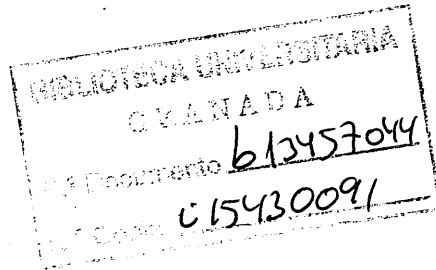


R-24.671

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION DE BIOLÓGICAS

INDUCCION DE LA GLUCONEOGENESIS RENAL POR INHIBICION  
SELECTIVA DE LA GLUCONEOGENESIS HEPATICA

JOSE ANTONIO LUPIAÑEZ CARA



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 1-9-75  
ENTRADA NUM. 3733

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA  
MCMLXXV

**MEMORIA** presentada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas por el Licenciado D. José Antonio Lupiáñez Cara

Director de esta Tesis:

**PROF. DR. D. FERMIN SANCHEZ DE MEDINA Y CONTRERAS**

Licenciado D. José Antonio Lupiáñez Cara

Aspirante al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Granada, Septiembre 1.975

El trabajo que presentamos ha sido realizado en el LABORATORIO DEL DEPARTAMENTO INTERFACULTATIVO DE BIOQUIMICA de la Universidad de Granada durante los cursos 1.972-1.973, 1.973-1.974, 1.974-1.975.

La realización del trabajo experimental ha sido sufragada en parte por una Beca del Plan de Formación del Personal Docente e Investigador.

Parte de los resultados de esta tesis han sido presentados en la XIII Reunión de la SEB, Madrid, Mayo 1.974.

Mi agradecimiento al Prof. Mayor Zaragoza por haberme admitido en su equipo de investigación y por haber despertado en mí la vocación por la tarea científica.

Deseo expresar mi mas sincera gratitud al Prof. Sánchez de Medina director de esta Memoria Doctoral, por la ilusión, inquietud y constante orientación con que ha seguido la realización de este trabajo, por la confianza con que me ha honrado y por la gran lección humana y científica que de él he recibido.

A mis buenos amigos, Josefa P. García Ruiz, Marisa Pita, Alberto Vargas, Paloma Hortelano, M<sup>a</sup> José Faus y Charo Muñoz, por su gran interés, amistad y valiosa ayuda.

A todos mis compañeros del Laboratorio, así como al personal técnico y auxiliar del Departamento de Bioquímica. A todos Gracias.



## ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
ALD	Aldolasa
AMP	Adenosín monofosfato
ANSA	Acido 1-amino-2-naftol, 4 sulfónico
ATP	Adenosín trifosfato
Carn	Carnitina
CoA	Coenzima A
E. C.	Comisión internacional de enzimas
ENO	Enolasa
FDP	Fructosa 1-6 difosfato
FDPasa	Fructosa 1-6 difosfatasa
F6P	Fructosa 6-fosfato
GAP	Gliceraldehido fosfato
GAPDH	Gliceraldehidofosfato deshidrogenasa
GDH	Glicerol 1-fosfato deshidrogenasa
GOD	Glucosa oxidasa
G6P	Glucosa 6-fosfato
G6Pasa	Glucosa 6-fosfatasa
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
HK-GK	Hexocinasa-glucocinasa
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IDP	Inosín difosfato
ITP	Inosín trifosfato
LAC	L-lactato
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAL	Malato
MDH	Malato deshidrogenasa
MICA	Acido 5 metoxi-2-indol carboxílico
NAD	Nicotín adenín dinucleótido
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NADP	Nicotín adenín dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
OAA	Oxalacetato

4PA	Acido 4-pentenóico
Pal	Palmitina
PC	Piruvato carboxilasa
PDHA	Fosfodihidroxiacetona
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFK	Fosfofructocinasa
PGI	Fosfogluco isomerasa
PGM	Fosfoglicero mutasa
2PGA	2-fosfoglicerato
3PGA	3-fosfoglicerato
PHI	Fosfohexosa isomerasa
Pi	Fósforo inorgánico
PIR	Piruvato
PK	Piruvato cinasa
POD	Peroxidasa
TCA	Ciclo tricarbóxico
TIM	Triosafosfato isomerasa
TRIS	Trihidroximetilaminometano
TRP	Triosas fosfato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinas
RNA	Acido ribonucleico

## INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCION .....	21
I.- <u>PARTE TEORICA</u> .....	27
1.1.- <u>Gluconeogénesis</u> .....	29
1.1.1.- <u>Generalidades</u> .....	29
1.1.2.- <u>Regulación de la gluconeogénesis</u> .....	34
1.1.2.1.- <u>Regulación a nivel de actividades enzimáticas</u> .....	34
1.1.2.2.- <u>Regulación por los productos finales</u> .....	38
1.1.2.3.- <u>Regulación por concentraciones enzimáticas</u> .....	41
1.1.2.4.- <u>Regulación hormonal de la gluconeogénesis</u> .....	42
1.1.2.5.- <u>Consideraciones finales sobre la regulación de la gluconeogénesis</u> .....	45
1.1.3.- <u>Condiciones fisiológicas de la gluconeogénesis hepática y renal</u> .....	46
1.1.4.- <u>Gluconeogénesis en otros tejidos</u> .....	48
1.1.5.- <u>Métodos de estudio de la gluconeogénesis</u> .....	50
1.2.- <u>Estudio de inhibidores específicos de la gluconeogénesis</u> .....	51
1.2.1.- <u>Triptófano y ácido quinolínico</u> .....	52
1.2.2.- <u>Hidrazinas</u> .....	54
1.2.3.- <u>Acido quináldico y derivados del indol carbóxílico</u> .....	55
1.2.4.- <u>Acido 4-pentenóico</u> .....	59
1.3.- <u>Esquema general del trabajo</u> .....	62
II.- <u>PARTE EXPERIMENTAL</u> .....	63
2.1.- <u>Material</u> .....	65
2.1.1.- <u>Especie ensayada</u> .....	65



	<u>Página</u>
2.1.2.- Material usado en las diferentes técnicas.....	65
2.2.- Productos .....	68
2.3.- Métodos .....	69
2.3.1.- Tratamiento de los animales .....	69
2.3.1.1.- Acido 5-metoxindol carboxílico .....	69
2.3.1.2.- Ayuno .....	69
2.3.2.- Tratamientos de los tejidos para la determina- ción de las actividades enzimáticas .....	69
2.3.2.1.- Glucosa 6 fosfatasa .....	69
2.3.2.2.- FDP-asa, PEPCK, LDH .....	70
2.3.3.- Tratamiento de los tejidos para la determina- ción de intermediarios metabólicos .....	70
2.3.4.- Determinación de actividades enzimáticas .....	72
2.3.4.1.- Determinación de la actividad enzimá- tica de la glucosa 6 fosfatasa .....	72
2.3.4.2.- Determinación de la actividad enzimá- tica de la fructosa 1-6 difosfatasa ....	75
2.3.4.3.- Determinación de la actividad enzimá- tica de la fosfoenolpiruvato carboxici- nasa .....	77
2.3.4.4.- Determinación de la actividad enzimá- tica de la lactato deshidrogenasa .....	80
2.3.5.- Determinación enzimática de metabolitos .....	81
2.3.5.1.- Determinación enzimática de glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato .....	81
2.3.5.2.- Determinación enzimática de fosfodihi- droxiacetona, gliceraldehido 3-fosfato, fructosa 1-6 difosfato .....	83
2.3.5.3.- Determinación enzimática de piruvato, fosfoenolpiruvato, 2-fosfoglicerato, 3-fosfoglicerato .....	85
2.3.5.4.- Determinación enzimática de L-malato .	88
2.3.5.5.- Determinación enzimática de glucosa ..	89

