

Alberto Manuel Vargas Morales

ACIDOSIS LACTICA Y GLUCONEOGENESIS RENAL DURANTE EL EJERCICIO

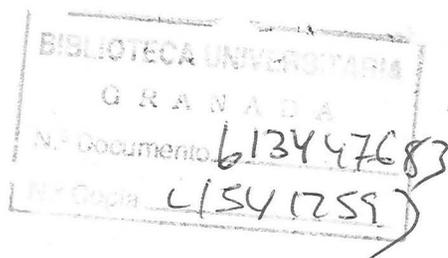
TESIS DOCTORALES DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

2022

C
~~Rev T 222~~
t 3/64

ACIDOSIS LACTICA Y GLUCONEOGENESIS RENAL DURANTE EL
EJERCICIO

ALBERTO MANUEL VARGAS MORALES
Tesis doctoral



El trabajo que presentamos ha sido realizado en el LABORATORIO DEL DEPARTAMENTO INTERFACULTATIVO DE BIOQUÍMICA de la Universidad de Granada durante los cursos 1974-1975; 1975-1976; 1976-1977 y 1977-1978

Parte de los resultados de esta tesis han sido presentados en 11th FEBS Meeting, Copenhagen, Agosto 1977.

Quiero expresar mi más sincera gratitud:

Al Prof. Dr. D. Fermín Sánchez de Medina Contreras por su valiosa labor de dirección.

A Marisa Pita, Pilar Morata, Paloma Hórtelano, Dolores Franco, M^a José Faus, Jose Antonio Lupiáñez, Rosario Muñoz, Antonio Sánchez, así como al resto de mis compañeros del Departamento de Bioquímica por su gran interés e inestimable colaboración en la realización de este trabajo.

A la Dra. M^a José Lupiani y al Departamento de Fisiología Animal por la ayuda recibida en las operaciones de los animales.

Al Dr. Cecilio Gonzalez y a M^a Angeles Ferrero por la lectura de los viales radioactivos.

Muy especialmente a Angustias Moreno por su dedicación durante tantas horas

A todos los que de una u otra forma me han ayudado, a todos, gracias.

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
ALD	Aldolasa
AMP	Adenosín monofosfato
ANSA	Acido 1 amino - 2 naftol- 4 sulfónico
CoA	Coenzima A
2-3DPG	2-3difosfoglicerato
DTT	Ditiotreitol
E C	Comisión internacional de enzimas
EDTA	Acido etilendiamino-tetracético
ENO	Enolasa
FDP	Fructosa 1-6 difosfato
FDPasa	Fructosa 1-6 difosfatasa
F6P	Fructosa 6 fosfato
GAP	Gliceraldehído fosfato
GAPDH	Gliceraldehidofosfato deshidrogenasa
GDH	Glicerol 1-fosfato deshidrogenasa
GOD	Glucosa deshidrogenasa
GOT	Glutamato-oxalacetato-transaminasa
GSH	Glutation reducido
G6P	<u>Glucosa-6-fosfato</u>
G6Pasa	<u>Glucosa-6-fosfatasa</u>
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
3-HBDH	3-Hidroxibutirato deshidrogenasa
HK	Hexocinasa
IDP	Inosin difosfato
ITP	Inosín trifosfato
LAC	<u>L-Lactato</u>

LDH	Lactato deshidrogenasa
MAL	Malato
MDH	Malato deshidrogenasa
NAD	Nicotín adenín dinucleótido
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NADP	Nicotín adenín dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
OAA	Oxalacetato
PDHA	Fosfodihidroxiacetona
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinas
PFK	Fosfofructocinas
PGI	Fosfoglucoisomerasa
PGM	Fosfoglicerato mutasa
2PGA	2-fosfoglicerato
3PGA	3-fosfoglicerato
PHI	Fosfohexosa isomerasa
PIR	Piruvato
PK	Piruvato cinasa
POD	Peroxidasa
POPOP	2, 2'-fosfofenilén-bis (5-fenil-oxazol)
PPO	2-5 difenil oxazol
TIM	Triosafosfato isomerasa
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
TRP	Triosas fosfato
RNA	Acido ribonucleico.

INDICE

	<u>Página</u>
I.- INTRODUCCION	20
II.- PARTE TEORICA.....	23
2.1.- Acidosis láctica.....	25
2.1.1.- Tipos de acidosis láctica.....	25
2.1.2.- Control de la concentración de lactato en sangre.....	28
2.1.2.1.- Glucolisis.....	28
2.1.2.2.- Gluconeogénesis.....	29
2.1.2.3.- Oxidación del lactato.....	29
2.1.2.4.- Excreción urinaria de lactato....	30
2.2.- Gluconeogénesis y acidosis.....	31
2.2.1.- Acidosis y gluconeogénesis hepática.....	31
2.2.2.- Acidosis y gluconeogénesis renal.....	33
2.3.- Adaptación metabólica al ejercicio.....	38
2.3.1.- La natación como método para forzar el ejer- cicio.....	38
2.3.2.- Algunos aspectos metabólicos característi- cos del ejercicio.....	39
III.- PARTE EXPERIMENTAL.....	43
3.1.- Material.....	45
3.1.1.- Especie ensayada.....	45
3.1.2.- Material usado en las diferentes técnicas.....	45
3.2.- Productos.....	47
3.3.- Métodos.....	48
3.3.1.- Tratamiento de los animales de experimenta- ción.....	48
3.3.1.1.- Ayuno.....	48

3.3.1.2. - Ejercicio.....	48
3.3.1.3. - Bicarbonato sódico.....	49
3.3.1.4. - Adrenalectomía.....	49
3.3.1.5. - Infusión de ácido láctico.....	49
3.3.1.6. - Infusión de lactato sódico.....	49
3.3.1.7. - Adrenalina.....	50
3.3.2. - Determinación de la capacidad gluconeogénica de corteza renal.....	50
3.3.2.1. - Determinación enzimática de gluco- sa.....	50
3.3.3. - Tratamiento de los tejidos para la determina- ción de actividades enzimáticas.....	53
3.3.3.1. - Glucosa 6 fosfatasa.....	53
3.3.3.2. - Fructosa difosfatasa, láctico des- hidrogenasa, piruvato cinasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasa, método espectrofotométrico.....	53
3.3.3.3. - Fosfoenolpiruvato carboxicinasa, método isotópico.....	54
3.3.4. - Determinación de actividades enzimáticas....	54
3.3.4.1. - Glucosa 6 Fosfatasa.....	54
3.3.4.2. - Lactato deshidrogenasa.....	57
3.3.4.3. - Fructosa 1-6 difosfatasa.....	59
3.3.4.4. - Piruvato cinasa.....	61
3.3.4.5. - Fosfoenolpiruvato carboxicinasa, método espectrofotométrico.....	63
3.3.4.6. - Fosfoenolpiruvato carboxicinasa, método isotópico.....	65
3.3.5. - Tratamiento de la sangre para la determina- ción de metabolitos.....	69
3.3.6. - Determinación de metabolitos en sangre.....	70

3.3.6.1. - Glucosa.....	70
3.3.6.2. - Lactato.....	70
3.3.6.3. - 3-hidroxibutirato.....	72
3.3.6.4. - Acetoacetato.....	73
3.3.7. - Determinación enzimática de las concentra- ciones "in vivo" de metabolitos intermedia- rios del proceso gluconeogénico.....	74
3.3.7.1. - Tratamiento de los tejidos, téc- nica del congelado instantaneo..	74
3.3.7.2. - Determinación enzimática de glu- cosa 6 fosfato y fructosa 6 fos- fato.....	76
3.3.7.3. - Determinación enzimática de fos- fodihidroxiacetona, gliceralde- hido 3 fosfato y fructosa 1-6 difosfato.....	78
3.3.7.4. - Determinación enzimática de pi- ruvato, fosfoenolpiruvato, 2 fos- foglicerato y 3 fosfoglicerato...	79
3.3.7.5. - Determinación enzimática de L- malato.....	82
3.3.7.6. - Determinación enzimática de L- aspartato.....	83
3.3.7.7. - Determinación enzimática de L- lactato.....	85
3.3.8. - Determinación del contenido de glucógeno hepático.....	86
IV. - RESULTADOS.....	91
4.1. - Evolución de algunos parámetros bioquímicos relacio- nados con la gluconeogénesis a lo largo del día.....	93

4. 1. 1. - Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxi- cinasa hepática y contenido en glucógeno...	94
4. 1. 2. - Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxi- cinasa y capacidad gluconeogénica de cor- teza renal de rata.....	94
4. 1. 3. - Contenido de lactato y glucosa en sangre...	99
4. 2. - Efecto de un ayuno de 24 horas sobre algunos pa- rámetros relacionados con la gluconeogénesis.....	99
4. 2. 1. - Actividad de la fructosa 1-6 difosfatasa, piruvato cinasa, láctico deshidrogena- sa y fosfoenolpiruvato carboxicina- sa de hígado de rata.....	102
4. 2. 2. - Actividad de la fructosa 1-6 difosfatasa, pi- ruvato cinasa, láctico deshidrogenasa, fos- foenolpiruvato carboxicina- sa y capacidad gluconeogénica de corteza renal.....	102
4. 2. 3. - Concentración en sangre de glucosa y de ácidos no volátiles.....	102
4. 2. 4. - Concentración hepática de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis.....	107
4. 2. 5. - Concentración renal de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis.....	107
4. 3. - Influencia de la acidosis metabólica en el efecto del ejercicio sobre la gluconeogénesis renal "in vivo"....	111
4. 3. 1. - Efecto del ejercicio sobre la concentración de lactato en sangre.....	111
4. 3. 2. - Efecto del ejercicio sobre la concentración de glucosa en sangre.....	112
4. 3. 3. - Efecto del ejercicio sobre la actividad de la piruvato cinasa de hígado de rata.....	112
4. 3. 4. - Efecto del ejercicio sobre la actividad de la piruvato cinasa de corteza renal de rata.....	119

4.3.5. - Efecto del ejercicio sobre la actividad de la glucosa 6 fosfatasa de hígado de rata....	119
4.3.6. - Efecto del ejercicio sobre la actividad de la glucosa 6 fosfatasa de corteza renal de rata.....	119
4.3.7. - Efecto del ejercicio sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal de rata....	119
4.3.8. - Evolución de los metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis en hígado y riñón de rata durante el ejercicio.....	125
4.3.8.1. - Evolución de la concentración de metabolitos en hígado.....	125
4.3.8.2. - Evolución de la concentración de metabolitos en riñón.....	132
4.4. - Efecto de la adrenalectomía sobre la gluconeogénesis renal en ratas ejercitadas.....	140
4.4.1. - Concentración de glucosa y lactato en sangre..	143
4.4.2. - Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicina <u>s</u> a y capacidad gluconeogénica de corteza re <u>n</u> al.....	143
4.5. - Efecto de la infusión en sangre de ácido láctico y lactato sódico sobre la gluconeogénesis renal de rata....	143
4.5.1. - Infusión de ácido láctico.....	148
4.5.1.1. - Efecto de la infusión de ácido láctico (8 mmoles/Kg) sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicina <u>s</u> a y capacidad gluconeogénica de corteza renal.....	148
4.5.1.2. - Efecto de la infusión de ácido láctico (4 mmoles/Kg) sobre las activi <u>d</u> ades de la fosfoenolpiruvato carboxicina <u>s</u> a, piruvato c <u>i</u> nsa y sobre	

la capacidad gluconeogénica de corteza renal.....	148
4.5.2. - Efecto de la infusión de lactato sódico (4 mmoles /Kg) sobre las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxicinas, piruva- to cinasa y sobre la capacidad glucone- ogénica de corteza renal.....	152
4.6. - Efecto de la infusión en sangre de adrenalina sobre la gluconeogénesis renal.....	152
4.6.1. - Efecto de la infusión de 5 µg/Kg de peso de adrenalina sobre las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxicinas, piruvato cinasa y sobre la capacidad gluconeogéni- ca de corteza renal.....	155
4.6.2. - Efecto de la infusión de 10 µg/Kg de peso de adrenalina sobre las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxicinas, piruvato cinasa y sobre la capacidad gluconeogéni- ca de corteza renal.....	155
V. - DISCUSION.....	159
5.1. - Evolución de los parámetros bioquímicos relaciona- dos con la gluconeogénesis a lo largo del día.....	161
5.2. - Acidosis láctica y gluconeogénesis renal durante el ejercicio.....	164
VI. - RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	173
VII. - BIBLIOGRAFIA.....	177

I.- INTRODUCCION

El presente trabajo se centra en las relaciones entre la actividad física y la psicología, en particular en la actividad física y la psicología del deporte. Se trata de un tema que ha adquirido gran importancia en los últimos años, debido a la creciente conciencia de la importancia de la actividad física para la salud y el bienestar. Este trabajo tiene como objetivo analizar las relaciones entre la actividad física y la psicología, y cómo estas relaciones pueden ser utilizadas para mejorar el rendimiento deportivo y la salud en general. El presente trabajo se divide en tres partes: primero, se describe la actividad física y su importancia para la salud; segundo, se describe la psicología del deporte y su importancia para el rendimiento deportivo; y tercero, se analizan las relaciones entre la actividad física y la psicología del deporte, y cómo estas relaciones pueden ser utilizadas para mejorar el rendimiento deportivo y la salud en general.

El presente trabajo se centra en las relaciones entre la actividad física y la psicología del deporte. Se trata de un tema que ha adquirido gran importancia en los últimos años, debido a la creciente conciencia de la importancia de la actividad física para la salud y el bienestar. Este trabajo tiene como objetivo analizar las relaciones entre la actividad física y la psicología del deporte, y cómo estas relaciones pueden ser utilizadas para mejorar el rendimiento deportivo y la salud en general. El presente trabajo se divide en tres partes: primero, se describe la actividad física y su importancia para la salud; segundo, se describe la psicología del deporte y su importancia para el rendimiento deportivo; y tercero, se analizan las relaciones entre la actividad física y la psicología del deporte, y cómo estas relaciones pueden ser utilizadas para mejorar el rendimiento deportivo y la salud en general.

I.- INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

El efecto del ejercicio muscular, o más concretamente de la natación en agua a 22º, sobre la gluconeogénesis renal ha sido objeto de estudio en este Departamento desde hace años y motivo de varias tesis doctorales. Como resultado de estos trabajos parece ya claramente establecido que en las ratas sometidas a este tipo de ejercicio se produce una inducción de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa de la corteza renal que lleva consigo un aumento en la capacidad gluconeogénica de dicho tejido. Esta adaptación metabólica está producida por la acidosis láctica concomitante al ejercicio y es probable que se acompañe de una aceleración de la producción de glucosa por la corteza renal "in vivo".

El presente trabajo se ha centrado en las relaciones entre la acidosis láctica y la gluconeogénesis renal durante el ejercicio y se ha procurado aportar datos adicionales que confirmaran dicha relación tanto "in vitro" como "in vivo". Para ello se ha estudiado fundamentalmente el efecto de la administración previa de bicarbonato sobre el perfil de los metabolitos intermediarios del proceso a lo largo de dos horas de ejercicio, el efecto de la supresión de los adrenes sobre la respuesta gluconeogénica renal y el efecto de la infusión de ácido láctico o lactato sódico sobre dicha respuesta.

Previamente a la realización de estas experiencias se ha estudiado la evolución de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxi-

cinasa y otros parámetros relacionados con la gluconeogénesis a lo largo del día. Algunas de estas evoluciones habían sido previamente descritas en la bibliografía pero parecía interesante ampliar los parámetros bioquímicos estudiados, sobre todo en nuestras condiciones experimentales específicas. Ello nos ha permitido seleccionar el -- tiempo más adecuado para la realización del ejercicio y disponer de estos conocimientos básicos para futuras experiencias relacionadas.

Por lo que se refiere al tema concreto de esta Memoria, los resultados obtenidos tanto "in vitro" como "in vivo" son coherentes con la hipótesis de trabajo y confirman plenamente que la inducción de la gluconeogénesis renal durante el ejercicio se debe a la acidosis láctica que lo acompaña.

II. PARTE TEORICA

1.1.- ACIDOSIS LACTICA

La acidosis metabólica se caracteriza por un pH sanguíneo menor de 7.35 y un bicarbonato sérico menor de 22 mEq/l. Su origen puede ser renal, hepático o por exceso de producción de lactato por un alto grado de hipoxia.

El término acidosis láctica se reserva para aquellas acidosis metabólicas que están asociadas con elevados niveles de lactato en sangre. Lo cual implica que la etiología se debe a los procesos que conducen a la producción metabólica de lactato en los tejidos, ya sea por un defecto en la oxidación de los ácidos grasos o por un exceso de producción de lactato como tal en los tejidos.

Esta forma de acidosis metabólica puede ser clasificada en: tipo A (Olivieri) y tipo B (Coville y Wessels).

A continuación describimos algunas de las causas metabólicas más importantes relacionadas con la acidosis láctica.

2.1.1.- Tipo de acidosis láctica

El lactato se forma por oxidación de la glucosa en los tejidos.

II.- PARTE TEORICA

II PARTE TEORICA

2.1. - ACIDOSIS LACTICA.

La acidosis metabólica se produce cuando existe un disturbio en la homeostasis ácido-base. Su origen puede ser respiratorio o no pero siempre se manifiesta por un pH arterial anormalmente bajo.

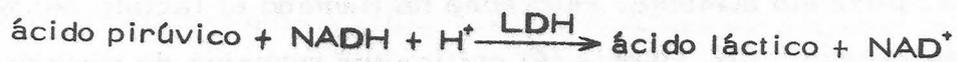
El término acidosis láctica se reserva para aquellas acidosis metabólicas que están asociadas con altas concentraciones de lactato en sangre, lo cual implica que la acidosis es debida a los protones que acompañan a la producción metabólica de lactato ya que el ácido láctico no puede existir como tal en cantidades apreciables al pH de los fluidos corporales.

Este tema ha sido ampliamente revisado recientemente por Oliva (1) y por Cohen y Woods (2).

A continuación describimos alguno de los aspectos metabólicos más importantes relacionados con la acidosis láctica.

2.1.1. - Tipos de acidosis láctica.

El ácido láctico se forma por reducción del ácido pirúvico según la reacción:



Ordenando la ecuación de acuerdo con la ley de acción de masas queda:

$$\text{ácido láctico} = \text{ácido pirúvico} \times \frac{\text{NADH} \times \text{H}^+}{\text{NAD}^+}$$

La concentración de lactato depende, pues, de dos variables: la concentración de piruvato y la constancia de la razón $\text{NADH} / \text{NAD}^+$, que a su vez depende del estado relativo de oxidación del tejido.

Un incremento en la producción de lactato puede ser debido a dos causas:

1) Alteración en la concentración de lactato por cambios en el estado de oxidación del NAD^+ sin cambiar el piruvato, aunque tal cosa ocurre raramente, pues, por regla general, se acompaña de un ligero incremento en la concentración de piruvato, debido a cambios de ventilación, glucosa o pH;

2) Alteración en la concentración de lactato por cambios en la concentración de piruvato sin cambio de la razón $\text{NADH} : \text{NAD}^+$. Esta situación puede alcanzarse de varias maneras: por ejemplo, por inyección intravenosa de bicarbonato sódico (3), o por administración intravenosa u oral de glucosa (3, 4). La razón lactato : piruvato se incrementa también a menudo durante hiperventilación.

Por otra parte, la situación (1) se puede producir por cualquier motivo causante de hipoxia tisular. El estado de oxidación del NAD^+ varía, constantemente, dependiendo del suministro de oxígeno a los tejidos. La hipoxia se traduce en un incremento en la forma reducida del NAD^+ y consecuentemente en una acumulación de lactato que no puede ser oxidado. En estas condiciones el incremento en la concentración de lactato, no está asociado a un aumento en la concentración de piruvato. Por tanto, la razón lactato : piruvato aumenta. Huckabee ha llamado al lactato así formado "lactato en exceso" (3). Harris (5) critica los trabajos de Huckabee, ya que el lactato en exceso es matemáticamente dependiente de la concentración de piruvato. Alpert (6) y Olson (7) ponen en duda la validez de igualar la razón lactato : piruvato en sangre con el estado de oxidación del tejido. Estos autores arguyen que puesto que existen "pools" separados de NADH y NAD^+ en citoplasma y mitocondria y puesto que la razón lactato : piruvato sanguínea depende, sobre todo, de la razón $\text{NADH} : \text{NAD}^+$ citoplasmática, esta puede no reflejar los cambios sufridos por el sistema $\text{NADH} : \text{NAD}^+$ mitocondrial que en definitiva es el último que determina la oxidación en los tejidos.

Clinicamente se puede clasificar la acidosis láctica en dos tipos:

A) Correspondiente a situaciones en las que existe un pobre aporte sanguíneo a los tejidos con la hipoxia consiguiente (8, 9), lo que provoca una elevación progresiva de la concentración de lactato a medida que va decreciendo la tensión de oxígeno. En el hombre, Huckabee (10) y Eldridge (11) no encuentran evidencia de acidosis láctica en pacientes con hipoxia crónica debida a enfermedades pulmonares, gracias a la acción de distintos mecanismos compensadores; no obstante, en casos de hipoxia aguda experimental (12), o durante episodios hipóxicos que se producen en pacientes con asma bronquial (13, 14), se produce un incremento en la concentración de lactato paralelo al incremento en el ratio lactato : piruvato. A este tipo corresponden también las acidosis producidas por " shock ", este término se usa para describir un síndrome consistente en hipotensión, taquicardia, frío en las extremidades, etc., que normalmente sobreviene como resultado de una hemorragia, septicemia o pobre función cardíaca. Se ha demostrado que la acidosis láctica puede acompañar al " shock ", sea cual sea la causa que lo produzca (15, 16, 17, 18). La acidosis láctica producida por el ejercicio es también de este tipo, debido a la hipoxia muscular producida y a que los mecanismos para eliminar el lactato sanguíneo en estas condiciones son insuficientes.

B) Correspondiente a situaciones en las que se acumula lactato en sangre, produciéndose un disturbio en la homeostasis ácido-base, en condiciones en las que existe un aporte sanguíneo a los tejidos y una oxigenación arterial adecuadas. Este tipo de acidosis se puede presentar asociado a ciertos desordenes comunes: uno de ellos es la diabetes. Jervell (19), Huckabee (20) Anderson (21) y Tranquada (18) encuentran una concentración normal de lactato en sangre en pacientes diabéticos bien controlados. En contraste, Hartmann (22), Watkins (23), Marliss (24), Zimmet (25) y Arieff (26) demuestran una elevada concentración de lactato en sangre en enfermos agudos con coma diabético antes de empezar el tratamiento. También se puede presentar asociado a leuce

mia (27, 28). También se puede producir en algunas enfermedades hereditarias, como son la enfermedad tipo I del glucógeno, en la que existe una deficiencia de glucosa 6 fosfatasa que motiva que se acumule glucosa 6 fosfato que deriva rápidamente hacia la vía glucolítica y cuando la capacidad del ciclo tricarboxílico para aceptar el piruvato es sobrepasada, el lactato se acumula en sangre (29). También ocurre en caso de deficiencia en fructosa 1-6 difosfatasa (30, 31). Por último, la acidosis láctica se puede producir por ingestión o administración de drogas u otras sustancias como son biguanidas: fenformina (32) y metformina (33), etanol (34, 35, 36), fructosa (37), etc.

2. 1. 2. - Control de la concentración de lactato en sangre.

La concentración de lactato en sangre es un reflejo de la cantidad de ácido láctico producido por los tejidos y de la cantidad metabolizada, principalmente, por el hígado.

Los principales procesos metabólicos implicados en este control son la glucolisis, gluconeogénesis, oxidación metabólica y excreción urinaria.

2. 1. 2. 1. - Glucolisis.

En casi todos los tejidos, excepto en tejido adiposo e hígado, la glucolisis es la ruta utilizada para producir ATP. En músculo los estudios de Margaria (38) demostraron que bajo condiciones de máximo ejercicio la provisión de energía vía glucolisis es esencial. Bajo condiciones anaerobias el único producto de la glucolisis es el ácido láctico.

En hombre y rata (39, 40) la concentración sanguínea de lactato está incrementada en el periodo neonatal, llegando a ser la concentración hepática cinco veces superior a la normal (41). Este efecto se debe a la alta capacidad glucolítica de los tejidos del recién nacido, hecho confirmado en el caso de la corteza renal (40) y que puede ser el responsa

sable, como Krebs ha sugerido, de la capacidad del recién nacido para sobrevivir a largos periodos de anoxia (42).

En hígado la función de la glucólisis es la conversión de carbohidratos en grasas más que la producción de ATP. En este órgano la velocidad de formación anaerobia de lactato se corresponde con la velocidad anaerobia de síntesis de ácidos grasos, como parece indicar el hecho de que la velocidad de síntesis de triglicéridos en hígado de rata sea muy comparable a la velocidad de la glucólisis anaerobia (37).

2. 1. 2. 2. - Gluconeogénesis .

Mientras todos los tejidos tienen capacidad para producir lactato, fundamentalmente solo dos tienen capacidad gluconeogénica: hígado y corteza renal. Mediante este proceso se consumen principalmente lactato y alanina, siendo ambos compuestos vehículos para el transporte de unidades de tres átomos de carbono del músculo al hígado.

El principal punto de control de la síntesis de glucosa a partir de lactato es la reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxinasa. Han sido publicadas magníficas revisiones bibliográficas sobre este tema por M. C. Scrutton y M. F. Utter (43), J. H. Exton (44), Hanson y cols. (45, 46) y Newsholme y Start (47). Por otra parte, los principales aspectos de este proceso han sido descritos con anterioridad por los doctores Sanchez Campos (48) y García Ruiz (49) en sus tesis doctorales.

2. 1. 2. 3. - Oxidación del lactato.

La velocidad de oxidación del lactato depende más que de la enzima láctico deshidrogenasa de la piruvato deshidrogenasa, cuya actividad decide si el carbohidrato pasa a convertirse en acetil-CoA o si se

resintetiza glucosa en hígado y riñón a partir de lactato.

Actualmente existe poca información acerca de la extensión en que el lactato se utiliza como fuente de energía cuando su concentración es normal. Sin embargo se sabe que cuando se añade lactato a altas concentraciones, 10 mM, a cortes de cerebro, músculo cardíaco, músculo esquelético, testículo, hígado, riñón y retina se incrementa el consumo de oxígeno por estos tejidos (50). En hígado y riñón este mayor consumo puede reflejar la energía necesaria para el proceso gluconeogénico.

Existen dos situaciones en que la oxidación del ácido láctico alcanza proporciones importantes: durante el periodo neonatal, en que los tejidos, principalmente cerebro, pueden utilizar el lactato como combustible, y cuando existe alteración en el almacenamiento de glucógeno. En esta enfermedad la degradación de glucógeno inducida por glucagón o ayuno produce un incremento en la concentración de lactato en sangre.

2.1.2.4. - Excreción urinaria de lactato.

Jervell (19) encontró pequeñas cantidades de lactato en la orina de individuos normales. Hewlett (51) hizo notar que la excreción urinaria de lactato solo se produce cuando la concentración de lactato en sangre excede de 4 mmoles / litro. Estos resultados y otros (52, 53, 54) sugieren la existencia de un umbral mínimo renal, semejante al existente para la glucosa.

2. 2. - GLUCONEOGENESIS Y ACIDOSIS

Como se acaba de mencionar, la gluconeogénesis tiene lugar principalmente en hígado y corteza renal. La mayor parte de los estudios se han realizado en el tejido hepático.

En este tejido el control de la síntesis de glucosa se ejerce, fundamentalmente, a nivel de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, cuya actividad es modulada por vía hormonal en relación con los niveles de glucosa en sangre, actuando el AMP cíclico como segundo mensajero hormonal. El aumento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (53) es debido a síntesis de nueva proteína (55), y se traduce en un fuerte estímulo de la gluconeogénesis. La relación glucemia-fosfoenolpiruvato carboxicinasa existe incluso en ausencia de factores hormonales, como se demuestra en hígado perfundido.

Por el contrario en riñón, aunque también es la fosfoenolpiruvato carboxicinasa la principal enzima implicada, la regulación de la gluconeogénesis no parece estar vinculada a la hipoglucemia sino fuertemente influenciada por el estado ácido-básico del organismo.

2. 2. 1. - Acidosis y gluconeogénesis hepática.

En experiencias realizadas en hígado perfundido de rata, con una concentración inicial de lactato en el medio baja, se produce lactato, piruvato y glucosa a gran velocidad durante los primeros 30 minutos de perfusión (37), momento en que se estabiliza al alcanzarse niveles de

concentración similares a los encontrados en sangre de ratas alimentadas. Igual ocurre en hígados perfundidos de ratas sometidas a ayuno. Sin embargo, el hígado de ratas alimentadas incrementa la formación aerobia de lactato al añadir glucosa 200 mM. Este hecho puede deberse a la saturación de las rutas de conversión de la glucosa 6 fosfato en glucógeno o ácidos grasos. En hígado ayunado no se produce acúmulo de lactato en estas condiciones porque la actividad de la hexocinasa "in situ" es demasiado baja para iniciar una velocidad de glucolisis significativa.

En lo que concierne al hígado, datos procedentes de experiencias en órganos aislados y perfundidos sugieren que bajo condiciones normales solo una pequeña parte del lactato es convertido en CO_2 y H_2O (57). La mayor parte se convierte en glucosa 6 fosfato y luego en glucosa o glucógeno. Esta evidencia está de acuerdo con el concepto del ciclo de Cori, en el que el lactato producido por glucolisis en tejidos extrahepáticos es rápidamente convertido en glucosa en el hígado, manteniéndose así los niveles de glucosa sanguínea y evitándose la pérdida de un combustible como el lactato, cuando la glucolisis excede al metabolismo oxidativo.

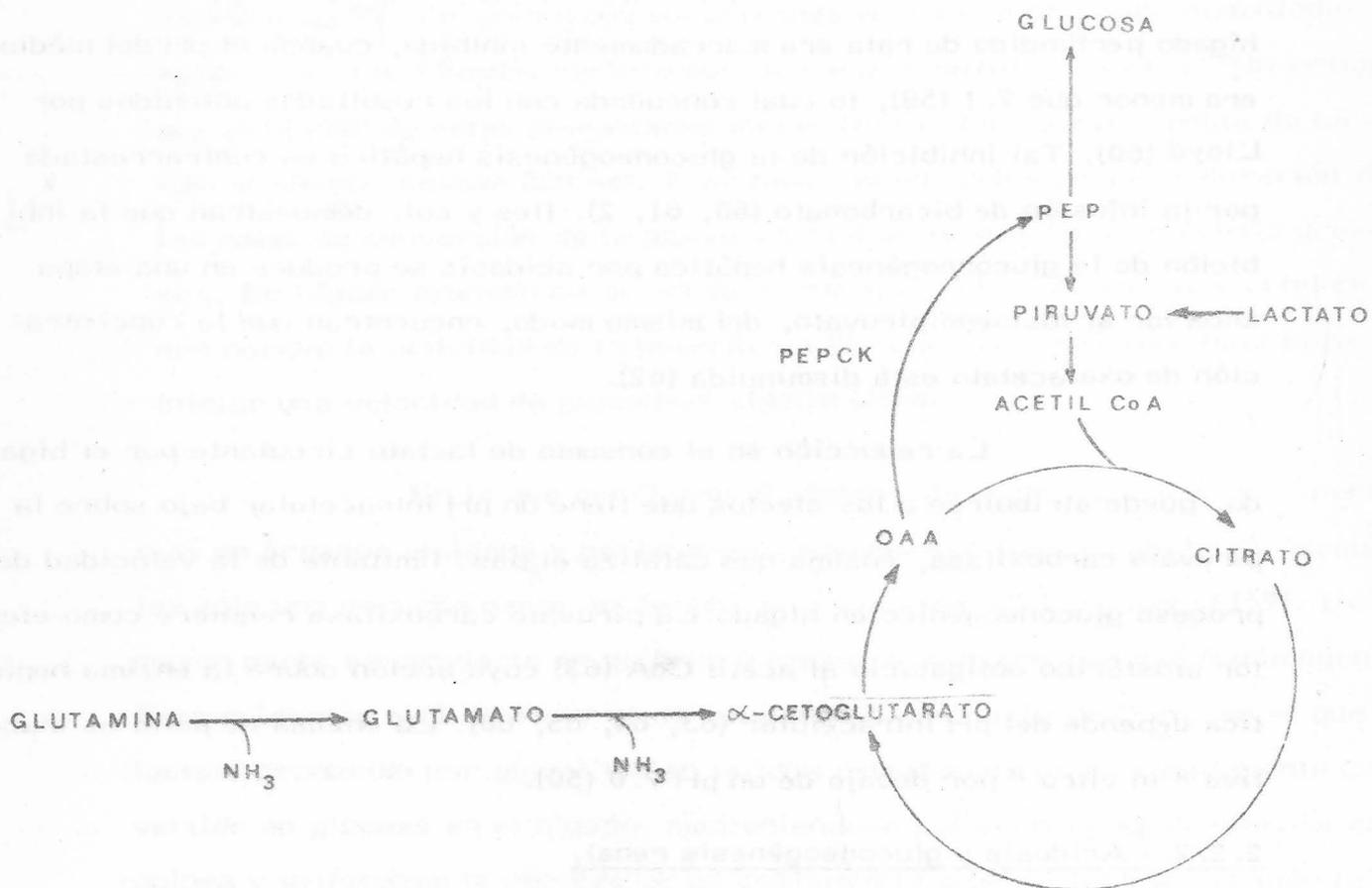
Berry (58) ha señalado el papel central del hígado en todas las formas de acidosis láctica. A partir de datos experimentales de la producción de lactato por tejidos periféricos y consumo por el hígado, concluye que este órgano puede metabolizar más lactato del que se puede producir incluso bajo condiciones de máxima producción por tejidos extrahepáticos. Este autor sugiere que el acúmulo de lactato durante shock o durante hiperventilación se debe no solo a la sobreproducción de lactato sino también, en gran parte, a un menor consumo por el hígado, como consecuencia de una disminución de la circulación esplácnica y hepática.

Hems muestra que la gluconeogénesis a partir de lactato en hígado perfundido de rata era marcadamente inhibida, cuando el pH del medio era menor que 7.1 (59), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Lloyd (60). Tal inhibición de la gluconeogénesis hepática es contrarrestada por la infusión de bicarbonato (60, 61, 2). Iles y col. demuestran que la inhibición de la gluconeogénesis hepática por acidosis se produce en una etapa anterior al fosfoenolpiruvato, del mismo modo, encuentran que la concentración de oxalacetato está disminuida (62).

La reducción en el consumo de lactato circulante por el hígado, puede atribuirse a los efectos que tiene un pH intracelular bajo sobre la piruvato carboxilasa, enzima que cataliza el paso limitante de la velocidad del proceso gluconeogénico en hígado. La piruvato carboxilasa requiere como efector alostérico obligatorio al acetil CoA (63) cuya acción sobre la enzima hepática depende del pH intracelular (63, 64, 65, 66). La enzima de pollo es inactiva " in vitro " por debajo de un pH 7.0 (50).

2.2.2. - Acidosis y gluconeogénesis renal.

En un principio se pensó que la regulación de la producción de glucosa por la corteza renal, no difería fundamentalmente de la hepática, a la vista de los resultados obtenidos por diversas manipulaciones nutricionales y hormonales. Así la velocidad de producción de glucosa y la actividad ensayable de la fosfoenolpiruvato carboxilasa aumentan de forma paralela en respuesta a la administración de glucocorticoides (67), ayuno (68) y diabetes (69). Sin embargo, los trabajos de Goodman y cols. (70), pusieron de manifiesto que la capacidad gluconeogénica renal se incrementa por la acidosis metabólica, demostrándose posteriormente que la regulación tiene lugar a nivel de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (71, 72) pero sin mediación directa del AMP cíclico, y sin que este efecto parezca estar relacionado con la glucemia (73).



Relaciones entre la producción de amonio y la gluconeogénesis en la corteza renal
 PEP: Fosfoenolpiruvato, PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxicinas, OAA: Oxalacetato.

