Y HANOUNE, J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1114-1120.
- GUNN, J.M., HANSON, R.W., MEYUHAS, O., RESHEF, L. Y BALLARD, F.J. (1975) *Biochem. J.* 150, 195-203.
- HALES, C.N. Y HYANS, D.E. (1964) *Lancet* 2, 69-70.
- HALESTRAP, A.P. (1978 a) *Biochem. J.* 172, 377-387.
- HALESTRAP, A.P. (1978 b) *Biochem. J.* 172, 389-398.
- HALESTRAP, A.P. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 973, 355-382.
- HALESTRAP, A.P. Y DUNLOP, J.L. (1986) *Biochem. J.* 239, 559-565.
- HALESTRAP, A.P., QUINLAN, P.T., ARMSTRONG, A.E. Y WIPPS, D.E. (1985) *Biochem. Soc. Trans.* 13, 659-663.
- HAM, J. Y PARKER, M.G. (1989) *Current Opinion in Cell Biology* 1, 503-511.
- HANSFORD, R.C. (1980) *Curr. Top. Bioenergetics* 10, 217-278.
- HÄRING, H., CALLE, C., BUG, A., RENNER, R., HEPP, K.D. Y KEMMLER, W. (1980) *Diabetologia* 19, 379-385.
- HARRISON, H.E. Y HARRISON, H.C. (1960) *Am. J. Physiol.* 199, 265-271.
- HARTAM, F.A. (1927) *Endocrinology and Metabolism*, Vol.II, p.119.
- HARTMAN, F.A., McArthur, C.G. Y HARTMAN, W.E. (1927) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 25, 69-70.

- HAUSBERG, F.X. (1958) *Diabetes* 7, 211-220.
- HAÜSSINGER, D., STEHLE, T., GEROK, W. Y SIES, H. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163, 197-203.
- HAWKINS, R.A., HOUGHTON, R.S. Y WILLIAMSON, D.H. (1973) *Biochem. J.* 132, 19-25.
- HAYNES, R.C.Jr. (1964) *Endocrinology* 75, 602-607.
- HENDERSON, I.C. Y LOEB, J.N. (1974) *Endocrinology* 94, 1637-1643.
- HENDERSON, I.C., FISCHER, R.E. Y LOEB, J.N. (1971) *Endocrinology* 88, 1471-1476.
- HERNANDEZ-SOTOMAYOR, S.M.T. Y GARCIA-SAINZ, J.A. (1984) *FEBS* 166, 385-388.
- HERNANDEZ-SOTOMAYOR, S.M.T. Y GARCIA-SAINZ, J.A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 968, 138-141.
- HERS, H.G. Y HUE, L. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* 52, 617-653.
- HERS, H.G., De WULF, H., STALMANS, W. Y VAN DEN BERGHE, G. (1970) *Adv. Enzyme. Regul.* 8, 171-180.
- HETCHER, O., SOLOMON, M.M., ZAFFARONI, A. Y PINOUS, G. (1953) *Arch. Biochem. Biophys.* 46, 201-214.
- HIDAKA, H., INAGATZI, M., KAWAMOTO, S. Y SASAKI, Y. (1984) *Biochemistry* 23, 5036-5041.
- HOFFMAN, B.B., MULLIKIN-KILPATRICK, D. Y LEFKOWITZ, R.J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4645-4652.
- HOHORST, H.I., KREUTZ, F.H., REIM, M. Y HUBENER, R. (1961) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 163-168.
- HORNBROOK, K.R., BURCH, H.B. Y LOWRY, O.H. (1966) *Mol. Pharmacol.* 2, 106-116.
- HOWARD, K.J. Y DISTELHORST, C.W. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 3474-3481.