	<u>Página</u>
2.3.5.5.- Determinación enzimática de oxalacetato . . . . .	92
2.3.5.7.- Determinación enzimática de L-lactato . . . . .	93
2.3.6.- Determinación de la capacidad gluconeogénica hepática. Técnica de perfusión hepática . . . . .	94
2.3.7.- Determinación de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal . . . . .	94
2.3.8.- Determinación de glucosa en sangre . . . . .	93
2.3.9.- Determinación de L-lactato en sangre . . . . .	96
2.3.10.- Determinación de glucógeno hepático . . . . .	97
<b>III.- RESULTADOS . . . . .</b>	<b>99</b>
3.1.- Efecto "in vitro" del ácido 4-pentenóico, ácido quinolínico, ácido 5-metoxi-2-indol carboxílico (MICA) sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal . . . . .	101
3.2.- Inhibición "in vitro" del ácido 5-metoxi-2-indol carboxílico (MICA) sobre la capacidad gluconeogénica hepática . . . . .	105
3.3.- Efecto de la intubación gástrica de MICA sobre la capacidad gluconeogénica hepática a partir de L-lactato . . . . .	109
3.4.- Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA sobre la capacidad gluconeogénica hepática a partir de L-lactato . . . . .	112
3.5.- Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA sobre la capacidad gluconeogénica hepática a partir de piruvato . . . . .	115
3.6.- Efecto de la administración de MICA sobre la capacidad gluconeogénica de la cor-	

	<u>Página</u>
teza renal .....	120
3.6.1.- Capacidad gluconeogénica renal a partir de L-lactato en ratas alimentadas y tratadas con intubación gástrica de MICA .....	120
3.6.2.- Capacidad gluconeogénica de la corteza renal a partir de piruvato, L-lactato, glutamina y fructosa en ratas alimentadas con inyección intraperitoneal de MICA .....	120
3.6.3.- Capacidad gluconeogénica de la corteza renal a partir de piruvato, L-lactato, glutamina y fructosa en ratas ayunadas 48 horas con inyección intraperitoneal de MICA ...	124
3.7.- Efecto de la administración de MICA sobre las actividades de la lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinas, fructosa 1-6 difosfatasa y glucosa 6 fosfatasa de hígado y corteza renal ....	127
3.7.1.- Actividades enzimáticas de hígado en ratas alimentadas con inyección intraperitoneal de MICA ...	127
3.7.2.- Actividades enzimáticas de hígado en ratas ayunadas 48 horas con inyección intraperitoneal de MICA .....	132
3.7.3.- Actividades enzimáticas de hígado y corteza renal de ratas ayunadas 48 horas con inyección intraperitoneal de MICA .....	132
3.7.4.- Actividades enzimáticas de corteza renal de ratas alimentadas con inyección intraperitoneal de MICA .....	135
3.7.5.- Actividades enzimáticas de corteza renal de ratas ayunadas 48 horas con inyección intraperitoneal de MICA .....	135

3.8.- Efecto de la administración de Actinomicina D y cicloheximida sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas renal de ratas alimentadas tratadas con MICA .....	140
3.8.1.- Efecto de la actinomicina D sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas renal de ratas tratadas con MICA .....	141
3.8.2.- Efecto de la cicloheximida sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas renal de ratas tratadas con MICA .....	145
3.9.- Concentración de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis hepática y renal de ratas tratadas con MICA .....	148
3.9.1.- Concentración hepática de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis de ratas alimentadas tratadas con MICA .....	148
3.9.2.- Concentración hepática de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis de ratas ayunadas 48 horas tratadas con MICA .....	149
3.9.3.- Concentración renal de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis de ratas alimentadas tratadas con MICA .....	149
3.9.4.- Concentración renal de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis de ratas ayunadas 48 horas tratadas con MICA .....	150
3.10.- Efecto de la administración de MICA sobre los niveles de glucosa y lactato en sangre y glucógeno hepático .....	157

3.10.1.- Efecto de la administración de MICA sobre los niveles de glucosa y lactato en sangre y glucógeno hepático en ratas alimentadas .....	157
3.10.2.- Efecto de la administración de MICA sobre los niveles de glucosa y lactato en sangre y glucógeno hepático en ratas ayunadas 48 horas .....	157
3.11.- Efecto de la administración de MICA sobre la glucemia a lo largo del tiempo, después de las tres horas de su administración .....	161
3.12.- Efecto de la administración de MICA sobre la capacidad gluconeogénica hepática a las seis horas de su administración .....	164
IV.- DISCUSION .....	167
4.1.- Inhibición selectiva de la gluconeogénesis hepática .....	159
4.2.- Inducción de la fosfoenolpiruvato carboxicinas y de la capacidad gluconeogénica renal .....	172
4.3.- Funcionamiento "in vivo" de la gluconeogénesis hepática y renal .....	177
4.4.- Consideraciones finales .....	181
V.- CONCLUSIONES .....	185
VI.- BIBLIOGRAFIA .....	191

## INTRODUCCION

1. The first part of the document is a list of names.

2. The second part of the document is a list of names.

3. The third part of the document is a list of names.

4. The fourth part of the document is a list of names.

5. The fifth part of the document is a list of names.

6. The sixth part of the document is a list of names.

7. The seventh part of the document is a list of names.

8. The eighth part of the document is a list of names.

9. The ninth part of the document is a list of names.

10. The tenth part of the document is a list of names.

11. The eleventh part of the document is a list of names.

12. The twelfth part of the document is a list of names.

13. The thirteenth part of the document is a list of names.

14. The fourteenth part of the document is a list of names.

15. The fifteenth part of the document is a list of names.

16. The sixteenth part of the document is a list of names.

17. The seventeenth part of the document is a list of names.

18. The eighteenth part of the document is a list of names.

19. The nineteenth part of the document is a list of names.

20. The twentieth part of the document is a list of names.

21. The twenty-first part of the document is a list of names.

22. The twenty-second part of the document is a list of names.

23. The twenty-third part of the document is a list of names.

24. The twenty-fourth part of the document is a list of names.

25. The twenty-fifth part of the document is a list of names.

26. The twenty-sixth part of the document is a list of names.

27. The twenty-seventh part of the document is a list of names.

## INTRODUCCION

La administración de galactosamina a las ratas en dosis apropiadas produce daños tisulares en el hígado muy semejantes a los que caracterizan a la hepatitis virásica. Por esta razón la degeneración hepática experimental producida por galactosamina se viene empleando con mucha frecuencia como modelo para el estudio de aquella enfermedad.

Una de las alteraciones metabólicas más destacables de esta situación patológica es la disminución de la capacidad gluconeogénica del tejido afectado, lo que se traduce en su escaso contenido en glucógeno. A nivel enzimático el fallo se localiza fundamentalmente a nivel de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas, afectándose también aunque en menor grado otras enzimas específicas de la gluconeogénesis.