El descubrimiento del incremento de la capacidad gluconeogénica renal durante la acidosis metabólica llamó la atención de numerosos investigadores, lo que originó un gran número de trabajos y revisiones (74, 75, 76, 77, 78, 79, 80). La inducción de la acidosis metabólica origina un incremento en la excreción renal de amonio que proviene fundamentalmente de la glutamina (veasé figura). La vía principal de degradación de este aminoácido supone su desaminación a glutamato por la actividad de la glutaminasa dependiente de fosfato y la desaminación ulterior de glutamato a α -cetoglutarato catalizada por la glutamato deshidrogenasa. El α -cetoglutarato es convertido en fosfoenolpiruvato gracias a la actividad aumentada de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas. De esta forma decrece la concentración de glutamato y sus productos y se acelera la producción de amonio por la actividad glutaminásica. Es importante señalar que el glutamato es un inhibidor de la glutaminasa.

La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas controla, por tanto, la producción de amonio, pero la fosfoenolpiruvato carboxicinasas es también un enzima clave de la gluconeogénesis, por lo que en estas condiciones aumenta también la capacidad gluconeogénica de la corteza renal.

Existen diferencias importantes en relación a los procesos metabólicos de producción de amonio y glucosa entre las especies. Así, mientras que en el perro el destino principal del fosfoenolpiruvato es reciclarse a piruvato y acetyl CoA para quemarse en el ciclo tricarboxílico (81), en la rata existe una producción considerable de glucosa a partir del fosfoenolpiruvato (82). Por otra parte, Cahill y col. han llamado la atención sobre la influencia del estado nutritivo del animal sobre el destino ulterior de este fosfoenolpiruvato. Así, la conversión en glucosa estaría favorecida en condiciones de ayuno, mientras que la combustión en el ciclo tricarboxílico sería operativa cuando la glucemia fuera alta y los niveles de ácidos grasos en sangre fueran bajos (83).

No parece razonable que la producción de glucosa por el riñón esté regulada fundamentalmente por las condiciones ácido-básicas del animal. Sin embargo, existen datos que apuntan en este sentido. Así, Kamm y Cahill han demostrado que el conocido aumento de la capacidad gluconeogénica que tiene lugar en el ayuno y en la diabetes no ocurre cuando se previene la acidosis metabólica concomitante por ingestión de bicarbonato (68). La fosfoenolpiruvato carboxicinasas tampoco aumenta su actividad en ratas diabéticas no acidóticas (84). Por otra parte, la ingestión de bicarbonato hace retornar lentamente a los valores basales la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas elevada por el ayuno (73).

La naturaleza de la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas renal que tiene lugar en condiciones de acidosis metabólica experimental provocada por la administración de cloruro amónico ha sido estudiada con detalle por Flores y Alleyne (85) y por Longshaw y cols. (86, 87). Como resultado se sugirió que los cambios en la actividad ensayable de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas en estas condiciones no se debían a síntesis de nueva proteína, sino al menos parcialmente, a una prolongación en la vida media del enzima o a una conversión de un precursor en una proteína activa. Con el uso de antibióticos que actúan a nivel de síntesis proteica (actinomicina D, que inhibe la síntesis de RNA mensajero (88), y cicloheximida, que inhibe la síntesis de proteínas a nivel de traducción (89),) no se ha encontrado que estos sean capaces de suprimir el efecto estimulante de la acidosis metabólica experimental sobre la fosfoenolpiruvato carboxicinasas renal (48), resultados que concuerdan perfectamente con los obtenidos por Flores y Alleyne (85).

Recientemente Lynédjand y cols. (73) han reexaminado el mecanismo de la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas durante la acidosis metabólica y encuentran que el fenómeno se debe a síntesis de proteína enzimática, reseñando que dicho efecto puede suprimirse administrando cor-

dicepina o actinomicina D en una dosis sustancialmente mayor que la utilizada por los anteriores investigadores.

Los resultados obtenidos en nuestro departamento en relación al ejercicio indican que el incremento de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas y de la capacidad gluconeogénica renal que tiene lugar en estas condiciones se debe a la acidosis láctica que acompaña a esta situación fisiológica (48, 49). El papel de la corteza renal en este caso es importante. Por un lado contribuye a la restauración del equilibrio ácido-básico del organismo alterado por la acumulación de lactato en sangre y, por otro, reconvierte el esqueleto carbonado del lactato en glucosa, pudiendo esta volver a utilizarse por el músculo como combustible metabólico para la contracción.

2. 3. - ADAPTACION METABOLICA AL EJERCICIO

2. 3. 1. - La natación como método para forzar el ejercicio.

La natación como método para el estudio de la fisiología del ejercicio tiene un gran número de ventajas sobre otros tipos de ejercicio como, por ejemplo, la utilización de correas sin fin (90). La natación requiere solo un equipo simple y barato y, por otra parte, no es necesario ningún entrenamiento dado que los animales de laboratorio tales como las ratas, el ratón y el cobaya tienen una capacidad natural para nadar; además de ello, estos animales presentan una gran tendencia a escapar para evitar ahogarse cuando tal cosa es evidente, todo lo cual asegura un alto nivel de ejercicio. No obstante hay que tener en cuenta que el cuadro metabólico originado por la natación puede estar influenciado por el estrés térmico o emocional, factores que son difíciles de eliminar y que hacen difícil, en ocasiones, la interpretación de los resultados. La natación se utiliza no solo para investigar los efectos de un ejercicio de corta duración, sino también para estudiar los cambios fisiológicos motivados por el entrenamiento.

Uno de los factores más importantes, entre aquellos que influyen el ejercicio forzado por la natación, es la temperatura del agua; cuando es muy diferente de la temperatura del cuerpo del animal la duración de la natación puede ser sustancialmente alterada. Una temperatura por encima o por debajo de la termoneutralidad aumenta, lógicamente, la complejidad de interpretación de los resultados porque superpone al estrés provocado por la natación el estrés térmico.

La capacidad para el ejercicio varía considerablemente de acuerdo con el tamaño, especie y edad del animal (90). En lo que se refiere al sexo, hay algunos estudios que indican que los animales hembras tienen mejores condiciones que los machos tanto para los ejercicios cortos de natación (91) como para los ensayos exhaustivos. (92).

2.3.2. - Algunos aspectos metabólicos característicos del ejercicio.

Está perfectamente establecido que durante el ejercicio se incrementa la glucólisis anaerobia en las células del músculo esquelético con la consiguiente superproducción de lactato (93, 94, 95). No obstante la producción de lactato varía considerablemente de acuerdo con las condiciones del ejercicio y, muy especialmente para el caso de la natación, con la temperatura del agua. Así, por ejemplo, Gollnick (96, 97, 98, 99) no encuentra variaciones significativas de lactato en sangre en ratas después de 30 minutos de natación en agua a 35° C. Por otra parte, Dawson y cols. (90) han determinado los valores de lactacidemia en ratas que nadaron en agua a 37° C y a 22° C. En el primer caso, los animales fueron capaces de completar 30 minutos de natación sin dar señales de agotamiento, siendo el incremento de lactato en sangre desde 1.8 mM hasta 5.2 mM en los primeros 3 minutos, bajando hasta 2.3 mM a los 30 minutos. En las ratas que nadaron a 22° C, el incremento en la concentración de lactato sanguíneo fué muy grande en los 3 primeros minutos (10.5 mM), decreciendo al mismo ritmo que en el caso anterior.

Contrariamente a los niveles de lactato en sangre, la glucemia no varía apreciablemente durante el ejercicio muscular, sea cual sea la temperatura del agua (100, 101). Hay un ligero aumento a los 15 minutos (102), apreciándose un descenso significativo solo después de 4 horas al día de natación (101). El transporte de los azúcares a las células de los tejidos periféricos parece estar incrementado durante el ejercicio a pesar del descenso en los niveles circulantes de insulina (103, 104)

El glucógeno muscular se agota durante el ejercicio (105, 106, 107) sin que este efecto sea mediado por vía hormonal, ya que ocurre igualmente en animales adrenalectomizados (108). Igualmente se registra un agotamiento del glucógeno hepático (106, 107). El descenso en los niveles de glucógeno

muscular y hepático con el ejercicio sucede también en la especie humana según ha sido señalado por Hultman (109).

El metabolismo lipídico durante el ejercicio ha sido menos estudiado. Aunque la mayor parte de la energía para el ejercicio muscular proviene de los glúcidos (110, 111, 112), la oxidación de los ácidos grasos cobra especial importancia en los animales entrenados (113, 114, 115, 116, 117, 118).

Está bien establecido que el ejercicio se acompaña de una fuerte liberación de ácidos grasos al plasma a partir del tejido adiposo (119).

En relación al metabolismo nitrogenado ha sido sugerido que el agotamiento por natación en las ratas está relacionado con los niveles de amoníaco en sangre (120, 121, 122, 123) aunque existen algunos datos contradictorios (124, 125). Existen algunos cambios enzimáticos significativos producidos por el ejercicio muscular. Así, aumentan los niveles de glutamato-oxalacetato-transaminasa en músculo (126, 127) y la malato deshidrogenasa hepática (128). En cambio, no varía la glutamato-piruvato-transaminasa (128) ni la lactato deshidrogenasa, a pesar del aumento en los niveles plasmáticos de esta última enzima (129). Las enzimas oxidativas (glicerol fosfato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa) aumentan en músculo e hígado al igual que los citocromos (130).

El ejercicio afecta también a la actividad metabólica del cerebro. Los grupos amido ligados a las proteínas originan amonio que es fijado por glutamato para formar glutamina (131, 132, 133, 134, 135, 136). También se afecta el metabolismo del 4 amino-butirato en el cerebro (137) durante la actividad muscular y hay también alteraciones en los niveles de RNA (138, 139, 140).

El sistema endocrino juega un importante papel en el ejercicio, sobre todo a nivel de la corteza suprarrenal (141, 142, 143, 144, 145). El

mecanismo de la influencia adrenocortical sobre la fatiga muscular durante la natación no está del todo clara, aunque la acción de estas hormonas sobre el metabolismo glucídico puede ser muy significativo. Como se señaló anteriormente los niveles de glucosa en sangre permanecen constantes durante el ejercicio en animales intactos. En cambio la glucemia desciende notablemente en animales adrenalectomizados (146) y se ha observado que la disminución de la capacidad de trabajo muscular en estos animales se relaciona con los niveles de glucemia (147, 148). Los glucocorticoides son necesarios para la inducción de numerosas enzimas que juegan un importante papel en la gluconeogénesis y, por tanto, en el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre durante la natación (127).

La médula suprarrenal forma así mismo parte del esquema fisiológico del ejercicio, contribuyendo a la movilización de los ácidos grasos a partir del tejido adiposo (149). Por otra parte se registra un descenso en los niveles circulantes de insulina (55) y un aumento en la producción de glucagón (150), condiciones todas favorables para la gluconeogénesis.

Las consecuencias del entrenamiento sobre el metabolismo son también muy amplias: hay cambios en los niveles de enzimas en el miocardio - lactato deshidrogenasa (99) y aldolasa (151) -, decrecen los niveles de colesterol en sangre (152, 153, 154) y la cantidad de grasa en el hígado (155), se inducen la hexocinasa (156), creatinfosfato cinasa (157) y glucógeno sintetasa (158) en músculo... etc.

El incremento de la gluconeogénesis renal por el ejercicio ha sido señalado en nuestro departamento y se ha citado en una sección anterior.

III. - PARTE EXPERIMENTAL

3.1. - MATERIAL

3.1.1. - Especies ensayada

Las experiencias se realizaron con ratas blancas para Wistar, de peso aproximado entre 150 y 200 gramos, alimentadas con dieta estándar y que han sido sometidas por el personal de la Unidad de Depuración de Aguas.

Los animales se mantuvieron, al menos una semana, con luz artificial que se enciende a las 7 h. y se apaga a las 19 h., en una habitación mantenida a 22° C.

3.1.2. - Material utilizado en las experiencias

Los animales se alojaron en el Zoológico de la UNAM (p. 10) en jaulas de 100 a 200 cm².

III. - PARTE EXPERIMENTAL

III. - PARTE EXPERIMENTAL .

3.1. - MATERIAL

3.1.1. - Especie ensayada

Las experiencias se han realizado con ratas hembras raza Wistar, de peso aproximado entre 150 y 200 grámos, alimentadas con dieta estándar y que han sido suministradas por el servicio de animales de la Universidad de Granada.

Los animales se mantuvieron, al menos una semana, con luz artificial que se encendía a las 7 h. y se apagaba a las 19 h., en una habitación termostatzada a 22° C.

3.1.2. - Material usado en las diferentes técnicas .

Las pesadas se realizaron en Balanza Mettler H 20 T (p. máximo = 160 g ± 0.01 mg).

Para la medida del pH se utilizó un pehachímetro Beckman Expandomatic SS-2 (pH 0.005).

Los cortes de corteza renal se realizaron con un microtomo manual CA. Thomas Co, Filadelfia, (USA) y cuchillas de acero nº 7, 120 D.

La homogenización tisular se realizó en un aparato tipo " Potter " mecánico (MSE) de vinilo-vidrio.

Las centrifugaciones en frío a gran velocidad se realizaron en centrifugas refrigeradas BECKMAN J 21 B y BECKMAN L3 - 50.

En los demás casos se utilizaron centrifugas angulares modelo "Piccolo" de la firma Martin Christ.

Para la agitación de los tubos se empleó un agitador Whirlimixer de la firma Fisons Scientific Apparatus Limited (Inglaterra).

Las incubaciones se realizaron en baños termostatzados del tipo Tecam Tempunit (Precisión $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$).

Las incubaciones de los cortes de tejido de corteza renal se realizaron en aparatos Gallekamp. IH-350.

Las incubaciones para la determinación de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas se realizaron en un incubador Grant SS 30.

La adición de sustratos y enzimas se realizó con micropipetas "EMIL WORKS" de enrase automático por estrangulamiento (auto Cero High Precision) y con micropipetas automáticas.

Las lecturas colorimétricas en la zona entre 440 y 660 nm se realizaron en un fotocolorímetro Bausch-Lomb modelo Spectronic - 20. Las medidas espectrofotométricas a 340 nm se realizaron en los espectrofotómetros: Hitachi Perkin-Elmer mod. 139 y Unicam SP 1.700, ambos con registrador gráfico incorporado y compartimento de cubetas termostatzado. Se utilizaron cubetas TSL de 1 cm de espesor.

Las determinaciones de ^{14}C se realizaron en un contador de centelleo líquido, Espectrómetro C.L. Philips Modelo PW 4510.

Los catéteres utilizados para canular la yugular a las ratas fueron Eimal Cannulen de la marca Braun.

La bomba de infusión utilizada fué una Peristaltic pump modelo 603 de Industrias e instrumentación.

En la técnica de congelado instantáneo se utilizó : Un vaso Dewar de 25 l. para contener el nitrógeno líquido. Pinzas de aluminio diseñadas al efecto. Vaso cilindrico de 10 l. de capacidad para contener el nitrógeno líquido de uso inmediato en el enfriamiento de las pinzas . Vaso Dewar de un litro de capacidad para las adiciones frecuentes de nitrógeno líquido a los morteros de porcelana con pistilos de mismo material.

La diálisis de la Malico deshidrogenasa se realizó en tubo especial tipo Wisking Tubing 8 / 32.

Los gaseos se han realizado con bombonas de carbógeno ($\text{O}_2 : \text{CO}_2$) (95 : 5) y de CO_2 puro.

3.2. - PRODUCTOS

En la preparación de tampones, soluciones salinas y demás reactivos generales se han utilizado productos PROBUS (España). CARLO ERBA (Italia) y MERCK (Darmstad, Alemania).

El hidrato de hidrazina y el indicador universal interno procedían de la firma BDH Chem. LTD (Poole, Inglaterra).

Los sustratos, enzimas y coenzimas utilizados procedían de las firmas Sigma Chemical Co (USA) y Boehringer (Mannheim, Alemania).

La heparina procedía de los laboratorios Leo (Madrid), la ortodiansidna procedía de Fluka, Ab. Busch S.G. Suiza. El nembutal, cortesía de los laboratorios ABBOT. La adrenalina procedía de los laboratorios Llorente.

3.3. - METODOS

3.3.1. - Tratamiento de los animales de experimentación.

3.3.1.1. - Ayuno.

Los animales fueron separados en jaulas y privados de alimento, pero dejándoles libre acceso al agua durante 24 horas.

3.3.1.2. - Ejercicio.

Las ratas fueron forzadas a nadar en recipientes de plástico con capacidad de 50 litros, llenos de agua a 22°C hasta una altura adecuada, de forma que no pudieran descansar en el fondo ni asirse al borde.

Se han empleado distintos tiempos de natación 15, 30, 60, 90 y 120 minutos.

3.3.1.3. - Bicarbonato sódico

El bicarbonato sódico se administró en dosis de 10 ml de solución 0.2 M por intubación gástrica con una jeringa provista de una cánula de plástico, 30 minutos antes del comienzo del ejercicio. A los animales controles se les administró una dosis de 10 ml de solución salina por el mismo procedimiento.

3.3.1.4. - Adrenalectomía

La operación se ha llevado a cabo bajo anestesia con éter por escisión bilateral dorsal. Los animales operados han sido mantenidos una semana antes de ser utilizados, bebiendo solución salina al 0.9%. Paralelamente se han efectuado controles sometidos a idéntica operación pero sin extirpación de adrenes.

3.3.1.5. - Infusión de ácido láctico

La infusión de ácido láctico a distintas dosis: 2, 4, 8 mmoles \times Kg⁻¹ de peso a una velocidad de 0.0514 ml \times min⁻¹, se ha realizado por medio de un cateter que se introdujo en una de las yugulares externas.

A los animales controles se les infundió el mismo volumen de solución salina 0.9 % por el mismo procedimiento. El tiempo que duró la infusión osciló entre 9 y 7 minutos dependiendo del peso de los animales.

3.3.1.6. - Lactato sódico

A los animales se les infundieron 4 mmoles \times Kg⁻¹ de peso de lactato sódico por el mismo procedimiento que el indicado en el apartado 3.3.1.5.

3.3.1.7. - Adrenalina

A las ratas se les infundieron distintas dosis de adrenalina 5, 10 $\mu\text{gr} \times \text{Kg}^{-1}$ de peso, por el mismo procedimiento que el indicado en el apartado 3.3.1.5.

3.3.2. - Determinación de la capacidad gluconeogénica de corteza renal

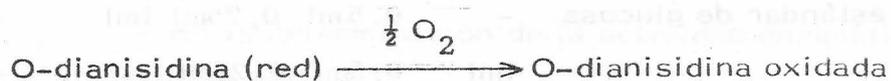
Se ha empleado el método de Krebs y col (159) que ha sido puesto a punto y descrito detalladamente por J. P. García Rufz en su Tesina de Licenciatura (160).

El método consiste en la incubación de cortes de la corteza renal en un medio de Krebs-Henseleit (161) durante una hora dándole una agitación que favorece el contacto del tejido con el sustrato puesto en el medio, en todos los casos, lactato 10 mM, y el gas carbónico para su respiración. Los líquidos resultantes de la incubación se desnaturalizan y neutralizan y se determina en ellos la glucosa producida como se indica a continuación. Los resultados se expresan en μmoles de producto producido durante la hora de incubación por gramo de tejido seco. Para ello es necesario pesar los cortes correspondientes a la incubación una vez desecados en una estufa a 70°C.

3.3.2.1. - Determinación enzimática de glucosa

La determinación de glucosa se ha realizado con el método enzimático de la glucosa-oxidasa-peroxidasa, usando como cromógeno la O-dianisidina.

la técnica ha sido descrita por Bergmeyer y col. (162)
 La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de la glucosa y por la peroxidasa (POD) el H_2O_2 formado se descompone en H_2O y oxígeno atómico que oxida al cromógeno.



La O-dianisidina oxidada, presenta un color que absorbe a 440 nm. Las pequeñas cantidades de α -D glucosa que puedan existir en las muestras también se determinan al estar la GOD comercial acompañada de pequeñas cantidades de mutarrotasa.

a) Reactivos

Tampón Fosfato, Tris-ClH 0,2 : 0,1 M pH 7.3

Suspensión de O-Dianisidina en etanol de 95% al 1% p/v

Solución estándar de glucosa 0,2 mM.

Glucosa-oxidasa (GOD) (E.C. 1.1.3.4.) comercial, 9,3 mg para 75 ml de mezcla enzimática

Peroxidasa (POD) (E.C. 1.11.1.7.) comercial, 3 mg para 75 ml de mezcla enzimática.

Mezcla enzimática: se prepara mezclando 9,3 mg de GOD, 3 mg de POD, 0,5 ml de la suspensión de O-dianisidina y se completa con tampón fosfato, tris-ClH hasta 75 ml.

b) Técnica

Se preparan los siguientes tubos con las cantidades siguientes:

	Blanco	S1	S2	S3	Muestra
Solución estándar de glucosa	-	0.5 ml	0,75 ml	1 ml	-
H ₂ O	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	-	-
Muestra neutralizada	-	-	-	-	1 ml
Mezcla enzimática	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

Se incuba una hora a 37°C y se determina la D.O. existente en cada tubo a 440 nm.

c) Cálculos

Para hallar los μ moles de glucosa de la muestra es necesario representar una recta patrón con las densidades ópticas de los estándar y sus respectivas concentraciones de 0.1, 0.15 y 0.2 μ moles de glucosa. Así se obtienen los μ moles de glucosa existente en 1 ml de muestra neutralizada.

Los cálculos son diferentes dependiendo de que la muestra proceda de una toma de sangre, del medio de perfusión hepática o del líquido de incubación de los cortes de corteza renal, teniendo en cuenta el volumen de que proceden y la neutralización o dilución realizada en cada caso, y la expresión a que se quiere referir el resultado.

3.3.3. - Tratamiento de los tejidos para la determinación de actividades enzimáticas.

3.3.3.1. - Glucosa-6-fosfatasa

En la determinación de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfatasa de hígado y corteza renal se han homogenizado 50 mg de tejido fresco exactamente pesados con 2 ml de tampón citrato 0,1 M pH 6.5 en un Potter Elvehjem mecánico, vinilo-vidrio en frío. El homogenizado se filtra por una torunda de gasa. En el filtrado se determina la correspondiente actividad enzimática. El filtrado mantiene su actividad glucosa 6 fosfatasa por un espacio de 2 horas cuando se conserva en frío.

3.3.3.2. - Fructosa difosfatasa, Lactico deshidrogenasa, piruvato cinasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasa, método espectrofotométrico.

En la determinación de la fructosa 1-6 difosfatasa, lactico deshidrogenasa, piruvato cinasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasa de hígado y corteza renal se ha homogenizado 100 g de tejido fresco pesados con exactitud con 1 ml de tampón Tris-sacarosa 0,01 : 0,25 M en

un Potter Elvehjem de tipo mecánico, vinilo-vidrio, en frío. El extracto obtenido se centrifuga a 38.000 x g y 4°C durante 30 min. En el sobrenadante se determinan las actividades de FDP-asa, LDH y PEPCK como se describe en las secciones correspondientes a cada enzima.

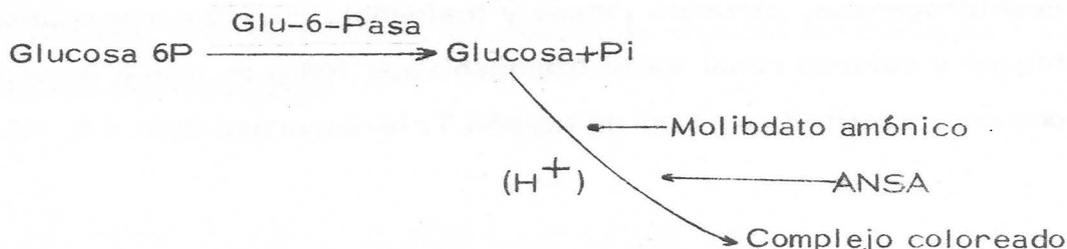
3.3.3.3.-Fosfoenolpiruvato carboxicinasas. Metodo isotópico.

En la determinación de la actividad enzimática de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de hígado y corteza renal por el método isotópico, se ha homogenizado 250 mg de tejido fresco pesados con exactitud con 5 ml de tampón Tris- sacarosa 0,05 : 0,25 M en un Potter-Elvehjem de tipo mecánico, vinilo-vidrio, en frío. El extracto obtenido se centrifuga a 105.000 x g y 4°C durante 45 min. En el sobrenadante se determina la correspondiente actividad enzimática.

3.3.4. - Determinación de actividades enzimáticas

3.3.4.1. - Determinación de la actividad enzimática de la glucosa 6 fosfatasa.

La actividad de la glucosa-6-fosfatasa se determina por la cantidad de fosfato liberado en presencia de glucosa 6P a pH 6.5 y 37°C según Harper (163).



a) Reactivos

Tampón citrato 0,1M pH 6,5

Solución extemporánea de glucosa 6P al 33%

Acido tricloroacético al 10 %

Solución estándar de fosfato 5×10^{-4} M

Agente reductor ANSA (ácido 1-amino, 2-naftol 4-sulfónico) 0.56 M.

Homogenado obtenido según se refiere en la sección 3.3.3.1.

Solución de molibdato amónico al 0,36% en medio sulfúrico.

b) Técnica

La reacción se realiza en tubos de ensayo dispuestos en un baño a 37°C con agitación. Es necesario preparar un blanco por cada muestra y un ciego por cada serie de experiencias. El homogenado se obtiene según la sección 3.3.3.1. Los reactivos se adicionan en el orden y cantidad que indica el siguiente protocolo:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>	<u>Ciego</u>
Homogenado	0.1 ml	0.1 ml	-
Tampón citrato	-	-	0.1 ml
Se agitan en el baño a 37°C durante 5 minutos y se añade lo siguiente:			
Tampón citrato	-	0.1 ml	-
Glucosa 6P	0.1 ml	-	0.1 ml

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>	<u>Ciego</u>
Se incuban durante 15 minutos esattamente medidos en el baño con agitación a 37 °C. La reacción se para por adición de ácido tricloroacético			
Acido tricloroacético 10%	2 ml	2 ml	2 ml

Los tubos se centrifugan a temperatura ambiente a 4.500 r.p. m. durante 10 min. En el sobrenadante decantado se hace la determinación de Pi

La determinación de fosfato inorgánico se ha realizado según la técnica de Fiske y Subarrow (164). siguiendo el orden indicado en el siguiente protocolo:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>	<u>Ciego</u>	<u>Stándar</u>
Molibdato	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Sobrenadante	1 ml	1 ml	1 ml	-
S. estándar de fosfato	-	-	-	1 ml
ANSA	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Los tubos se mantienen 20 minutos a temperatura ambiente y se realiza la lectura colormétrica a 660 nm. El cero se ajusta con el ciego y se lee la D.O. correspondiente a cada tubo.

c) Cálculos

La actividad de la glucosa 6-Pasa se expresa en nmoles de fosfato liberados $\times \text{min}^{-1} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido fresco.

Para el cálculo se tienen en cuenta las diluciones sufridas por el proceso de modo que se hace según lo siguiente:

$$\text{nmoles} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1} = \frac{(\text{D.O.}_M - \text{D.O.}_{BI})}{\text{D.O.}_{St}} \times 0,5 \times 2,2 \times \frac{1000}{15 \times V \times 25}$$

Siendo:

D.O._M = Densidad óptica del problema

D.O._{BI} = Densidad óptica del blanco

D.O._{St} = Densidad óptica del estándar de fosfato

0,5 = μmoles de fosfato existente en un 1 ml de solución estándar de fosfato

2,2 = Volumen final del tubo en que se realiza la reacción enzimática

15 = Minutos que dura la reacción

1000 = Para expresar la actividad por gramo de tejido fresco

V = 0,1 ml de muestra homogenado

25 = mg de tejido fresco en 1 ml de homogenado

3.3.4.2. - Determinación de la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa

La determinación de la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa (LDH) ha sido realizada según el método de Bergmeyer y col. (165) cuyo fundamento es el siguiente:



a) Reactivos

Tampón fosfato 0,05 M, pH 7.5

Solución extemporánea de NADH 8×10^{-3} M

Solución extemporánea de Piruvato sódico 1×10^{-3} M

Extracto, obtenido según 3.3.3.2. y se ha hecho una dilución en tampón Tris- sacarosa 0,01 : 0,25 M, pH 7.4 al 1/100 antes de la determinación enzimática.

b) Técnica

Las cubetas se preparan con las soluciones antes citadas y en las cantidades siguientes:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	2,91ml	3.00 ml
Piruvato	0,10ml	0,10 ml
NADH	0,05ml	0,01 ml
Extracto	0.05ml	-

Las lecturas se hacen a 25°C y 340 nm. Se anotan los descensos del $\Delta E/\text{min}$, durante seis minutos.

c) Cálculos

La cantidad de lactato producido en nmoles por miligramos de proteína y minuto, expresa la actividad de esta enzima:

$$\text{nmoles} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1} = \frac{\Delta E \times V}{10^{-6} \times \xi \times d \times v \times P} \times 1000$$

ΔE = Valor medio del incremento de la D.O. en un minuto.

V = Volumen total de la cubeta.

$\xi = 6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2 / \text{mol}$ = coeficiente de extinción molar aproximado del NADH a 340 nm.

d = Espesor de la cubeta.

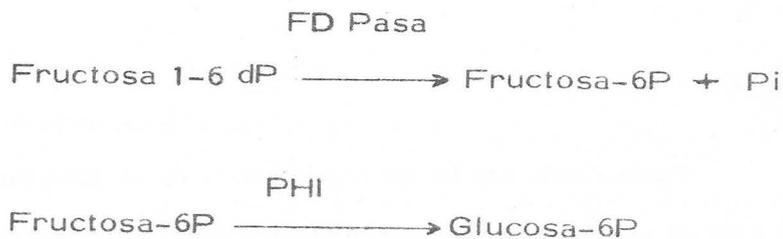
$v = 0.050 \text{ ml}$ de homogenado.

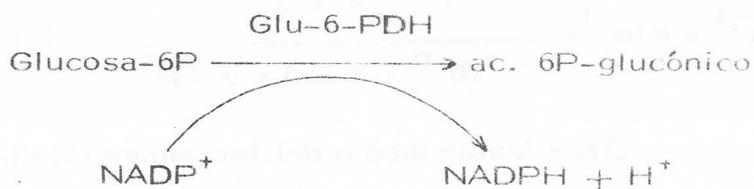
1000 = para expresarlo en nmoles.

P = mg de proteína x ml de homogenado.

3.3.4.3.- Determinación de la actividad enzimática de la fructosa 1-6 difosfatasa

La determinación de la actividad de la fructosa 1-6 difosfatasa se ha realizado según Mendicino (166). El método seguido está basado en tres reacciones enzimáticas en cadena, siendo la desencadenante la catalizada por la fructosa 1-6 difosfatasa y la última la catalizada por la glucosa-6-P deshidrogenasa ligada al sistema $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$. Estas reacciones son:





La aparición de NADPH seguido espectrofotométricamente a 340 nm nos va a referir cuantitativamente la actividad de la enzima desencadenante del proceso.

a) Reactivos

Tampón glicocola 0.04 M, pH 9.4

Solución de $\text{Cl}_2 \text{Mn}$ 0,5 mM

Solución extemporánea de NADP^+ 0,5 mM

Solución extemporánea de FDP 1 mM

Fosfohexosa isomerasa (E.C. 5.3.1.9) (PHI) 10 μl .
por determinación

Glucosa-6-P-deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.4.9) 20 μl .
por determinación

Homogenado obtenido según se refiere en la sección
3.3.3.2.

b) Técnica

Para cada serie de experiencias se preparan las siguientes cubetas con el contenido que a continuación se expresa:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón glicocola	2.72 ml	3.10 ml
Cl ₂ Mn	0.10 ml	-
FDP	0.10 ml	-
NADP	0.10 ml	-
PHI	0.01 ml	-
Glu-6-PDH	0.02 ml	-
Homogenado	0.05 ml	-

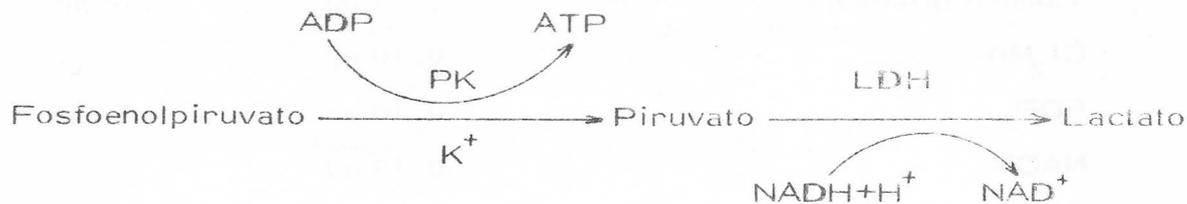
La determinación se hace a 340 nm y 25°C. Se anota el $\Delta E/\text{min.}$ de los seis primeros minutos de la reacción.

c) Cálculos

La actividad de la FDP-asa se expresa en nmoles de fructosa 6 P producidos por minuto y miligramo de proteína. Los cálculos se realizan de igual manera a los citados en la sección 3.3.4.2.

3.3.4.4. - Determinación de la actividad enzimática de la piruvato cinasa

La actividad de la piruvato cinasa ha sido determinada espectrofotométricamente midiendo la desaparición del NADH según el método descrito por Carbonelss (167).



a) Reactivos

- Tampón imidazol 0.2 M pH 7
- Solución de ClK 2 M
- Solución de Cl_2Mg 0.1 M
- Solución extemporánea de NADH 20 mM
- Solución extemporánea de PEP 0.1 M
- Solución extemporánea de ADP 0.1 M
- Lactico deshidrogenasa LDH (E. C. 1. 1. 1. 27.)

b) Técnica

Para cada serie de experiencias se preparan las siguientes cubetas con el contenido que a continuación se expresa

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	0.75 ml	3.10 ml
ClK	0.25 ml	-
NADH	0.10 ml	-
Cl_2Mg	0.15 ml	-
LDH	10 unidades	-
H_2O	1.50 ml	-
ADP	0.20 ml	-
Extracto	0.05 ml	-
PEP	0.10 ml	-

La reacción empieza con la adición del PEP, se anota el AE / min.

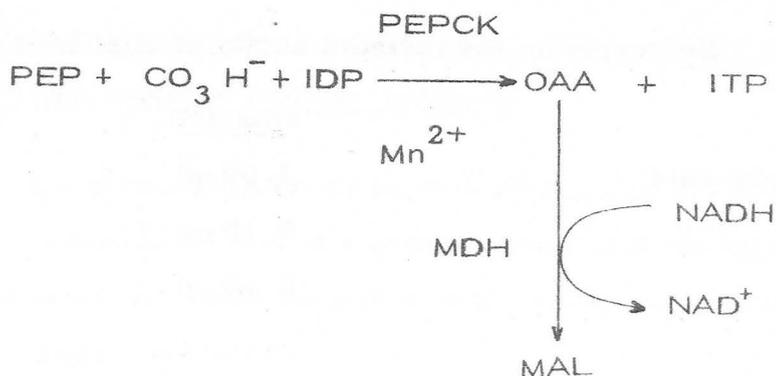
c) Cálculos

La actividad se expresa en μmoles de sustrato transformado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mgr}^{-1}$ de proteína.

3.3.4.5. - Determinación de la actividad enzimática de la fosfoenolpiruvato carboxilasa según el método espectrofotométrico

La determinación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa en la dirección carboxilante con el sistema málico deshidrogenasa $-\text{NAD}^+/\text{NADH}$ acoplado, se ha realizado por el método puesto a punto en nuestro Departamento por Pilar Antonio Oriola (168), descrito en su Tesina.

La carboxilación enzimática del PEP se realiza con CO_3HNa , utilizando IDP como nucleótido coenzimático y Cl_2Mn como efector. Para proteger los grupos $-\text{SH}$ de la enzima se adiciona el medio glutation reducido. El OAA formado se reduce a malato en presencia de NADH y málico deshidrogenasa.



a) Reactivos

Tampón Tris-Clorhídrico 0,01 M, pH 7.4

Tampón Fosfato sódico 0,01 M, pH 7.5

Tampón Tris-sacarosa 0,01 : 0,25 M, pH 7.4

Solución de Cl_2Mn 1 / 33 M

Solución extemporánea de fosfoenolpiruvato 1 / 33M

Solución extemporánea de IDP 1 / 33 M

Solución extemporánea de glutation reducido (GSH) 0,01 M

Solución extemporánea de CO_3HNa 0,1 M gaseada con carbógeno momentos antes de llenar las cubetas

Solución de CO_3HNa 0,1 M gaseada con carbógeno momentos antes de llenar las cubetas

Málico deshidrogenasa (MDH) (E.C. 1.1.1.37) dializada en 1/200 ml de tampón fosfato sódico 0,01M, pH 7.5 durante 12 horas.