- HUE, L., FELIU, J.E. Y HERS, H.G. (1978) *Biochem. J.* 176, 791-797.
- HUGHES, B.P., RYE, K.A., PICKFORD, L.B., BARRIT, G.J. Y CHALMERS, A.H. (1984) *Biochem. J.* 222, 535-540.
- HULTER, H.N., LICHT, J.H., BONNER, E.R., GLYNN, R.D. Y SEBASTIAN, A. (1980) *Am. J. Physiol.* 239, F30-F43.
- HULTER, H.N., SIGALA, J.F. Y SEBASTIAN, A. (1981) *Kidney Int.* 20, 43-49.
- INGEBRITSEN, T.S. Y COHEN, P. (1983) *Science* 221, 331-338.
- INGEBRITSEN, T.S., STEWART, A.A. Y COHEN, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 132, 297-307.
- INGLE, D.J. (1952) *J. Endocrinol.* 8, XXIII-XXXVIII.
- INGLE, D.J. Y BAKER, B.L. (1953) *Springfield III*, 20.
- IYNEDJIAN, P. Y HANSON, R.W. (1977) *J. Biol Chem.* 252, 655-662.
- JAKOB, A. Y DIEM, S. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 404, 57-66.
- JANTZEN, H-M, STRÄHLE, U., GLOSS, B., STEWART, F., SCHMID, W., BOSCHART, M. MIKSICEK, R. Y SCHÜTZ, G. (1987) *Cell* 49, 29-38.
- JEANRENAUD, B. Y RENOLD, A.E. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2217-2223.
- JOHNSON, M.E.M., DAS, N.M., BUTCHER, F.R. Y FAIN, J.N. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3229-3235.
- JOMAIN-BAUM, M. Y HANSON, R.W. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 8978-8985.
- JOSEPH, S.K. Y WILLIAMSON, J.R. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 10425-10432.
- KAHN, C.R., GOLDFINE, I.D., NEVILLE, D.M.Jr. y De MEYTS, P. (1978) *Endocrinology* 103, 1054-1066.

- KAKU, T., LAKATTA, E. Y FILBURN, C. (1991) *Am. J. Physiol.* C635-C642.
- KASUGA, M., AKAMUNA, Y., IWAMOTO, Y. Y KOSAKA, K. (1977) *Endocrinology* 100, 1384-1390.
- KATZ, J. Y Mc GARRY, J.D. (1984) *J. Clin. Invest.* 74, 1901-1909.
- KATZ, J., GOLDEN, S. Y WALS, P.A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 3433-3437.
- KATZ, J., KUWAJIMA, M., FOSTER, D.W. Y Mc GARRY, J.D. (1986) *Trends. Biochem. Sci.* 11, 136-140.
- KATZ, N., NAUCK, M.A. Y WILSON, T. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 1052-1059.
- KENDALL, J.W., EGANS, M.L., STOTT, A.K., KRAMER, R.M. Y JACOBS, J.J. (1972) *Endocrinology* 90, 525-530.
- KHOO, J.C. Y STEINBERG, D. (1975) *FEBS Lett.* 57, 68-72.
- KIM, Y.S. Y KIM, Y. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 2293-2298.
- KING, R.J.B. (1986) *J. Steroid Biochem.* 25, 451-454.
- KING, R.J.B. (1987) *J. Endocrinol.* 114, 341-349.
- KINSELLA, J. CUJDIK, T. Y SACKTOR, B. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 630-634.
- KISHIMOTO, A., TAKAI, Y., MORI, T., KIKKAWA, U. Y NISHIZUKA, Y. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2273-2276.
- KNEER, N.H., BOSCH, A.L., CLARK, M.G. Y LARDY, H.A. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 4523-4527.
- KRAFT, A.S. Y ANDERSON, W.B. (1983) *Nature (London)* 301, 621-623.
- KRAUS-FRIEDMANN, N. (1986) "Hormonal Control of Gluconeogenesis" Vol. 2, *Signal Transmission* (Kraus-Friedmann, N., ed.) pp. 79-87, CRC Press, Boca Raton.