Los trabajos realizados en el Departamento por García Ruiz y colaboradores han puesto de manifiesto que en estas condiciones aumenta la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de la corteza renal, registrándose también un pequeño pero significativo aumento de la capacidad gluconeogénica



de este tejido a partir de lactato ( \* ). Estos hallazgos pueden tener importancia fisiológica ya que sugieren que la corteza renal aumenta su contribución a la gluconeogénesis total cuando la capacidad funcional del hígado se encuentra disminuida.

No se conoce todavía con exactitud la aportación relativa del hígado y el riñón a la síntesis de glucosa para mantener los niveles fisiológicos de glucemia. Aunque tradicionalmente se ha considerado al parénquima hepático como el principal tejido implicado en la gluconeogénesis, la capacidad de la corteza renal es tan grande como la del hígado por unidad de peso. Y aunque la masa de tejido cortical es muy inferior a la del parénquima hepático, la velocidad de flujo sanguíneo por el riñón es muy considerable. En la actualidad tiende a considerarse como probable que el hígado protagonice la función gluconeogénica en condiciones fisiológicas normales, condiciones en las que responde de forma muy sensible a las señales provocadas por la hipoglucemia. Solo cuando la capacidad funcional del hígado se encontrara marcadamente disminuida, la síntesis de glucosa tendría lugar a gran escala en la corteza renal tras los correspondientes mecanismos de adaptación.

Dentro de este contexto general, el presente trabajo se ha emprendido con el deseo de contribuir al conocimiento de los mecanismos que controlan la aportación del

---

( \* ) García Ruíz, J.P., Moreno, F., Sanchez-Medina, F. y Mayor F., FEBS Letters, 34, 113 (1973)

riñón a la síntesis de glucosa, estudiando la respuesta metabólica de la corteza renal cuando se inhibe selectivamente la gluconeogénesis hepática. Con este tipo de inhibición se ha pretendido disminuir al máximo las posibles interferencias originadas en el daño celular generalizado, circunscribiendo las alteraciones metabólicas al proceso gluconeogénico.

Después de una labor prospectiva de la influencia de diversos inhibidores de la gluconeogénesis hepática sobre la corteza renal, se ha seleccionado el ácido 5-metoxi-2-indol carboxílico, cuyo efecto sobre este último tejido es muy pequeño por lo que puede utilizarse de hecho como inhibidor diferencial de la gluconeogénesis hepática. Los resultados obtenidos confirman que el tratamiento con ácido 5-metoxi-2-indol carboxílico produce una fuerte inhibición de la gluconeogénesis hepática. En estas condiciones aumentan la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxinasa y de la capacidad gluconeogénica renal a partir de los sustratos que utilizan dicha enzima para su conversión en glucosa. Es de destacar que la respuesta renal es más rápida y más fuerte que la encontrada en ratas con degeneración hepática experimental producida con galactosamina.

Teniendo en cuenta que los mecanismos de inhibición de la gluconeogénesis hepática son diferentes en ambas situaciones mientras que la respuesta renal es muy semejante pa-

rece probable que se trate de un fenómeno general, aconsejando el estudio de este problema en otras circunstancias patológicas que cursen con alteraciones funcionales de la gluconeogénesis hepática.

## 2.1.3.3. Scattering

The scattering of light by particles is a phenomenon that occurs when light waves encounter an obstacle or a change in the medium. This process is governed by the laws of conservation of energy and momentum. In the case of Rayleigh scattering, the particles are much smaller than the wavelength of the light, and the scattering is isotropic. For larger particles, the scattering becomes anisotropic and depends on the angle of observation. The intensity of the scattered light is proportional to the square of the particle size and the inverse fourth power of the wavelength.

The following table shows the dependence of the scattering intensity on the particle size and wavelength.

Table 2.1.3.3.1: Dependence of the scattering intensity on the particle size and wavelength. The table shows that the intensity of the scattered light increases with the square of the particle size and decreases with the inverse fourth power of the wavelength.

## I. - PARTE TEORICA

The theoretical part of the study is divided into two main sections: the first section deals with the general theory of scattering, and the second section deals with the specific case of Rayleigh scattering. The first section discusses the basic principles of scattering, including the conservation of energy and momentum, and the classification of scattering into elastic and inelastic scattering. The second section focuses on the theory of Rayleigh scattering, which is the dominant mechanism for the scattering of light by small particles in the visible spectrum.

II - PARTE TEORICA

## 1. - PARTE TEORICA

### 1.1. - GLUCONEOGENESIS

#### 1.1.1. - Generalidades

Se conoce con el nombre de gluconeogénesis al proceso bioquímico que comprende la síntesis de glucosa y glucógeno a partir de precursores no glucídicos, tales como aminoácidos glucogénicos, lactato, glicerol, piruvato, intermediarios del ciclo tricarboxílico, etc. Por extensión se aplica también esta denominación a la síntesis de glucosa a partir de otros azúcares.

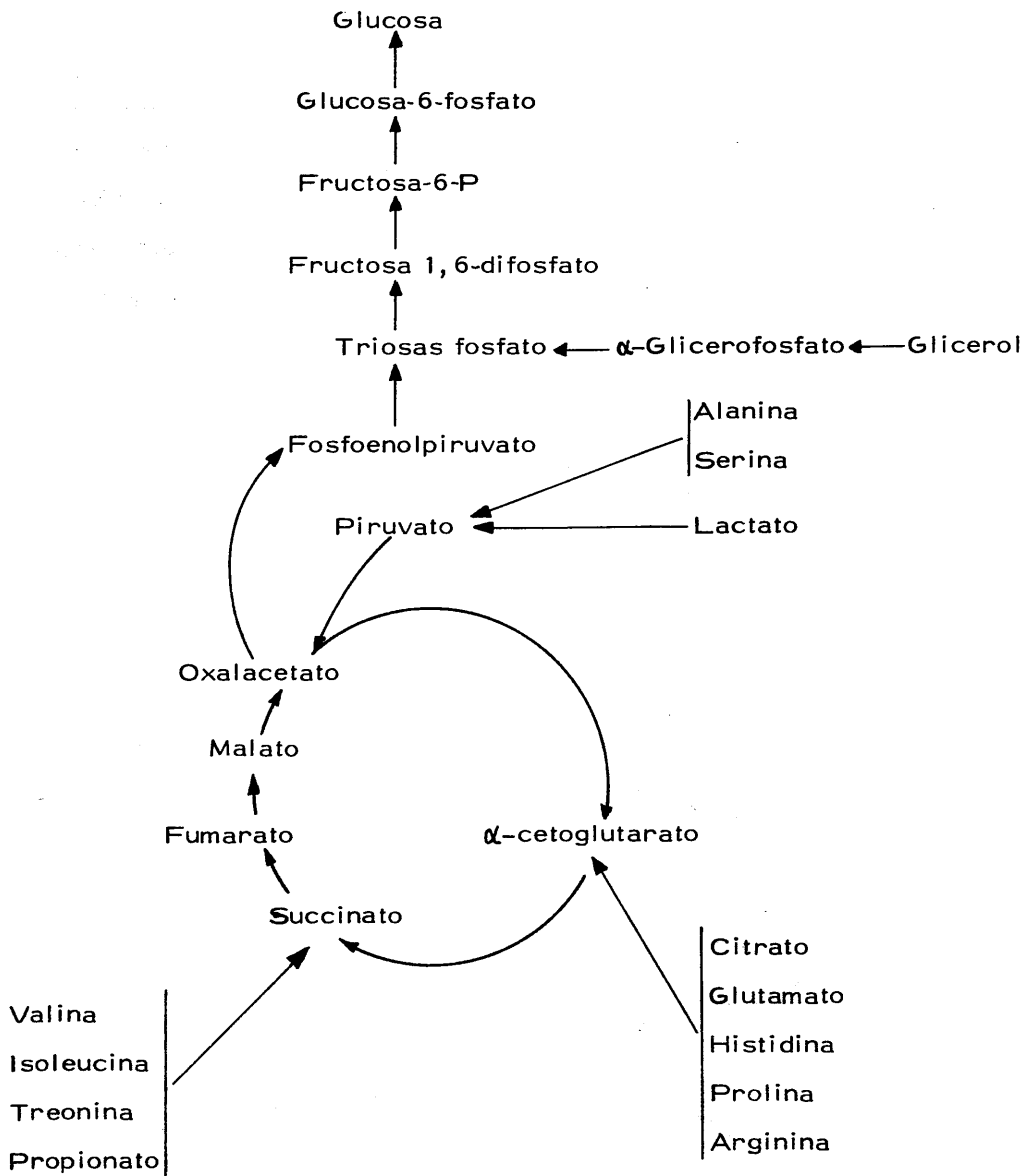
Es un proceso ampliamente distribuido en células de diversos orígenes y niveles filogenéticos distintos. En los organismos superiores, la síntesis de glucosa tiene lugar en el hígado y en la corteza renal. Del adecuado funcionamiento de este proceso en estos órganos depende en gran parte el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre en muchas circunstancias fisiológicas. Teniendo en cuenta que la glucosa es el combustible metabólico esencial para las células del sistema nervioso central y los eritrocitos, la importancia del proceso es indudable. Por este motivo, en los últimos años han aparecido en la literatura bioquímica una serie de revisiones bibliográficas sobre gluconeogénesis entre las que cabe destacar las efectuadas por M. C. Scrutton y M. F. Utter ( 1 ) y por J. H. Exton ( 2 ). Dado que en nuestro departamento el tema ha sido también ampliamente considerado por los doctores L. Sánchez-Urrutia ( 3 ) y J. P. García Ruiz ( 4 ) ,