Extracto obtenido según la sección 3.3.3.2 (al 1 / 10 en tampón Tris- sacarosa 0,01 : 0,25 M, pH 7.4)

b) Técnica

Se preparan las cubetas según el siguiente protocolo:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón Tris-ClH	1.00 ml	1.00 ml
Cl_2Mn	0.10 ml	0.10 ml
PEP	0.10 ml	0.10 ml

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
IDP	0.15 ml	0.15 ml
H ₂ O destilada	0.80 ml	0.90 ml
GSH	0.20 ml	0.20 ml
CO ₃ HNa	0.50 ml	0.50 ml
NADH	0.20 ml	0.15 ml
MDH	0.01 ml	0.01 ml
Extracto	0.05 ml	-

Todas las cubetas así preparadas se gasean por espacio de 1 minuto con CO₂ antes de la adición de la málico deshidrogenasa y el extracto. La lectura espectrofotométrica se hace a 340 nm y 30°C anotando el descenso de la densidad óptica por minuto por un espacio de seis minutos.

c) Cálculos

La actividad se expresa en moles de OAA producidos por minuto y mg de proteína. Los cálculos son similares a los descritos en la sección 3.3.4.2.

3.3.4.6. - Determinación de la actividad enzimática de la fosfoenolpiruvato carboxilasa según el método isotópico.

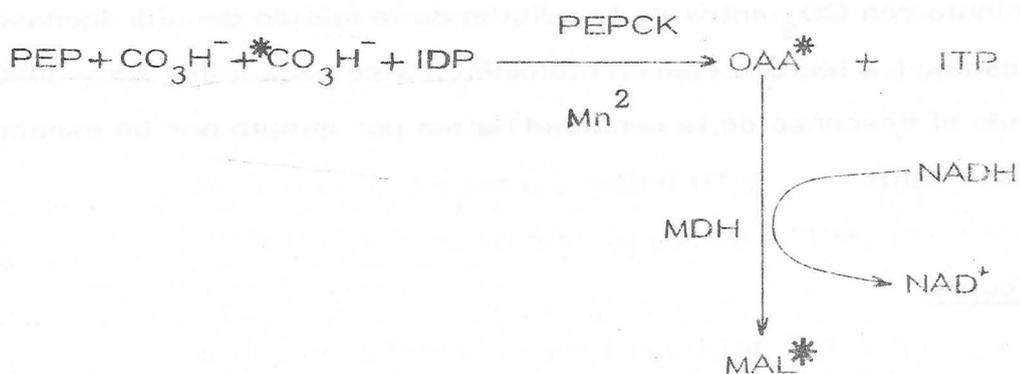
La determinación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa en la dirección carboxilante con el sistema málico deshidrogenasa -NAD⁺/NADH acoplado se ha realizado por el método isotópico modificación (169) parcial de Chang y Lane (170).

La carboxilación enzimática del PEP se realiza con bi-

carbonato sódico $\frac{\text{CO}_3 \text{HNa}}{^{14}\text{CO}_3 \text{HNa}}$: $\frac{3}{2}$ utilizando IDP como nucleótido

coenzimático y Cl_2Mn como efector.

El OAA formado se reduce a malato en presencia de NADH y málico deshidrogenasa. La radiactividad incorporada en este último se mide en un contador de centelleo líquido.



a) Reactivos

Tampón Imidazol 1 M, pH 6.6

Solución de Cl_2Mn 0,02 M

Acido Tricloroacético al 10 %

Solución extemporánea de IDP 25 mM

Tampón Tris-sacarosa 0.05: 0.25 M, pH 7.0

DTT

$\text{CO}_3 \text{HNa}$

$^{14}\text{CO}_3 \text{HNa}$ comercial

NADH

PEP

Málico deshidrogenasa comercial

Líquido de centelleo:

Tolueno	500 ml
PPO	3.125 g
POPOP	0.3 g

b) Técnica

El extracto se obtiene según la sección 3.3.3.3. (al 1/20 en tampón Tris- sacarosa 0.05 : 0.25 M pH 7.0).

La reacción se realiza en tubos de ensayo dispuestos en un baño a 37°C con agitación. Es necesario preparar por cada muestra dos tubos y dos blancos.

Se prepara un cocktail del cual se adicionan 0.9 ml a cada cubeta, y que lleva todos los reactivos, excepto el IDP, en las siguientes cantidades: Tampón Imidazol 100 μ moles, Cl_2Mn 2 μ moles, DTT 3.8 μ moles, CO_3H^- 30. μ moles, $^{14}\text{CO}_3\text{H}^-$ 20 μ moles, NADH 2.5 μ moles, PEP 1.5 μ moles MDH 2 unidades, todo ello en un volumen de 23 ml.

Los reactivos se adicionan a la cubeta de la siguiente forma:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
agua destilada	-	0.05 ml
IDP	0.05 ml	-
cocktail	0.90 ml	0.90 ml
Se mantienen en el baño a 37°C, bajo campana, durante unos minutos.		
Extracto	0.05 ml	0.05ml

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Se incuban durante 10 minutos exactamente medidos en el baño con agitación a 37°C. La reacción se para por adición de		
Acido Tricloroacético 10 %	0.50 ml	0.50 ml

Paralelamente se han preparado dos estándares en seridos viales según el siguiente protocolo:

Cocktail	0.05 ml
Líquido de centelleo	10 ml
Etanol absoluto	2.5 ml
Hidroxido de Hiamina	0.05 ml

Los tubos donde se ha producido la reacción se gasean con CO₂ durante tres minutos con abundante burbujeo, en cabina de gases, para desprender el exceso de bicarbonato.

A continuación se centrifugan a 2.500 r.p.m. durante diez minutos. Del sobrenadante se toman 0.5 ml y se llevan a un vial. Se desecan en vacío hasta un volumen aproximado de 0.2 ml.

Se preparan a continuación los viales según el siguiente protocolo:

Muestra desecada	0.2 ml
Líquido de centelleo	10 ml
Etanol absoluto	2.5 ml

Se agitan los viales y se mide su radiactividad en un contador de centelleo líquido.

c) Cálculos

La actividad de la enzima se expresa en μmoles de OAA producidos por minuto y por miligramo de proteína.

$$\mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ de proteína} = \frac{(\text{Dpm muestra} - \text{Dpm blanco}) \times 1.5 \times 2.775}{\text{Dpm estándar} \times \text{mg proteína} \times 0.5 \times 0.05 \times 10}$$

Dpm = Desintegración por minuto

2.775 = μmoles de $^{14}\text{CO}_3\text{H}^-$ en el estándar

1.5 = Volumen final del medio de reacción

0.5 = Volumen del medio de reacción llevado al vial

0.05 = Volumen del extracto utilizado

10 = Tiempo de reacción en minutos.

3.3.5.- Tratamiento de la sangre para la determinación de metabolitos

La sangre fué extraída de la aorta abdominal de ratas anestesiadas con pentobarbital sódico $60 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ de peso ó con eter etílico, con una jeringa heparinizada.

Se toman 0.5 ml y se desnaturalizan con 4 ml de ácido perclórico al 2 % (V/V)

Posteriormente se centrifuga la muestra y se neutraliza con indicador universal interno.

3.3.6. - Determinación de metabolitos en sangre

3.3.6.1. - Determinación de glucosa en sangre

De la muestra preparada como se indica en la sección 3.3.5 se toman 0.2 ml y se completa hasta 1 ml con agua destilada.

La determinación se realiza como se indicó en la sección 3.3.2.1.

Los resultados se expresan en μ moles de glucosa existentes en 1 ml de sangre.

3.3.6.2. - Determinación de lactato en sangre

La obtención y tratamiento de las muestras se ha descrito anteriormente, sección 3.3.5.

La cantidad de lactato se determina observando espectrofotométricamente la formación de NADH paralela al consumo de lactato por la lactico deshidrogenasa a pH 9.5. El procedimiento ha sido descrito por Hohorst y col (171).



a) Reactivos

Tampón Hidrazina: glicocola 0.9 M, pH 9.5

Solución extemporánea de NAD al 0.5%

Lactato deshidrogenasa (LDH) (E. C. 1.1.1.27) comercial.

b) Técnica

Las cubetas se preparan con las siguientes cantidades de reactivos:

	<u>Problema</u>	<u>Control</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	1.50 ml	1.50 ml	1.50 ml
NAD ⁺	0.40 ml	0.40 ml	0.40 ml
Muestra	0.20 ml	-	-
Agua destilada	1.00 ml	1.20 ml	1.20 ml
LDH	0.01 ml	0.01 ml	-

El curso de la reacción es detectado espectrofotométricamente midiendo a 340 nm el ΔE debido a la formación de NADH.

c) Cálculos

Los μmoles de L-lactato por ml de sangre, vienen dados por la expresión:

$$\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1} \text{ de sangre} = \frac{(\Delta E - \Delta \phi) \times V}{10^{-6} \times \epsilon \times d \times v} \times F_1 \times F$$

siendo:

$(\Delta E - \Delta \phi)$ medida del incremento de densidad óptica

V = volumen de la cubeta

ϵ = coeficiente de extinción molar aproximado del NADH.

d = espesor de la cubeta

v = volumen de la muestra

F_1 = factor de neutralización

F = factor de dilución

3.3.6.3. - Determinación de 3-hidroxiacetato en sangre

Se ha utilizado el método enzimático descrito por D. H. Williamson y J. Mellanby (1972), consistente en la oxidación de 3-hidroxiacetato por la enzima 3-hidroxiacetato deshidrogenasa (3-HADH) y NAD.



En presencia de hidrazina el acetoacetato que va formándose es eliminado del medio de reacción en forma de hidrazona y la reacción ocurre cuantitativamente de izquierda a derecha.

a) Reactivos

Tampón Tris 0,1 M, pH 8,5

Tampón Tris-hidrazina pH 8,5

Se prepara mezclando 1 ml de hidrato de hidrazina, 20 mg de EDTA - $\text{Na}_2\text{H}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$, 5 ml de ClH 1N y 14 ml de tampón tris 0,2M. Debe prepararse cada día.

Solución β -NAD 14 mM

3-Hidroxiacetato deshidrogenasa (3-HADH)

E. C. 1.1.1.30

b) Técnica

Se preparan las cubetas siguiendo el protocolo:

	<u>Muestra</u>	<u>Control</u>	<u>Blanco</u>
Tampón Tris-			
hidrazina	1 ml	1 ml	1 ml
Solución NAD	0.1 ml	0.1 ml	--
Muestra	2.0 ml	--	--
H ₂ O	--	2 ml	2 ml
3-HBDH	0.010 ml	0.010 ml	--

Se mide el cambio de extinción a 340 nm y temperatura ambiente hasta estabilización.

c) Cálculos

Las cantidades de 3-hidroxiacetato se expresan en μ moles existentes en 1 ml de sangre.

3.3.6.4. - Determinación de acetoacetato en sangre

El acetoacetato se ha determinado por reducción enzimática a 3-hidroxiacetato mediante la enzima 3-hidroxiacetato deshidrogenasa según el método de S. Mellanby y D.H. Williamson descrito en la sección anterior.

a) Reactivos

Tampón fosfato 0.1 M; pH 7.0

Solución de β -NADH 6 mM

3-Hidroxiacetato deshidrogenasa (3-HBDH)

(E.C. 1.1.1.30)

b) Técnica

Pipetear en las cubetas:

	<u>Muestra</u>	<u>Control</u>	<u>Blanco</u>
Tampón fosfato	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
NADH	0.1 ml	0.1 ml	0.05 ml
Muestra	2.0 ml	--	--
H ₂ O	--	2.0 ml	2.0 ml
3-HBDH	0.010 ml	0.010 ml	--

El descenso de extinción debido a la oxidación del NADH es proporcional a la cantidad de acetoacetato presente. Medir a 340 nm y a temperatura ambiente.

c) Cálculos

Los cálculos son iguales a los de la sección

Los valores obtenidos se expresan en μ moles de acetoacetato por ml de sangre.

3.3.7. - Determinación enzimática de las concentraciones "in vivo" de metabolitos intermediarios del proceso gluconeogénico.

3.3.7.1. - Tratamiento de los tejidos. Técnica del congelado instantáneo

Ha sido demostrado que la concentración de ciertos metabolitos varía entre otros motivos con la duración de la muerte del animal, debido a que no se paran los sistemas enzimáticos e incluso algu-

nos de ellos se inducen por la situación de estrés producida en los momentos que preceden inmediatamente a la muerte. Para sorprender las concentraciones de los metabolitos lo más cercano posible al estado "in vivo" se ha empleado la técnica del "congelado instantáneo" (173, 174).

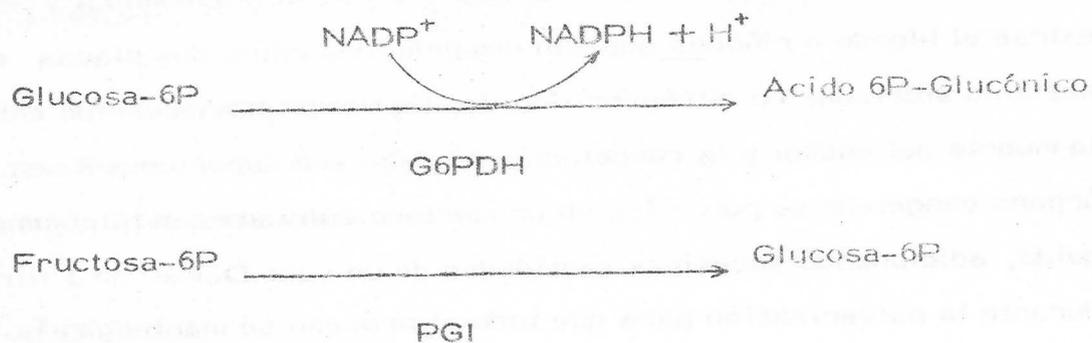
En el "congelado instantáneo" se mata la rata por dislocación cervical. Rápidamente se práctica una incisión abdominal y se extrae el hígado o riñones que son comprimidos entre dos placas de aluminio enfriadas en nitrógeno líquido. El tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la congelación no debe ser superior a 8 seg. El órgano congelado se pulveriza en un mortero enfriado con nitrógeno líquido, adicionando sucesivas cantidades de un vaso Dewar de 1 litro durante la pulverización para que todo el proceso se mantenga a la temperatura del nitrógeno líquido.

El polvo al que ha quedado reducido el órgano se pesa por diferencia en un tubo de centrifuga, se añade en la proporción 1:4 (p:v) ácido perclórico al 2% y se homogeniza en un Potter-Elvehjem mecánico vinilo-vidrio.

El homogenizado se centrifuga a 30.000 x g y 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante es decantado y se neutraliza con KOH al 20%, en frío, hasta pH 3.5 visualizado con el indicador interno naranja de metilo. Se vuelve a centrifugar para eliminar el precipitado de ClO_4K formado. El sobrenadante formado se emplea en la determinación de los metabolitos. Se conserva congelado y no se debe descongelar-congelar más de una vez.

3.3.7.2. - Determinación enzimática de glucosa 6P y fructosa 6P

La observación de la cantidad de glucosa-6P y fructosa-6P de una muestra preparada según 3.3.7.1. se ha hecho espectrofotométricamente por la formación de NADPH paralela a la oxidación de glucosa-6P y fructosa-6P seguida a la adición de glucosa 6P-deshidrogenasa (G6PDH) y fosfoglucosa isomerasa (PGI) a pH 7.6 según el método de H. Klotzsch (175).



a) Reactivos

- Tampón Trietanolamina 0,4 M, pH 7.6.
- Solución de Cl₂Mg 0,5 M
- Solución extemporánea de NADP 2 x 10⁻² M
- Glucosa-6P deshidrogenasa (E.C. 11.1.4.9) comercial.
- Fosfoglucosa isomerasa (E.C. 5.3.1.9) comercial
- Muestra: preparada según la sección

b) Técnica

Se preparan las cubetas con el siguiente contenido:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	1.00 ml	2.50 ml
NADP	0.01 ml	--
Cl ₂ Mg	0.01 ml	--
Muestra	1.50 ml	--
G6PDH	0.01 ml	--
PGI	0.01 ml	--

La lectura se hace a 340 nm y temperatura ambiente. El ΔE_1 aparecido tras la adición de G6PDH corresponde a la glucosa-6P de la muestra. el ΔE_2 seguido de la adición de PGI corresponde a la fructosa-6P de la misma muestra.

c) Cálculos

La concentración de glucosa-6P y fructosa-6P se ha expresado en μ moles por gramo de tejido fresco.

$$\mu\text{moles/g de tejido fresco} = \frac{\Delta E \times 2.5}{\epsilon \times 10^{-6} \times V} \times F.n. \times \frac{V_t}{P}$$

donde:

ΔE = incremento de la densidad óptica

2.5 = volumen total de la cubeta

6.22×10^6 = coeficiente de extinción molar en $\text{cm}^2/\text{M} = \epsilon$

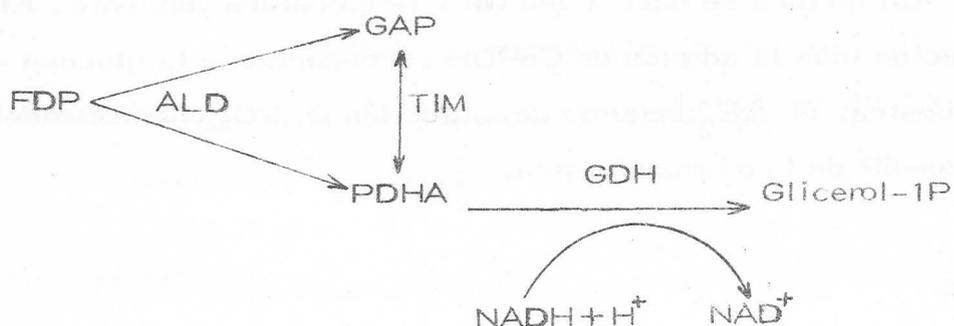
V = ml de muestra neutralizada

V_t = volumen total del extracto ácido = volumen inicial de neutralización
+ peso en gramos de tejido $\times 0.75$.

P = peso en gramos de tejido fresco.

3.3.7.3. - Determinación enzimática de fosfodihidroxiacetona, gliceraldehído-3-fosfato y fructosa 1-6 difosfato,

Los tres metabolitos, fosfodihidroxiacetona (PDHA), gliceraldehído-3 fosfato (GAP) y fructosa 1-6 difosfato (FDP), se han observado en la misma determinación espectrofotométrica según el método de T. Bücher (176) con el fundamento siguiente:



a) Reactivos

Tampón Trietanolamina 0,4 M, pH 7.6
Solución extemporánea de NADH 5×10^{-3} M
Glicerol-1P deshidrogenasa (GDH) (E.C. 1.1.1.8) comercial
Triosafosfato isomerasa (TIM) (E.C. 5.3.1.1.) comercial
Aldolasa (ALD) (E.C. 4.1.2.7.) comercial.

b) Técnica

Se han preparado cubetas con el siguiente protocolo:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	1.00 ml	2.50 ml
NADH	0.02 ml	--
Muestra	1,50 ml	--
GDH	0.01 ml	--
TIM	0.01 ml	--
ALD	0.01 ml	--

La lectura se ha realizado a 340 nm y temperatura ambiente. Los tres ΔE obtenidos seguidos a la adición sucesiva de GDH, TIM, y ALD corresponden respectivamente a la PDHA, GAP y FDP existente en la muestra.

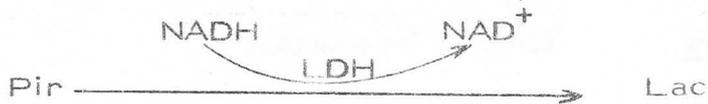
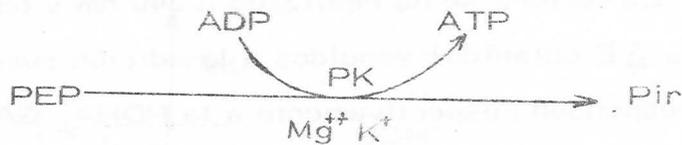
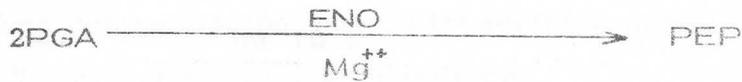
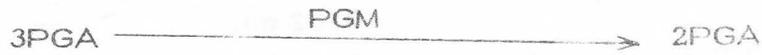
c) Cálculos

Se expresa en μ moles de metabolito transformado por gramo de tejido fresco. Hay que tener en cuenta que por cada FDP se consumen 2 de NADH. Los cálculos son iguales a los de la sección 3.3.7.2.

3.3.7.4. - Determinación enzimática de piruvato, fosfoenolpiruvato, 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato

El análisis de piruvato (Pir), fosfoenolpiruvato PEP, 2-fosfoglicerato (2PG) y 3-fosfoglicerato (3PG) se ha realizado en una sola determinación escalonada, según el método de Bergmeyer y col (177).

El fundamento es el siguiente:



a) Reactivos

Tampón trietanolamina 0,4 M, pH 7.6

Solución de ClK 2 M

Solución de SO₄ Mg 0,5 M

Solución extemporánea de ADP 0.01 M

Solución extemporánea de 2-3 dPG 0.01 M

Solución extemporánea de NADH 5×10^{-3} M

Fosfogliceromutasa (PGM) (E.C. 2.7.5.3.) comercial

Enolasa (ENO) (E.C. 4.2.1.11.) comercial

Piruvato cinasa (PK) (E.C. 2.7.1.40) comercial

L-lactato deshidrogenasa (LDH) (E.C. 1.1.1.27) comercial.

b) Técnica

El protocolo seguido en la preparación de las cubetas ha sido:

	<u>Muestra</u>	<u>Bianco</u>
Tampón	0.50 ml	2.64 ml
CIK	0.20 ml	--
SO ₄ Mg	0.10 ml	--
ADP	0.20 ml	--
2-3 dPG	0.05 ml	--
NADH	0.05 ml	--
Muestra	1.50 ml	--
LDH	0,01 ml	--
PK	0.01 ml	--
Eno	0.01 ml	--
PGM	0.01 ml	--

Los ΔE encontrados en la determinación espectrofotométrica a 340 nm y temperatura ambiente, seguidos a la adición de los enzimas por el orden de protocolo y esperando siempre que se consuma el NADH correspondiente a cada metabolito antes de añadir el siguiente enzima, corresponde a :

ΔE_1	piruvato
ΔE_2	fosfoenolpiruvato
ΔE_3	2-fosfoglicerato
ΔE_4	3-fosfoglicerato

c) Cálculos

Se expresan en μ moles de metabolito existente en un gramo de tejido fresco, según lo citado en la sección 3.3.7.2.

3.3.7.5. - Determinación enzimática de L-malato

El L-malato se ha determinado oxidándolo enzimáticamente a oxalacetato mediante la enzima málico deshidrogenasa a pH 9,5 según ha descrito H. J. Hohorts (178).



a) Reactivos

Tampón Hidrazina-Glicocola 0.9:1 M pH 9,5

Solución extemporánea de NAD^+ 5×10^{-2} M

L-Malato deshidrogenasa (MDH) (E.C. 1.1.1.37)

comercial

b) Técnica

Las cubetas han sido preparadas con las siguientes cantidades de reactivos.

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	1.50 ml	1.50 ml
NAD	0.10 ml	--
Agua destilada	--	1.00 ml
Muestra	1.00 ml	--
MDH	0.01 ml	--

La determinación espectrofotométrica se realiza a 340 nm y temperatura ambiente anotando el ΔE debido a la formación del NADH paralelo al consumo de malato.

c) Cálculos

La cantidad de malato existente se expresa en μ moles de malato transformado por g de tejido fresco.

3.3.7. 6. - Determinación enzimática de L-aspartato

El L-aspartato se ha determinado enzimáticamente, transformándolo en oxalacetato por la glutamato-oxalacetato transaminasa y posterior reducción de este a malato por la L- malato deshidrogenasa según ha descrito Kojima (179)



a) Reactivos

Tampón fosfato 67 mM pH 7.2

Solución extemporánea de NADH 12 mM

α -Ceto glutarato 0.1 M

L-Malato deshidrogenasa (MDH) (E. C. 1. 1. 1. 37)

Glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) (E. C. 2. 6. 1. 1.)

b) Técnica

Las cubetas han sido preparadas con las siguientes cantidades de reactivo.

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	2.50 ml	3.1 ml
Muestra	0.50 ml	--
NADH	0.05 ml	--
α -KG	0.10 ml	--
MDH	0.01 ml	--
GOT	0.02 ml	--

La determinación espectrofotométrica se realiza a 340 nm y temperatura ambiente, anotando el ΔE debido al consumo de NADH paralelo al de OAA, formado en la reacción de transaminación.

c) Cálculos

Las cantidades de aspartato existentes se expresan en $\mu\text{moles} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido fresco.

3.3.7.7. - Determinación enzimática de L-lactato

El L-lactato se determina enzimáticamente oxidándolo con NAD mediante el enzima lactato deshidrogenasa (LDH) a pH 9.5 según ha descrito K. Gawehn (180).



a) Reactivos

Tampón hidrazina-glicocola 0.9:1 M, pH 9.5

Solución extemporánea de NAD al 0.5 %

Lactato deshidrogenasa (LDH) (E.C. 1.1.1.27)

b) Técnica

Las cubetas han sido preparadas con las siguientes cantidades de reactivos:

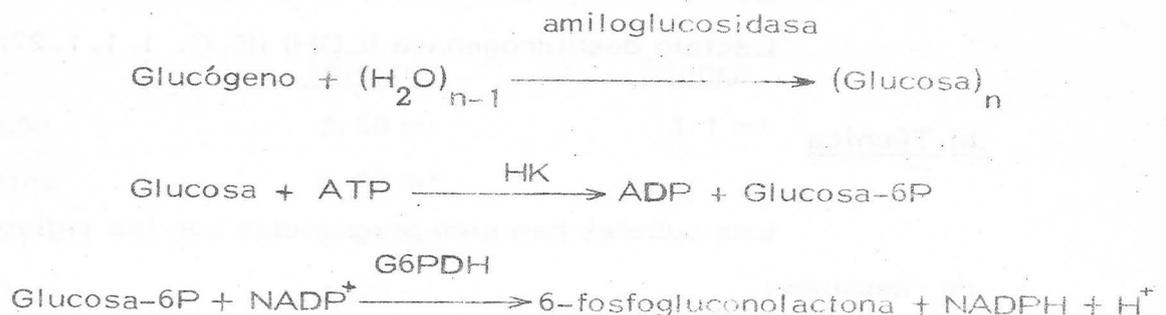
	<u>Muestra</u>	<u>Control</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	1.50 ml	1.50 ml	1.50 ml
NAD	0.40 ml	0.40 ml	0.20 ml
Agua destilada	0.10 ml	0.60 ml	0.80 ml
Muestra	0.50 ml	--	--
LDH	0.02 ml	0.2ml	--

La determinación espectrofotométrica se realiza a 340 nm y temperatura ambiente anotando el ΔE debido al consumo de lactato paralelo a la formación de NADH.

3.3.8. - Determinación del contenido de glucógeno hepático

Se determina el glucógeno al estado de glucosa, después de hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa (181).

La enzima libera glucosa a partir de glucógeno hidrolizando las uniones α -D (1 - 4) y α -D (1 - 6). La enzima es específica lo que permite efectuar la hidrólisis en homogenados de órganos y de células sanguíneas sin necesidad de aislar el glucógeno. La glucosa formada es específicamente determinada con hexocinasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.



a) Reactivos

Solución de bicarbonato potásico 1M

Amiloglucosidasa comercial

Tampón acetato 0.2 M pH 4.8

Tampón Trietanolamina 0.3 M Tra, 4.05 mM SO_4Mg , pH 7.5

ATP

NADP^+

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) comercial

Hexokinasa (HK)

Acido perclórico 0.6 N

b) Técnica

1. Hidrólisis del glucógeno:

Se extrae rapidamente el hígado del animal y se pesa por diferencia en un tubo de centrifuga, se añade en la proporción 1:5P/V ácido perclórico 0,6 N e inmediatamente se homogeniza en un Potter Elvehjem mecánico vinilo-vidrio. A continuación se pipetea 0.2 ml de homogenado en un tubo de centrifuga y se conserva en baño de hielo. Esta alcuota se utiliza para la hidrólisis del glucógeno.

El resto del homogenado se centrifuga durante 15 minutos y después de neutralizar con CO_3HK sólido se toman 0.05 ml para determinar glucosa, constituyendo así el blanco que nos da la glucosa preexistente en el homogenado.

Para realizar la hidrólisis del glucógeno se incuban los 0.2 ml que tomamos del homogenado con 0.1 ml de bicarbonato potásico 1 M y 2 ml de una solución de amiloglucosidasa al 0.02% en tampón acetato, en un tubo de centrifuga tapado, con agitación a 46°C durante 2 horas. Se para la reacción con 1 ml de perclórico, se centrifugan los tubos y se toman 0.05 ml del sobrenadante para determinar la glucosa.

2. Determinación de glucosa:

Se prepara una cubeta para el blanco de glucosa y otra para el hidrolizado del glucógeno, siguiendo el protocolo descrito a continuación;

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco Clu.</u>	<u>Blanco</u>
Cocktail	2.000 ml	2.000 ml	
Muestra del hidrolizado	0.050 ml	-	-
Muestra inicial	-	0.050 ml	-
Hexocinasa	0.005 ml	0.005 ml	-
Agua destilada	-	-	2.055 ml

El cocktail se prepara disolviendo en tampón trietanol-
amina el ATP en concentración 1 mM / ml, el NADH en concentración
0.9 mM / ml y la G-6-PDH en concentración 5.0 ug / ml.

El curso de la reacción se sigue espectrofotométrica-
mente midiendo a 340 nm el ΔE debido a la formación de NADPH.

c) Cálculos

El glucógeno se expresa como $\mu\text{moles de glucosa} \times \text{gramo}^{-1}$
de tejido húmedo.

$$\mu\text{moles / g} = \frac{\Delta E_p \times 2.055 \times 3.3}{6.22 \times 10^6 \times 10^{-6} \times 0.05 \times 0.2} \times \frac{V_t}{P}$$

$$= \frac{\Delta E_b \times 2.055}{6.22 \times 10^6 \times 10^{-6} \times 0.05} \times \frac{V_t}{P}$$

Siendo:

ΔE_p = Medida del incremento de la densidad óptica
correspondiente al hidrolizado.

ΔE_b = Medida del incremento de la densidad óptica correspondiente al blanco de glucosa

2.055 = Volumen del medio de reacción (det. de glucosa)

3.3 = Volumen total del hidrolizado de glucógeno

6.22×10^6 Coeficiente de extinción molar del NADP^+ = ϵ

0.05 = Volumen de muestra en cubeta (det. de glucosa)

0.2 = Volumen del homogenado en el hidrolizado de glucógeno.

P = Peso en gramos de la muestra de hígado fresco

IV. - RESULTADOS

4.1. - EVOLUCION DE ALGUNOS PARAMETROS BIOQUIMICOS RELACIONADOS CON LA GLUCONEOGENESIS A LO LARGO DEL DIA.

Relativos datos bibliográficos que indican que la fosfoenolpiruvato carboxilasa posee diversas formas de actividad a lo largo del día tanto en elgado como en el hígado (192, 193, 194).

Las experiencias que se describen a continuación refieren por objeto conocer la evolución de la actividad de esta enzima en muestras de hígado de ratones de laboratorio al ser sometidos a diferentes condiciones experimentales, junto a las variaciones de la capacidad gluconeogénica hepática y de otros parámetros bioquímicos relacionados con la gluconeogénesis. Con ello se espera obtener información que permita seleccionar el momento más adecuado del día para realizar las experiencias relacionadas con el ejercicio.

Los animales utilizados para el estudio, fueron ratones de la raza Wistar, machos, con un peso promedio de 150 g y con un nivel de actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa hepática de 1.200 U/mg de proteína (195).

IV. - RESULTADOS

El presente estudio se realizó en un período de 12 días, los días 1 y 2 se utilizaron para la adaptación de los animales a la dieta y a las condiciones de alojamiento que se utilizarán durante el estudio. Los días 3 y 4 se utilizaron para la adaptación de los animales a las condiciones de alojamiento y a la dieta que se utilizarán durante el estudio. Los días 5 y 6 se utilizaron para la adaptación de los animales a las condiciones de alojamiento y a la dieta que se utilizarán durante el estudio.

Los días 7 y 8 se utilizaron para la adaptación de los animales a las condiciones de alojamiento y a la dieta que se utilizarán durante el estudio. Los días 9 y 10 se utilizaron para la adaptación de los animales a las condiciones de alojamiento y a la dieta que se utilizarán durante el estudio. Los días 11 y 12 se utilizaron para la adaptación de los animales a las condiciones de alojamiento y a la dieta que se utilizarán durante el estudio.

IV. - RESULTADOS

4.1. - EVOLUCION DE ALGUNOS PARAMETROS BIOQUIMICOS RELACIONADOS CON LA GLUCONEOGENESIS A LO LARGO DEL DIA.

Existen datos bibliográficos que indican que la fosfoenolpiruvato carboxicinasas presenta diversos grados de actividad a lo largo del día tanto en hígado como en riñón de rata (182, 183, 184).

Las experiencias que se describen a continuación tenían por objeto conocer la evolución de la actividad de esta enzima en nuestras condiciones experimentales, junto a las variaciones de la capacidad gluconeogénica renal y de otros parámetros bioquímicos relacionados con la gluconeogénesis. Con ello se esperaba disponer de una información que permitiera seleccionar el momento más adecuado del día para realizar las experiencias posteriores relacionadas con el ejercicio.

Los animales empleados para el estudio, fueron acondicionados en una habitación termostatazada a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ y con luz artificial que era encendida a las 7 y apagada a las 19 horas.

Se emplearon dos lotes de animales, el primero de los cuales tenía acceso a la comida a lo largo de todo el día, mientras que el segundo se separaba en jaulas aparte sin comida desde las 9 horas. Ambos lotes de animales tuvieron libre acceso al agua.

Se pudo constatar que prácticamente hasta las 12 horas, los animales que tenían acceso a la comida no ingerían absolutamente nada, y era a partir de esta hora cuando empezaban a comer algo, llegando a

a ingerir alrededor de 3 gramos de pienso a las 18 horas.

4. 1. 1. - Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas hepática y contenido en glucógeno

Los resultados obtenidos están expresados en la tabla I y gráfica 1, como puede observarse no hay diferencias significativas entre los dos lotes de animales empleados. La fosfoenolpiruvato carboxicinasas muestra un mínimo a las 10 h y su actividad va incrementándose a lo largo del día.

El contenido en glucógeno es máximo en las primeras horas, y mantiene un descenso continuo, que es mucho más acusado en los animales a los que se les había privado del acceso a la comida, llegando a haber diferencias significativas entre uno y otro lote a las 18 horas.

4. 1. 2. - Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y capacidad gluconeogénica de corteza renal de rata.

La fosfoenol-piruvato carboxicinasas de corteza renal de rata, muestra un mínimo de actividad a las 12 h, como puede verse en la tabla II y gráfica 1, aumentando posteriormente hasta valores superiores a los encontrados a primeras horas de la mañana.

El comportamiento en ambos lotes de animales no presenta diferencias significativas, si bien puede observarse que en el caso de animales sin acceso a la comida, se obtienen los valores más altos antes que en animales con acceso a ella.

TABLA I

Evolución de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática y del contenido hepático en glucógeno a lo largo del día, en ratas con libre acceso a la comida y en ratas privadas de alimento a partir de las 9 horas.

La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado \times minuto⁻¹ \times mg⁻¹ de proteína, se ha determinado por el método espectrofotométrico tal y como se describe en la sección 3.3.5.4. El contenido en glucógeno se expresa en nmoles de glucosa \times gramo⁻¹ de tejido fresco.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis. * $P < 0.05$ según el test de la t de Student, tomando como controles a los animales con acceso a la comida.