- KRAUS-FRIEDMANN, N. (1986) Trends Biochem. Sci. 11, 276-279.
- KREBS, H.A., GASCOYNE, T. Y NOTTON, B.M. (1967) Biochem. J. 102, 275-282.
- KRONE, W., MARQUARDT, W., SEITZ, H.J. Y TARNOWSKI, W. (1975) FEBS Lett. 57, 64-67.
- KRONE, W., MARQUARDT, W., SEITZ, H.J. Y TARNOWSKI, W. (1976) Biochim. Biophys. Acta 451, 72-81.
- KROTIEWSKI, M., KROTIEWSKI, J. Y BJÖRNTORP, P. (1970) Acta Endocrinol. 63, 185-192.
- KUMAN, A., YAMAMURA, H. Y NISHIZUKA, Y. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1290-1297.
- LACASA, D., AGLI, B. Y GIUDICELLI, Y. (1983) Biochim. Biophys. Res. Commun. 153, 489-495.
- LALOUX, M., STALMANS, W. Y HERS, H.G. (1978) Eur. J. Biochem. 92, 15-24.
- LANDAU, B.R. Y WHAREN, J. (1988) FASEB J. 2, 2368-2375.
- LANDAU, B.R., (1965) Vitam. Horm. N.Y. 23, 1-59.
- LANGAN, T.A. (1968) Science 162, 579-580.
- LANGE, A., KUMMEL, L., EL-MAGHRABI, M.R., TAULER, A., COLOSIA, A.D., MARKER, A. Y PILKIS, S.J. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 162, 753-760.
- LAUTT, W.W. Y GREENWAY, C.V. (1976) Am. J. Physiol. 232, H652-H656.
- LAWSON, N., JENNINGS, R.J., FEARS, R. Y BRINDLEY, D.N. (1982 a) FEBS Lett. 143, 9-12.
- LAWSON, N., POLLARD, A.D., JENNINGS, R.J. Y BRINDLEY, D.N. (1982 b) FEBS Lett. 146, 204-208.
- LITWACK, G. Y RONSENFELD, S.A. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 181.

- LITWACK, G. Y SINGER, S. (1972) *Biochem. Actions. Horm.* 2, 114-163.
- LIVINGSTON, J.R. Y LOCKWOOD, O.H. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 8353-8360.
- LONG, C.N.H., KATZIN, B. Y FRY, E.G. (1940) *Endocrinology* 26,309-344.
- MAEKUBO, H., MORIYA, K. Y HIROSHIGE, T. (1977) *J. Appl. Physiol.* 42, 159-165.
- MAGNUSON, M.A., ANDREONE, T.L., PRINTZ, R.L., KOCH, S. Y GRANNER, D.K. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 4838-4842.
- MAICKEL, R.P., STERN, D.N., TAKABATAKE, E. Y BRODIE, B.B. (1967) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 157, 111-116.
- MALAISSIE, W. J., MALAISSIE-LAGAE, F., McCRAW, E.F. Y WRIGHT, P.H. (1967) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124, 924-928.
- MANO, K., AKBARZADEH, A. Y TOWNLEY, R.G. (1979) *Life Sci.* 25, 1925-1930.
- MARGOLIS, R.N. Y CURNOW, R.T. (1983) *Endocrinology*, 113, 2113-2119.
- MARKER, A.J., COLOSIA, A.D., TAULER, A.D., SOLOMON, D., CAYRE, Y., LANGE, A., EL-MAGHRABI Y M.R., PILKIS, S.J. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 7000-7004.
- MARTIN, A.D., ALLAN, E.H. Y TITHERADGE, M.A. (1984) *Biochem. J.* 219, 107-115.
- MARTIN-REQUERO, A., AYUSO, M.S. Y PARRILLA, R. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 114-127.
- MARTIN-REQUERO, A., AYUSO, M.S. Y PARRILLA, R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 13973-13978.
- MARTIN-REQUERO, A., PEREZ-DIAZ, J., AYUSO-PARRILLA, M.S. Y PARRILLA, R. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 223-234.