limitaremos nuestra labor a resumir los aspectos más esenciales de dichas revisiones en lo que concierne a los aspectos generales de la gluconeogénesis, ampliando sin embargo aquellos aspectos -inhibidores especialmente- que están más estrechamente vinculados a nuestro trabajo.

El esquema metabólico de la gluconeogénesis es similar en todos los orígenes salvo ciertas particularidades específicas. En todos los casos, la vía principal implica la reversión de la glucólisis salvando las reacciones irreversibles de este proceso por reacciones catalizadas por enzimas característicos. La formación de los precursores gluconeogénicos que ingresan en la vía principal adopta caminos metabólicos distintos según sea su origen.

En el caso de los organismos superiores la vía gluconeogénica comporta la conversión de precursores en ácidos dicarboxílicos tetracarboxilados, siendo especialmente importante la significación fisiológica del paso de lactato a oxalacetato, y la conversión de oxalacetato en glucosa, proceso que incluye la reversión de la glucólisis.

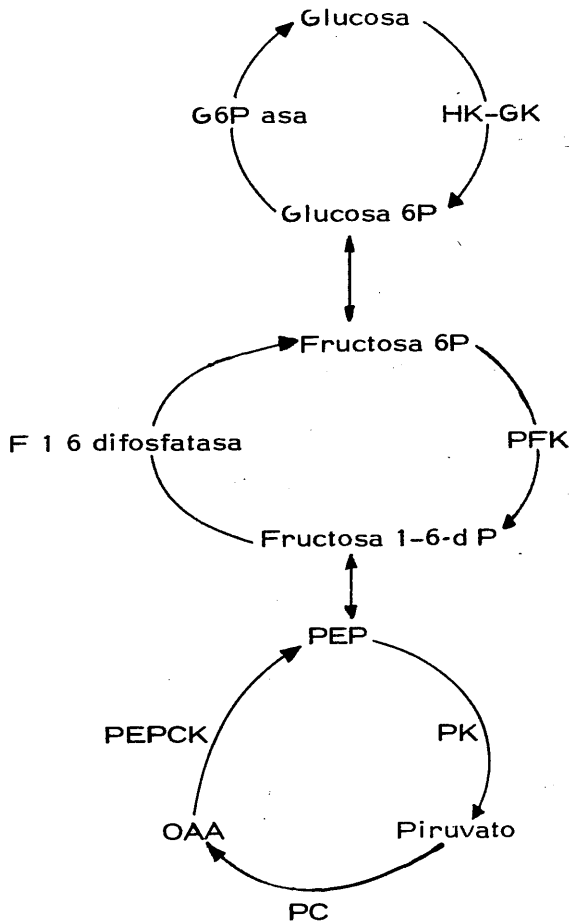
(ver esquema pag. sig.)



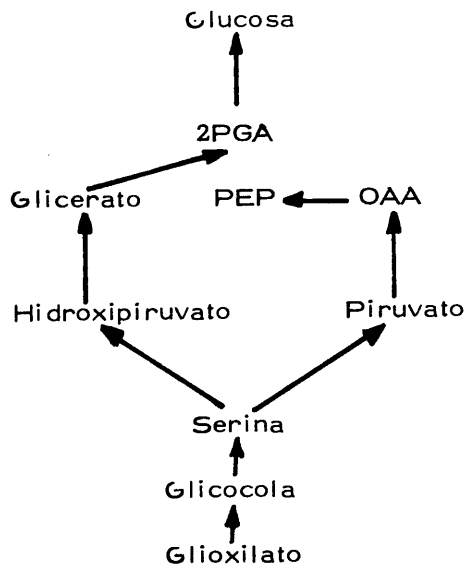
Vías Metabólicas de la gluconeogénesis a partir de distintos precursores.



Aunque existen ligeras variantes en las características de las enzimas de acuerdo con la naturaleza de las células gluconeogénicas, las reacciones de la vía glucolítica catalizadas por la piruvato cinasa (PK), fosfofructocinasa (PFK) y hexocinasa-glucocinasa (HK-GK) son sustituidas por sistemas gluconeogénicos específicos: Piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PC y PEPCK), Fructosa difosfatasa (FDP asa) y Glucosa 6 Fosfatasa (G6P asa):



Estas vías metabólicas gluconeogénicas están bien establecidas en animales superiores pero quedan algunos problemas por resolver, especialmente en el caso de la formación de precursores a partir de aminoácidos. Así, por ejemplo, Venezia ha postulado que la gluconeogénesis a partir de piruvato no transcurre solamente a través de la PC y PEPCK ( 5, 6 ), mientras que Wagle sugiere un camino alternativo para el proceso, especialmente operativo en diabetes, que implica la carboxilación del 2-oxoglutarato y reversión parcial del ciclo tricarboxílico ( 7 ). Por otra parte, Rowsell y col. proponen la existencia de una vía gluconeogénica a partir de glioxilato, basándose en la existencia de una glioxilato alanina - transaminasa muy elevada en el periodo neonatal e inducible por glucagón ( 8, 9 )