	PEPCK HEPATICA		GLUCOGENO	
	con acceso a la comida	sin acceso a la comida	con acceso a la comida	sin acceso a la comida
10 horas	12 \pm 2 (4)	13 \pm 2 (3)	149.7 \pm 11.0 (3)	151.2 \pm 12.1 (3)
12 horas	12 \pm 1 (3)	14 \pm 1 (3)	115.4 \pm 7.5 (3)	110.3 \pm 6.4 (3)
16 horas	18 \pm 2 (5)	20 \pm 2 (4)	70.1 \pm 5.6 (3)	43.8 \pm 15.1 (3)
18 horas	31 \pm 1 (5)	26 \pm 4 (3)	62.3 \pm 8.6 (3)	28.9 \pm 6.1 (3) *

GRAFICA N° 1

Evolución de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa de hígado y corteza renal de rata, de la capacidad gluconeogénica renal, del contenido hepático de glucógeno y del contenido de glucosa en sangre a lo largo del día, en ratas con libre acceso a la comida y en ratas privadas de alimento a partir de las 9 horas.

Los resultados están expresados igual que en las tablas I II y III.

Las líneas verticales representan el error estándar de la media en cada punto.

- PEPCK hepática
- PEPCK renal
- ★ Capacidad gluconeogénica renal
- Contenido hepático de glucógeno
- Contenido de glucosa en sangre.

GRAFICA Nº 1

CON ACCESO A LA COMIDA

SIN ACCESO A LA COMIDA

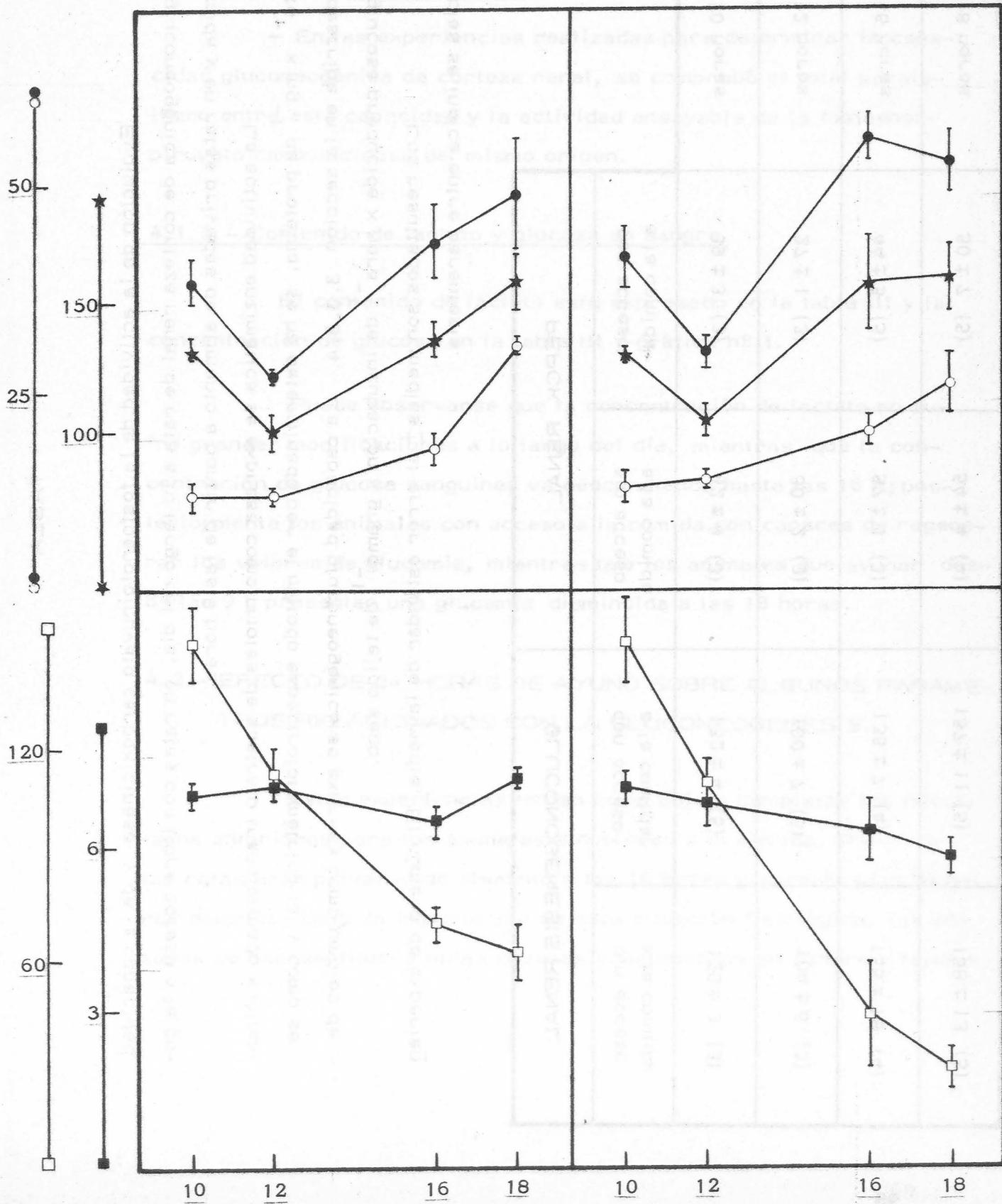


TABLA II

Evolución de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y de la capacidad gluconeogénica de corteza renal de rata a lo largo del día, en ratas con libre acceso a la comida y en ratas privadas de alimento a partir de las 9 horas.

La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformado x minuto⁻¹ x mg⁻¹ de proteína, se ha determinado por el método espectrofotométrico tal y como se describe en la sección 3.3.5.4. La capacidad gluconeogénica se expresa como μ moles de glucosa producida x hora⁻¹ de incubación x gramo⁻¹ de tejido seco.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre parentesis.

	PEPCK RENAL		GLUCONOGENESIS RENAL	
	con acceso a la comida	sin acceso a la comida	con acceso a la comida	sin acceso a la comida
10 horas	39 \pm 3 (3)	42 \pm 4 (3)	132 \pm 4 (5)	129 \pm 3 (3)
12 horas	27 \pm 1 (3)	30 \pm 2 (3)	100 \pm 7 (3)	104 \pm 6 (3)
16 horas	44 \pm 5 (5)	57 \pm 3 (3)	135 \pm 7 (4)	156 \pm 18 (4)
18 horas	50 \pm 7 (5)	54 \pm 4 (4)	157 \pm 11 (5)	158 \pm 13 (5)

En las experiencias realizadas para determinar la capacidad gluconeogénica de corteza renal, se comprobó el total paralelismo entre esta capacidad y la actividad ensayable de la fosfoenolpiruvato carboxicinas del mismo origen.

4.1.3. - Contenido de lactato y glucosa en sangre

El contenido de lactato está expresado en la tabla III y la concentración de glucosa en la tabla III y gráfica nº 1.

Puede observarse que la concentración de lactato no sufre grandes modificaciones a lo largo del día, mientras que la concentración de glucosa sanguínea va descendiendo hasta las 16 h; posteriormente los animales con acceso a la comida son capaces de regenerar los valores de glucemia, mientras que los animales que ayunan desde las 9 h presentan una glucemia disminuida a las 18 horas.

4.2. - EFECTO DE 24 HORAS DE AYUNO SOBRE ALGUNOS PARAMETROS RELACIONADOS CON LA GLUCONEOGENESIS.

Estas experiencias tenían como objeto completar los resultados anteriores para los animales sin acceso a la comida. Para ello las ratas eran privadas de alimento a las 10 horas y sacrificadas 24 horas después. Dada la importancia de esta situación fisiológica, los ensayos se han ampliado a otras enzimas y metabolitos en sangre y tejidos.

TABLA III

Evolución, a lo largo del día, del contenido de lactato y glucosa en sangre, en ratas con libre acceso a la comida y en ratas privadas de alimento a partir de las 9 horas.

Las concentraciones se expresan en $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$ de sangre.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

* $P < 0.02$ según el test de Student, tomando como controles a los animales con acceso a la comida.

	LACTATO		GLUCOSA	
	con acceso a la comida	sin acceso a la comida	con acceso a la comida	sin acceso a la comida
10 horas	1.973 \pm 0.330 (3)	2.123 \pm 0.116 (3)	7.131 \pm 0.270 (4)	7.236 \pm 0.316 (3)
12 horas	2.007 \pm 0.116 (3)	2.065 \pm 0.425 (3)	7.316 \pm 0.321 (3)	6.946 \pm 0.423 (3)
16 horas	2.620 \pm 0.340 (2)	2.818 \pm 0.345 (3)	6.615 \pm 0.301 (4)	6.392 \pm 0.677 (3)
18 horas	2.980 \pm 0.900 (3)	2.547 \pm 0.382 (3)	7.467 \pm 0.211 (4)	5.915 \pm 0.353 (3)*

TABLA IV

Efecto de un ayuno de 24 horas sobre las actividades de los enzimas, fructosa difosfatasa, piruvato cinasa, láctico deshidrogenasa y fosfoenol piruvato carboxicina de hígado de rata.

La actividad enzimática se expresa en $\text{nmoles} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se expresa entre paréntesis.

* $p < 0.001$ según el test de la t de Student.

	ALIMENTADAS	AYUNADAS
FDPasa	110 ± 11 (4)	104 ± 7 (4)
PK	369 ± 15 (3)	324 ± 37 (4)
LDH	3854 ± 502 (4)	4745 ± 336 (4)
PEPCK	14 ± 1 (10)	38 ± 3 (8) *

La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicina se ha determinado por el método espectrofotométrico, tal y como se describe en la sección 3.3.5.4.

4. 2. 1. - Actividad de la fructosa 1-6 difosfatasa, piruvato cinasa, láctico deshidrogenasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasa de hígado de rata.

Los resultados se encuentran expuestos en la tabla IV y gráfica nº 2. Puede observarse que solo la fosfoenolpiruvato carboxicinasa sufre un aumento significativo, mientras que la piruvato cinasa, fructosa 1-6 difosfatasa y láctico deshidrogenasa no sufren modificación.

4. 2. 2. - Actividad de la fructosa 1-6 difosfatasa, piruvato cinasa, láctico deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa y capacidad gluconeogénica de corteza renal.

Los resultados están expuestos en la tabla V, pueden observarse, al igual que en hígado, variaciones significativas en la fosfoenolpiruvato carboxicinasa que sufre un aumento del 175 %. La capacidad gluconeogénica también se incrementa aunque en menor proporción.

4. 2. 3. - Concentración en sangre de glucosa y de ácidos no volátiles.

Los resultados se exponen en la tabla VI y gráfica nº 3. Se observa que el ayuno de 24 horas produce un descenso significativo en los niveles de glucosa circulante.

Los niveles de ácido láctico sufren un ligero aumento no significativo, mientras que los cuerpos cetónicos (acetoacetato y 3-hidroxibutirato) sufren un aumento extraordinario.

TABLA V

Efecto de un ayuno de 24 horas sobre las actividades de los enzimas: fructosa 1-6 difosfatasa, piruvato cinasa, láctico deshidrogenasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasa, así como sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal de rata.

La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado x minuto⁻¹ x mg⁻¹ de proteína. La capacidad gluconeogénica se expresa en µmoles de glucosa producida x hora⁻¹ x gramo⁻¹ de tejido seco.

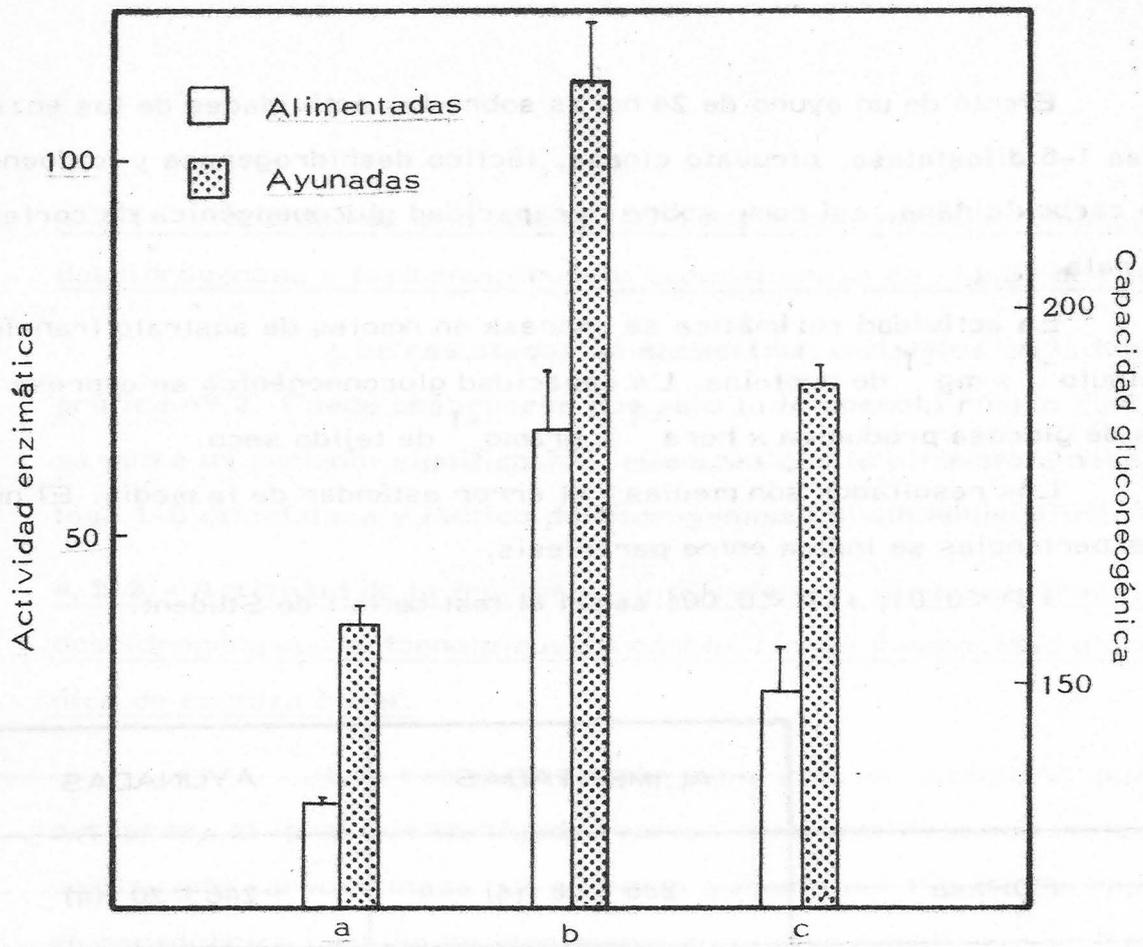
Los resultados son medias ± el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre parentesis.

* P < 0.01; ** P < 0.001 según el test de la t de Student.

	ALIMENTADAS	AYUNADAS
FDPasa	238 ± 28 (4)	246 ± 20 (4)
PK	204 ± 19 (4)	265 ± 40 (4)
LDH	3763 ± 775 (4)	4437 ± 605 (4)
PEPCK	64 ± 8 (7)	111 ± 11 (7) *
GNG renal	149 ± 6 (6)	190 ± 3 (6) **

La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa se ha determinado por el método espectrofotométrico, tal y como se describe en la sección 3.3.5.4..

GRAFICA N° 2



Efecto de 24 horas de ayuno sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de hígado y riñón y sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal de rata.

La actividad enzimática se expresa en $\text{nmoles} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína y la capacidad gluconeogénica como $\mu\text{moles de glucosa producida} \times \text{hora}^{-1} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido seco. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

- a) PEPCK hepática
- b) PEPCK renal
- c) Capacidad gluconeogénica renal

TABLA VI

Efecto de un ayuno de 24 horas sobre la concentración de glucosa, lactato, acetoacetato y 3-hidroxi butirato en sangre de rata.

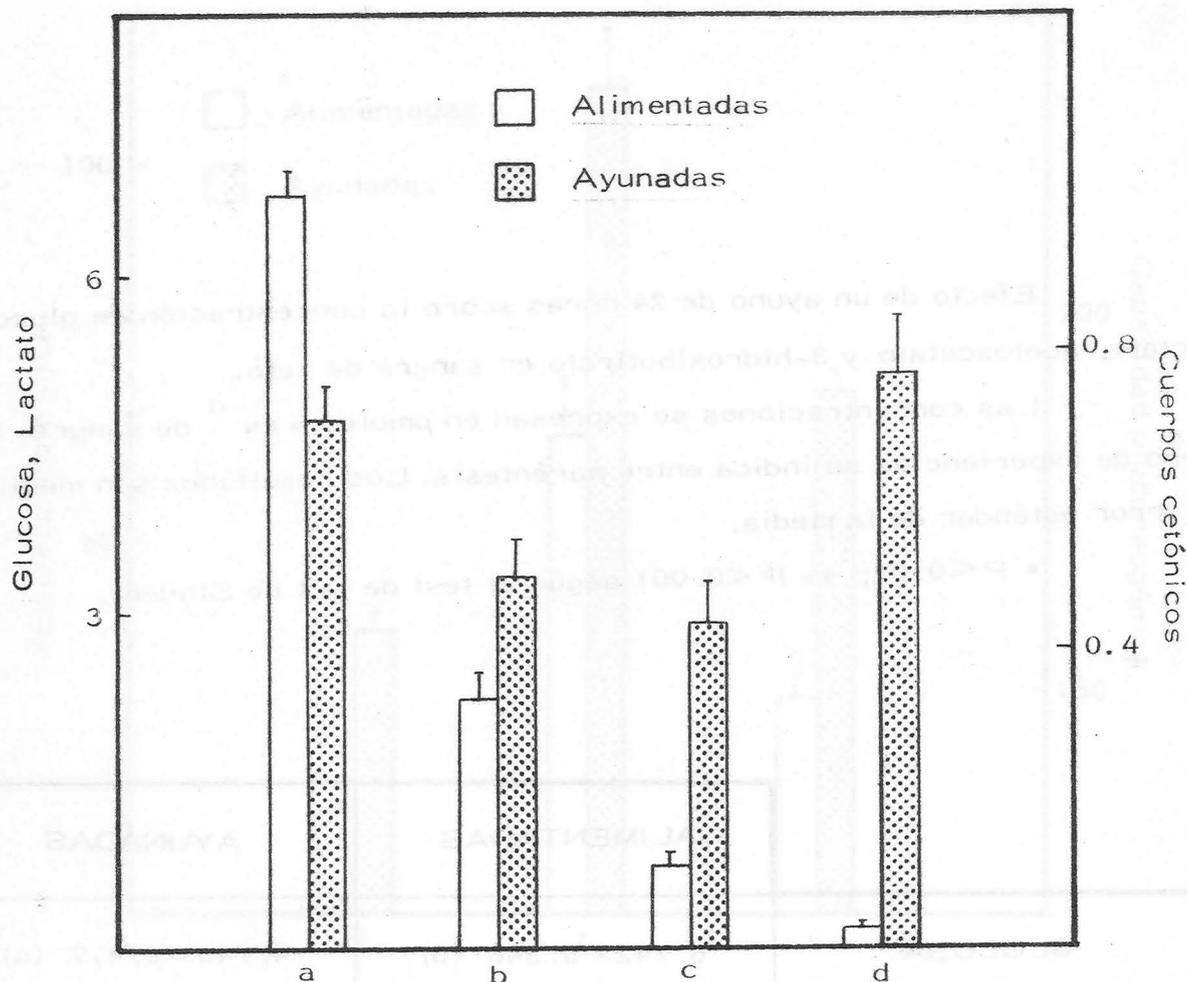
Las concentraciones se expresan en $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$ de sangre. El número de experiencias se indica entre paréntesis. Los resultados son medias \pm el error estándar de la media.

* $P < 0.02$; ** $P < 0.001$ según el test de la t de Student.

	ALIMENTADAS	AYUNADAS
GLUCOSA	6.742 ± 0.348 (6)	4.743 ± 0.477 (4) *
LACTATO	2.238 ± 0.325 (4)	3.320 ± 0.516 (9)
ACETOACETATO	0.109 ± 0.019 (9)	0.436 ± 0.058 (10) **
3-HIDROXIBUTIRATO	0.026 ± 0.008 (9)	0.773 ± 0.075 (10) **



GRAFICA Nº 3



Efecto de 24 horas de ayuno sobre la concentración de: glucosa, lactato, acetoacetato y 3-hidroxibutirato, en sangre.

Los resultados se expresan en $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$ de sangre.

a) Glucosa; b) Lactato; c) Acetoacetato; d) 3-Hidroxibutirato.

4.2.4. Concentración hepática de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis.

Los resultados se exponen en la tabla VII y gráfica nº 4. Destacan especialmente el descenso en las concentraciones tisulares de lactato y piruvato y el aumento en el 2-fosfoglicerato.

4.2.5. Concentración renal de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis.

Los resultados se exponen en la tabla VIII y gráfica nº 4. Se observa especialmente un gran descenso en 2-fosfoglicerato (que contrasta con lo que ocurre en hígado) y un incremento muy considerable en fosfoenolpiruvato y en hexosas fosfato.

TABLA VII

Efecto de un ayuno de 24 horas sobre la concentración de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en hígado de rata. Los resultados están expresados en $\mu\text{moles} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido fresco.

El \pm representa el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre parentesis.

LAC, indica lactato; PIR, piruvato; MAL, malato; PEP, fosfoenolpiruvato; 2PGA, 2 fosfoglicerato; 3PGA, 3 fosfoglicerato; TRP, triosas fosfato; FDP, fructosa 1-6 difosfato; F6P, fructosa 6 fosfato; G6P, glucosa 6 fosfato.

	ALIMENTADAS	AYUNADAS	Veces control
LAC	1.514 \pm 0.118 (7)	0.537 \pm 0.047 (6)	0.35
PIR	0.079 \pm 0.006 (7)	0.074 \pm 0.018 (6)	0.93
MAL	0.596 \pm 0.033 (7)	0.285 \pm 0.046 (6)	0.48
PEP	0.065 \pm 0.010 (6)	0.091 \pm 0.022 (5)	1.40
2PGA	0.053 \pm 0.007 (7)	0.117 \pm 0.034 (5)	2.20
3PGA	0.290 \pm 0.038 (7)	0.153 \pm 0.043 (4)	0.53
TRP	0.064 \pm 0.005 (7)	0.068 \pm 0.007 (5)	1.06
FDP	0.044 \pm 0.005 (7)	0.025 \pm 0.003 (6)	0.57
F6P	0.021 \pm 0.004 (6)	0.016 \pm 0.013 (3)	0.76
G6P	0.236 \pm 0.035 (7)	0.104 \pm 0.016 (5)	0.44

TABLA VIII

Efecto de un ayuno de 24 horas sobre la concentración de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en riñón de rata.

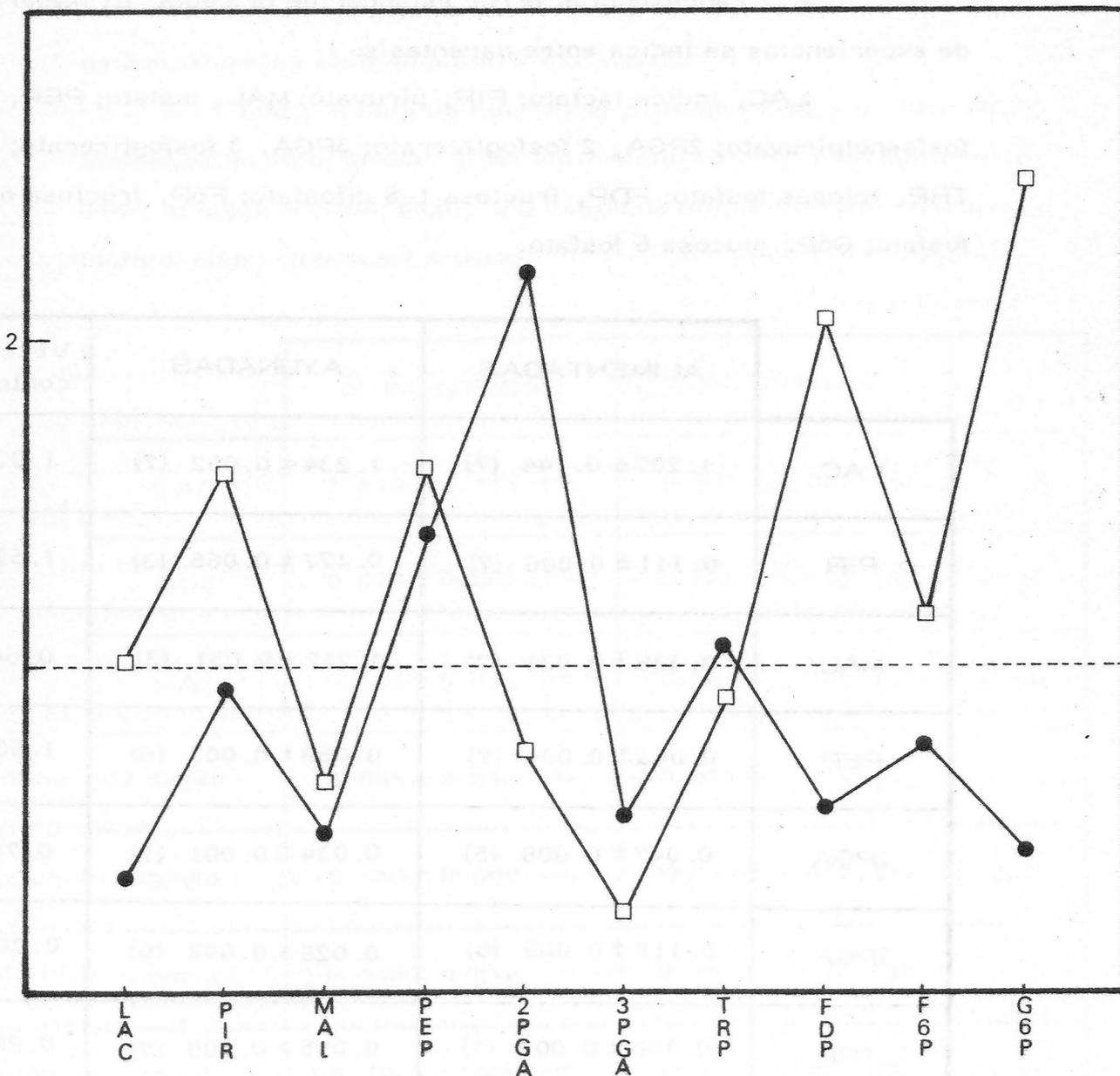
Los resultados están expresados en $\mu\text{moles} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido fresco.

El \pm representa el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre parentesis.

LAC, indica lactato; PIR, piruvato; MAL, malato; PEP, fosfoenolpiruvato; 2PGA, 2 fosfoglicerato; 3PGA, 3 fosfoglicerato; TRP, triosas fosfato; FDP, fructosa 1-6 difosfato; F6P, fructosa 6 fosfato; G6P, glucosa 6 fosfato.

	ALIMENTADAS	AYUNADAS	Veces control
LAC	1.207 \pm 0.144 (7)	1.234 \pm 0.082 (7)	1.02
PIR	0.111 \pm 0.006 (7)	0.177 \pm 0.065 (3)	1.59
MAL	0.338 \pm 0.031 (7)	0.217 \pm 0.051 (3)	0.64
PEP	0.043 \pm 0.004 (7)	0.069 \pm 0.003 (6)	1.60
2PGA	0.047 \pm 0.008 (5)	0.034 \pm 0.001 (7)	0.74
3PGA	0.113 \pm 0.009 (6)	0.028 \pm 0.002 (6)	0.24
TRP	0.106 \pm 0.007 (7)	0.095 \pm 0.009 (7)	0.90
FDP	0.031 \pm 0.004 (6)	0.062 \pm 0.005 (7)	2.22
F6P	0.013 \pm 0.001 (2)	0.015 \pm 0.004 (6)	1.15
G6P	0.023 \pm 0.005 (4)	0.057 \pm 0.004 (6)	2.48

GRAFICA Nº 4



Efecto de un ayuno de 24 horas sobre las concentraciones de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en hígado y riñón de rata. Los datos se expresan como múltiplos de valores controles.

● Hígado □ Riñón

4.3. - INFLUENCIA DE LA ACIDOSIS METABOLICA EN EL EFECTO DEL EJERCICIO SOBRE LA GLUCONEOGENESIS RENAL " IN VIVO "

En trabajos anteriormente realizados en el Departamento, se había puesto de manifiesto que la natación en agua a 22° C de temperatura llevaba consigo un aumento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y de la capacidad gluconeogénica de corteza renal de rata (48, 49, 185), muy probablemente debido a la acidosis metabólica producida por el ejercicio.

Las experiencias que se describen a continuación se han realizado con el fin de confirmar que el aumento en la capacidad gluconeogénica de corteza renal se corresponde con un mayor funcionamiento de este proceso durante el ejercicio y está estrechamente vinculada a la acidosis que se produce en estas circunstancias. Para ello se han utilizado dos lotes de animales, que se sometieron a distintos tiempos de natación, haciendo ingerir a las ratas del segundo lote 10 ml. de CO_3HNa 0.2 M 30 minutos antes de la realización del ejercicio con el fin de prevenir la acidosis.

De acuerdo con las experiencias reseñadas con anterioridad, el ejercicio se realizó desde las 10 h. hasta las 12 h. momento en que la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y la capacidad gluconeogénica renales son mínimas. Se han confirmado algunos datos obtenidos anteriormente en el Departamento y se han determinado los metabolitos intermediarios del proceso gluconeogénico en hígado y riñón. Las determinaciones se han ampliado a algunas enzimas no estudiadas o estudiadas solo preliminarmente con anterioridad y que tienen gran importancia en este proceso.

4.3.1. - Efecto del ejercicio sobre la concentración de lactato en sangre.

Estas medidas se han realizado con el único fin de corro-

borar los resultados obtenidos anteriormente en el Departamento (48) para los tiempos empleados en nuestras experiencias. Los resultados se describen en la tabla IX y gráfica nº 5, coincidiendo en general con aquellos.

4.3.2. - Efecto del ejercicio sobre la concentración de glucosa en sangre.

La concentración de glucosa en sangre en ratas ejercitadas, se ve aumentada en los primeros minutos del ejercicio, disminuyendo progresivamente hasta el final. En el caso de ratas sometidas a ejercicio y tratadas previamente con bicarbonato los valores iniciales son más bajos pero aumentan durante la natación. Los resultados se exponen en la tabla X y gráfica nº 5 .

4.3.3. - Efecto del ejercicio sobre la actividad de la piruvato cinasa de hígado de rata.

La determinación de esta enzima tiene interés porque puede anular "in vivo" la actuación de las enzimas gluconeogénicas fosfoenolpiruvato carboxicinasa y piruvato carboxilasa.

En experiencias realizadas anteriormente en nuestro Departamento (186) se había demostrado que la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática no se veía alterada por el ejercicio.

Los resultados expuestos en la tabla XI y gráfica nº 6 indican un aumento en la actividad de la piruvato cinasa que es máximo a los 90 minutos de iniciado el ejercicio. En cambio, no hay diferencias significativas en la actividad de la enzima a lo largo del ejercicio en el caso de animales tratados previamente con bicarbonato sódico.

4.3.4. - Efecto del ejercicio sobre la actividad de la piruvato cinasa de corteza renal de rata.

Los resultados están expresados en la tabla XII y gráfica nº 6. En el caso de las ratas sometidas a ejercicio, se encuentra, también, un au-

TABLA IX

Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la concentración de lactato en sangre, en ratas controles y en ratas a las que se había administrado 10 ml de CO_3H^- 200 mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Los resultados se expresan como $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$ de sangre.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

* $P < 0.01$ ** $P < 0.001$ según el test de la t de Student.

	EJERCICIO + CINA	EJERCICIO + CO_3H^-
0 minutos	2.214 \pm 0.120 (7)	2.105 \pm 0.237 (5)
15 minutos	7.800 \pm 0.884 (4)**	7.872 \pm 0.465 (5)**
30 minutos	4.800 \pm 0.471 (5)**	5.391 \pm 0.484 (5)**
60 minutos	3.083 \pm 0.439 (6)	4.342 \pm 0.342 (4)*
90 minutos	3.500 \pm 0.330 (5)*	2.539 \pm 0.288 (5)
120 minutos	2.851 \pm 0.173 (4)	2.231 \pm 0.383 (5)

TABLA X

Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la concentración de glucosa en sangre, en ratas controles y en ratas a las que se había administrado 10 ml de CO_3H^- 200mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Los resultados se expresan en $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$ de sangre.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

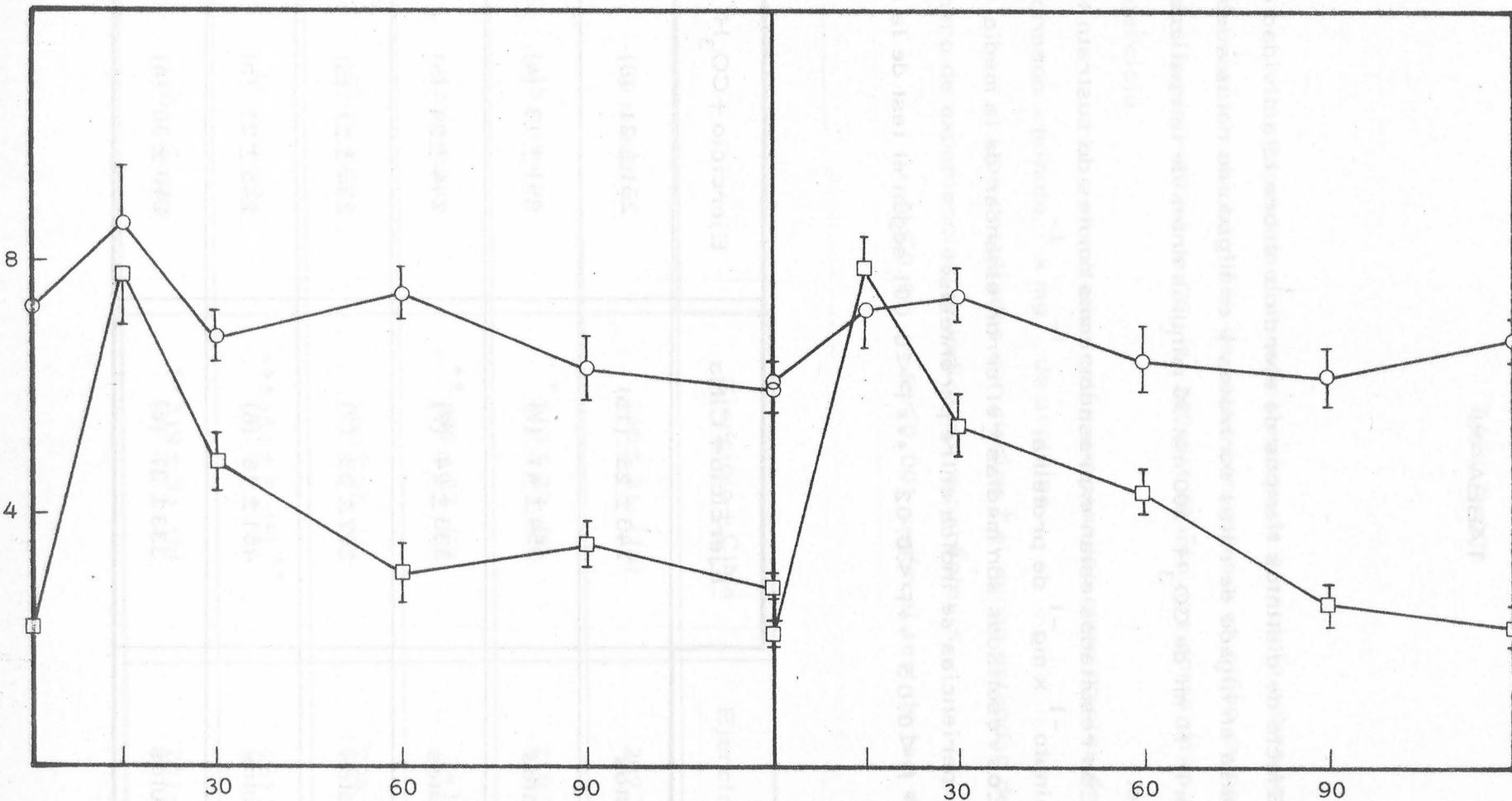
* $P < 0.05$ ** $P < 0.02$ según el test de la t de Student.

	Ejercicio + ClNa	Ejercicio + CO_3H^-
0 minutos	7.310 ± 0.451 (12)	6.075 ± 0.108 (5)
15 minutos	8.581 ± 0.892 (5)	7.237 ± 0.615 (5)
30 minutos	6.815 ± 0.386 (5)	7.453 ± 0.434 (5) **
60 minutos	7.562 ± 0.413 (7)	6.434 ± 0.522 (5)
90 minutos	6.295 ± 0.554 (6)	6.141 ± 0.464 (5)
120 minutos	5.998 ± 0.391 (8) *	6.772 ± 0.366 (4)

GRAFICA Nº 5

EJERCICIO + ClNa

EJERCICIO + CO₃H⁻



Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre las concentraciones de lactato y glucosa en sangre, en ratas controles y en ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO₃H⁻ 200 mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Las barras verticales representan el error estándar de la media.