- MAZANCOURT, P., GIOT, J. Y GIUDICELLI Y. (1990) *Horm. Metabol. Res.* 22, 22-24.
- MAZANCOURT, P., LACASA, D., GIOT, J. Y GIUDICELLI, Y. (1989) *Endocrinology* 124, 1131-1139.
- McCORMACK, J.G. (1985) *Biochem. J.* 231, 581-595.
- MENAHAN, L.A. Y WIELAND, O. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 880-885.
- MEREN, H., VARIN, F., RUWART, M. Y THURMAN, R.G. (1986) *Hepatology* 6, 917-921.
- MERRYFIELD, M.L. Y LARDY, H.A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3628-3635.
- METCALFE, H.K., COHEN, R.D. Y MONSON, J.P. (1990) *Bios. Rep.* 10, 573-577.
- MILLER, T.B., EXTON, J.H. Y PARK, C.R. (1971) *J. Bio. Chem.* 246, 3672-3678.
- MILLER, T.B.Jr., HAZEN, R. Y LARNER, J. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 566-474.
- MINER, P.B.Jr., SUTHERLAND, E. Y SIMON, F.R. (1980) *Gastroenterology (U.S.A.)* 79, 212-221.
- MITRAKOU, A., JONES, R., OKUDA, Y., PENA, J. NURJHAN, N., FIELD, J.B. Y GERICH, J.E. (1991) *Am. J. Physiol.* 260, E194-E202.
- MIYONAGA, O., NAGONO, M. Y COTTAM, G.L. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10617-10623.
- MOBLEY, P.L. Y SULSER, F. (1980) *Nature* 286, 608-609.
- MONDER, C. Y BRADLOW, H.L. (1980) *Recent Progress in Hormone Research* 36, 345-400.
- MOOLENAAR, W.H., TERTOOLEN, L.G.J. Y DE LATT, S.W. (1984) *Nature (London)* 312, 371-374.

- MORITA, Y. Y MUNCK, A. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 93, 150-157.
- MOY, J.A., BATES, J.N. Y FISHER, R.A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 8092-8096.
- MUNCK, A. Y KORITZ, S.B. (1962) *Biochim. Biophys. Acta.* 57, 310-317.
- NAKANISHI, S., KITA, T., TANI, S., IMURA, H. Y NUMA, S. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 3283-3286.
- NARAY-FEJES-TOTH, A. Y FEJES-TOTH, G. (1990) *Am. J. Physiol.* 259, F672-F678.
- NEWGARD, C.D., MOORE, S.V., FOSTER, D.W. Y Mc GARRY, J.D. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 6958-6963.
- NICHOLS, W.K. Y GOLDBERG, N.D. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 279, 245-259.
- NILSSON, N.O., STRALFORS, P., FREDRIKSON, G. Y BELFRAGE, P. (1980) *FEBS Lett.* 111, 125-130.
- NOBES, C.D., HAY, W. W. Jr. Y BRAND, M.D. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 12910-12915.
- NORONHA-BLOB, L. Y SACKTOR, B. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 2164-2169.
- OCHS, R.S. Y LARDY, A.H. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 9956-9962.
- OLEFSKY, J.M. (1975) *J. Clin. Invest.* 56, 1499-1508.
- OLEFSKY, J.M. (1976) *J. Clin. Invest.* 58, 1450-1460.
- OLEFSKY, J.M., JOHNSON, J., LIU, F., JEN, P. Y REAVEN, G.M. (1975) *Metabolism* 24, 517-527.
- OVERELL, B.G., CONDON, S.E., Y PETROW, V. (1959) *J. Pharm. Pharmacol.* 12, 150-153.

- PAGANO, G., CAVALLO-PERIN, P., CASSADER, M., BRUNO, A., OZZELLO, A., MASCIOLA, P., DALL'OMO, A.M. Y IMBIMBO, B. (1983) *J. Clin. Invest.* 72, 1814-1820.
- PANDE, S.V. Y PARVIN, R. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1565-1573.
- PARK, C.R. Y EXTON, J.H. (1972) "The Glucagon" (Lefebvre, P.J. y Unger, R.H., eds.) Pergamon Press, pp.77-108.
- PARRILLA, R. (1978 a) *Eur. J. Physiol. Pflügers Arch.* 374, 9-14.
- PARRILLA, R. (1978 b) *Eur. J. PhysiolPflügers Archiv.* 374, 3-8.
- PARRILLA, R., JIMENEZ, M.I. Y AYUSO-PARRILLA, M.S. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 174, 1-12.
- PATEL, T.B., BARROU, L.L. Y OLSON, M.S. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7525-7531.
- PETERSEN, D.D., KOCH, S.R. Y GRANNER, D.K. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7800-7804.
- PHORNCHIRASILP, S. Y MATANGKASOMBUT, O.P. (1982) *Horm. Metab. Res.* 14, 207-209.
- PICCOLETTI, R., ALETTI, M.G., BENDINELLI, P., ARIENTI, D. Y BERNELLI-ZAZZERA, A. (1990) *Biochem. Biophys. Research Commun.* 167, 345-352.
- PLESTED, C.P., TAYLOR, E., BRINDLEY, D.N. Y VERNON, R.G. (1987) *Biochem. J.* 247, 459-465.
- PLOMP, P.J.A.M., ROERMUND, C.W.T., GROEN, A.K., MEIJER, A.J. Y TAGER, J.M. (1985) *FEBS Lett.* 193, 243-246.
- POOL, G.P., POSTLE, A.D. Y BLOXHAM, D.P. (1982) *Biochem. J.* 204, 81-87.
- POSTLE, A.D. Y BLOXHAM, D.P. (1982) *Eur. J. Biochem.* 124, 103-108.
- PREKSAITIS, H.G., KAN, W.H. Y KUNOS, G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 4321-4327.