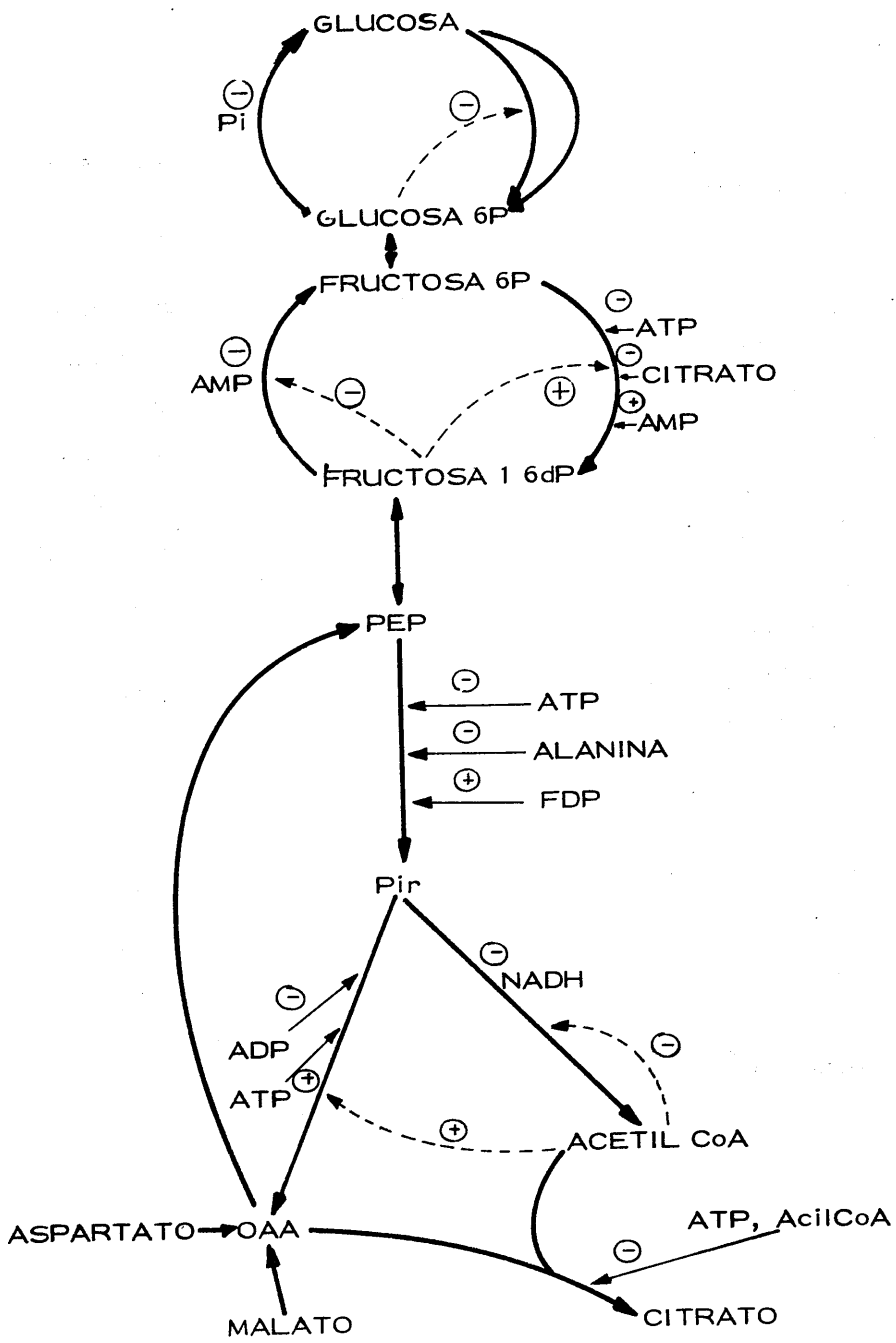


### 1.1.2. - Regulación de la gluconeogénesis

El funcionamiento del proceso gluconeogénico requiere el trabajo integrado de todos los orgánulos celulares de las células gluconeogénicas y en los seres superiores, de una suplementación hormonal. Es por tanto un proceso muy controlado, ya que está implicado en la homeostasia glucémica y porque su vía metabólica contiene pasos que suponen la reversión del proceso inverso, la glucólisis.

#### 1.1.2.1. - Regulación a nivel de actividades enzimáticas

En las situaciones en que la gluconeogénesis es operativa, las relaciones intracelulares ATP/ADP, NADH/NAD y Acetil CoA/CoA son altas; esto hace que la primera encrucijada metabólica a nivel de piruvato se resuelva a favor de la síntesis de OAA ya que el Acetil CoA inhibe a la piruvato deshidrogenasa competitivamente respecto al CoA (10), mientras que la relación NADH/NAD actúa en virtud de la ley de acción de masas sobre esta reacción, y la ATP/ADP alta favorece la PC a la vez que actúa sobre el ciclo tricarbóxico inhibiendo en su conjunto (11, 12). (Véase el esquema de la página siguiente).



Igualmente la segunda encrucijada metabólica a nivel de OAA se desvía a la producción de PEP debido a que el ATP inhibe a la Citrato sintasa (CS) ( 13, 14) y decrece la actividad del ciclo tricarboxílico ya que la fosforilación oxidativa es a su vez regulada por ATP.

La formación del PEP con fines gluconeogénicos implica la inactivación de la PK, cuya actividad llevaría a un reciclaje inútil con el resultado neto de una acción ATP-ásica; sin embargo, las propiedades alostéricas de las isoenzimas hepática y renal son adecuadas para evitar el reciclaje, ya que son inhibidas por alanina y ATP ( 15, 16 ) y dependen de fructosa difosfato ( FDP) para su actividad a bajas concentraciones de sustrato ( 17, 18 ). Por ello, aun sin variar los niveles de ATP, el decrecimiento en la concentración de FDP propia de la gluconeogénesis ( 19 ) podría explicar la inactividad de la PK ( 20 ).

Las concentraciones de FDP en hígado no son sin embargo, suficientemente pequeñas aún en condiciones gluconeogénicas. No obstante se ha postulado que una parte considerable de FDP puede estar ligada a otras enzimas, aldolasa sobre todo ( 21 ) y que una parte considerable del total puede estar también en las células no parenquimatosas del hígado ( 22 ).

Mientras que la síntesis de fructosa difosfato a partir de fosfoenolpiruvato transcurre por reversión de la glucólisis, la formación de fructosa 6 fosfato a partir de fructosa difosfato requiere la catálisis de la fructosa difosfatasa y la inactivación paralela de la fosfofructocinasa. Las concentraciones relativas de ATP, AMP, citrato y fructosa difosfato juegan un papel muy importante en el control de ambas enzimas ( 23 ). La alta afinidad de la fructosa difosfatasa por su sustrato le permite funcionar a gran velocidad con concentraciones muy bajas de sustrato. En cambio, la enzima es inhibida por exceso de fructosa difosfato, siendo además este mismo metabolito activador de la fosfofructocinasa ( 24 ) y de la piruvato cinasa ( 17, 18 ).

La etapa final de la gluconeogénesis es la conversión de glucosa 6 fosfato en glucosa, catalizada por la glucosa 6 fosfatasa. En tejidos hepáticos, la actividad de la glucocinasa - requiere grandes concentraciones de glucosa ( 25-28 ) mientras que la glucosa 6 fosfatasa es inhibida competitivamente por sus productos de reacción ( 29-30 ). Si a esto unimos su diferente localización, el reciclaje de la glucosa no es probable. En el riñón, que contiene mayor proporción de hexocinasa, no tiene lugar la acción conjunta de ambas enzimas, debido probablemente a la inhibición de la hexocinasa por glucosa 6 fosfato ( 31 ).