○ Glucosa, □ Lactato.

TABLA XI

Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la actividad de la piruvato cinasa en hígado de ratas controles y en hígado de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO_3H^- 200 mM 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Los resultados estan expresados como nmoles de sustrato transformado $\times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

* $P < 0.05$ ** $P < 0.02$ *** $P < 0.001$ según el test de la t de Student.

	Ejercicio + CINA	Ejercicio + CO_3H^-
0 minutos	243 ± 25 (15)	231 ± 21 (8)
15 minutos	354 ± 41 (7) *	251 ± 13 (4)
30 minutos	333 ± 24 (7) **	244 ± 24 (5)
60 minutos	297 ± 33 (7)	254 ± 21 (5)
90 minutos	461 ± 16 (6) ***	245 ± 21 (5)
120 minutos	333 ± 21 (6) **	260 ± 36 (4)

TABLA XII

Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la actividad de la piruvato cinasa en riñón de ratas controles y en riñón de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO_3H^- 200 mM 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Los resultados están expresados como nmoles de sustrato transformado $\times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

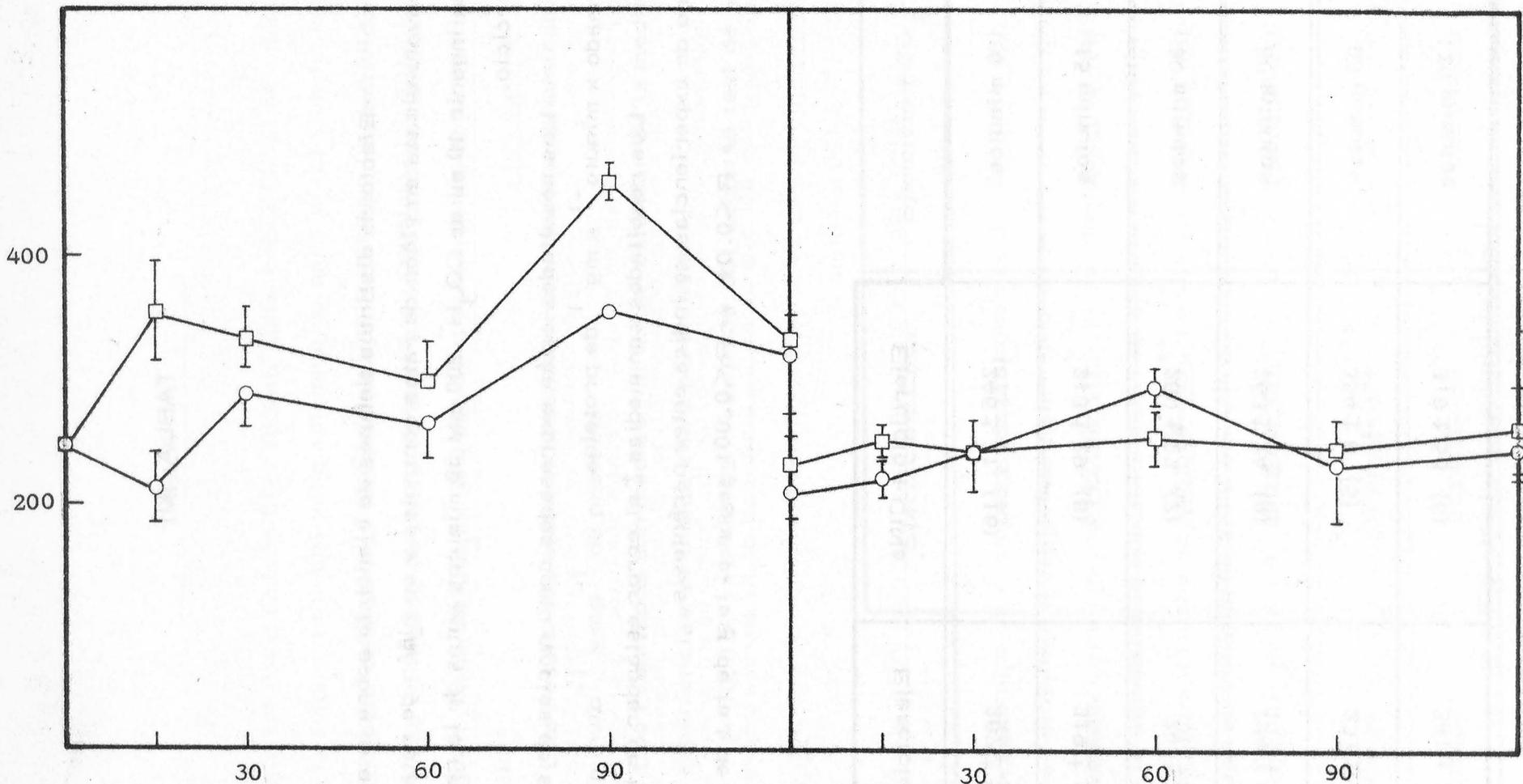
* $P < 0.01$ ** $P < 0.001$ según el test de la t de Student.

	Ejercicio + ClNa	Ejercicio + CO_3H^-
0 minutos	246 ± 21 (16)	207 ± 19 (8)
15 minutos	213 ± 29 (8)	219 ± 15 (5)
30 minutos	289 ± 27 (7)	243 ± 29 (5)
60 minutos	263 ± 24 (4)	294 ± 14 (5) *
90 minutos	354 ± 8 (5) **	231 ± 45 (5)
120 minutos	319 ± 53 (6)	241 ± 25 (5)

GRAFICA Nº 6

EJERCICIO + ClNa

EJERCICIO + CO_3H^-



Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la actividad de la piruvato cinasa de hígado y riñón de ratas controles y de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO_3H^- 200 mM 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Las barras verticales representan el error estándar de la media.

□ Hígado, ○ Riñón

mento en la actividad ensayable de esta enzima a los 90 minutos del comienzo del mismo. En el caso de animales previamente tratados con bicarbonato, se encuentra un aumento significativo en el valor de la piruvato cinasa a los 60 minutos del comienzo del ejercicio.

4.3.5. - Efecto del ejercicio sobre la actividad de la glucosa 6 fosfatasa de hígado de rata.

Los resultados se encuentran en la tabla XIII y gráfica nº 7; se observa que en el caso de ratas sometidas a ejercicio la actividad enzimática sufre un descenso paulatino, siendo este altamente significativo a los 120 minutos. Por el contrario, en los animales a los que se administró bicarbonato antes del ejercicio, la actividad de la enzima presenta claros incrementos a los 30 y 90 minutos, elevándose ligeramente por encima de este valor a los 120 minutos.

4.3.6. - Efecto del ejercicio sobre la actividad de la glucosa 6 fosfatasa de riñón de rata.

Los resultados encontrados se expresan en la tabla XIV y grafica nº 7. En el caso de ratas sometidas a ejercicio se observa un progresivo incremento en la actividad del enzima a lo largo del tiempo que dura el ejercicio. En el caso de ratas a las que previamente al ejercicio se les habia administrado bicarbonato sódico, se encuentra un comportamiento muy similar al de hígado, con un máximo a los 30 minutos de natación, un mínimo a los 60 y un aumento posterior llegando al máximo a los 120 minutos del comienzo del ejercicio.

4.3.7. - Efecto del ejercicio sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal de rata.

Los resultados están expuestos en la tabla XV y gráfica nº 8 y confirman en líneas generales los datos obtenidos previamente en el Departamento. (187).

TABLA XIII

Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la actividad de la glucosa 6 fosfatasa en hígado de ratas controles y en hígado de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO_3H^- 200 mM 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Los resultados se expresan como $\mu\text{moles} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido fresco.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ según el test de la t de Student.

	Ejercicio + ClNa	Ejercicio + CO_3H^-
0 minutos	10.40 ± 0.52 (11)	11.27 ± 0.90 (5)
15 minutos	12.07 ± 0.93 (7)	10.11 ± 0.60 (5)
30 minutos	10.88 ± 1.02 (7)	14.32 ± 1.18 (5)
60 minutos	10.78 ± 0.58 (6)	11.17 ± 0.66 (5)
90 minutos	8.82 ± 1.30 (6)	14.39 ± 0.81 (3) *
120 minutos	7.42 ± 0.60 (5) **	16.24 ± 1.03 (3) **

TABLA XIV

Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la actividad de la glucosa 6 fosfatasa en riñón de ratas controles y en riñón de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO_3H^- 200 mM 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Los resultados se expresan como $\mu\text{moles} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido fresco.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

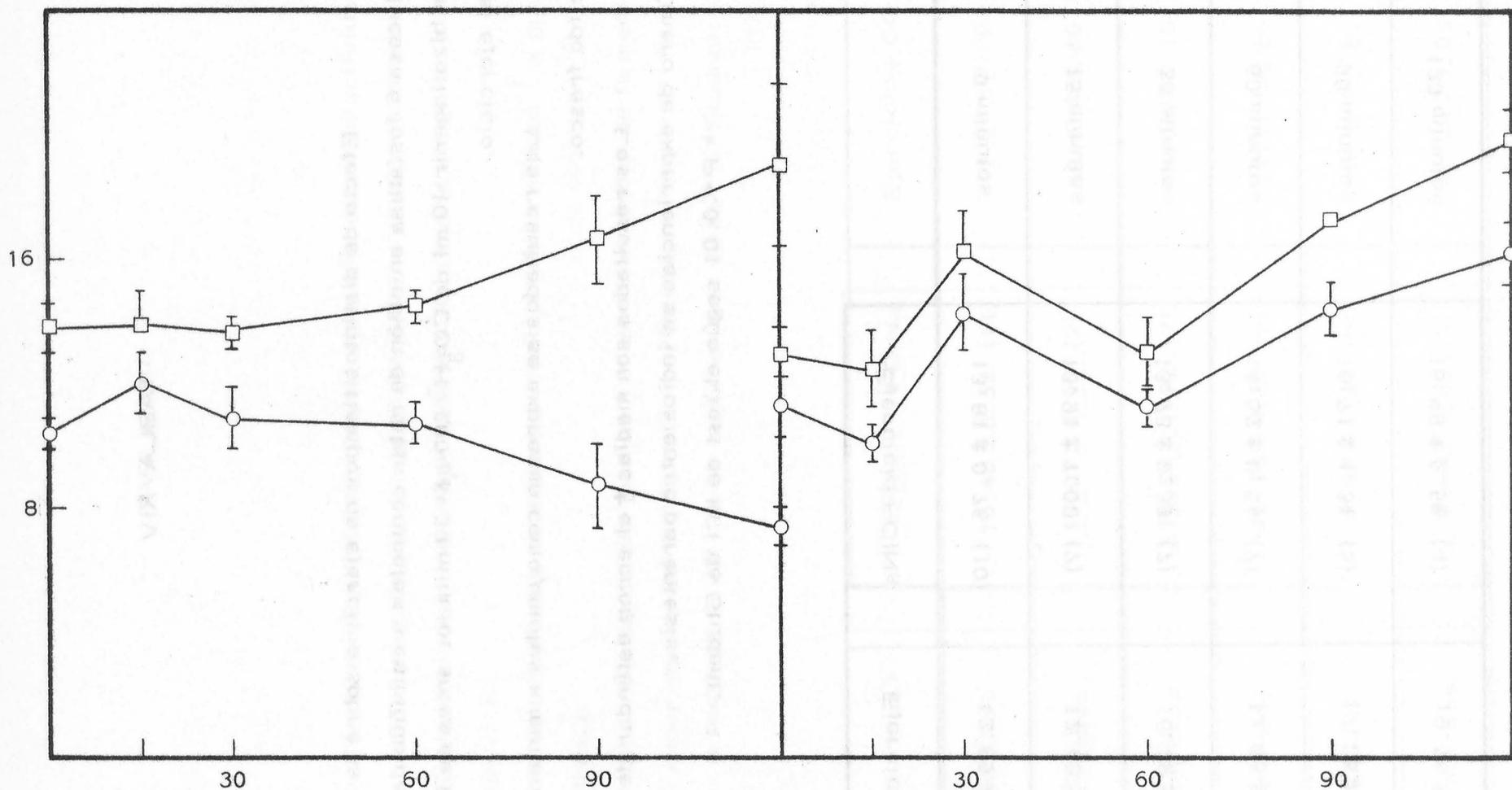
* $P < 0.01$ según el test de la t de Student.

	Ejercicio + ClNa	Ejercicio + CO_3H^-
0 minutos	13.81 ± 0.76 (10)	12.89 ± 0.85 (5)
15 minutos	13.91 ± 1.00 (7)	12.43 ± 1.29 (5)
30 minutos	13.73 ± 0.39 (7)	16.18 ± 1.35 (5)
60 minutos	14.52 ± 0.54 (7)	13.03 ± 1.10 (5)
90 minutos	16.71 ± 1.31 (5)	17.25 ± 0.18 (5)*
120 minutos	18.99 ± 2.58 (4)	19.76 ± 0.95 (5)*

GRAFICA Nº 7

EJERCICIO + ClNa

EJERCICIO + CO_3H^-



Efecto del ejercicio sobre la actividad de la glucosa 6 fosfatasa en hígado y riñón de ratas controles y de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO_3H^- 200 mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Las barras verticales representan el error estándar de la media.

○Hígado, □Riñón.

TABLA XV

Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal de ratas controles y de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO_3H^- 200 mM 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

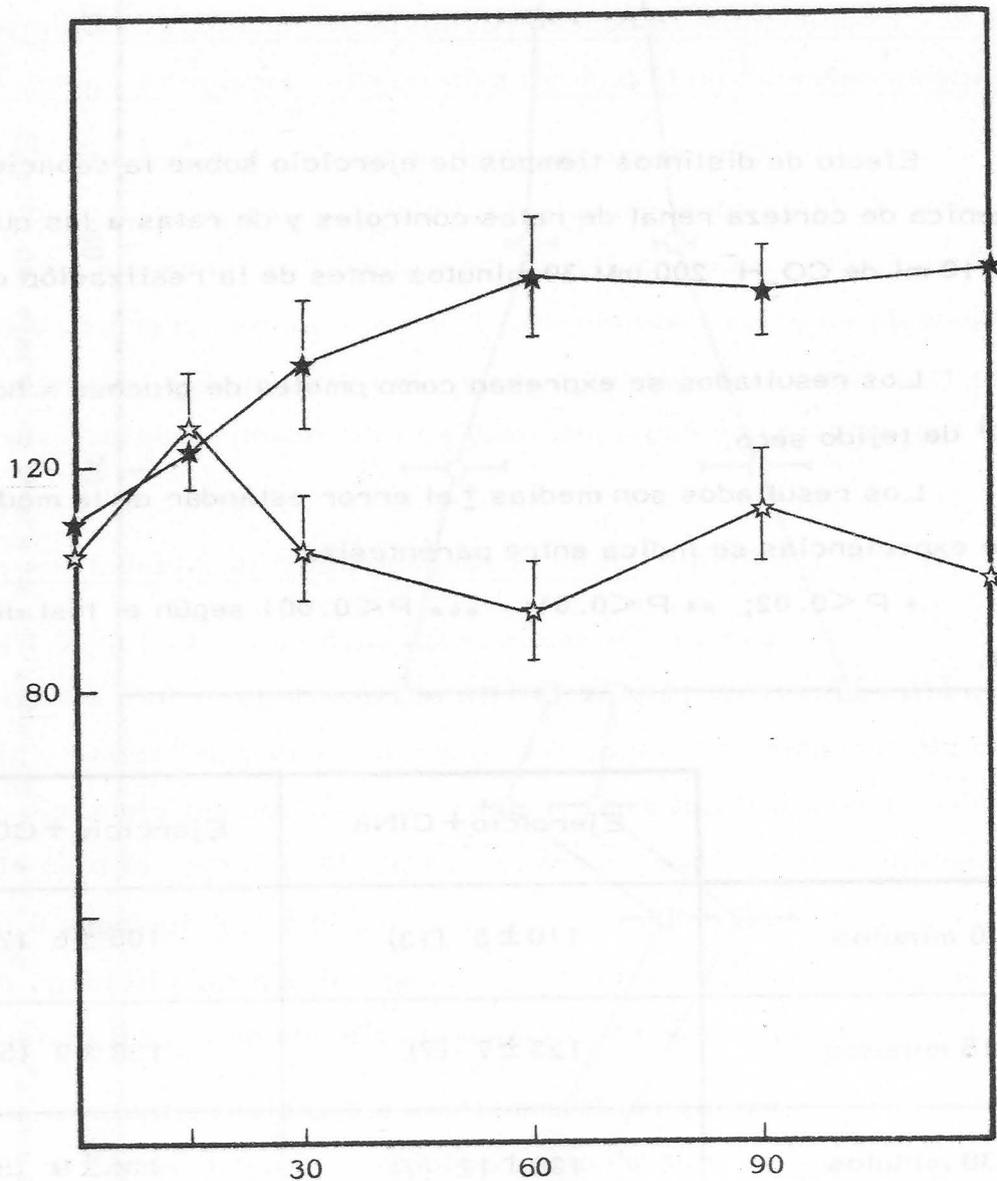
Los resultados se expresan como $\mu\text{moles de glucosa} \times \text{hora}^{-1} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido seco.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

* $P < 0.02$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ según el test de la t de Student.

	Ejercicio + ClNa	Ejercicio + CO_3H^-
0 minutos	110 ± 5 (13)	105 ± 6 (7)
15 minutos	123 ± 7 (7)	128 ± 9 (5)
30 minutos	138 ± 12 (7)	106 ± 9 (5)
60 minutos	146 ± 11 (6) *	94 ± 9 (4)
90 minutos	143 ± 8 (4) **	113 ± 10 (5)
120 minutos	147 ± 7 (4) ***	99 ± 3 (4)

GRAFICA Nº 8



Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal de ratas controles y de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO_3H^- 200 mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

★CINA, ☆ CO_3H^- .

4.3.8. - Evolución de la concentración de los metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis en hígado y riñón de rata durante el ejercicio.

Con objeto de tener un mayor conocimiento sobre el funcionamiento de la gluconeogénesis "in vivo", tanto hepática como renal, se ha determinado la concentración de los metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis en estas condiciones. Para ello se ha recurrido a la técnica del congelado instantáneo de los tejidos con nitrógeno líquido para evitar al máximo las variaciones "post mortem" en la concentración de estos metabolitos.

4.3.8.1. - Evolución de la concentración de metabolitos en hígado.

Los resultados se expresan en las tablas XVI y XVII y en las gráficas nº 9, nº 10 y nº 11. En el caso de las ratas sometidas a ejercicio sin tratamiento previo, las concentraciones de lactato y piruvato están fuertemente elevadas en los primeros minutos del ejercicio para caer por debajo de los valores normales a los 120 minutos, si bien el descenso en la concentración de piruvato es más rápido. Las hexosas 6 fosfato se encuentran por encima de los valores normales a todo lo largo del ejercicio, siendo siempre más elevada la concentración de glucosa 6 fosfato.

En las ratas sometidas a ejercicio y tratadas previamente con bicarbonato, el incremento producido en las concentraciones de lactato y piruvato en los primeros momentos es menos acentuado y el piruvato permanece al final de los 120 minutos por encima de los valores normales. La fructosa 6 fosfato está desde el primer momento por debajo de los valores normales llegando a estos al final de los 120 minutos, mientras que la glucosa 6 fosfato está bastante elevada a todo lo largo del ejercicio (gráfica nº9).

Las concentraciones de malato y aspartato se incrementan a los 15 minutos y permanecen todo el tiempo por encima de los valores iniciales, sobre todo el aspartato; en cambio no hay variaciones importantes

TABLA XVI

Evolución de la concentración en hígado de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas alimentadas sometidas a distintos tiempos de ejercicio.

El número de experiencias se indica entre parentesis. Los resultados se expresan como $\mu\text{moles} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido fresco y son medias \pm el error estándar de la media.

	LAC	PIR	MAL	ASP	PEP	2PGA	3PGA	TRP	FDP	F6P	G6P
Controles	0.982 \pm 0.147 (12)	0.063 \pm 0.014 (8)	0.523 \pm 0.032 (12)	0.695 \pm 0.059 (9)	0.105 \pm 0.011 (8)	0.046 \pm 0.007 (7)	0.240 \pm 0.027 (8)	0.050 \pm 0.009 (4)	0.026 \pm 0.002 (11)	0.029 \pm 0.003 (8)	0.354 \pm 0.041 (11)
15 minutos	4.290 \pm 0.425 (5)	0.301 \pm 0.051 (8)	1.274 \pm 0.081 (4)	1.652 \pm 0.132 (5)	0.124 \pm 0.009 (5)	0.038 \pm 0.003 (5)	0.289 \pm 0.039 (4)	0.098 \pm 0.007 (5)	0.038 \pm 0.004 (6)	0.041 \pm 0.009 (6)	0.623 \pm 0.026 (6)
Veces control	4.37	4.78	2.44	2.38	1.10	0.83	1.20	1.96	1.46	1.41	1.76
30 minutos	3.688 \pm 0.999 (4)	0.237 \pm 0.084 (6)	0.810 \pm 0.284 (3)	1.635 \pm 0.225 (4)	0.083 \pm 0.012 (6)	0.037 \pm 0.006 (4)	0.186 \pm 0.023 (5)	0.078 \pm 0.010 (6)	0.032 \pm 0.006 (6)	0.035 \pm 0.003 (6)	0.633 \pm 0.032 (6)
Veces control	3.76	3.76	1.55	2.35	0.79	0.80	0.78	1.56	1.23	1.21	1.77
60 minutos	1.013 \pm 0.341 (4)	0.122 \pm 0.030 (5)	0.830 \pm 0.160 (4)	2.396 \pm 0.293 (2)	0.146 \pm 0.010 (4)	0.042 \pm 0.003 (4)	0.276 \pm 0.012 (5)	0.088 \pm 0.009 (3)	0.029 \pm 0.004 (5)	0.051 \pm 0.009 (3)	0.714 \pm 0.024 (4)
Veces control	1.03	1.94	1.59	3.45	1.39	0.91	1.15	1.76	1.11	1.76	2.02
90 minutos	0.644 \pm 0.163 (5)	0.089 \pm 0.020 (5)	0.840 \pm 0.273 (2)	2.155 \pm 0.426 (3)	0.113 \pm 0.016 (5)	0.050 \pm 0.008 (5)	0.333 \pm 0.046 (3)	0.063 \pm 0.004 (5)	0.021 \pm 0.003 (5)	0.040 \pm 0.016 (3)	0.658 \pm 0.029 (5)
Veces control	0.68	1.41	2.30	3.10	1.08	1.09	1.39	1.26	0.81	1.38	1.85
120 minutos	0.570 \pm 0.086 (6)	0.036 \pm 0.005 (6)	0.660 \pm 0.026 (3)	2.053 \pm 0.202 (5)	0.081 \pm 0.009 (4)	0.036 \pm 0.003 (6)	0.193 \pm 0.019 (5)	0.057 \pm 0.003 (6)	0.022 \pm 0.002 (6)	0.029 \pm 0.003 (5)	0.591 \pm 0.040 (6)
Veces control	0.58	0.57	1.26	2.95	0.77	0.78	0.80	1.14	0.85	1.00	1.67

TABLA XVII

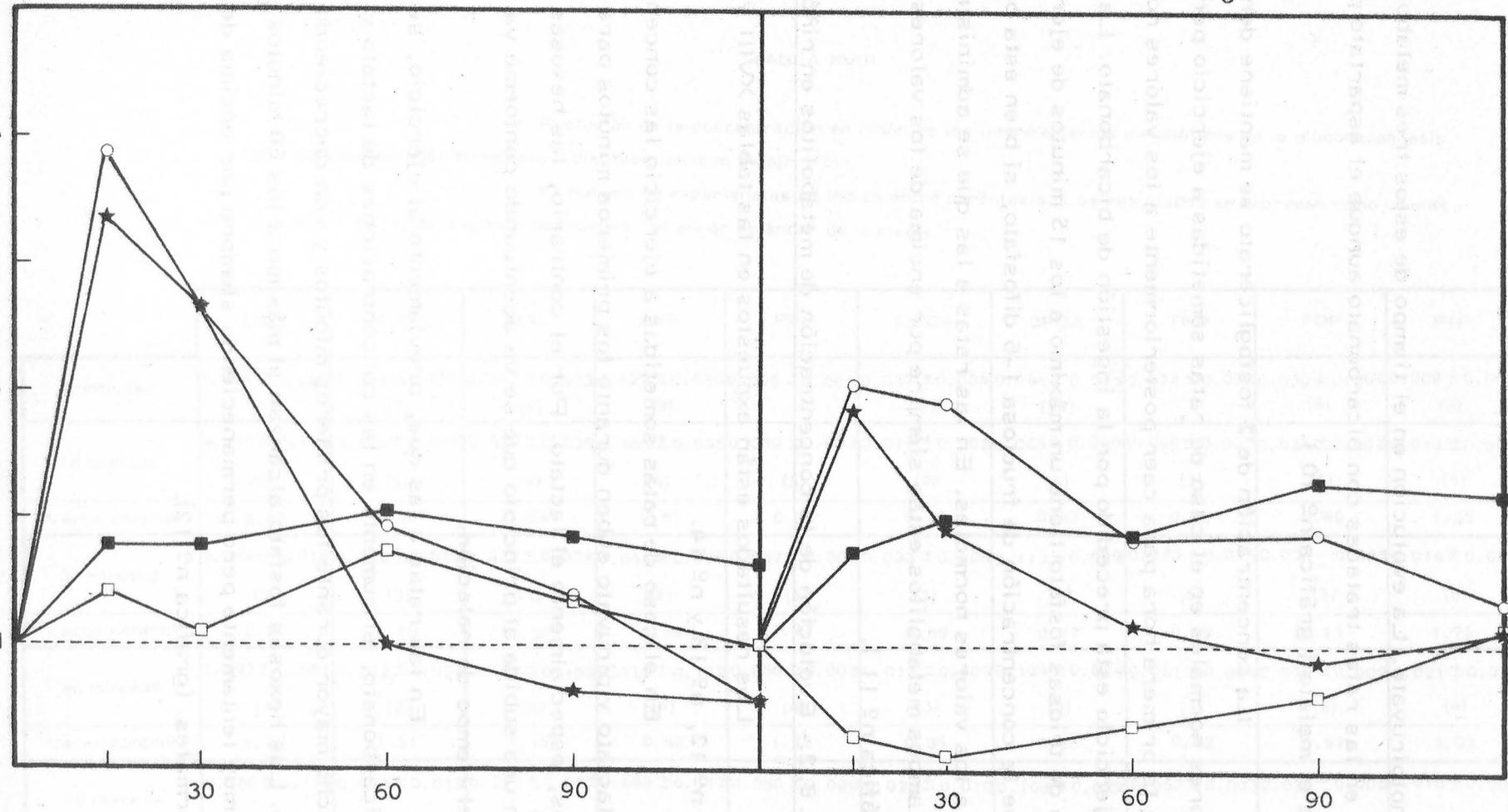
Evolución de la concentración en hígado de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas a las que se hizo ingerir 10 ml. de CO_3H^- 200 mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

El número de experiencias se indica entre paréntesis. Los resultados se expresan como $\mu\text{moles} \times \text{grámo}^{-1}$ de tejido fresco y son medias \pm el error estándar de la media.

	LAC	PIR	MAL	ASP	PEP	2 PGA	TRP	FDP	F6P	G6P
Controles	1.235 \pm 0.276 (5)	0.034 \pm 0.008 (4)	0.593 \pm 0.076 (5)	0.518 \pm 0.084 (3)	0.044 \pm 0.012 (5)	0.023 \pm 0.005 (5)	0.033 \pm 0.005 (6)	0.016 \pm 0.002 (6)	0.035 \pm 0.006 (5)	0.284 \pm 0.040 (5)
15 minutos	3.524 \pm 0.302 (5)	0.104 \pm 0.012 (5)	0.674 \pm 0.044 (5)	0.778 \pm 0.093 (4)	0.067 \pm 0.008 (5)	0.055 \pm 0.003 (5)	0.044 \pm 0.007 (4)	0.025 \pm 0.001 (4)	0.010 \pm 0.001 (5)	0.491 \pm 0.008 (5)
Veces control	2.86	3.06	1.14	1.48	1.52	2.39	1.33	1.56	0.29	1.73
30 minutos	2.372 \pm 0.314 (5)	0.099 \pm 0.016 (3)	0.657 \pm 0.056 (5)	1.174 \pm 0.117 (4)	0.057 \pm 0.018 (3)	0.053 \pm 0.004 (3)	0.046 \pm 0.008 (5)	0.026 \pm 0.002 (5)	0.006 \pm 0.002 (3)	0.568 \pm 0.017 (3)
Veces control	1.92	2.91	1.11	2.27	1.30	2.30	1.39	1.63	0.17	2.00
60 minutos	1.447 \pm 0.200 (5)	0.063 \pm 0.006 (5)	0.829 \pm 0.096 (5)	2.037 \pm 0.719 (5)	0.061 \pm 0.006 (5)	0.053 \pm 0.004 (5)	0.056 \pm 0.007 (5)	0.022 \pm 0.002 (5)	0.014 \pm 0.003 (5)	0.539 \pm 0.012 (3)
Veces control	1.17	1.85	1.40	3.93	1.39	2.30	1.70	1.38	0.40	1.90
90 minutos	1.095 \pm 0.119 (6)	0.065 \pm 0.007 (6)	0.944 \pm 0.089 (6)	1.298 \pm 0.254 (6)	0.052 \pm 0.006 (6)	0.020 \pm 0.002 (3)	0.040 \pm 0.003 (6)	0.026 \pm 0.002 (6)	0.022 \pm 0.002 (6)	0.653 \pm 0.042 (6)
Veces control	0.89	1.91	1.59	2.51	1.18	0.87	1.21	1.63	0.63	2.30
120 minutos	1.360 \pm 0.150 (6)	0.046 \pm 0.010 (6)	0.991 \pm 0.118 (6)	1.863 \pm 0.319 (5)	0.045 \pm 0.007 (6)	0.022 \pm 0.004 (5)	0.049 \pm 0.003 (5)	0.013 \pm 0.001 (5)	0.040 \pm 0.016 (4)	0.630 \pm 0.099 (4)
Veces control	1.10	1.35	1.67	3.60	1.02	0.96	1.48	0.81	1.14	2.22

EJERCICIO + CINA

EJERCICIO + CO₃H⁻



Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la concentración de: lactato, piruvato, fructosa 6 fosfato y glucosa 6 fosfato en hígado de ratas normales y en hígado de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO₃H⁻ 200 mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Los resultados se expresan como múltiplos de los valores controles.

○ Lactato, ★ Piruvato, □ Fructosa 6 fosfato, ■ Glucosa 6 fosfato.

del fosfoenolpiruvato. La evolución en el tiempo de estos tres metabolitos es similar en las ratas tratadas con bicarbonato aunque el aspartato predomina sobre el malato (gráfica nº 10).

La concentración de 2 fosfoglicerato se mantiene dentro de los valores normales en el caso de ratas sometidas a ejercicio pero sube durante la primera hora para caer posteriormente a los valores normales si el ejercicio está precedido por la ingestión de bicarbonato. La concentración de triosas fosfato tiene un máximo a los 15 minutos de ejercicio, al igual que la concentración de fructosa 1-6 difosfato, si bien esta baja rápidamente a los valores normales. En las ratas a las que se administró bicarbonato, ambos metabolitos están siempre por encima de los valores normales (gráfica nº 11).

4. 3. 8. 2.- Evolución de la concentración de metabolitos en riñón.

Los resultados están expuestos en las tablas XVIII y XIX y gráficas nº 12, nº 13 y nº 14.

En el caso de ratas sometidas a ejercicio las concentraciones de lactato y piruvato suben durante los primeros minutos para bajar después, especialmente el lactato. Por el contrario, las hexosas fosfato sufren una subida al principio que se va acentuando conforme va aumentando el tiempo de natación.

En las ratas a las que, previamente al ejercicio, se administró bicarbonato, el aumento en las concentraciones de lactato y piruvato es mucho mayor durante los primeros minutos y van decreciendo más lentamente. Las hexosas fosfato alcanzan el máximo a los 60 minutos y después caen muy lentamente pero permaneciendo siempre por encima de los valores normales (grafica nº 12).

TABLA XVIII

Evolución de la concentración en riñón de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas alimentadas sometidas a distintos tiempos de ejercicio.

El número de experiencias se indica entre paréntesis. Los resultados se expresan como $\mu\text{moles} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido fresco y son medias \pm el error estándar de la media.