- PRENTKI, M., CORKEY, B.E. Y MATSCHINSKY, F.M. (1985) J. Biol. Chem. 260, 1985-1990.
- PRYOR, H., SMYTH, J.E., QUINLAN, P.T. Y HALESTRAP, A.P. (1987) Biochem. J. 247, 449-457.
- QUINLAN, P.T. Y HALESTRAP, A.P. (1986) Biochem. J. 236, 789-800.
- RASMUSSEN, H. (1970) Science 170, 404-412.
- RASMUSSEN, H. Y BARRET, P.Q. (1984) Physiol. Rev. 64, 938-984.
- RASMUSSEN, H. Y TENENHOUSE, A. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 59, 1364-1370.
- REILLY, F.D., Mc CUSKEY, R.S. Y CILENTO E.V. (1981) Microvasc. Res. 21, 103-116.
- REINHART, P.H., TAYLOR, W.M. Y BYGRAVE, F.L. (1982 a) Biochem. J. 208, 619-630.
- REINHART, P.H., TAYLOR, W.M. Y BYGRAVE, F.L. (1984 a) Biochem. J. 220, 35-42.
- REINHART, P.H., TAYLOR, W.M. Y BYGRAVE, F.L. (1984 b) Biochem. J. 220, 43-50.
- REINHART, P.H., TAYLOR, W.N. Y BYGRAVE, F.L. (1982 b) J. Biol. Chem. 257, 1906-1912.
- REINHART, P.H., TAYLOR, W.N. Y BYGRAVE, F.L. (1984 c) Biol. Rev. 59, 511-557.
- REUTER, H. Y SEITZ, N. (1968) J. Physiol. 195, 451-470.
- RICHARDS, C.S. Y UYEDA, K. (1982) J. Biol. Chem. 257, 8854-8861.
- RINARD, G.A., OKUNO, G. Y HAYNES, R.C.Jr. (1969) Endocrinology 84, 622-631.

- ROACH, P.J. (1986) Liver Glycogen Synthase. En "The Enzymes" (Boyer, P.D., KREBS, E.G. eds.) Vol. XVII, pp. 499-539, Academic Press.
- ROBERTS, D.C.S. Y BLOOM, F.E. (1981) Eur. J. Pharmacol. 74, 37-41.
- RODAN, S.B. Y RODAN, C.A. (1986) Endocrinology 118, 2510-2519.
- RODBELL, M. (1980) Nature 284, 17-22.
- ROGOFF, J.M. Y STEWART, G.N. (1928) Am. J. Physiol. 84, 660-674.
- ROMANOFF, L.P., PLAGER, J. Y PINCUS, G. (1949) Endocrinology 45, 10-20.
- ROS, M., NORTHUP, J.K. Y MALBON, C.C. (1989) Biochem. J. 257, 737-744.
- RÖSLER, M. Y SCHONER, W. (1990) Arch. Biochem. Biophys. 281, 185-190.
- ROSSEN, J.M., FINA, J.J., MILHOLLAND, R.J. Y ROSEN, F. (1970) J. Biol Chem. 245, 2074-2080.
- ROUSSEAU, G.G., MARTIAL, J. Y DE VISSCHER, M. (1976) Eur. J. Biochem. 66, 499-506.
- ROUSSEAU, G.G., SCHMIT, J.P. (1977) J. Steroid. Biochem. 8, 911-919.
- RUDERMAN, N.B., ROSS, P.S. Y BERGER, M. (1974) Biochem. J. 138, 1-10.
- S. AYUSO, M., VEGA, P., GONZALEZ-MANCHON, C. Y PARRILLA, R. (1986) Biochim. Biophys. Acta 883, 33-40.
- SAGGERSON, E.D. (1980) FEBS Lett. 115, 127-128.
- SAGGERSON, E.D. Y CARPENTER, C.A. (1981) FEBS Lett. 129, 225-228.