La eficacia del proceso gluconeogénico necesita, de acuerdo con las circunstancias que se precisan para el funcionamiento neto de los sistemas enzimáticos implicados, el trabajo integrado de los diferentes compartimentos celulares (mitocondrias, citoplasma y microsomas), así como un intercambio controlado, a través

de los intermediarios comunes, entre sistemas metabólicos tales como la fosforilación oxidativa, ciclo cítrico, glucólisis y oxidación de ácidos grasos ( 32 ). Este último proceso es fundamental dentro del cuadro metabólico a que aludimos, ya que contribuye mayoritariamente al suministro de la energía necesaria para la gluconeogénesis y aumenta las relaciones ATP/ADP, NADH/NAD, y Acetil CoA/CoA hasta los niveles adecuados para la síntesis - en glucosa.

Por otra parte la alta actividad de la adenilato cinasa hepática tiene una importante repercusión sobre el funcionamiento alternativo de la glucólisis y gluconeogénesis, al relacionar así las concentraciones de los adeninucleótidos:



con el consiguiente efecto sobre las actividades de la PFK, PC y FDP asa ( 32 ).

#### 1.1.2.2.- Regulación por los productos finales

Como ocurre en otras vías anabólicas, la gluconeogénesis se halla regulada por el efecto inhibitor de un producto terminal- glucosa o glucógeno- sobre algunas de sus etapas iniciales específicas. El papel represor de la glucosa sobre la PEPCK ha sido establecido en orígenes microbianos ( 33 34 ) y en el protozoo ciliado Tetrahymena pyriformis( 35 )

En animales superiores existen varios problemas no esclarecidos aún. En perfusión el poder regulador del hígado para utilizar la glucosa o sintetizarla de acuerdo con la presencia o ausencia de azúcar en el medio (36-38) sugiere una regulación por glucosa. Sin embargo, Ross y col. ( 39 ) y Exton y Park ( 40 ) no han hallado alteración de la gluconeogénesis hepática a partir de lactato por adición de glucosa al medio de perfusión. En riñón se ha descrito un efecto directo de la glucosa sobre la gluconeogénesis ( 41 ).

Por otra parte existe una relación inversa significativa entre los niveles de glucosa sanguínea y los de la PEPCK con un coeficiente de correlación de  $-0,01$  en ratas adrenalectomizadas ( 42 ). La glucosa reprime a la enzima "in vivo" tanto en ratas alimentadas ( 43 ) como sobre todo en animales ayunados ( 44 ). La fructosa y glicerol tienen el mismo efecto represor que la glucosa en ratas ayunadas, mientras que el efecto de la galactosa y la ribosa es mucho menor. Sin embargo, todos estos azúcares producen glucógeno, lo que no parece apoyar la existencia de una estrecha relación metabólica entre la enzima y el polímero ( 45 ). Dado que la galactosa y la ribosa no son metabolizadas periféricamente parece probable que el efecto represor de la glucosa se realice a través del metabolismo periférico. Otra circunstancia que apoya esta hipótesis es la atenuación por 2-desoxiglucosa de la represión debida a glucosa o glicerol. En efecto, la 2-desoxiglucosa impide la formación de glucógeno muscular pero no hepático, es decir, se comporta como un inhibidor del metabolismo periférico.



Treadows y Khairallah ( 46 ) han establecido una clara relación entre la represión por glucosa de la PEPCK y los niveles de AMP cíclico. En las células hepáticas la represión por glucosa de la PEPCK se puede impedir con la administración paralela de AMP cíclico, lo que relaciona ambos fenómenos. La acción represora de la glucosa en este caso tiene lugar a nivel post-transcripcional, ya que dicha acción se impide por cicloheximida ( 46 ).

La capacidad gluconeogénica hepática depende también de su contenido en glucógeno ( 47 ) aunque no parece existir un paralelismo entre el decrecimiento de los niveles de glucógeno y la capacidad gluconeogénica. Una vez agotada la reserva de glucógeno la respuesta gluconeogénica es rápida, sugiriendo que se trata de una acción sobre la actividad de las enzimas y no de fenómenos de inducción.

Los trabajos realizados en nuestro Departamento ( 3 ), han puesto de manifiesto que la PEPCK se estimula en hígado perfundido de rata cuando los niveles de glucosa circulante son suficientemente bajos. Este incremento se impide por tratamiento previo con cicloheximida lo que demuestra que se debe a fenómenos de inducción. La adición de imidazol al medio de perfusión bloquea igualmente el incremento de la actividad enzimática ensayable lo que sugiere un papel mediador del AMP cíclico en la inducción. Efectivamente, el aumento de la actividad de la enzima es paralelo al aumento de las concentraciones intrahepáticas del

AMP cíclico en condiciones "hipoglucémicas" ( 48 ). Este hallazgo no invalida el bien establecido esquema del control hormonal de la glucemia, pero se trata de un mecanismo regulador que podría operar presumiblemente en ciertas condiciones patológicas y que presenta un evidente interés evolutivo. Por otra parte se ha demostrado que en hígado perfundido no existe ningún tipo de relación entre los niveles de glucógeno y la actividad de la PEPCK lo que parece sugerir que las relaciones recíprocas que exhiben estos valores "in vivo" se deben a influencias hormonales. Parece también, muy probable que ambos fenómenos no sean interdependientes sino que estén ocasionados por un estímulo común.

#### 1.1.2.3. - Regulación por concentraciones enzimáticas

Está bien establecido que la PC, PEPCK y glucosa 6 fosfatasa se incrementan en ayuno y vuelven a decrecer al restablecerse el equilibrio nutricional ( 49-53 ), mientras que la fructosa difosfatasa disminuye con el ayuno ( 49, 54, 55 ).

Estas enzimas también se elevan en diabetes y disminuyen al tratar con insulina ( 56 - 59 ) elevándose igualmente por la administración de glucocorticoides ( 59-63 ). Después del hallazgo de la glucocinasa y su inducción por insulina ( 64, 65 ), Weber postuló la hipótesis de que las reacciones clave de la glucolisis y de la gluconeogénesis pudieran depender de unidades genéticas funcionales inducidas y reprimidas respectivamente por insulina. Las enzimas gluconeogénicas serían inducidas además por los corticoides ( 66 ). Esta hipótesis fué confirmada

por el hallazgo de la inducción por insulina de la PK ( 67-69 ) y de la fosfofructocinasa ( 70 ), si bien se han observado también variaciones no coordinadas de estas enzimas por efectos nutricionales ( 71 ).

En lo que se refiere a la PEPCK, la sensibilidad a la inducción es exclusiva de la fracción soluble. La fracción mitocondrial de hígado de rata no responde a estímulos nutricionales ni hormonales ( 53 ).

#### 1.1.2.4.- Regulación hormonal de la gluconeogénesis

Este tema ha merecido la atención de numerosos investigadores, siendo los datos bibliográficos extraordinariamente cuantiosos y, en algunas circunstancias contradictorios. Efectivamente, el espectro de la actuación hormonal es muy variado y los estudios realizados en este campo están sujetos a las inconveniencias que plantea la complejidad de todo proceso caracterizado por múltiples interrelaciones tisulares.