	LAC	PIR	MAL	ASP	PEP	2 PGA	3PGA	TRP	FDP	F6P	G6P
Controles	1.454 \pm 0.244 (9)	0.084 \pm 0.003 (7)	0.343 \pm 0.033 (8)	1.122 \pm 0.086 (9)	0.040 \pm 0.003	0.047 \pm 0.004 (7)	0.146 \pm 0.015 (10)	0.074 \pm 0.002	0.030 \pm 0.004 (8)	0.008 \pm 0.003 (6)	0.039 \pm 0.006 (6)
15 minutos	4.115 \pm 0.179 (6)	0.126 \pm 0.019 (5)	0.529 \pm 0.029 (4)	0.685 \pm 0.045 (4)	0.030 \pm 0.003 (5)	0.017 \pm 0.002 (5)	0.063 \pm 0.006 (6)	0.049 \pm 0.007 (5)	0.024 \pm 0.002 (5)	0.010 \pm 0.002 (4)	0.084 \pm 0.008 (4)
Veces control	2.63	1.50	1.54	0.61	0.75	0.36	0.43	0.66	0.80	1.25	2.15
30 minutos	2.954 \pm 0.518 (6)	0.142 \pm 0.012 (3)	0.437 \pm 0.029 (5)	0.644 \pm 0.066 (6)	0.047 \pm 0.009 (5)	0.032 \pm 0.008 (3)	0.113 \pm 0.009 (4)	0.073 \pm 0.011 (5)	0.034 \pm 0.005 (5)	0.014 \pm 0.003 (6)	0.113 \pm 0.008 (4)
Veces control	2.03	1.69	1.27	0.59	1.17	0.69	0.77	0.99	1.13	1.75	2.90
60 minutos	1.793 \pm 0.581 (4)	0.102 \pm 0.056 (2)	0.409 \pm 0.105 (4)	0.519 \pm 0.132 (4)	0.050 \pm 0.003 (4)	0.016 \pm 0.009 (3)	0.124 \pm 0.024 (3)	0.061 \pm 0.004 (3)	0.029 \pm 0.007 (4)	0.021 \pm 0.005 (4)	0.099 \pm 0.008 (3)
Veces control	1.23	1.21	1.19	0.46	1.25	0.34	0.85	0.82	0.97	2.02	2.54
90 minutos	0.765 \pm 0.115 (4)	0.083 \pm 0.013 (5)	0.353 \pm 0.083 (2)	0.669 \pm 0.117 (4)	0.080 \pm 0.009 (3)	0.026 \pm 0.010 (5)	0.168 \pm 0.029 (5)	0.057 \pm 0.003 (3)	0.039 \pm 0.005 (4)	0.016 \pm 0.002 (2)	0.098 \pm 0.005 (3)
Veces control	0.53	0.99	1.03	0.60	2.00	0.55	1.15	0.77	1.30	2.00	2.51
120 minutos	0.700 \pm 0.066 (4)	0.076 \pm 0.009 (6)	0.369 \pm 0.031 (5)	0.845 \pm 0.038 (3)	0.115 \pm 0.015 (4)	0.029 \pm 0.001 (6)	0.204 \pm 0.023 (6)	0.092 \pm 0.004 (4)	0.036 \pm 0.006 (6)	0.030 \pm 0.005 (4)	0.113 \pm 0.018 (5)
Veces control	0.48	0.90	1.08	0.75	2.87	0.62	1.40	1.24	1.20	3.75	2.90

TABLA XIX

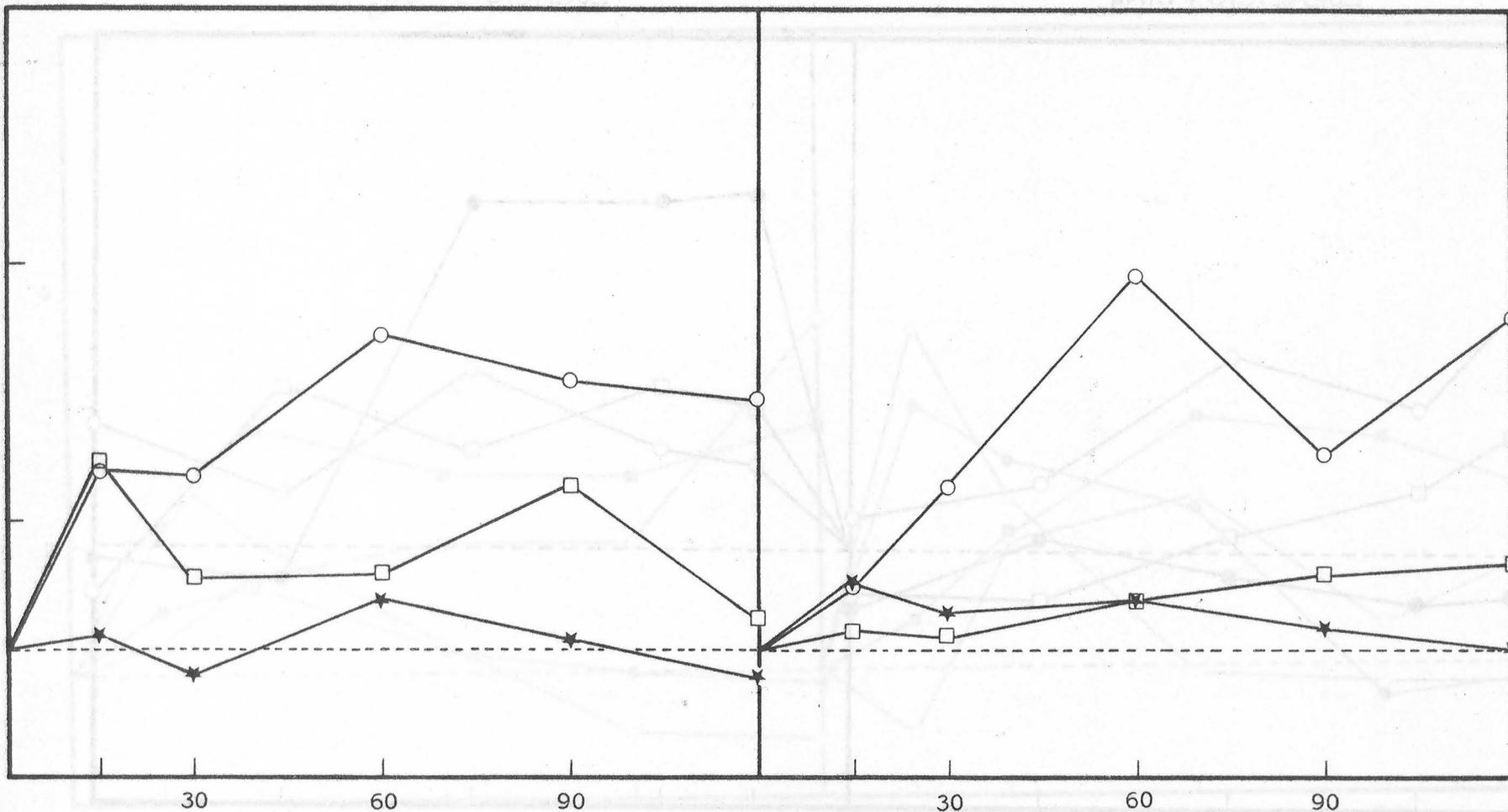
Evolución de la concentración en riñón de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas a las que se hizo ingerir 10 ml. de CO_3H^- 200 mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

El número de experiencias se indica entre parentesis. Los resultados se expresan como $\mu\text{moles} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido fresco y son medias \pm el error estándar de la media.

	LAC	PIR	MAL	ASP	PEP	2PGA	TRP	FDP	F6P	G6P
Controles	1.142 \pm 0.228 (5)	0.034 \pm 0.004 (5)	0.314 \pm 0.017 (5)	0.691 \pm 0.085 (4)	0.030 \pm 0.006 (5)	0.015 \pm 0.002 (5)	0.066 \pm 0.006 (4)	0.012 \pm 0.001 (5)	0.006 \pm 0.003 (3)	0.033 \pm 0.013 (4)
15 minutos	4.144 \pm 0.149 (5)	0.104 \pm 0.012 (5)	0.697 \pm 0.044 (5)	0.726 \pm 0.025 (4)	0.061 \pm 0.004 (5)	0.032 \pm 0.004 (5)	0.083 \pm 0.004 (5)	0.024 \pm 0.004 (5)	0.003 \pm 0.001 (4)	0.046 \pm 0.003 (4)
Veces control	3.66	3.06	2.22	1.05	2.03	2.13	1.26	2.00	0.50	1.39
30 minutos	2.639 \pm 0.424 (6)	0.089 \pm 0.016 (5)	0.556 \pm 0.100 (5)	0.455 \pm 0.075 (5)	0.037 \pm 0.006 (5)	0.021 \pm 0.003 (5)	0.072 \pm 0.004 (6)	0.024 \pm 0.002 (6)	0.012 \pm 0.003 (5)	0.067 \pm 0.013 (5)
Veces control	2.33	2.62	1.77	0.66	1.23	1.40	1.09	2.00	2.00	2.03
60 minutos	1.073 \pm 0.145 (5)	0.076 \pm 0.006 (6)	0.514 \pm 0.106 (5)	0.569 \pm 0.025 (5)	0.058 \pm 0.005 (6)	0.030 \pm 0.003 (6)	0.069 \pm 0.003 (6)	0.019 \pm 0.003 (6)	0.014 \pm 0.003 (5)	0.097 \pm 0.003 (4)
Veces control	0.95	2.24	1.64	0.22	1.93	2.00	1.05	1.58	2.33	2.94
90 minutos	0.993 \pm 0.082 (5)	0.026 \pm 0.002 (5)	0.318 \pm 0.041 (5)	0.580 \pm 0.063 (5)	0.034 \pm 0.002 (5)	0.008 \pm 0.004 (5)	0.054 \pm 0.005 (5)	0.011 \pm 0.002 (5)	0.008 \pm 0.001 (5)	0.091 \pm 0.008 (5)
Veces control	0.88	0.76	1.01	0.84	1.13	0.53	0.82	0.92	1.33	2.76
120 minutos	0.988 \pm 0.154 (6)	0.031 \pm 0.004 (6)	0.343 \pm 0.048 (6)	0.710 \pm 0.055 (6)	0.035 \pm 0.005 (6)	0.007 \pm 0.002 (4)	0.049 \pm 0.003 (5)	0.012 \pm 0.001 (5)	0.012 \pm 0.002 (5)	0.075 \pm 0.005 (5)
Veces control	0.87	0.91	1.09	1.03	1.17	0.47	0.74	1.00	2.00	2.27

EJERCICIO + ClNa

EJERCICIO + CO₃H⁻



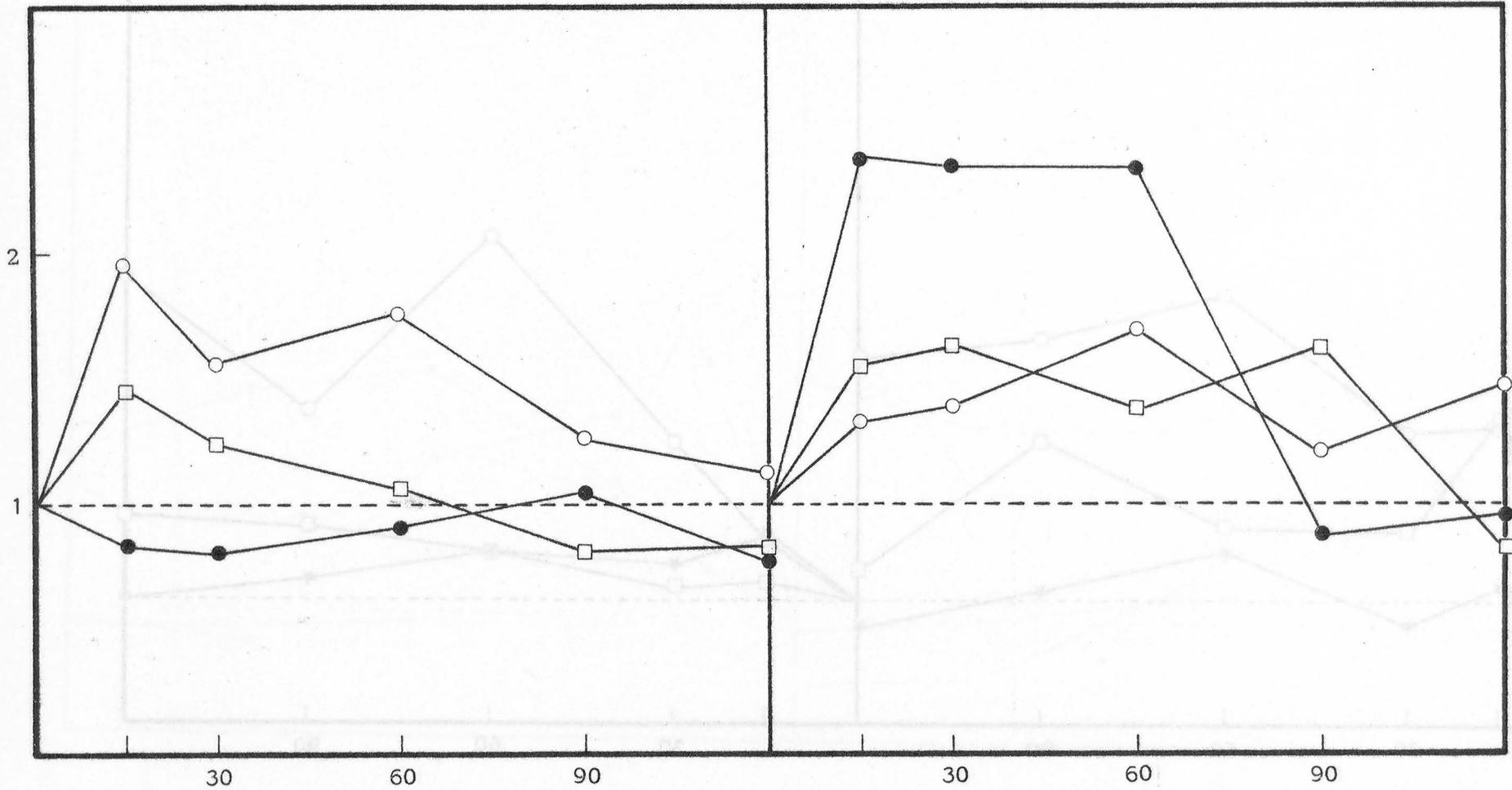
Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la concentración de: malato, aspartato y fosfoenolpiruvato en hígado de ratas alimentadas y en hígado de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO₃H⁻ 200 mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Los resultados se expresan como múltiplos de los valores controles.

□Malato, ○Aspartato, ★Fosfoenolpiruvato.

EJERCICIO + ClNa

EJERCICIO + CO_3H^-



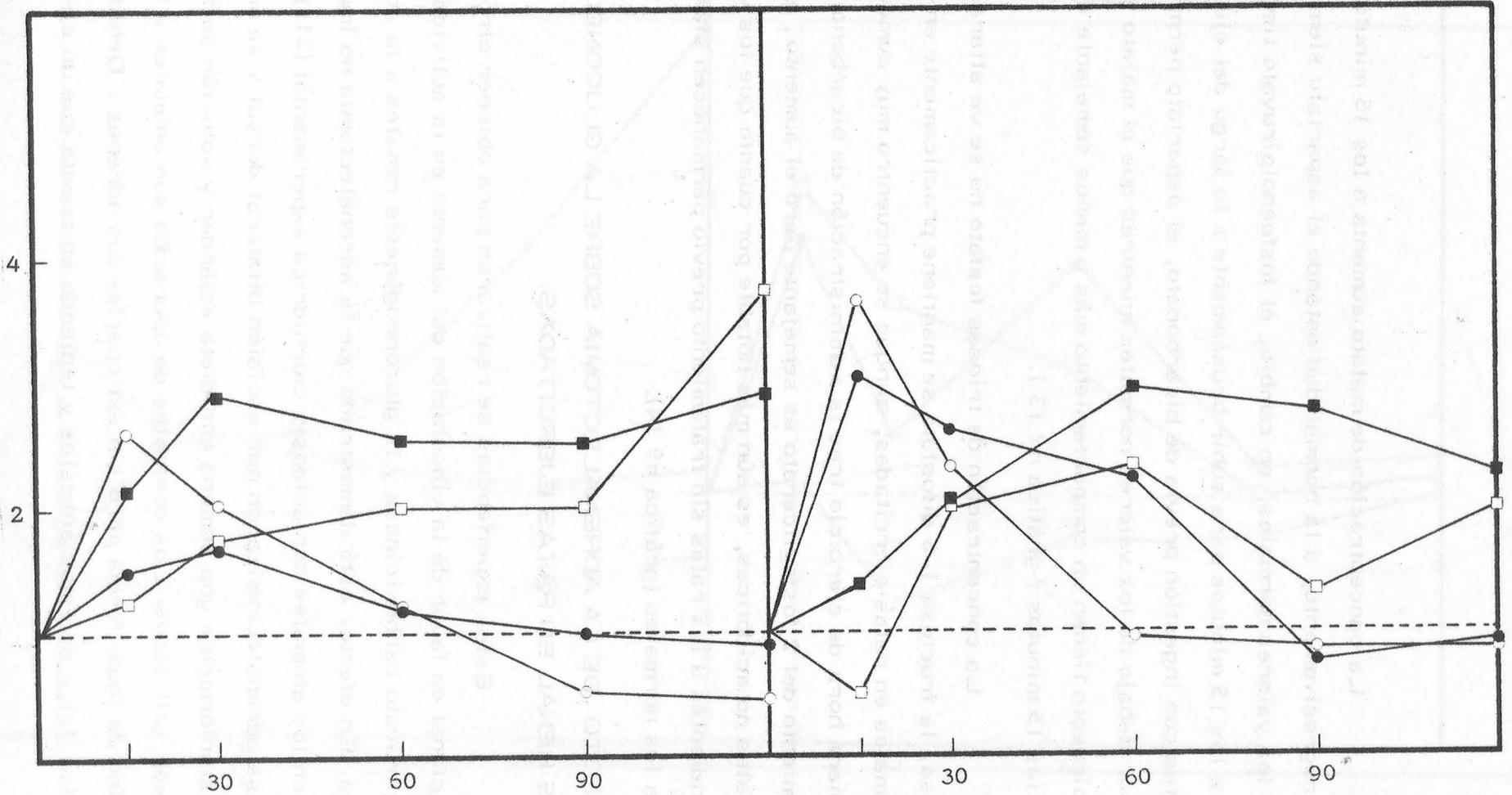
Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la concentración de: 2 fosfoglicerato, triosas fosfato y fructosa 1-6 difosfato, en hígado de ratas alimentadas y en el de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO_3H^- 200 mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Los resultados se expresan como múltiplos de los valores controles.

● 2 Fosfoglicerato, ○ Triosas fosfato, □ Fructosa 1-6 difosfato.

EJERCICIO + CINA

EJERCICIO + CO_3H^-



Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la concentración de: lactato, piruvato, fructosa 6 fosfato y glucosa 6 fosfato, en riñón de ratas alimentadas y en el de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml. de CO_3H^- 200 mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Los resultados se expresan como múltiplos de los valores controles.

○ Lactato, ● Piruvato, □ Fructosa 6 fosfato, ■ Glucosa 6 Fosfato.

La concentración de malato aumenta a los 15 minutos y desciende, progresivamente, a la normalidad estando el aspartato siempre por debajo de los valores normales, en cambio, el fosfoenolpiruvato tiene un descenso a los 15 minutos para subir bruscamente a lo largo del ejercicio. En las ratas con ingestión previa de bicarbonato, el aspartato permanece siempre por debajo de los valores normales mientras que el malato y el fosfoenolpiruvato tienen un comportamiento más o menos semejante con un máximo a los 15 minutos (gráfica nº 13).

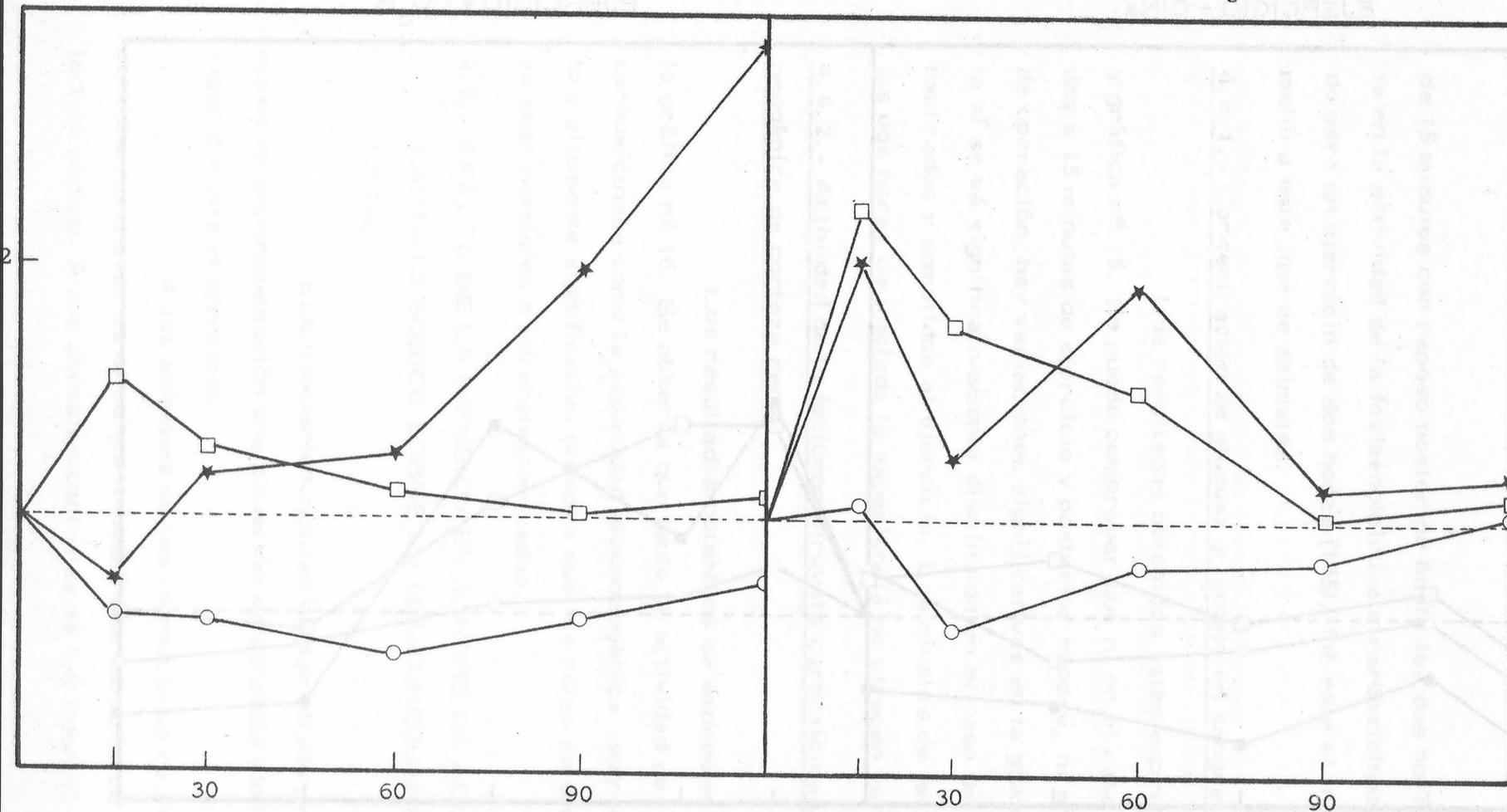
La concentración de triosas fosfato no se ve alterada en ningún caso, la fructosa 1-6 difosfato se mantiene practicamente en los niveles normales en ratas ejercitadas, aunque se encuentra muy aumentada en la primera hora de ejercicio tras la administración de bicarbonato. El comportamiento del 2 fosfoglicerato es semejante pero el aumento, en el caso de ratas no acidóticas, es aún más notable por cuanto que los valores correspondientes a las ratas sin tratamiento previo permanecen siempre inferiores a los normales (gráfica nº 14).

4.4. - EFECTO DE LA ADRENALECTOMIA SOBRE LA GLUCONEOGENESIS RENAL EN RATAS EJERCITADAS.

Estas experiencias se realizaron para obtener otro argumento adicional en favor de la vinculación del aumento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas y la gluconeogénesis renales a la acidosis metabólica. En efecto, está demostrado que la adrenalectomía no impide este efecto en los animales con acidosis clorhídrica experimental (215). Los animales se adrenalectomizaron por escisión bilateral dorsal y se mantuvieron posteriormente una semana con dieta estándar y solución salina 0.9% antes de ser utilizados. Los controles de operación son animales a los que se intervino de igual forma pero sin extirparles los adrenes . Debido a la inferioridad física de estos animales y teniendo en cuenta que un ejercicio

EJERCICIO + ClNa

EJERCICIO + CO_3H^-



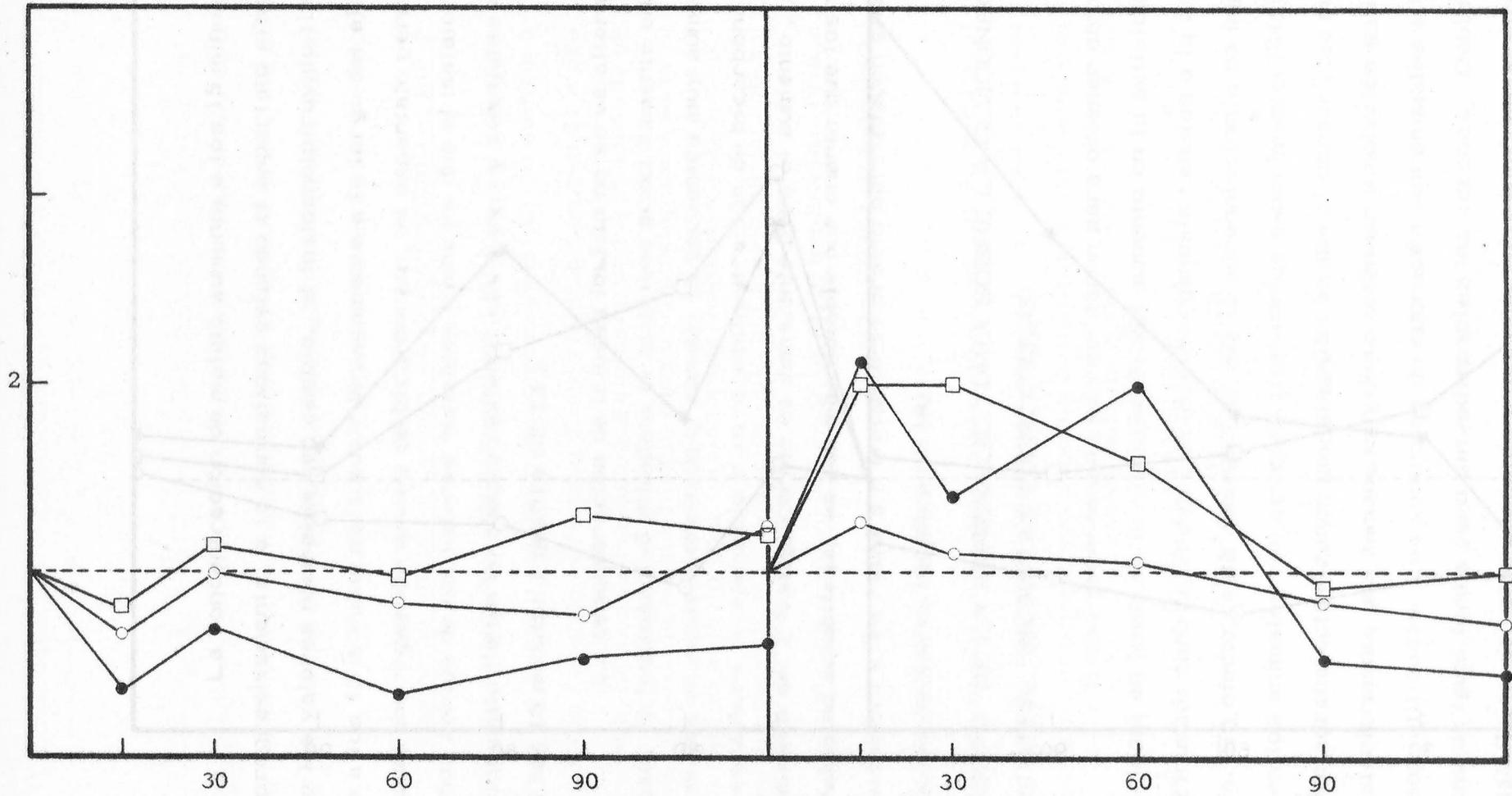
Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la concentración de: malato, aspartato y fosfoenolpiruvato en riñón de ratas alimentadas y en el de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO_3H^- 200 mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Los resultados se expresan como múltiplos de los valores controles.

□ Malato, ○ Aspartato, ★ Fosfoenolpiruvato.

EJERCICIO + ClNa

EJERCICIO + CO_3H^-



Efecto de distintos tiempos de ejercicio sobre la concentración de: 2 fosfoglicerato, triosas fosfato y fructosa 1-6 difosfato, en riñón de ratas a las que se hizo ingerir 10 ml de CO_3H^- 200 mM, 30 minutos antes de la realización del ejercicio.

Los resultados se expresan como múltiplos de los valores controles.

● 2 Fosfoglicerato, ○ Triosas fosfato, □ Fructosa 1-6 difosfato.

de 15 minutos con reposo posterior hasta las dos horas produce un incremento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas similar al encontrado para un ejercicio de dos horas (185), fué este el tratamiento a que se sometió a este tipo de animales.

4.4.1. - Concentración de glucosa y lactato en sangre.

Los resultados obtenidos están expresados en la tabla XX y gráfica nº 15. Se puede comprobar que ni en el caso de animales sometidos a 15 minutos de ejercicio y posterior reposo, ni en el de los controles de operación hay variaciones significativas en la glucemia, en cambio ésta sí se vé significativamente disminuida en el caso de animales adrenalectomizados y sometidos al ejercicio. Los niveles de lactato en sangre tras las dos horas de iniciada la experiencia no ofrecen variaciones especiales

4.4.2. - Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y capacidad gluconeogénica de corteza renal

Los resultados obtenidos se expresan en la tabla XXI y en la gráfica nº 16. Se observa que tanto la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas como la capacidad gluconeogénica sufren un aumento paralelo y altamente significativo siempre que las ratas se someten al ejercicio, ya sean normales o adrenalectomizadas.

4.5. - EFECTO DE LA INFUSION EN SANGRE DE ACIDO LACTICO Y LACTATO SODICO SOBRE LA GLUCONEOGENESIS RENAL DE RATA.

Estas experiencias tenían por objeto provocar en los animales de experimentación una situación de acidosis similar a la que tiene lugar durante el ejercicio.

A los animales se les introdujo un catéter en la yugular derecha y a través de él se les infundió una solución de ácido láctico o lactato sódico. A los animales controles se les infundió el mismo volumen

TABLA XX

Efecto de la adrenalectomía sobre las concentraciones de glucosa y lactato en sangre, en ratas ejercitadas durante 15 minutos y sacrificadas a los 120 minutos del comienzo del ejercicio.

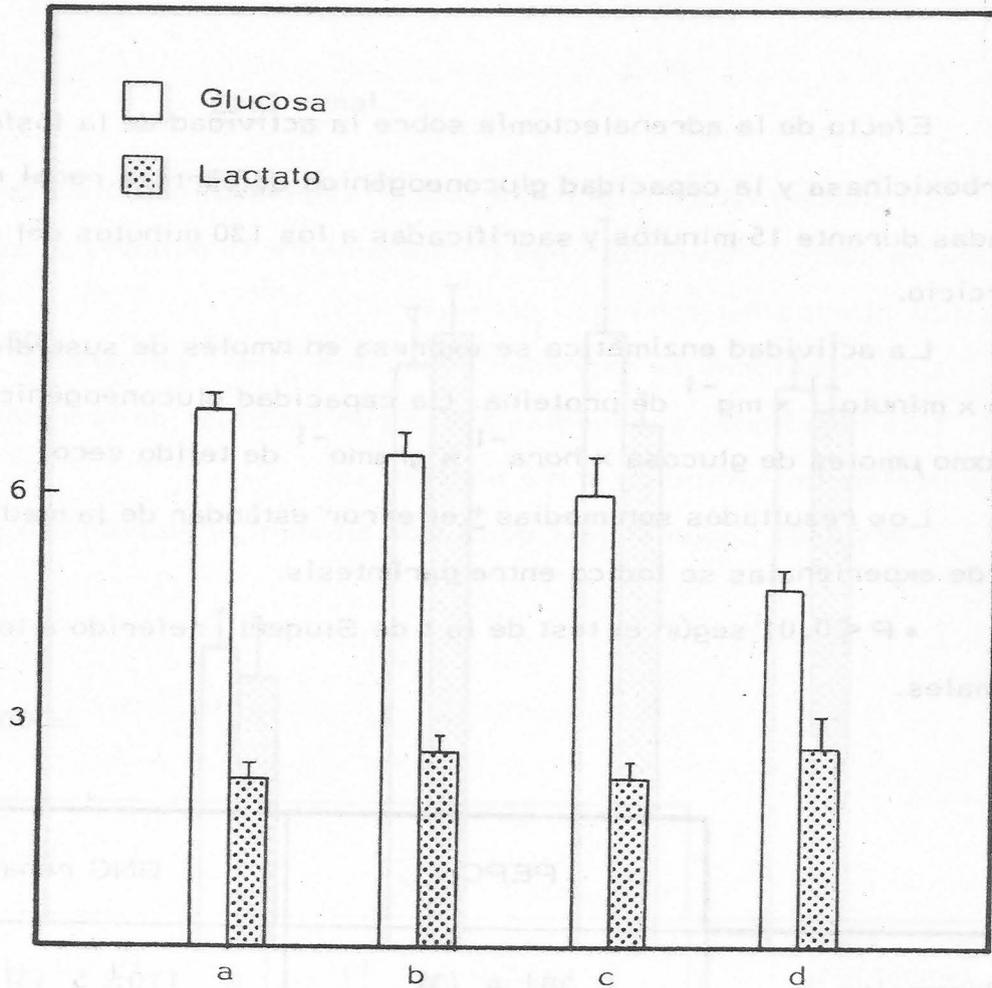
Los resultados se expresan en $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$ de sangre.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

* $P < 0.01$ según el test de la t de Student, referido a los animales normales.

	GLUCOSA	LACTATO
Normales	7.163 ± 0.213 (4)	2.219 ± 0.215 (3)
Ejercicio	6.517 ± 0.356 (3)	2.540 ± 0.174 (3)
Controles + Ejerc.	6.026 ± 0.466 (3)	2.226 ± 0.206 (3)
Adrenalect. + Ejerc.	4.748 ± 0.252 (3)*	2.622 ± 0.419 (3)

GRAFICA Nº 15



Efecto de la adrenalectomía sobre las concentraciones de glucosa y lactato en sangre en ratas ejercitadas durante 15 minutos y sacrificadas a los 120 minutos del comienzo del ejercicio.

a) Normales; b) Ejercicio; c) Controles operación+Ejercicio; d) Adrenalectomizadas +Ejercicio

TABLA XXI

Efecto de la adrenalectomía sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas y la capacidad gluconeogénica de corteza renal en ratas ejercitadas durante 15 minutos y sacrificadas a los 120 minutos del comienzo del ejercicio.

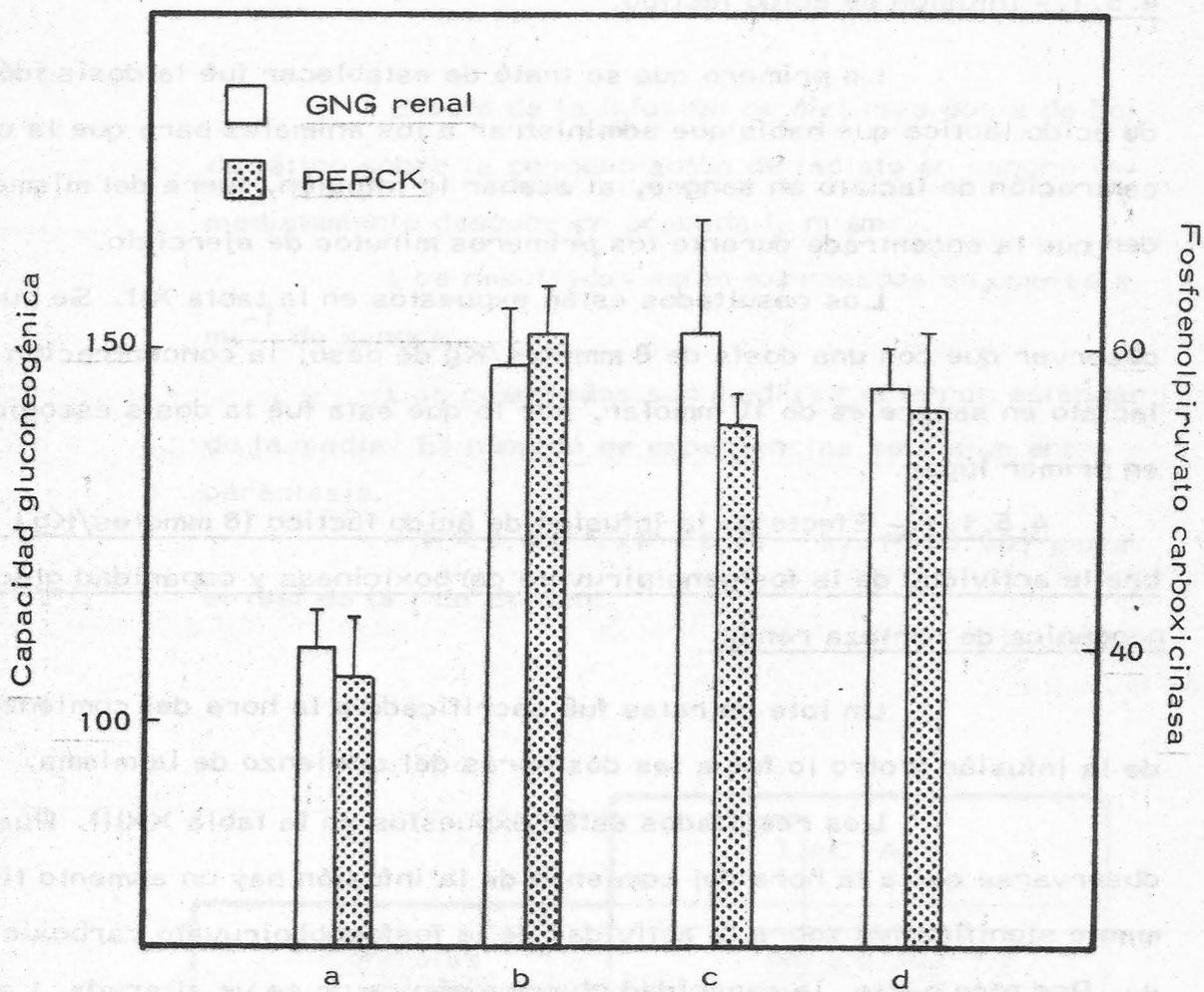
La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado \times minuto⁻¹ \times mg⁻¹ de proteína. La capacidad gluconeogénica se expresa como μ moles de glucosa \times hora⁻¹ \times gramo⁻¹ de tejido seco.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

* $P < 0.01$ según el test de la t de Student, referido a los animales normales.

	PEPCK	GNG renal
Normales	38 ± 4 (3)	110 ± 5 (3)
Ejercicio	61 ± 3 (3)*	148 ± 7 (3)*
Controles + Ejerc.	55 ± 2 (3)*	152 ± 15 (3)*
Adrenalect. + Ejerc.	56 ± 5 (5)*	145 ± 5 (5)*

GRAFICA Nº 16



Efecto de la adrenalectomía sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal de ratas sometidas a 15 minutos de ejercicio y sacrificadas a los 120 minutos del comienzo del mismo.

a) Normales; b) Ejercicio; c) Controles de operación + Ejercicio; d) Adrenalectomizadas + Ejercicio.

de solución salina 0.9 %.