- SAKAI, D.D., HELMS, S., CARLSTEDT-DUKE, J., GUSTAFSSON, J.-A., ROTTMAN, F.M. Y YAMAMOTO, K.R. (1988) *Genes Dev.* 2, 1144-1154.
- SARKADI, B. Y TOSTESON, D.C. (1980) "Membrane transport in biology" (Giebisch, G., Tosteson, D.C. y Ussing, H.H. eds.) vol.2, pp. 117-160, Springer-Verlag, Berlin.
- SAYERS, G. Y PORTANOVA, R. (1973) *Federation Proc.* 32, 295.
- SAYERS, G.R., BEALL, J. Y SEELIG, S. (1975) "MTP International Review of Science" London, Butterworths, Vol.8, chapt.7.
- SAZ, J.M., GONZALEZ-MANCHON, C., AYUSO, M.S. Y PARRILLA, R. (1989) *Biochem. Intern.* 19, 107-113.
- SCARPACE, P.J., BARESI, L.A. Y MORLEY, J.E. (1988) *Am. J. Physiol.* 255, E153-E158.
- SCHADE, D.S., WOODSIDE, W. Y EATON, R.P. (1979) *Metabolism* 28, 874-886.
- SCHAEFFER, L.D., CHENOWETH, M. Y DUNN, A. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 192, 292-303.
- SCHELLING, D.L., LEADER, D.P., ZAMMIT, V.A. Y COHEN, P. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 927, 221-231.
- SCHOENLE, E., ZAPF, J. Y FROESCH, E.R. (1977) *Diabetologia* 13, 243-249.
- SCHOLZ, R., OLSON, M.S., SCHWAB, A.J., SCHWABE, V., NOELL, C. Y BRAUN, W. (1978) *J. Biochem.* 86, 519-530.
- SCHONHOFERR, P.S., SKIDMORE, I.F., PAUL, M.I., DITZION, B.R., PAUK, G.L. Y KRISHNA, G. (1972) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 273, 267-282.
- SCHUDT, C. (1979) *Eur. J. Biochem.* 98, 77-82.
- SCHUDT, C. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 628, 277-285.
- SCHÜLE, R., MULLER, M., KALTSCHMIDT, C. Y RENKAWITZ, R. (1988) *Science* 242, 1418-1420.

- SCHWANTKE, N. Y LE PEUCH, CH.J. (1984) FEBS Lett. 177, 36-40.
- SCOW, R.O. (1963) "Perspectives in Biology" (Cori, C.F., Foglia, V.G., Leloir, L.F. Y Ochoa, S., eds.) Amsterdam: Elsevier pp. 153-157.
- SCOW, R.O. Y CHERNICK, S.S. (1960) Recent Progress in Hormone Research 16, 497-545.
- SCOW, R.O. Y CHERNICK, S.S. (1970) "Comprehensive Biochemistry" (Florkin, M. y Stotz, E.H., eds.) Amsterdam: Elsevier, pp. 19-50.
- SCRUTTON, M.C. Y GRIFFITHS, S.R. (1981) En "Short-term Regulation of liver Metabolism" (Hue, L. Y Van der Werve G. eds.) pp 175-1987. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.
- SEELIG, S. Y SAYERS, G. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 154, 230-239.
- SHACKLEFORD, G.M., HART, S.F. Y BERRY L.J. (1986) Endocrinol. Metab. 13, E218-E225.
- SHAFRIR, E. Y KERPEL, S. (1964) Arch. Biochem. Biophys. 105, 237.
- SHAPIRO, D.J. Y BROCK, M.L. (1985) Biochemical Actions of Hormones Litwack, G. (ed.) p139.
- SHULMAN, G.I., ROTHMAN, D.L., SMITH, D., JOHNSON, L.M., BLAIR, J.B., SHULMAN, R.G., Y DEFRONZO, R.A. (1985) J. Clin. Invest. 76, 1229-1236.
- SIBROWSKI, W. Y SEITZ, H.J. (1980) Eur. J. Biochem. 113, 121-129.
- SIES, H., AKERBOOM, T.P.M. Y TAGER, J.M. (1977) Eur. J. Biochem. 72, 301-307.
- SIESS, E.A., BROCKS, D.G. Y WIELAND, D.H. (1978) Biochem. Soc. Trans. 6, 1139, 1144.
- SIESS, E.A., Y WIELAND, O.H. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 323-330.