En la acción de las hormonas glucocorticoides están involucrados los tejidos periféricos que suministran al hígado precursores gluconeogénicos y ácidos grasos cuya degradación suministra energía al tiempo que favorece que estos precursores sigan la vía gluconeogénica ( 72 ). Según Weber estos ácidos grasos actúan como potentes inhibidores de las enzimas claves de la glucólisis, IDH y fumarasa del TCA y de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y

6 fosfogluconato deshidrogenasa de la vía de las pentosas, mientras que no parece afectar a las enzimas específicas ni bifuncionales de la vía gluconeogénica ( 73, 74 ). En cambio los trabajos recientes de Parvin y Dakshinamurti sugieren que esta múltiple inhibición carece de significado fisiológico ya que tanto los ácidos grasos de cadena larga como sus derivados activos (acil CoA) son capaces de inhibir a las enzimas gluconeogénicas de una forma análoga a la descrita para las enzimas glucolíticas ( 75 ).

Como hemos indicado anteriormente , la administración de glucocorticoides origina un fuerte incremento en la concentración hepática de las enzimas llave de la gluconeogénesis registrándose también un aumento en la cantidad de algunas enzimas bifuncionales ( 76, 77 ) y de ciertas transaminasas ( 78, 79 ). Según ha propuesto recientemente Dunn ( 79 ), los glucocorticoides parecen también actuar sobre la permeabilidad hepática a la alanina, principal aminoácido implicado en la gluconeogénesis como precursor extrahepático ( 80, 81 ). El mismo autor ha subrayado que este efecto no es cuantitativamente importante en condiciones normales, y que la acción de las hormonas que tienen una función limitante para la gluconeogénesis se produce a nivel periférico, como resultado de su estímulo sobre el catabolismo - protéico y el consiguiente flujo acrecentado de precursores gluconeogénicos hacia el hígado.

La bien establecida acción antagónica de las hormonas pancreáticas sobre el metabolismo del glucogeno (82, 83 ) y la lipólisis ( 84, 85 ) se manifiesta igualmente sobre la gluconeogénesis. Así la formación de glucosa a partir de piruvato o lactato

en hígado perfundido de rata es incrementada por glucagón y decrecida por insulina ( 86-89 ), mientras que el glucagón parece tener poco efecto sobre la gluconeogénesis a partir de dihidroxiacetona, glicerol o fructosa. (90, 91)

Los efectos del glucagon y de la adrenalina se han atribuido a su capacidad de activación de la lipasa hepática - que estaría a su vez condicionada por las concentraciones de ácido adenilico cíclico, a cuyo nivel interaccionan glucagon, adrenalina e insulina ( 85, 92, 93 ). Además, la administración de glucagon provoca la inducción de algunas enzimas, especialmente la PEPCK ( 59 ). Esta inducción se produce como resultado del incremento en la concentración de AMP cíclico, siendo esta una nueva perspectiva en la acción fisiológica de este nucleótido ( 94-96 ) que actúa - normalmente por fenómenos no inductivos. Se explica así la inefectividad del glucagon en estimular la gluconeogénesis a partir de - fructosa y glicerol, sustratos que entran por encima de la reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxicinasas.

Además de su acción antagónica con el glucagón, la insulina ejerce una acción represiva general sobre las enzimas llave de la gluconeogénesis ( 56 - 59 ) mientras que estimula la formación "de novo" de las enzimas llave de la glucólisis ( 97 - 99 ).

El efecto de otras hormonas sobre la gluconeogénesis es poco conocido. Podemos consignar que la hormona paratiroidea estimula específicamente la gluconeogénesis renal ( 100, 101 ) mientras que la hormona del crecimiento lo hace sobre la gluconeogénesis hepática a partir de aminoácidos ( 102 ).

### 1. 1. 2. 5. - Consideraciones finales sobre la regulación de la gluconeogénesis.

Los trabajos de Krebs y col. ( 39 ) y de Exton y col. ( 40 ) en hígado perfundido de rata, muestran que la etapa limitante de la gluconeogénesis a partir de piruvato o lactato está situada por debajo de las triosas fosfato. Por otra parte, existe una estrecha relación entre la actividad de la PEPCK y la gluconeogénesis renal y hepática. La paralela inhibición de la actividad de la PK en situaciones gluconeogénicas está de acuerdo con el papel limitante de la PEPCK siendo esta inhibición el principal factor acelerante de la gluconeogénesis a partir de piruvato en condiciones de ayuno ( 103 ). Por otra parte se ha demostrado que la gluconeogénesis a partir de lactato en hígado perfundido es tanto más alta cuanto más baja es la relación PK/PEPCK medida después de la perfusión ( 104 ).

La formación de fructosa 6-fosfato a partir de fructosa difosfato constituye otra etapa limitante de significado más general. Start y Newsholme han sugerido que el principal responsable de esta interconversión es la propia concentración de fructosa 6-fosfato. Este metabolito es capaz de reducir la inhibición de la PFK por ATP por lo que su disminución en ayuno sería enormemente significativa ( 54 ). De hecho, el funcionamiento de los "círculos inútiles" en la vía gluconeogénica parece ser un factor de extraordinaria importancia en la regulación del proceso en general ya que al determinarse el gasto energético real de la gluconeogénesis en distintas condiciones se han encontrado valores superiores a los teóricos relacionados con la velocidad en la síntesis de glucosa ( 105 ).

### 1.1.3. - Condiciones fisiológicas de la gluconeogénesis hepática y renal.

Una de las situaciones fisiológicas en la que se incrementa la gluconeogénesis tanto hepática como renal es la que se origina cuando la dieta es pobre en glúcidos ( 39, 47, 106 ). En todos los casos, la sustitución de la fracción glucídica debe realizarse por una cantidad proporcional de proteína. Cuando los requerimientos calóricos son satisfechos por lípidos, la capacidad gluconeogénica no varía de forma apreciable ( 107 ).

Durante el ayuno se produce un estímulo de la gluconeogénesis fundamentalmente a partir de aminoácidos. Sin embargo, la velocidad de la gluconeogénesis a partir de éstos es menor que a partir de piruvato o lactato ( 40, 108 ). El ayuno aumenta también la capacidad gluconeogénica del riñón aunque no tanto como la dieta pobre en glúcidos ( 106 ).

La exposición al frío estimula asimismo el proceso gluconeogénico, tanto en hígado como en riñón. El incremento es paralelo al intenso trabajo muscular que lo acompaña, lo que pone de manifiesto que la síntesis de glucosa tiene por objeto proveer al músculo del combustible energético necesario ( 109, 110 ).

Una situación metabólica en la que aumenta la capacidad gluconeogénica de la corteza renal -con aumento paralelo en la actividad de la PEPCK- sin que se aprecien variacio-

nes en el comportamiento hepático, es la acidosis metabólica inducida, por ejemplo, por ingestión de cloruro amónico ( 111,112 ). Este aumento contribuye de una manera importante a la mayor excreción de amonio urinario y, por tanto, al restablecimiento del pH a los valores fisiológicos. El comportamiento hepático en relación a la acidosis es totalmente distinto al del riñón, tanto en lo que se refiere a la PEPCK ( 113 ) como al proceso gluconeogénico ( 114 ).