4.5.1. - Infusión de ácido láctico.

Lo primero que se trató de establecer fué la dosis idónea de ácido láctico que había que administrar a los animales para que la concentración de lactato en sangre, al acabar la infusión, fuera del mismo orden que la encontrada durante los primeros minutos de ejercicio.

Los resultados están expuestos en la tabla XII. Se puede observar que con una dosis de 8 mmoles/Kg de peso, la concentración de lactato en sangre es de 10 mmolar, por lo que esta fué la dosis escogida en primer lugar.

4.5.1.1. - Efecto de la infusión de ácido láctico (8 mmoles/Kg) sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y capacidad gluconeogénica de corteza renal.

Un lote de ratas fué sacrificado a la hora del comienzo de la infusión y otro lo fué a las dos horas del comienzo de la misma.

Los resultados están expuestos en la tabla XXIII. Puede observarse que a la hora del comienzo de la infusión hay un aumento ligeramente significativo sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas. Por otra parte, la capacidad gluconeogénica no se ve alterada. La concentración de glucosa en sangre sufre un aumento a las dos horas de comenzada la infusión. Los animales sufrieron un gran daño renal con eliminación de gran cantidad de sangre en orina a partir de los primeros minutos del comienzo de la infusión. Por este motivo pareció conveniente disminuir la dosis de ácido láctico en sucesivas experiencias.

4.5.1.2. - Efecto de la infusión de ácido láctico (4 mmoles/Kg) sobre las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas, piruvato cinasa y sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal.

Los resultados están expuestos en la tabla XXIV. Se pue-

TABLA XXII

Efecto de la infusión de distintas dosis de ácido láctico sobre la concentración de lactato en sangre inmediatamente después de acabada la misma.

Los resultados están expresados en $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$ de sangre.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ según el test de la t de Student.

	LACTATO
<u>Controles</u>	<u>1.881 ± 0.502 (3)</u>
<u>2 mmoles / kg</u>	<u>4.392 ± 0.794 (4)*</u>
<u>4 mmoles / kg</u>	<u>4.492 ± 0.558 (7)**</u>
<u>8 mmoles / kg</u>	<u>10.153 ± 1.057 (3)***</u>

TABLA XXIII

Efecto de la infusión de ácido láctico (8 mmoles/Kg de peso) sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas, sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal y sobre las concentraciones de lactato y glucosa en sangre, a distintos tiempos después de comenzada la infusión.

La actividad enzimática se expresa en nmoles x minuto⁻¹ x mg⁻¹ de proteína. La capacidad gluconeogénica en μ moles de glucosa producida x hora⁻¹ x gramo⁻¹ de tejido seco. Las concentraciones de glucosa y lactato en μ moles x ml⁻¹ de sangre.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

* P < 0.05, según el test de la t de Student.

	CONTROLES	1 HORA	2 HORAS
PEPCK	42 \pm 3 (4)	53 \pm 4 (8)*	48 \pm 4 (9)
GNG renal	105 \pm 3 (3)	98 \pm 7 (5)	112 \pm 5 (9)
Lactato	2.137 \pm 0.205 (4)	2.594 \pm 0.577 (4)	2.441 \pm 0.088 (8)*
Glucosa	7.279 \pm 0.203 (4)	7.940 \pm 0.347 (4)	9.108 \pm 0.836 (6)*

TABLA XXIV

Efecto de la infusión de ácido láctico (4 mmoles/Kg de peso) sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal, así como sobre las concentraciones de glucosa y lactato en sangre, a las 2 horas de comenzada la infusión.

La actividad enzimática se expresa en $\text{nmol} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína. La capacidad gluconeogénica en μmol de glucosa producida $\times \text{hora}^{-1} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido seco. Las concentraciones de glucosa y lactato en $\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1}$ de sangre.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

* $P < 0.01$; ** $P < 0.001$ según el test de la t de Student.

	CONTROLES	ACIDO LACTICO
PEPCK	43 ± 2 (10)	71 ± 5 (16) **
GNG renal	121 ± 6 (9)	161 ± 9 (12) *
PK	209 ± 20 (8)	208 ± 21 (5)
Lactato	2.066 ± 0.133 (9)	2.607 ± 0.209 (16)
Glucosa	7.279 ± 0.203 (8)	7.527 ± 0.203 (15)

de apreciar que la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y la capacidad gluconeogénica de corteza renal sufren un incremento altamente significativo del mismo orden que el encontrado para ratas sometidas a un ejercicio de 2 horas.

4. 5. 2. - Efecto de la infusión de lactato sódico (4 mmoles/Kg) sobre las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, piruvato cinasa y capacidad gluconeogénica de corteza renal.

Los resultados están expresados en la tabla XXV. Puede observarse que, como cabía esperar, no hay ningún parámetro que presente variaciones significativas.

En la gráfica nº 17 se comparan las actividades de la PEPCK y la capacidad gluconeogénica de corteza renal de ratas con infusión de ácido láctico y de ratas a las que se infundió lactato sódico.

4. 6. - EFECTO DE LA INFUSION EN SANGRE DE ADRENALINA SOBRE LA GLUCONEOGENESIS RENAL.

En el aumento de la capacidad gluconeogénica de corteza renal y de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa de ratas sometidas a dos horas de natación, en agua a 22 °C, influyen factores como el frío y el estrés que sufren los animales en estas condiciones (185). Por otra parte, la sobreproducción muscular de lactato está influenciada por la adrenalina a través de la glucogenolisis. Debido a ello pareció conveniente realizar unas experiencias infundiendo adrenalina a las ratas para tratar de delimitar la influencia que esta hormona tiene en la gluconeogénesis renal en tales condiciones.

TABLA XXV

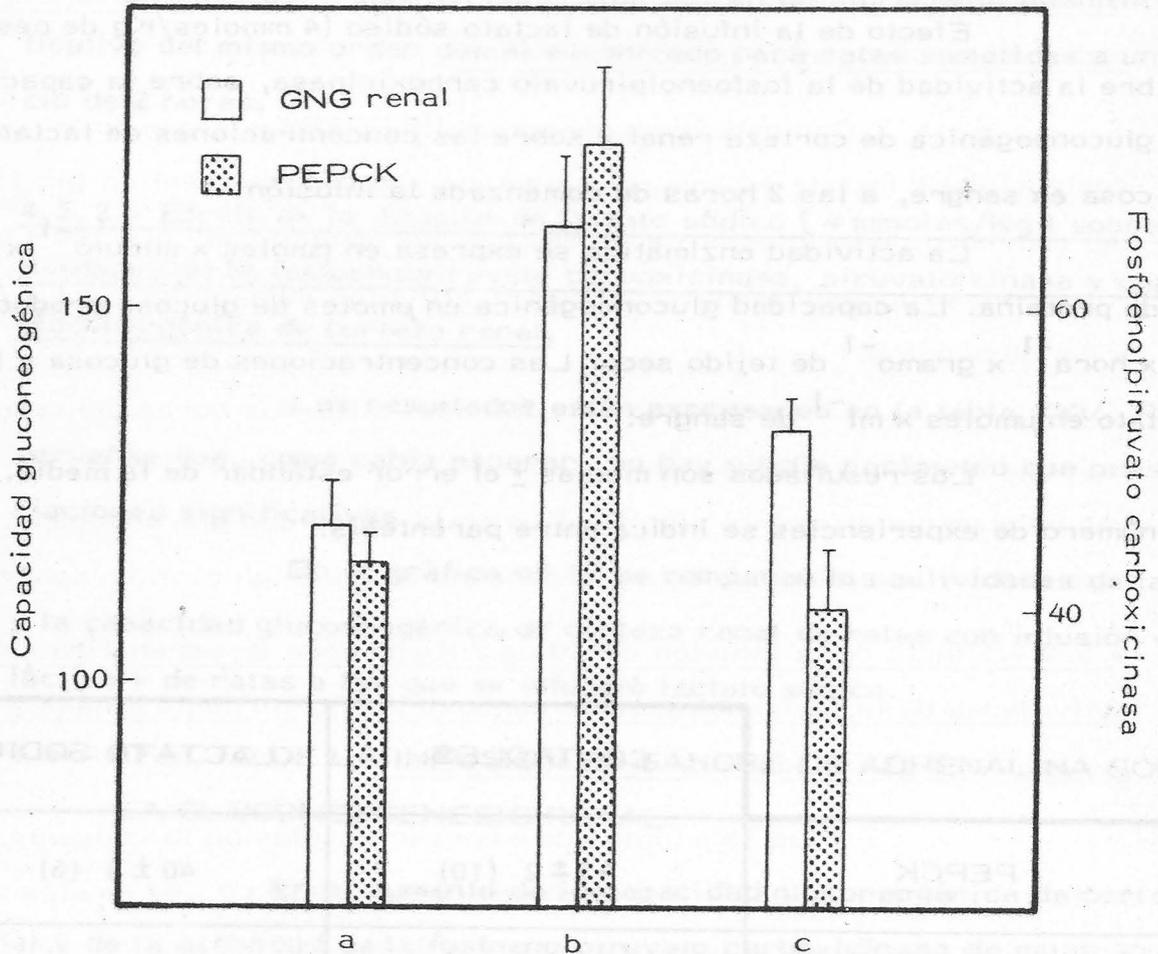
Efecto de la infusión de lactato sódico (4 mmoles/Kg de peso) sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas, sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal y sobre las concentraciones de lactato y glucosa en sangre, a las 2 horas de comenzada la infusión.

La actividad enzimática se expresa en $\text{nmoles} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína. La capacidad gluconeogénica en μmoles de glucosa producida $\times \text{hora}^{-1} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido seco. Las concentraciones de glucosa y lactato en $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$ de sangre.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

	CONTROLES	LACTATO SODICO
PEPCK	43 ± 2 (10)	40 ± 4 (6)
GNG renal	121 ± 6 (9)	134 ± 4 (4)
PK	209 ± 20 (8)	202 ± 12 (6)
Lactato	2.066 ± 0.133 (9)	2.396 ± 0.476 (5)
Glucosa	7.279 ± 0.203 (8)	6.908 ± 0.257 (6)

GRAFICA Nº 17



Efecto de la infusión de 4 mmoles/Kg de ácido láctico y 4 mmoles/Kg de lactato sódico sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal de rata.
a) Controles, b) Infusión de ácido láctico, c) Infusión de lactato sódico.

XXX AJBAT
TABLA XXVI

4.6.1. - Efecto de la infusión de 5 μg / Kg de peso de adrenalina sobre las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, piruvato cinasa y sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal.

Con esta dosis de adrenalina pudimos comprobar que la concentración de lactato en sangre aumentaba significativamente a los 15 minutos del comienzo de la infusión: de $1.881 \pm 0.302 \mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$ a 3.190 ± 0.280 , disminuyendo progresivamente a 2.960 ± 0.110 a los 30 minutos y a 1.670 ± 0.200 a los 60 minutos.

Los resultados encontrados a las dos horas del comienzo de la infusión están reflejados en la tabla XXVI y gráfica nº 18. Puede observarse un aumento altamente significativo en la capacidad gluconeogénica de corteza renal y una disminución en la concentración de glucosa en sangre.

4.6.2. - Efecto de la infusión de 10 μg / Kg de peso de adrenalina sobre las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, piruvato cinasa y sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal.

A los 15 minutos de empezar la infusión la concentración de lactato en sangre se había incrementado hasta $3.932 \pm 0.302 \mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$ y la concentración de glucosa en sangre a $9.440 \pm 0.378 \mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$.

Los resultados encontrados a la hora y a las dos horas del comienzo de la infusión se muestran en la tabla XXVII y gráfica nº 18. En los dos tiempos los resultados son semejantes: ligero aumento, pero significativo, en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, aumentos altamente significativos en la capacidad gluconeogénica y ligero descenso en la concentración de glucosa en sangre que se hace patente a las dos horas del comienzo de la infusión.

TABLA XXVI

Efecto de la infusión de adrenalina (5 µg/Kg de peso) sobre las actividades enzimáticas de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y de la piruvato cinasa, sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal y las concentraciones de lactato y glucosa en sangre, a distintos tiempos de acabar la infusión.

Las actividades enzimáticas se expresan en nmoles x minuto⁻¹ x mg⁻¹ de proteína. La capacidad gluconeogénica en µmoles de glucosa producida x hora⁻¹ x gramo⁻¹ de tejido fresco. Las concentraciones de lactato y glucosa en sangre como µmoles x ml⁻¹ de sangre.

Los resultados son medias ± el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

* P < 0.01 ** P < 0.001 según el test de la t de Student.

	CONTROLES	ADRENALINA
PEPCK	40 ± 3 (6)	50 ± 5 (5)
GNG renal	116 ± 5 (6)	154 ± 6 (6) **
PK	198 ± 18 (5)	225 ± 11 (6)
Lactato	2.139 ± 0.206 (6)	2.229 ± 0.311 (5)
Glucosa	7.195 ± 0.408 (6)	5.989 ± 0.316 (6) *

TABLA XXVII

Efecto de la infusión de adrenalina (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso) sobre las actividades enzimáticas de la fosfoenolpiruvato carboxicinas y de la piruvato cinasa, sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal y las concentraciones de lactato y glucosa en sangre, a distintos tiempos de acabar la infusión.

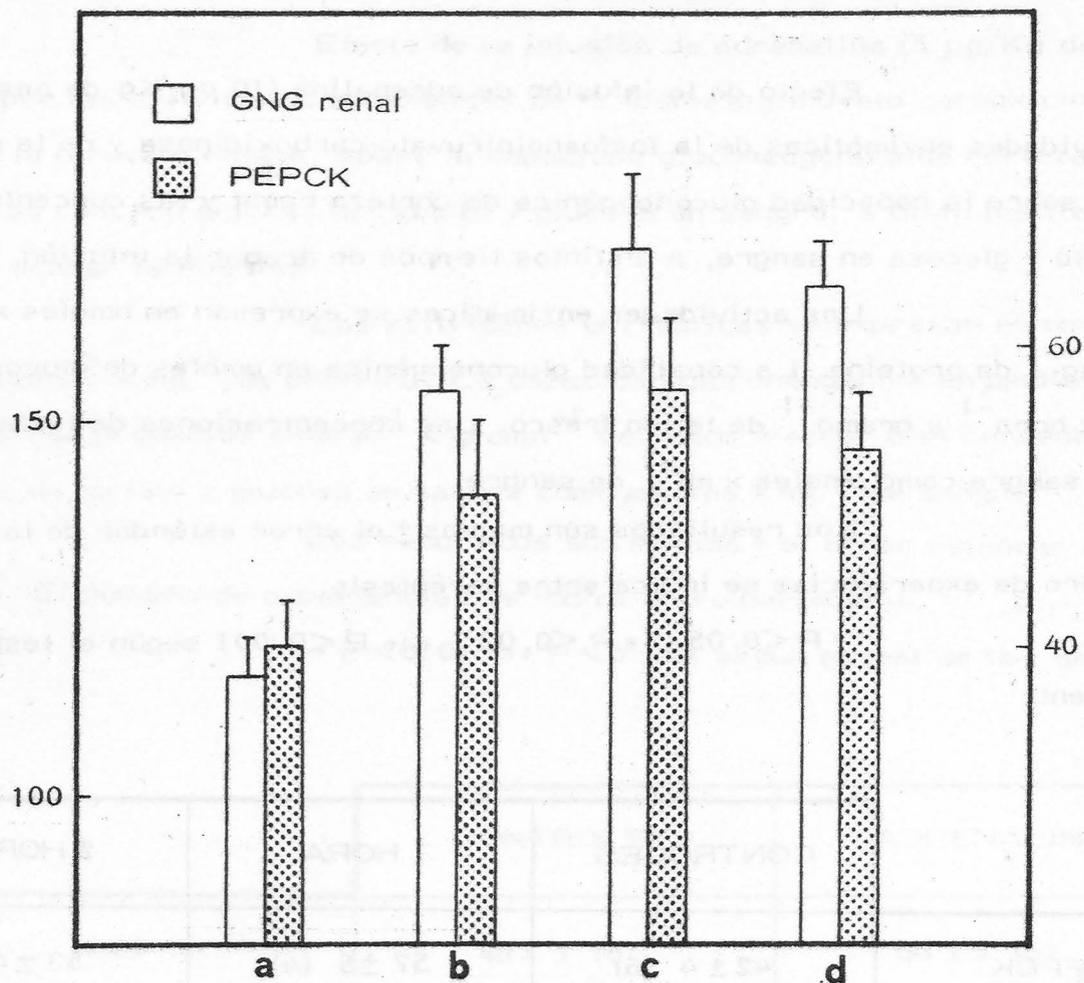
Las actividades enzimáticas se expresan en $\text{nmoles} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína. La capacidad gluconeogénica en μmoles de glucosa producida $\times \text{hora}^{-1} \times \text{gramo}^{-1}$ de tejido fresco. Las concentraciones de lactato y glucosa en sangre como $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$ de sangre.

Los resultados son medias \pm el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre paréntesis.

* $P < 0.05$ ** $P < 0.02$ *** $P < 0.001$ según el test de la t de Student.

	CONTROLES	1 HORA	2 HORAS
PEPCK	42 ± 4 (6)	57 ± 5 (4)**	53 ± 4 (4)*
GNG renal	114 ± 7 (6)	173 ± 10 (4)***	167 ± 6 (8)***
PK	213 ± 16 (6)	244 ± 34 (4)	250 ± 37 (3)
Lactato	1.999 ± 0.128 (7)	2.788 ± 0.416 (3)	2.887 ± 0.361 (7)*
Glucosa	7.332 ± 0.219 (6)	7.220 ± 0.288 (3)	6.159 ± 0.168 (8)**

GRAFICA Nº 18



Efecto de la infusión de adrenalina

(distintas dosis y muerte a distintos tiempos) sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas y sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal de rata.

a Controles.

b Infusión de $5 \mu\text{g} \times \text{Kg}^{-1}$ de adrenalina y muerte a las 2 horas del comienzo de la misma.

c Infusión de $10 \mu\text{g} \times \text{Kg}^{-1}$ de adrenalina y muerte a 1 hora del comienzo de la misma.

d Infusión de $10 \mu\text{g} \times \text{Kg}^{-1}$ de adrenalina y muerte las 2 horas del comienzo de la misma.

V. DISCUSION

5.1. EVOLUCION DE LOS PARAMETROS BIOQUIMICOS RELACIONADOS CON LA TRUCOGENESIS A LO LARGO DEL DIA.

Solo muy recientemente los biólogos han tomado conciencia de que muchos procesos fisiológicos están sometidos a ciclos de actividad cuando se estudian bajo condiciones constantes de laboratorio. En muchos casos, los ciclos son de 24 horas y para ellos el profesor Franz Halberg, de la Universidad de Minnesota, ha propuesto el término de ritmos "circadianos" (ritmos de aproximadamente un día).

En la actualidad se conocen ritmos de esta clase para algunos enzimas de gran interés metabólico, entre otros la fosfoenolpiruvato carboxilasa. El ritmo de actividad de este enzima ha sido estudiado por Phillip y Barry en hígado de ratón (189, 190), por Nagai, Suda y Nakagawa y por Lane y Marinides en hígado de rata (181, 183, 191) y por Nagai, Suda, Yonagishi, Takami y Nakagawa en riñón de rata (184). Hay que hacer notar que en muchos casos la amplitud de las variaciones en la actividad de este enzima sobrepasa de los efectos originados por diversas manipulaciones nutricionales y hormonales. Esto obliga necesariamente a una gran cautela en la interpretación de los resultados, máxime cuando los mecanismos responsables del ritmo biológico natural no están todavía bien conocidos.

V. - DISCUSION

Nuestro estudio se ha realizado en unas condiciones similares a las reseñadas en la bibliografía que estamos citando, pero durante un tiempo a que se han realizado las determinaciones en períodos más cortos que los de 24 horas y nuestros resultados experimentales coinciden con los de Halberg y sus colaboradores y nuestros resultados experimentales coinciden con los de Halberg y sus colaboradores y nuestros resultados experimentales coinciden con los de Halberg y sus colaboradores.

V DISCUSION

5. 1. EVOLUCION DE LOS PARAMETROS BIOQUIMICOS RELACIONADOS CON LA GLUCONEOGENESIS A LO LARGO DEL DIA.

Solo muy recientemente los biólogos han tomado conciencia de que muchos procesos fisiológicos están sometidos a ciclos de actividad cuando se estudian bajo condiciones constantes de laboratorio. En muchos casos, los ciclos son de 24 horas y para ellos el profesor Franz Halberg, de la Universidad de Minnesota, ha propuesto el término de ritmos "circadianos" (ritmos de aproximadamente un día).

En la actualidad se conocen ritmos de esta clase para algunas enzimas de gran interés metabólico, entre ellas la fosfoenolpiruvato carboxicinas. El ritmo "circadiano" de esta enzima ha sido estudiado por Phillis y Berry en hígado de ratón (189, 190), por Nagai, Suda y Nakagawa y por Lane y Mavrides en hígado de rata (182, 183, 191) y por Nagai, Suda, Yamagishi, Toyama y Nakagawa en riñón de rata (184). Hay que hacer notar que en muchos casos la amplitud de las variaciones en la actividad de esta enzima supera la de los efectos originados por diversas manipulaciones nutricionales u hormonales. Ello obliga, necesariamente, a una gran cautela en la interpretación de los resultados, máxime cuando los mecanismos responsables del ritmo biológico natural no están todavía bien conocidos.

Nuestro estudio se ha realizado en unas condiciones similares a las reseñadas en la bibliografía que acabamos de citar, pero los tiempos a que se han realizado las determinaciones eran distintos pues correspondían específicamente a nuestras necesidades experimentales habituales. En general se puede decir que la concordancia ha sido muy grande y los datos obtenidos nos han permitido realizar las experiencias siguientes en las condiciones más adecuadas , en las que la actividad gluconeogénica

es mínima.

Otro aspecto destacable de forma general es la notable similitud entre las variaciones registradas, en la mayoría de los casos, en las ratas con acceso a la comida y las privadas de alimento. Esta similitud no es difícil de explicar si se tiene en cuenta que la rata se alimenta, fundamentalmente, en las horas de oscuridad, siendo muy pequeña la ingesta durante la etapa luminosa. La ausencia de alimento se nota especialmente en los valores de glucógeno y glucosa sanguínea en las últimas horas de la experiencia, valores que son lógicamente menores que los correspondientes a los animales con acceso a la comida.

La curva ascendente de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática concuerda totalmente con los datos bibliográficos. Es interesante resaltar que las variaciones enzimáticas son inversas al contenido en glucógeno, lo que resulta de interés fisiológico indudable, dado el papel gluconeogénico fundamental de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa. Al alcanzar la máxima actividad aumenta el potencial de síntesis de glucosa aunque probablemente esta capacidad no será utilizada a gran escala a menos que los animales sean privados de alimento durante las horas siguientes de oscuridad.

Las fluctuaciones de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal se corresponden en amplitud con las reseñadas en la bibliografía, aunque el incremento en la actividad se inicia antes en nuestras condiciones experimentales. Es especialmente destacable el paralelismo con la capacidad gluconeogénica de la corteza renal, lo que subraya, una vez más, el papel esencial de dicha enzima en la regulación de la producción de glucosa por el riñón.

En relación a los resultados obtenidos tras 24 horas de

ayuno, se corroboran datos ampliamente conocidos, tales como el descenso en la glucemia y el aumento de la concentración de cuerpos cetónicos en sangre. Por otra parte, no se han obtenido diferencias significativas para la actividad de las enzimas fructosa difosfatasa, piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa. Para esta última enzima no ha sido descrita ninguna activación por ayuno, mientras que los datos bibliográficos en relación a la piruvato cinasa y fructosa difosfatasa no son coherentes sino, incluso, contradictorios (43, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198). En cualquier caso, parece ahora bien establecido que ambas enzimas pueden ser reguladas en su actividad sin cambios importantes en la cantidad de proteína. Así la fructosa difosfatasa se regula fundamentalmente por los niveles de sus efectores alostéricos, básicamente, AMP (199, 200, 201). Por lo que se refiere a la piruvato cinasa, su papel regulador en el sistema glucolisis - gluconeogénesis está relacionado con la existencia de formas convertibles (por fosforilación - defosforilación) en la isoenzima tipo L que tienen distinta actividad (202, 203, 204, 205).

La fosfoenolpiruvato carboxicinasas alcanza valores muy superiores a los encontrados durante las primeras 16 horas, sobre todo en el caso de la corteza renal, lo que concuerda perfectamente con los datos bibliográficos (43, 206). Esta activación registrada "in vitro" se refleja en el perfil de los metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis obtenido en experiencias "in vivo". En efecto, tanto en hígado como en riñón aparece un decrecimiento de malato y un incremento de fosfoenolpiruvato con respecto a las concentraciones basales. Los niveles de malato reflejan en una cierta extensión a los de oxalacetato, más difícil de medir, y sustrato de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas. Ello parece indicar que la gluconeogénesis funciona en ambos órganos de acuerdo con sus condicionamientos fisiológicos respectivos. El desencadenamiento de la gluconeogénesis hepática debe estar provocado por la hipoglucemia a través de los estímulos hor-

monales oportunos. En cambio, la producción de glucosa por el riñón parece estar vinculada a la regulación del equilibrio ácido-básico del medio interno (188). Por ello el aumento en la gluconeogénesis renal debe estar condicionado por la acidosis metabólica originada por el acúmulo de los compuestos cetónicos en plasma.

La última consideración en torno a estos resultados concierne a la diferencia entre los valores controles de fosfoenolpiruvato carboxicinasa y de la capacidad gluconeogénica de corteza renal reseñados en las tablas II y V. Estos últimos resultados corresponden a experiencias realizadas en Marzo, mientras que los datos de la tabla II fueron obtenidos en Enero. Las diferencias para la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal en estos meses ha sido descrita recientemente por Nagai y colaboradores (184) y son del mismo orden de magnitud que las que comentamos.

5. 2. - ACIDOSIS LACTICA Y GLUCONEOGENESIS RENAL DURANTE EL EJERCICIO.

Las relaciones entre la gluconeogénesis renal y la acidosis están bien establecidas (véase parte teórica, sección 2. 2. 2.). Cuando en nuestro Departamento se puso de manifiesto que el ejercicio muscular, realizado en determinadas condiciones experimentales (natación en agua a 22° C), producía una activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal de rata, esta activación fué atribuida a la acidosis provocada por la acumulación de lactato en plasma como consecuencia de la intensa glucólisis muscular (206, 207). Posteriormente, la vinculación del efecto del ejercicio a la acidosis metabólica concomitante ha sido confirmada en ulteriores trabajos (185, 187).

Por otra parte, existían algunos datos que permitían supo-

ner que la gluconeogénesis renal era operativa " in vivo " durante el ejercicio de acuerdo con el perfil de metabolitos intermediarios del proceso (49) pero no existía ningún estudio de este tipo en ratas no acidóticas sometidas a natación.

Nosotros hemos acometido este último estudio con el fin de corroborar que el funcionamiento de la gluconeogénesis renal durante el ejercicio está vinculado a la existencia de acidosis. Para ello, se han determinado los metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis en hígado y riñón de ratas sometidas a ejercicio y tratadas previamente con bicarbonato para prevenir la acidosis. Paralelamente se han realizado una serie de determinaciones relacionadas con la gluconeogénesis como referencia para interpretar los datos obtenidos " in vivo ".

Como ya se ha indicado anteriormente, el ejercicio se ha desarrollado entre las 10 y las 12 horas, periodo que coincide con el utilizado habitualmente con anterioridad y en el que tiene lugar un decrecimiento de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal en las ratas controles.

La evolución de la capacidad gluconeogénica renal y de los valores de ácido láctico y de glucosa en sangre durante el ejercicio coincide con los datos obtenidos anteriormente (185, 187). Si bien la lactacidemia a los 15 minutos de la natación es ahora menor, ello se debe a que también son menores los valores iniciales de lactato, siendo idéntico el incremento en todos los casos. Se corrobora también que el descenso de la lactacidemia a la normalidad es más lento en los animales tratados con bicarbonato, lo que parece explicarse por el menor funcionamiento de la gluconeogénesis renal a partir de lactato en estos animales (187).

Datos originales de estos estudios " in vitro " son los que se refieren a la evolución de las enzimas glucosa 6 fosfatasa y piruvato cina-

sa durante las dos horas de natación. Sobre la glucosa 6 fosfatasa existían datos preliminares que indicaban una activación ligera durante el ejercicio (49). En cuanto a la piruvato cinasa, el interés de su estudio radica en que se trata de una enzima cuyo funcionamiento afecta negativamente a la gluconeogénesis por facilitar el reciclaje del fosfoenolpiruvato (producido por la fosfoenolpiruvato carboxicinas) a piruvato. De hecho, la relación entre las actividades de estas dos enzimas, piruvato cinasa y fosfoenolpiruvato carboxicinas, condiciona el funcionamiento de la gluconeogénesis en diversas condiciones experimentales (208)

Si solo se tienen en cuenta los resultados obtenidos para la evolución de la actividad ensayable de la piruvato cinasa, es lógico pensar que el funcionamiento de la gluconeogénesis durante el ejercicio no debe estar facilitado en hígado. Incluso se puede establecer un cierto antiparalelismo entre la actividad de la piruvato cinasa y las concentraciones de fosfoenolpiruvato en hígado a los distintos tiempos estudiados. De todos modos, la actividad ensayable de la piruvato cinasa no basta para deducir su funcionamiento " in vivo ", puesto que este depende, sobre todo, de la especie enzimática presente entre las formas convertibles de la isoenzima tipo L (202, 203, 204, 205). Para el riñón solo se ha detectado un cambio significativo a los 90 minutos, coincidiendo con el máximo de activación en hígado. Sin embargo, a este tiempo no hay correspondencia con un descenso en las concentraciones de fosfoenolpiruvato renal. Aunque la distribución isoenzimática de la piruvato cinasa en riñón difiere de la del hígado, la regulación de la enzima se realiza de forma similar (167, 209; 210, 211, 212, 213) por lo que la interpretación de estos fenómenos requiere un cuidadoso estudio ulterior.

El aumento en la actividad ensayable de la piruvato cinasa hepática que tiene lugar durante el ejercicio parece estar relacionado con la acidosis puesto que no se da cuando a los animales se les administra previa-

mente bicarbonato. Por otra parte, aunque en estas condiciones hay un aumento de la piruvato cinasa en el riñón a los 60 minutos de ejercicio, la administración de bicarbonato proporciona valores de actividad más bajos en los últimos tiempos, por lo que el esquema general de estos efectos podría sumariarse así: durante el ejercicio aumenta la actividad de la enzima en hígado y riñón, siendo anulados estos efectos por la administración de bicarbonato. Dada la trascendencia de la piruvato cinasa a efectos de regulación, de acuerdo con las recientes investigaciones que acabamos de citar, parece claro el interés de proseguir estudios durante el ejercicio, profundizando en los aspectos isoenzimáticos para poner de manifiesto cuál de las especies moleculares se ve afectada en nuestro sistema experimental.

Por lo que se refiere a la glucosa 6 fosfatasa, las variaciones encontradas son de pequeña magnitud y en muchos casos no significativas. Se corrobora el efecto estimulante del ejercicio sobre la enzima renal ya descrito en un trabajo anterior (49), efecto que no parece estar relacionado con la acidosis. La enzima hepática sufre un ligero pero significativo declive al final del ejercicio mientras que la administración de bicarbonato durante la natación se traduce en un aumento de la actividad. En cambio, las referencias bibliográficas indican que el bicarbonato afecta negativamente "in vitro" a la glucosa 6 fosfatasa (214).

La evolución de los metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis a lo largo del ejercicio parece indicar que este proceso no funciona a gran escala en el hígado. Se observa un gran acúmulo de lactato y piruvato a los 15 minutos - que coincide con la máxima lactacidemia -, seguido de un decrecimiento gradual a lo largo del tiempo hasta retornar a los valores iniciales. Sin embargo, dado el progresivo aumento de malato y, sobre todo, de aspartato, es lógico pensar que gran parte del esqueleto carbonado del lactato no toma la vía gluconeogénica. Ello coincide con la relativa cons

tancia de los valores de fosfoenolpiruvato. La poca operatividad de la gluconeogénesis hepática no es difícil de explicar si se recuerda que se trata de animales bien alimentados y con suficiente cantidad de glucógeno de reserva. La gluconeogénesis hepática es probablemente el origen de la constancia en los altos valores de glucosa 6 fosfato durante todo el ejercicio. La contribución del glucógeno hepático al mantenimiento de la glucemia durante el ejercicio está bien establecida (90, 105, 106, 109).

La administración de bicarbonato se manifiesta fundamentalmente por el gran incremento de las concentraciones de 2 fosfoglicerato y fructosa difosfato sobre los valores iniciales, aunque se llega a la normalización al final del ejercicio. Desafortunadamente no disponemos de valores de 3 fosfoglicerato por lo que es difícil atribuir el incremento en 2 fosfoglicerato a una inhibición de la enolasa. En cambio, sí parece lógico pensar en una inhibición "in vivo" de la fructosa difosfatasa porque, simultáneamente, tiene lugar un descenso en fructosa 6 fosfato.

Otro aspecto destacable es que en las ratas no acidóticas las concentraciones de lactato y piruvato a los 15 minutos son muy inferiores a las correspondientes a los animales acidóticos. Ello parece indicar una dificultad inicial en estos últimos animales para metabolizar el lactato, lo que concuerda con las experiencias de Iles y cols. en hígado perfundido, que encuentran que la gluconeogénesis hepática se inhibe por acidosis a partir de lactato y piruvato (62).

Los datos para el riñón indican, por el contrario, que la gluconeogénesis es altamente operativa durante el ejercicio en los animales acidóticos y que decrece algo en los animales tratados con bicarbonato. En efecto, el acúmulo de lactato y piruvato a los 15 minutos es menor en los primeros que en los segundos y aunque los niveles de hexosas fosfato son altos en estos a partir de los 30 minutos iniciales, los niveles de dichas hexosas se mantienen elevados durante todo el ejercicio en los animales no tratados.

Los valores de glucosa 6 fosfato en este caso solo pueden ser indicativos de gluconeogénesis, dada la pequeña cantidad de glucógeno que es capaz de almacenar el riñón.

Las diferencias con el hígado todavía son más claras en relación a los metabolitos implicados en la reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxicinasas. En el riñón no existe acúmulo sino decrecimiento en aspartato mientras que los niveles tisulares de malato, aunque aumentan en los primeros momentos como consecuencia del metabolismo del lactato, van decreciendo después paulatinamente hasta la normalidad. Es lógico deducir que las concentraciones de oxalacetato (reflejo de las de aspartato y malato) son en todos los momentos poco importantes. El fosfoenolpiruvato, en cambio, aumenta gradualmente a partir de los 30 minutos, indicando muy claramente la progresiva aceleración de la reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y confirmando "in vivo" los resultados obtenidos "in vitro". La administración de bicarbonato parece traducirse, en cambio, en un paulatino decrecimiento en la velocidad de esta reacción, como también cabía esperar de las experiencias "in vitro".

Como resumen de estas consideraciones puede decirse que la gluconeogénesis hepática contribuye poco a la homeostasis glucémica durante el ejercicio, siendo más importante el aporte de glucosa a la sangre procedente de la glucogenólisis. La gluconeogénesis renal, por el contrario, es operativa en estas condiciones, sobre todo en los animales acidóticos. La prevención de la acidosis hace decrecer la velocidad de la reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y parece que disminuye en conjunto la producción de glucosa.

Las experiencias realizadas con animales adrenalectomizados tenían por objeto confirmar la vinculación de la respuesta renal al ejercicio con la acidosis metabólica que acompaña a esta situación fisiológica por una vía complementaria a las utilizadas con anterioridad. Aunque está establecido que la inducción de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal tiene lugar, únicamente, por dos tipos de estímulos: -) acidosis metabólica y -) hormonas corticoides (188), el mecanismo es distinto para ambos, de tal forma que el efecto de la acidosis se puede dar en animales adrenalectomizados (188). Nuestros resultados son similares, constituyendo, por tanto, un dato confirmativo adicional de nuestra hipótesis de trabajo. Los animales adrenalectomizados pudieron soportar el ejercicio porque este tuvo una duración de solo 15 minutos seguido de un descanso hasta las dos horas habituales. Como había sido puesto de manifiesto en nuestro Departamento con anterioridad, el efecto de los 15 minutos de ejercicio es igual que si la natación se mantiene dos horas dado que la producción de lactato es idéntica en los dos casos (185).