- SISTARE, F.D. Y HAYNES, R.C.Jr. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 12748-12753.
- SISTARE, F.D. Y HAYNES, R.C.Jr. (1985) *The Journal of Biological Chemistry.* 260, 12761-12768.
- SOLER, C., POVEDA, B., PASTOR-ANGLADA, M. Y SOLEY, M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1091, 193-196.
- SOLER-ARGILAGA, C., INFANTE, R., REANAUD, G. Y POLONOVSKI, J. (1974) *Biochimie* 56, 757-761.
- SPIROVSKI, M.Z., KOVACEV, V.P., SPASOVSKA, M., CHERNIK, S.S. (1975) *Am. J. Physiol.* 228, 382-385.
- STARR, J.J. (1979) "Methods of hormone radioimmunoassay" Jaffe, B.M. y Berhman, H.R. (eds.) *Acad. Press. New York*, pag. 613.
- STUCKI, J.W., BRAWAND, F. Y WALTER, P. (1972) *Eur. J. Biochem.* 27, 181-191.
- STUDER, R.K. Y BORLE, A.B. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 804, 377-385.
- STUMPO, D.J. Y KLETZIEN, R.F. (1981) *J. of Cellular Physiology* 107, 11-19.
- SUGANO, T., SHIOTA, M., TANAKA, T., MIYAMAE, Y., SHIMADA, M. Y OSHINO, N. (1980) *J. Biochem.* 87, 153-166.
- SWINGLE, W.W. Y PFIFFNER, J.J. (1930) *Science* 71, 321-322.
- SWINGLE, W.W. Y PFIFFNER, J.J. (1931) *Am. J. Physiol.* 96, 153-163.
- TAGER, J.M., WANDERS, R.J.A., GROEN, A.K., KUNZ, W., BOHNENSACK, R., KÜSTER, U., LETKO, G., BÖHME, G., DUSZYNSKY, J. Y WOJTCZAK, L. (1983) *FEBS Lett.* 151, 1-9.
- TAKEDA, N., YASUDA, K., KITABCHI, A.E., HORIYA, T., JALLEPALLI, P. Y MIURA, K. (1987) *Metabolism* 36,1063-1066.
- TAN, A.W.H. Y NUTTAL, F.Q. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 410, 45-60.

- TAN, A.W.H. Y NUTTAL, F.Q. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* 445, 118-130.
- TAYLOR, K.W. (1976) "Hormone assay and their clinical application" Loraine, J.A. y Bell, E.T. (eds.) Churchill-Livingstone, Edingburgh, pag. 333.
- TAYLOR, W. M., VAN DE POL, E. Y BYGRAVE, F.L. (1986) *Biochem. J.* 233, 321-324.
- THOMAS, A.P. Y HALESTRAP, A.P. (1981) *Biochem. J.* 198, 551-564.
- THOMPON, E.B. Y LIPPMAN, M.E. (1974) *Metab. Clin. Exp.* 23, 159-202.
- THOTAKURA, N.R., MAZANCOURT, P. Y GIUDICELLI, Y. (1982) *Biochimica y Biophysica Acta* 717, 32-40.
- TOLBERT, M.E.M. Y FAIN, J.N. (1984) *J.Biol. Chem.* 249, 1162-1166.
- TOMAS, F.M., MUNRO, H.N. Y YOUNG, V.R. (1979) *Biochem. J.* 178, 139.
- TRILIVAS, I., Mc DONOUGH, P.M. Y BROWN, J.H. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 8431-8438.
- TUTWILER, G.F. Y DELLEVIGNE, P. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2935-2941.
- UETE, T. Y ASHMORE, J. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 2906-2911.
- URCELAY, E., GONZALEZ-MANCHON, C., AYUSO, M.S. Y PARRILLA, R. (1990) "Caracterización de la respuesta adrenérgica en hígado perfundido de rata". PL 47 XVII Congreso Nacional de Bioquímica, Oviedo.
- UTTER, M.F. Y SCRUTTON, M.C. (1969) *Curr. Top. Cell. Regul.* 1, 253-296.
- VAN LAN, V., YAMAGUCHI, N., GARCIA, M.J., RAMEY, E.R. Y PENHOS, J.C. (1974) *Endocrinology*, 94, 671-675.