Por último, hemos tratado de reproducir experimentalmente una situación de acidosis láctica infundiendo ácido láctico a los animales. Yudkin y Cohen han estudiado la contribución del riñón al consumo de lactato en estas condiciones (53), pero el efecto de la acidosis láctica experimental sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal, no había sido puesto de manifiesto con anterioridad. En todos los casos los estudios se habían realizado con animales hechos acidóticos por ingestión de cloruro amónico (188)

Dado que los animales no soportaban bien la infusión de una dosis de 8 mmoles / Kg., que originaba unos valores de lactato en sangre similares o incluso algo mayores que en el ejercicio, nuestros estudios

se han realizado con la mitad de la dosis, lo que originaba una lactacidemia claramente menor que la correspondiente al ejercicio. Sin embargo, los resultados obtenidos en estas condiciones son similares a los obtenidos en los animales sometidos a ejercicio, unicamente no hay respuesta para la piruvato cinasa, tal vez porque la activación de esta enzima requiera más altos valores de lactato en sangre.

Como era de esperar, según nuestra hipótesis de trabajo, la sustitución del ácido láctico por lactato sódico lleva consigo la desaparición de la respuesta renal, puesto que en este caso no hay acidosis metabólica a pesar del aumento en la lactacidemia.

La infusión de $5 \mu\text{g} / \text{Kg}$. de adrenalina se traduce en un incremento de lactato en sangre inferior al que se consigue por infusión directa del mismo. En estas condiciones no hay estímulo sobre la fosfoenolpiruvato carboxicinasas pero en cambio aumenta la capacidad gluconeogénica renal. Es claro que en este caso esta inducción debe tener otro mecanismo, quizá relacionado con las concentraciones intracelulares de AMP cíclico, que parece ser el mediador de la respuesta renal a las catecolaminas (215). Al aumentar la dosis de adrenalina y conseguirse una concentración mayor de lactato en sangre, la fosfoenolpiruvato carboxicinasas renal muestra una ligera pero significativa activación, en tanto que la capacidad gluconeogénica renal se incrementa considerablemente, como era de esperar de acuerdo con los razonamientos anteriores.

En resumen, se puede concluir que la acidosis láctica experimental produce un efecto similar al del ejercicio sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal. Aunque en las condiciones fisiológicas del ejercicio interviene la

adrenalina en el aumento de la concentración de lactato sanguíneo, de forma decisiva, por su conocida acción sobre la glucogenolisis muscular, el mecanismo de acción de esta hormona es distinto y no parece ser ella la desencadenante de la respuesta metabólica renal sino la acidosis láctica originada.

VI RESUMEN Y CONCLUSIONES

1.- En nuestras condiciones experimentales específicas se ha estudiado, a lo largo del día, la evolución de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y de la capacidad gluconeogénica de corteza renal, así como de otros parámetros bioquímicos relacionados con la gluconeogénesis. Ello ha permitido seleccionar las 12 de la mañana como la hora más adecuada para realizar las siguientes determinaciones, por ser mínima, en ese momento, la actividad gluconeogénica.

2.- Se han determinado los metabolitos intermedios de la gluconeogénesis en hígado y riñón de ratas sometidas a ejercicio y tratadas previamente con bicarbonato para prevenir la acidosis. Para el momento se han realizado una serie de determinaciones relacionadas con la gluconeogénesis como referencia para interpretar los datos obtenidos "in vivo". De los datos obtenidos parece deducirse que la gluconeogénesis hepática contribuye poco, durante el ejercicio, al mantenimiento de la glucemia. En cambio, la gluconeogénesis renal es operativa en estas condiciones, confirmando los resultados "in vitro" y los datos preliminares obtenidos "in vivo". La prevención de la acidosis hace disminuir la actividad catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxilasa y disminuye globalmente la producción de glucosa por la corteza renal.

VI.- CONCLUSIONES

1.- La administración no impide la activación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal por el ejercicio. Ello permite a los glucocorticoides como mediadores de dicha activación y constituye una contribución adicional de la vinculación de esta a la acción metabólica que acompaña al ejercicio.

VI RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1. - En nuestras condiciones experimentales específicas se ha estudiado, a lo largo del día, la evolución de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y de la capacidad gluconeogénica de corteza renal, así como de otros parámetros bioquímicos relacionados con la gluconeogénesis. Ello ha permitido seleccionar las 12 de la mañana como la hora más adecuada para realizar las siguientes determinaciones, por ser mínima, en ese momento, la actividad gluconeogénica.

2. - Se han determinado los metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis en hígado y riñón de ratas sometidas a ejercicio y tratadas previamente con bicarbonato para prevenir la acidosis. Paralelamente se han realizado una serie de determinaciones relacionadas con la gluconeogénesis como referencia para interpretar los datos obtenidos "in vivo". De los datos obtenidos parece deducirse que la gluconeogénesis hepática contribuye poco, durante el ejercicio, al mantenimiento de la glucemia. En cambio, la gluconeogénesis renal es operativa en estas condiciones, confirmando los resultados "in vitro" y los datos preliminares obtenidos "in vivo". La prevención de la acidosis hace decrecer la velocidad de la reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y disminuye globalmente la producción de glucosa por la corteza renal.

3. - La adrenalectomía no impide la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal por el ejercicio. Ello elimina a los glucocorticoides como mediadores de dicha activación y constituye una confirmación adicional de la vinculación de esta a la acidosis metabólica que acompaña al ejercicio.

4. - La infusión de ácido láctico produce efectos similares a los del ejercicio sobre la fosfoenolpiruvato carboxicinas y la capacidad gluconeogénica de la corteza renal. La sustitución del ácido láctico por lactato sódico lleva consigo la desaparición de este efecto, lo que lo hace claramente atribuible a la acidosis metabólica y no al incremento en la lactici- demia.

5. - La infusión de adrenalina estimula fuertemente la capa- cidad gluconeogénica de la corteza renal y solo muy ligeramente la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas, siendo este ultimo efecto dependiente de la concentración de ácido láctico que se alcanza en sangre.

CONCLUSION GENERAL

Se confirma que la activación de la fosfoenolpiruvato carbo- xi cinasa y de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal producidas por el ejercicio realizado en nuestras condiciones experimentales (natación en - agua a 22 °C) se debe a la acidosis láctica que lo acompaña.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- OLIVA, PH. B.: *The American Journal of Medicine*, **55**, 209, (1970).
 - 2.- COHEN, R. D. y WOODS, H. F.: Blackwell Scientific Publications, Oxford y London (1966).
 - 3.- MCKHASEE, W. E.: *J. Clin. Invest.* **37**, 294, (1958).
 - 4.- GOLDSMITH, G. A.: *Amer. J. Med. Sci.* **215**, 182, (1968).
 - 5.- HARRIS, P.; BATESMAN, M. y GLOSTER, J.: *Clin. Sci.* **23**, 251, (1962).
 - 6.- ALPERT, N. B.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **119**, 973, (1965).
 - 7.- OLSON, R. E.: *Ann. Intern. Med.*, **58**, 960, (1963).
 - 8.- CAIN, S. M.: *Amer. J. Physiol.*, **205**, 604, (1963).
 - 9.- RUGGLES, T. N.; LAVIETES, M. H.; MILLER, M.; WOODWARD, F. y THEISTER, M.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **145**, 602, (1968).
 - 10.- MCKHASEE, W. E.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 723, (1965).
 - 11.- BLURIDGE, F.: *New Eng. J. Med.* **275**, 979, (1966).
 - 12.- MCKHASEE, W. E.: *J. Clin. Invest.* **37**, 264, (1958).
 - 13.- WITHOEFER, J. C.; RUNSER, R. H. y KRAETZKY, M. S.: *New Eng. J. Med.* **272**, 1200, (1965).
 - 14.- STRAUSS, F. G.; SULLIVAN, M. A.: *J. Hopkins Med. J.* **135**, 378, (1971).
- ## VII. - BIBLIOGRAFIA
- 15.- PERETZ, G. I.; MURPHY, M. y DOSSETOR, J. B.: *Canad. Med. Ass. J.* **90**, 871, (1964).
 - 16.- HORNBERG, R. W.; SAGGA, G.; PENN, I. y SWERDLOFF, P. A.: *Amer. Med. Ass. J.* **191**, 321, (1961).
 - 17.- MACLEAN, L. D.; MURPHY, W. D.; WELLS, A. P. H. y KAPLAN, J. H.: *Ann. Surg.* **115**, 793, (1970).
 - 18.- TRANQUADA, R. E.; SPAIN, W. J. y PEPPER, H. W.: *Ann. Intern. Med.* **117**, 182, (1962).
 - 19.- JARVELA, O.: *Ann. Med. Scand. Suppl.* **25**, 1, (1960).

VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- OLIVA, PH. B.: The American Journal of Medicine, 48, 209, (1970).
- 2.- COHEN, R. D. y WOODS, H. F.: Blackwell Scientific Publication, Oxford y London (1976).
- 3.- HUCKABEE, W. E.: J. Clin. Invest. 37, 244, (1958).
- 4.- GOLDSMITH, G. A.: Amer. J. Med. Sci. 215, 182, (1968).
- 5.- HARRIS, P.; BATEMAN, M. y GLOSTER, J.: Clin. Sci. 23, 251, (1962).
- 6.- ALPERT, N. R.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 119, 995, (1965).
- 7.- OLSON, R. E.: Ann. Intern. Med., 59, 960, (1963).
- 8.- CAIN, S. M.: Amer. J. Physiol. 209, 604, (1965).
- 9.- RUGGLES, T. N.; LAVIETES, M. H.; MILLER, M.; WOODWARD, H. y TREISTER, M.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 148, 662, (1968).
- 10.- HUCKABEE, W. E. : Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 723, (1965).
- 11.- ELDRIDGE, F.: New Eng. J. Med. 274, 878, (1966).
- 12.- HUCKABEE, W. E. : J. Clin. Invest. 37, 264, (1958).
- 13.- MITHOEFER, J. C.; RUNSER, R. H. y KARETZKY, M. S.: New Engl. J. Med. 272, 1200, (1965).
- 14.- STRAUSS, F. G.; SULLIVAN, M. A.; J. Hopkins Med. J. 128, 278, (1970).
- 15.- PERETZ, D, I.; MCGREGOR, M. y DOSSETOR, J. B.: Canad. Med. Ass. J. 90, 673, (1964).
- 16.- HOPKINS, R. W.; SABGA, G.; PENN, I. y SIMEONE, F. A.: J. Amer. Med. Ass. , 191, 731, (1965).
- 17.- MACLEAN, L. D.; MULLIGAN, W. G.; McLEAN, A. P. H. y DUFF, J. H.: Ann. Surg. 166, 543, (1967).
- 18.- TRANQUADA, R. E.; GRANT, W. J. y PETERSON, P. R.: Arch. Intern. Med. 117, 192, (1966).
- 19.- JERVELL, O. : Acta. Med. Scand. Suppl. 24, 1, (1928).

20. - HUCKABEE, W. E.: Amer. J. Med. 30, 833, (1961)
21. - ANDERSON, J. y MAZZA, R.: Lancet, iii, 270, (1963).
22. - HARTMANN, A.F.: Arch. Intern. Med. 56, 413, (1935).
23. - WATKINS, P. J.; SMITH, J. S.; FIZGERALD, M. G. y MALINS, J. M.:
Brit. Med. J. 1, 744, (1969)
24. - MARLISS, E. B.; OHMAN, J. L.; AOKI, T. T. y KOZAK, G. P.: New
Engl. J. Med. 283, 978, (1970).
25. - ZIMMET, P. Z.; TAFT, P.; ENNIN, G. C. y SHEATH, J.: Brit. Med.
J. 3, 610, (1970).
26. - ARIEFF, A. I. y CARROLL, H.: J. Medicine 51, 73, (1972).
27. - FIELD, M.; BLOCK, J. B.; LEVIN, R. y RALL, D. P.: Amer. J. Med.
40, 528, (1966).
28. - BLOCK, J. B.; BRONSON, W. R. y BELL, W. R.: Ann. Intern. Med.
65, 101, (1966).
29. - ZUPPINGER, K. y ROSSI, E.: Helv. Med. Acta. 35, 406 (1969).
30. - BAKER, L. y WINEGRAD, A. I.: Lancet. iii, 13, (1970).
31. - PAGLIARA, A. S.; KARL, I. E.; KEATING, J. P.; BROWN, B. I. y
KIPNIS, D. M.: J. Clin. Invest. 51, 2115, (1972).
32. - LACHER, J. y LASAGNA, L.: Clin. Pharmacol. Therap. 7, 477, (1966).
33. - JANGAARD, N. O.; PEREIRA, J. N. y PINSON, E. R.: Diabetes, 17,
96, (1968).
34. - FORSANDER, O. A.: Biochem. J. 98, 244, (1966).
35. - SELIGSON, D.; WALDSTEIN, S. S.; GIGES, B.; MERONEY, W. H. y
SBOROV, V. M.: Clin. Res. Proc. 1, 86, (1953).
36. - KREBS, H. A.; CUNNINGHAM, D. J. C.; STUBBS, M. y JENKINS, D.
J. A.: Israel J. Med. Sci. 5, 959, (1969).
37. - WOODS, H. F. y KREBS, H. A.: Biochem. J. 125, 129, (1971).
38. - MARGARIA, R.: "Exercise in altitude". Excepta Medica Foundation.
New York. (1967).
39. - DANIEL, S. S. y JAMES, L. S.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 119, 1147, (1965).
40. - DICKER, S. E. y SHIRLEY, D. G.: J. Physiol. 212, 235, (1971).

- 41.- BALLARD, F. J.: *Biochem. J.* 124, 265, (1971).
- 42.- KREBS, H. A.: *Essays in Biochemistry*, vol. 8, 1, (1972).
- 43.- SCRUTTON, M. C. y UTTER, M. F.: *Ann. Rev. Biochem.* 37, 249, (1968).
- 44.- EXTON, J. H.: *Metabolism* 21, 945, (1972).
- 45.- HANSON, R. W. y GARBER, A. J.: *Amer. J. Clin. Nutr.* 25, 1010, (1972).
- 46.- HANSON, R. W.; GARBER, A. J.; RESHEF, L. y BALLARD, F. D.: *Amer. J. Clin. Nutr.* 26, 56, (1973).
- 47.- NEWSHOLME, E. A. y START, C.: "Regulation in metabolism". 247, John Wiley El Sous, London (1975).
- 48.- SANCHEZ CAMPOS, L.: Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
- 49.- GARCIA RUIZ, J. P.: Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- 50.- KREBS, H. A.: *Adv. Enzyme Regul.* 10, 397, (1972)
- 51.- HEWLETT, A. W.; BARNETT, G. D. y LEWIS, J. K.: *J. Clin. Invest.* 3, 317, (1926).
- 52.- CRAIG, F. N.: *Amer. J. Physiol.* 146, 146, (1946).
- 53.- YUDKIN, J. y COHEN, R. D.: *Clin. Sci. Mol. Med.* 48, 121, (1975).
- 54.- MILLER, A. T. y MILLER, J. O.: *J. Appl. Physiol.* 1, 614, (1949).
- 55.- WICKS, W. D.; LEWIS, W. y McKIBBIN, J. B.: *Biochim. Biophys. Acta* 264, 177, (1972).
- 56.- MORENO, F.; SANCHEZ-URRUTIA, L.; MEDINA, J. M.; SANCHEZ-MEDINA, F. y MAYOR, F.: *Biochem. J.* 150, 51, (1975).
- 57.- EXTON, J. H. y PARK, C. R.: *J. Biol. Chem.* 244, 1424, (1967).
- 58.- BERRY, M. N.: *Proc. R. Soc. Med.* 60, 1260, (1967).
- 59.- HEMS, R.; ROSS, B. D.; BERRY, M. N. y KREBS, H. A.: *Biochem. J.* 101, 284, (1966).

60. - LLOYD, M. H.; ILES, R. A. y SIMPSON, B. R., STRUNIN, J. M. LAYTON, J. M. y COHEN, R. D.: Clin. Sci. Mol. Med. 45, 543, (1973).
61. - COHEN, R. D. y ILES, R. A.; Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 6, 101, (1975).
62. - ILES, R. A.; COHEN, R. D.; RIST, A. H. y BARON, P. G.: Biochem. J. 164, 185, (1977).
63. - SCRUTTON; M. C. y UTTER, M. F.: Amer. J. Med. 32, 831, (1967).
64. - SOLING, H. D.; WILLIMS, B.; KLEIMENE, J. y GEHLHOFF, M.: Europ. J. Biochem. 16, 289, (1970).
65. - KLEINEKE, J. y SOLING, H. D.: "Regulation of gluconeogenesis" Gerog. Thieme Stuttgart. 20, (1971).
66. - SCRUTTON, M. C. y WHITTE, M. D.: Biochem. Med. 9, 271, (1974).
67. - HENNING, H. V.; STUMT; B.; OHLY, B. y SEUBERT, W.: Biochem. Z. 344, 274, (1966).
68. - KAMM, D. E. y CAHILL, G. F. Jr.: Amer. J. Phisiol. 216, 1207, (1969)
69. - LISATENKO, M. S.: Biochem. Med. 3, 298, (1970).
70. - GOODMAN, A. D.; FUISZ, R. E. y CAHILL, G. F. Jr: J Clin. Invest. 45, 612, (1966).
71. - ALLEYNE, G. A. O. y SCULLARD, G. H.: J. Clin. Invest. 48, 364, (1969)
72. - ALLEYNE, G. A. O.: J. Clin. Invest. 49, 943, (1970).
73. - IYNEDJIAN, P. B.; BALLARD, F. J. y HANSON, R. W.: J. Biol. Chem. 250, 5596, (1975).
74. - ORLOFF, J. y BURG, M.: Ann. Rev. Phisiol. 33, 83, (1971).
75. - GOODMAN, A. D.: Nitrogen metabolism and the environment. 297, (1972). Academic Press, Londres y Nueva York.
76. - KUROKAWA, K. y RASMUSSEN, H.: Biochim. Biophys. Acta, 313, 17, (1973).
77. - KUROKAWA, K.; OHNO, T. y RASMUSSEN, H.: Biochim. Biophys. Acta, 313, 32, (1973).
78. - KUROKAWA, K. y RASMUSSEN, H.: Biochim. Biophys. acta, 313, 42, (1973).

79. - KUROKAWA, K. y RASMUSSEN, H., *Biochim. Biophys. Acta* 313, 59, (1973).
80. - ALLEYNE, G.A.O. y ROOBOL, A., *The Medical Clinics of North America*, 59, 781 (1975)
81. - PITTS, R. F.; PILKINGTON, L.A.; McLEOD, M. B. y LEAL-PINTO, E. *J. Clin. Invest.*, 51, 557, (1972).
82. - KAMM, D.E. y STROPE, G. L., *J. Clin. Invest.*, 51, 1251, (1972)
83. - CAHILL, G. F. Jr. y AOKI, T.T., *The Medical Clinics of North America*, 59, 751, (1975)
84. - KAMM, D.E.; STROPE, G.L. y KUCHMY, B.L., *Metabolism*, 23, 1073, (1974).
85. - FLORES, H. y ALLEYNE, G.A.O., *Biochem. J.*, 123, 35, (1971).
86. - LONGSHAW, I.D. y POGSON, C.I., *J. Clin. Invest.*, 51, 2277 (1972).
87. - LONGSHAW, I.D.; ALLEYNE, G.A.O. y POGSON, C.I., *J. Clin. Invest.* 51, 2284 (1972).
88. - GOLDBERG, I.H.; RABIONOWTZ, M. y REICH, E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48, 2094, (1962)
89. - ENNIS, H.L. y LUBIN, M., *Science*, 146, 1474, (1964).
90. - DAWSON, C.A. y HORVATH, S.M., *Medicine & Science Sports*, 2, 2, (1970).
91. - BIRREN, J.E. y KAY, H.J., *Geront*, 13, 374, (1958)
92. - NOACK, H. y SCHWARTZE, P., *Endokrinol*, 37, 119, (1959)
93. - HILL, A.V.; LONG, C.N.H. y LUPTON, H., *Proc. Roy. Soc. B.* 97, 84, (1924).
94. - HILL, A.V.; LONG, C.N.H. y LUPTON, H., *Proc. Roy. Soc. B.* 97, 96, (1924).
95. - MARGARIA, R.; EDWARDS, H. T. y DILL, D.B., *Amer. J. Physiol.* 201, 694, (1933)

96. - GOLLNICK, P. D.: Amer. J. Physiol. 213, 734, (1967).
97. - GOLLNICK, P. D. y HEARN, J. R.: Amer. J. Physiol. 201, 694, (1961).
98. - GOLLNICK, P. D. y SIMMONS, S. W.: Int. Z. Angew. Physiol. 23, 322, (1967).
99. - GOLLNICK, P. D.; STRUCK, P. J. y BOGYO, T. P.: J. Appl. Physiol. 22, 623, (1967).
100. - YANG, T. L. y LISSAK, K.: Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 17, 63, (1960).
101. - VRBA, R.: Physiol. Bohemoslov 3, 122, (1954).
102. - TORSTI, P.; VAPAATALO, H. I. y NEUVONEN, P.: Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 46, 53, (1968).
103. - GOULD, M. K. y RAWLINSON, W. A.: Amer. J. Physiol. 211, 147, (1966).
104. - WAHREN, J.; FELIG, P.; AHLBORG, G. y JORFELOLT, L.: J. Clin. Invest. 50, 2715, (1971).
105. - WILBER, C. G.: Amer. Zool. 5, 245, (1965).
106. - WILBER, C. G.: Life Sci. 8, 564, (1963).
107. - EVANS, G.: J. Physiol., 82, 468, (1934).
108. - RAMEY, E.; GOLDSTEIN, M. S. y LEVENE, R.: Amer. J. Physiol. 162, 10, (1950).
109. - HULTMAN, E.: Scand. J. of Clin. Lab. 19, Suppl. 94, (1967).
110. - ZIERLER, K. L.; MASERI, A.; KLASSEN, G.; RABINOWITZ, D. y BURGESS, J.: Trans. Ass. Amer. Physicians. 8, 266, (1968).
111. - HAVEL, R. J.; NAIMARK, A. y BORCHGREVINK, C. F.: J. Clin. Invest., 42, 1054, (1963).
112. - PAUL, P. y ISSEKUTZ, B.: J. Appl. Physiol., 22, 615, (1967).
113. - CHRISTESEN, E. H. y HANSEN, O.: Skand. Arch. Physiol., 81, 137, (1939).
114. - ISSEKUTZ, B.; MILLER, H. I. y RODAHL, K.: Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 25, 1415, (1966).

- 115.- ASTRAND, P. O.: Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 26, 1772, (1967).
- 116.- HAVEL, R. J.; CARLSON, L. A.; EKELUND, L. G. y HOLMGREN, A.: J. Appl. Physiol., 19, 613, (1964).
- 117.- ISSEKUTZ, B.; MIILLER, H. I.; PAUL, P. y RODAHL, K.: J. Appl. Physiol., 20, 293, (1965).
- 118.- MOLE, P. A. y HOLLOSZI, J. O.: Proc, Soc. Exp. Biol. and. Med., 134, 3, (1970).
- 119.- GOLLNICK, P. D.: Amer. J. Physiol., 205, 453, (1963)
- 120.- BARNES, R. H.; LABADAN, B. A.; SIYAMOGLU, B. y BRADFIELD, R. B.: Amer. J. Physiol., 207, 1242, (1964).
- 121.- LABORIT, H.; MOYMIER, R.; TRZEBSKI, A.; GUIOT, G. y BARON, C.: Compt. Rend. Soc. Biol., 151, 138, (1957).
- 122.- LABORIT, H.; OBRENOVITCH, L. y LEGUEN, F.: Compt. Rend. Soc. Biol., 152, 1359, (1958).
- 123.- ROSEN, H.; BLUMENTHAL, A.; AGERSBORG, H. P. K.: J. Pharm. Sci., 51, 592, (1962).
- 124.- MATOUSH, L. R. O.; CONSOLAZIO, C. F.; NELSON, R. A.; ISAAC, G. J. y TORRES, J. B.: J. Appl. Physiol. 19, 262, (1964).
- 125.- WINTER, D.; SAUVARD, S.; STANESCU, C.; NITELEA, I. y TANESÉSCU, D.: Studii si Cercetari de Fiziologie, Bucuresti, 12, 207, (1967).
- 126.- CRITZ, J. B.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121, 101, (1966).
- 127.- CRITZ, J. B. y WITHROW, T. S.: Steroids, 5, 719, (1965).
- 128.- SAMCSTER, J. F. y BEATON, J. R.: Proc, Soc, Exp, Biol. Med., 122, 542, (1966)
- 129.- PAPADOPOULAS, N. M.; LEON, A. S. y BLOOR, C. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125, 999, (1967).
- 130.- KRAUS, H. y KRSTEN, R.: Pflügers Arch. 320, 334, (1970).
- 131.- VRBA, R.: Physiol. Bohemoslov 3, 394, (1954).
- 132.- VRBA, R.: Nature, 176, 117, (1955).

133. - VRBA, R.: *Physiol. Bohemoslov*, 4, 397, (1955).
134. - VRBA; R.: *Nature*, 176, 1258, (1955).
135. - VRBA, R.: *Neurochem*, 1, 21, (1956).
136. - VRBA, R.: *Physiol. Bohemoslov*, 5, 257, (1956).
137. - YAKOVLEV, N. N.: *Ukrain Biokhim. Zhur*, 35, 175, (1963).
138. - ALEKSANDROVSKAYA, N. N.; GEINISNAN, Yu. Ya.; LORINA, V. N. y MATS, V. N.: *Byull. Eksp. Biol. Med.*, 64, 103, (1967).
139. - RICHTER, C.P.: *Ciba Foundation Symposium on Neurological basis of Behavior*, 204, (1958).
140. - RICHTER, C.P.: *Biological clocks in Med. & Psychiatry*, C.C. Thomas, Springfield, Illinois, 1965.
141. - GAARENSTROOM, J. H.; WATERMAN, L. y LAQUEUR, E.: *Acta Brev. Nederland Physiol.* 7, 10, (1937).
142. - WATERMAN, I.; DANBY, M.; GAARENSTROOM, J. H.; SPANHOFF, R. W. y UYLDERT, I. E.: *Acta Brev. Nederland*, 9, 75, (1939).
143. - FEDERSPIL, G.; LEFESVRE, P. y LUYCKX, A.: *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 77, 778, (1969).
144. - FRENKL, R.; CSALAY, L. y CSAKVARY, G.: *Acta Physiol. Ac. Sc. Hung.* 36, 365, (1970)
145. - VIRU, A. y AKKE, H.: *Acta. Endocrinol.* 62, 385, (1969).
146. - DUMM, M.E. y RALLI, E.P.: *Fed. Proc.* 9, 34, (1950).
147. - INGLE, D.J.: *Endocrinol.* 34, 191, (1944).
148. - INGLE, D.J. y LUKENS, F.D.: *Endocrinol.* 29, 443 (1941)
149. - GOLLNICK, P.D.; SOULE, R.G.; TAYLOR, A.W.; WILLIANS, C. y TANUZZO, C.D.: *Amer. J. Physiol.* 219, 729 (1970).
150. - BOFTGER, I; SCHLEIN, E.M.; FALOONA, G.R.; KNOCHEL, J.P. y UNGER, R.H.: *J. clin. Endocrinol. Metab.* 35, 117, (1972).
151. - HEARN, G.R. y WAINO, W.W.: *Amer. J. Physiol.* 190, 206, (1957).

152. - JONES, E.M.; JOHNSON, P.B.; MONTOYE, H.D. y VANHUSS, W. P.: Fed. Proc. 20, 207, (1961).
153. - JONES, E.M.; MONTOYE, H.D.; JOHNSON, P. B.; MARTIN, S.M. J. M.; VANHUSS, W.P. y CEDERQUIST, D.: Amer. J. Physiol. 207, 460, (1964).
154. - MONTOYE; SHERBURNE, J.; ACKERMAN, K.; JONES, E.M. y CEDERQUIST, D.: Res. Quart. 33, 430, (1962).
155. - PITTS, G.C.: Amer. J. Physiol. 185, 41, (1956).
156. - PETER, J.B.; JEFFRESS, R.N. y LAMB, D. R.: Science. 160, 200, (1968).
157. - KENDRICK-JONES, J. y PERRY, S.V.; Nature, 208, 1068, (1965)
158. - JEFFRESS, R.N.; PETER, J.B. y LAMB, D.R.: Life Sciences, 7, 957, (1968).
159. - KREBS, H.A.; BENNET, G. A. H.; GASQUET, P.; GASCOINE, F. y YOSHIDA, T.: Biochem. 86, 22, (1963).
160. - GARCIA-RUIZ, J. P.: Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Granada (1972).
161. - KREBS, H. A. y HENSELEIT, K.: Hoppe-Seyl. 2, 210, 33, (1932).
162. - BERGMAYER, H. U.: Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press. New York- London, 123, (1965).
163. - HARPER, A.E.: Methods of Enzymatic Analysis (Academic Press, New York, London) 788, (1965)
164. - FISKE, C.H. y SUBBARROW, Y.: J. Biolchem. 66, 375, (1925).
165. - BERGMAYER, H.V.: Methods of Enzymatic Analysis. (Academic Press New York, London), (1965)
166. - MEDICINO, J.; OLIVER, R.M. y KRATOWICH, N.: J. Biol. Chem. 247, 6643; (1972).
167. - CARBONELLS, J.; FELIU, J.E.; MARCO, R. y SOLS, A.: Eur. J. Biochem. 37, 148, (1973)

168. - ANTONIO ORIOLA, P.: Tesina de licenciatura. Facultad de Farmacia, Granada. 1970.
169. - BALLARD, F. J. y HANSON, R. V.: J. Biol. Chem. 244, 5625, (1969).
170. - CHANG, H. C. y LANE, M. D.: J. Biol. Chem. 241, 2413, (1966).
171. - HOHORST, L. L.; KREUTZ, y BUCHER.: Th. Biochem. Z. 322, 18, (1959).
172. - WILLIAMSON, D. H. y MELLANBY, J.: en Methods of Enzymatic Analysis, (Academic Press, New York, London), 1837, (1974).
173. - WOLLENBERGER, A.; RISTAN, O. y SCHFFA, P.: Arch. ges. Physiol. 270, 399, (1967).
174. - WILLIAMSON, D. H.; LUND, P. y KREBS, H. A.: Biochem. J. 103, 514, (1967).
175. - KLOTZSCH, H. y BERGMAYER, H. U.: en Methods of Enzymatic Analysis, (Academic Press, New York, London), 1156, (1965).
176. - BUCHER, T.: en Methods of Enzymatic Analysis, (Academic Press, New York, London), 246, (1965).
177. - BERGMAYER, H. U.: en Methods of Enzymatic Analysis, (Academic Press, New York, London); 229, (1965).
178. - HOHORST, H. J.: en Methods of Enzymatic Analysis, (Academic Press New York, London), 328, (1965).
179. - KOJIMA, Y. y WACKER, E. C.: J. Lab. Clin. Med. 74, 521, (1969).
180. - GAWEHN, K. y BERGMAYER, H. U.: en Methods of Enzymatic Analysis, (Academic Press, New York, London), 1492, (1974).
181. - BURCHARD, W, KEPPLER, D. y DECKER, K.: Makromolekulare Chem. 115, 250, (1968).
182. - SUDA, M.; NAGAI, K. y NAKAGAWA, H.: J. Biochem. 73, 727, (1973).
183. - NAGAI, K.; SUDA, M. y NAKAGAWA, H.: J. Biochem. 74, 863, (1973).
184. - NAGAI, K. ; SUDA, M.; YAMAGISHI, O.; TOYAMA, Y. y NAKAGAWA; H.: J. Biochem. 77, 1249, (1975).
185. - MUÑOZ-CLARES, R.: Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. (1976).

186. - SANCHEZ-MEDINA, F.: en Avances de la Bioquímica. 255. Salvat editores. Barcelona. (1976).
187. - SANCHEZ-URRUTIA, L.; GARCIA-RUIZ, J. P.; SANCHEZ-MEDINA; F. y MAYOR, F.: Biochem. Med. 14, 355, (1975).
188. - POGSON, C. O.; LONGSHAW, I. D.; ROOBOL, A.; SMITH, S. A. y ALLEYNE, G. A. O.: en Gluconeogenesis, its Regulation in Mammalian Species. Eds. Hanson, R. W. y Mehlman, M. A. 335, John Wiley y Sons. New York (1976).
189. - PHILLIPS, L. J. y BERRY, L. J.: Amer. J. Physiol. 218, 1440 (1970).
190. - PHILLIPS, L. J. y BERRY, L. J.: Amer. J. Physiol. 219, 697, (1970).
191. - LANE, E. A. y MAVRIDES, C.: Can. J. Biochem. 48, 1297, (1970).
192. - MARCO, R. y SOLS, A.: Metab. Reg. and Enzyme Action, 19, 64, (1969).
193. - LARDY, H. A. y FOSTER, D. O.: Adv. Enz. Reg. 2, 39, (1974).
194. - HENNING, H. V.; STUMPF, B.; OHLY, B. y SEUBERT, W.: Biochem. Z. 334, 274, (1966).
195. - NORDLIE, R. C.; ARION, W. J.; HANSON, T. L.; GÍSDORS, J. R. y HORNE, R. N.: J. Biol. Chem. 243, 1140, (1968).
196. - RESHEF, L.; HANSON, R. W. y BALLARD, F. J.: J. Biol. Chem. 244, 1994, (1969).
197. - KREBS, H. A. y EGGLESTON, L. V.: Biochem. J. 94, 3c, (1965).
198. - MORENO, F. J.; BENITO, M.; SANCHEZ-MEDINA, F.; MEDINA, J. M. y MAYOR, F.: Mol and Cell. Biochem. 13, 89, (1976).
199. - SALAS, M.; VIÑUELA, E.; SALAS, Y. y SOLS, A.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 150, (1964).
200. - MENDICINO, Y. y VASARHEL, Y. F.: J. Biol. Chem. 238, 3528, (1963).



01052583

- 201.- TAKETA, K. y POGELL, B.M.: Biochem. Biophys. Res. Commun, 12, 229, (1963)
- 202.- Van BERKEL, T.J.; KRUIJT, J.K. y KOSTER, J.F.: Eur. Biochem 81/3, 423, (1971)
- 203.- ROGNSTAD, R. y KATZ, J.: J. Biol. Chem. 252/6, 1831, (1977)
- 204.- FELIU, J.E.; HUE, L. y HERS, H.G.: Eur. J. Biochem. , 81/3 609, (1977)
- 205.- VAN BERKEL, T.J.; KRUIJT, J.K. y KOSTER, J.F.: Biochem. Soct. Trans. 6/1, 147 (1978)
- 206.- SANCHEZ-MEDINA, F.; SANCHEZ-URRUTIA, L.; MDINA y MAYOR, F.: FEBS Lett. 19, 128 (1971)
- 207.- SANCHEZ-MEDINA, F.; SANCHEZ-URRUTIA, L.; MEDINA, J.M. y MAYOR, F. : FEBS Lett, 26, 25, (1972).
- 208.- KRAMER, J. W. y FREEDLAND, R. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 140, 1399, (1972).
- 209.- OSTERMAN, J.; FRITZ, P. J. y WUNTCH, T.: J. Biol. Chem. 248, 1011, (1972).
- 210.- IMAMURA, K. y TANAKA, T.: J. Biochem. 71, 1043, (1972).
- 211.- IMAMURA, K.; TANIUCHI, K. y TANAKA, T.: J. Biochem. 72, 1001, (1972).
- 212.- SUSOR, W. A. y RUTTER, W. J.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 14, (1968).
- 213.- SOLING, H. D. y KLEINEKE, J.: en "Gluconeogenesis. Its Regulation in Mammalian Species" 369, EDs. Hanson, R. W. y Mehlman, M. A. John Wiley y Sons, New York. (1976).
- 214.- NORDLIE, R. C.: en "Gluconeogenesis. Its Regulation in Mammalian Species" 93, EDs. Hanson, R. W. y Mehlman, M. A. John Wiley y Sons, New York. (1976).
- 215.- ALLEYNE, G. A. O. y ROOBOL, A.: "The medical clinics of North America" (Symposium on renal metabolism) p. 781 W. B. Saunders Company, Philadelphia. (1975).