VANDENHEEDE, J.R., De WULF, H. Y MERLEVEDE, W. (1979) Eur. J. Biochem. 101, 51-58.

VAULONT, S., MUNNICH, A., DECAUX, J.F. Y KAHN, A. (1986) J. Biol. Chem. 261, 7621-7625.

VAULONT, S., MUNNICH, A., DECAUX, J.F. Y KAHN, A. (1986) J. Biol. Chem. 261, 7621-7625.

VILLAR-PALASI, C. Y GUINOVART, J.J. (1986) " Mecanismos de control de la actividad de la glucógeno sintasa", en Bioquímica y Biología Molecular. Temas de actualidad para graduados. (Editado por Ochoa, S., Leloir, L.F., Oró, J. y Sols, A.), pp. 229-235, Salvat, Barcelona.

WAKAT, D.K., BORLAND, K.M. Y HAYNES, R.C.Jr. (1977) Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 36, 914.

WAKAT, D.K. Y HAYNES, R.C.Jr. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 184, 561-571.

WATANABLE, H., NICHOLSON, W.E. Y ORTH, D.N. (1973) Endocrinology 93, 411-416.

WERNER, S. Y LÖW, H. (1974) Horm. Metab. Res. 6, 365-370.

WHITTON, P.D. Y HEMS, D.A. (1976) Biochem. J. 156, 585-592.

WIELAND, O. Y LOFFLER, G. (1963) Biochem. J. 339, 204-211.

WIERINGA, T. Y KRANS, H.M.J. (1978) Biochim. Biophys. Acta 538, 563-570.

WILLIAMSON, D.H., LUND, P. Y KREBS, H.A. (1967) Biochem. J. 103, 514-527.

WILLIAMSON, J.R. Y COOPER, R.H. (1980) FEBS Lett. 117, Supplement K73-k85.

WILLIAMSON, J.R., BROWNING, E.T. Y SCHOLZ, R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4607-4616.

WILLIAMSON, J.R., COOPER, R.H., JOSEPH, S.K. Y THOMAS, A.P. (1985) *Am. J. Physiol.* 248, C203-C216.

WILLIAMSON, J.R., KREISBERG, R.A. Y FELTS, P.W. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 247-254.

WILLIAMSON, J.R., SCHOLZ, R. Y BROWNING, E.T. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4617-4627.

WILSON, D.F., STUBBS, M., VEECH, R.L., ERECINSKA, M. Y KREBS, H.A. (1974) *Biochem. J.* 140, 57-64.

WILSON, M.A. Y MILES, L.E.M. (1977) "Handbook of Radioimmunoassay". Abraham, G.E. (ed.) Dekker Inc., N.Y., pag. 275.

WIRA, C. Y MUNCK, A. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 3436-3438.

WITTWERS, L.E. Y TRASKO, C.S. (1979) *Am. J. Physiol.* 237, E23-E29.

WOLFE, B.B., HARDEN, K. Y MOLINOFF, P.B. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1343-1347.

WOLFE, R.R. Y SHAW, J.H. (1984) *Amer. J. Physiol.* 246, E181-E186.

YAMAZAKI, R.K. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7924-7930.

YATES, F.E. Y MARAN, J.W. (1974) *Handbook of Physiology*, vol.4, part.2, sect.7, pp.367-404.

YOUN, J.H. Y BERGHAM, R.N. (1990) *Am. J. Physiol.* 258, E899-E906.

ZABLUCKI, K., GEMEL, J. Y BRYLA, J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 757, 111-118.