La influencia del pH en la gluconeogénesis renal ha sido evidenciada por Bowman en riñón perfundido de rata ( 115 ). Un pH relativamente bajo en el medio de perfusión favorece la gluconeogénesis a partir de sustratos que entran a través del oxalacetato. En cambio ello no ocurre así a partir de fructosa y glicerol, lo que parece indicar que el efecto de la acidez se realiza a nivel de la PEPCK.

Una situación fisiológica en la que existe un marcado funcionamiento de la gluconeogénesis es el ejercicio muscular, siendo el lactato y la alanina los principales sustratos gluconeogénicos implicados ( 116 ). El efecto del entrenamiento sobre la gluconeogénesis ha sido descrito por Krebs en corteza renal de rata ( 117 ). El entrenamiento físico causa un sustancial incremento en la capacidad gluconeogénica de este tejido, casi tan alto como el producido por una dieta pobre en glúcidos. Por otra parte, los trabajos realizados en nuestro Departamento indican que el ejercicio agudo estimula la actividad de la PEPCK y de la capacidad gluconeogénica renal, estando vinculado probablemente dicho efecto a la acidosis láctica concomitante al ejercicio ( 3, 4, 118,119 ).



Parece pues, bien establecido que la gluconeogé-  
nesis renal tiene una importancia comparable a la hepática, aunque  
en cada órgano el proceso se regula en parte por mecanismos dife-  
rentes. Ambos tejidos parecen contribuir de forma semejante al -  
mantenimiento de los niveles de glucosa sanguínea ya que aunque el  
peso del riñón es considerablemente menor que el del hígado, la ca-  
pacidad gluconeogénica es semejante y el flujo de sangre que llega  
a la corteza renal es muy elevado. ( 120 ).

#### 1.1.4. - Gluconeogénesis en otros tejidos

Aunque el principal camino para reconvertir en  
glucógeno el ácido láctico producido por la actividad muscular es  
la gluconeogénesis hepática y renal, recientemente ha sido demos-  
trado que este proceso tiene lugar en parte en el propio músculo.  
Sin embargo la gluconeogénesis muscular es muy poco activa y -  
está restringida al músculo blanco ( 121 ). Este tejido contie-  
ne solo cantidades muy pequeñas de piruvato carboxilasa ( 122 ),  
y glucosa 6-fosfatasa, siendo en cambio más rico en fructosa difos-  
fatasa ( 123, 124 ). Recientemente se ha encontrado también -  
fosfoenol-piruvato carboxicinasa ( 123, 125 ) y enzima málica ( 125),  
sistema este último que puede suplir la falta de piruvato carboxilasa.  
Todas estas enzimas parecen estar implicadas, por tanto en la sín-  
tesis de glucógeno por el músculo a partir de lactato. Aunque la ca-  
pacidad gluconeogénica sea pequeña (7% de la hepática), la masa -  
muscular es muy grande por lo que el proceso debe ser tomado en -  
consideración ( 125 ).

Las células de la mucosa intestinal de rata contienen también muy poca piruvato carboxilasa y glucosa 6 fosfatasa, pero los niveles de fosfoenolpiruvato carboxicinasa y fructosa difosfatasa son más importantes (126). El trabajo conjunto de estas dos últimas enzimas podría hacer funcionar la gluconeogénesis si hubiera oxalacetato disponible. Por lo menos podrían proporcionar glucosa 6 fosfato a partir de aminoácidos y glicerol, Según Anderson (126). las células de la mucosa intestinal de cobaya contienen cantidades apreciables de las cuatro enzimas gluconeogénicas, lo que significa la posibilidad del funcionamiento gluconeogénico completo desde lactato y piruvato hasta glucosa. No se conoce aún el significado de la gluconeogénesis en este tejido.

La presencia de fructosa difosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasa ha sido señalada también en la glándula mamaria de bóvidos, aunque su significado tampoco está claro (122).

La gluconeogénesis cerebral es muy poco importante (128) existiendo las correspondientes enzimas gluconeogénicas en muy pequeña cantidad (128, 129).

También se ha descrito recientemente actividad gluconeogénica en la vejiga urinaria de sapo, tejido muy similar al que constituyen las nefronas distales de mamíferos (130). De forma semejante a lo que ocurre en el caso de la corteza renal, la acidosis extracelular influye en la gluconeogénesis de este tejido a partir de sustratos como lactato, piruvato u oxalacetato y no a partir de dihidroxiacetona. Sin embargo no hay aumento en la producción de amonio en estas condiciones y la glutamina no es utilizada como sustrato gluconeogénico. Por ello el posible papel regulador de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa en estas células no está suficientemente establecido.

de amonio en estas condiciones y la glutamina no es utilizada como sustrato gluconeogénico. Por ello el posible papel regulador de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa en estas células no está suficientemente establecido.

#### 1.1.5. - Métodos de estudio de la gluconeogénesis

Tradicionalmente han venido utilizándose dos métodos para estudiar el proceso gluconeogénico: animales pancreatomizados o tratados con floridzina y la perfusión del hígado de animales sin tratar. En el primer caso puede medirse el rendimiento en glucosa a partir de precursores variados ( 131 ). El hígado aislado, especialmente de animales de laboratorio relativamente grandes, es un método que permite determinar la gluconeogénesis en animales no diabéticos ( 132 ). Como ha señalado Krebs (133), "estos métodos han conducido al establecimiento del balance de la conversión de sustancias no glucídicas en glúcidos, pero son de un empleo muy limitado en el estudio del metabolismo intermediario y del control metabólico".

El uso de precursores marcados como sustratos de la gluconeogénesis ha permitido el estudio del proceso en animal entero, sin necesidad de recurrir a tratamiento alguno. Ello supone, evidentemente, un paso importante en la metodología a la que nos referimos aunque presenta la desventaja de que es difícil distinguir las aportaciones relativas de los distintos órganos gluconeogénicos. A este respecto la perfusión hepática es de gran valor, puesto que especifica perfectamente la contribución del hígado a la síntesis de glu

cosa. En general, los valores de gluconeogénesis determinados por esta técnica en hígado de rata son sensiblemente superiores a los que se obtienen con cortes de tejido hepático ( 87 ). En cambio para la medida de la gluconeogénesis renal, la perfusión ( 115, 134 ) no aporta ventajas sustanciales a las del estudio en cortes de tejido, que sigue siendo la técnica de elección, dada su sencillez ( 106 ).

Los estudios del proceso gluconeogénico no pueden limitarse a la determinación de las velocidades con que uno u otro sustrato se transforman en glucosa y a la investigación de las circunstancias que pueden influir en cada caso. Para conocer con más detalle las modalidades metabólicas de la gluconeogénesis y de su regulación hay que recurrir al empleo de otras técnicas bioquímicas especialmente a la determinación de los activadores enzimáticos y de las concentraciones de los metabolitos intermediarios.

## 1. 2. - ESTUDIO DE INHIBIDORES ESPECIFICOS DE LA GLUCONEOGENESIS.

Teniendo en cuenta el interés fisiológico de la gluconeogénesis y la complejidad de su regulación, el estudio de la naturaleza de los sistemas reguladores es una tarea importante tanto para el interesado en el conocimiento teórico de mecanismos fundamentales como para el que busca medios más eficaces contra los desordenes metabólicos tales como la diabetes. Por ello no es extraño que existan amplias referencias bibliográficas sobre el empleo de

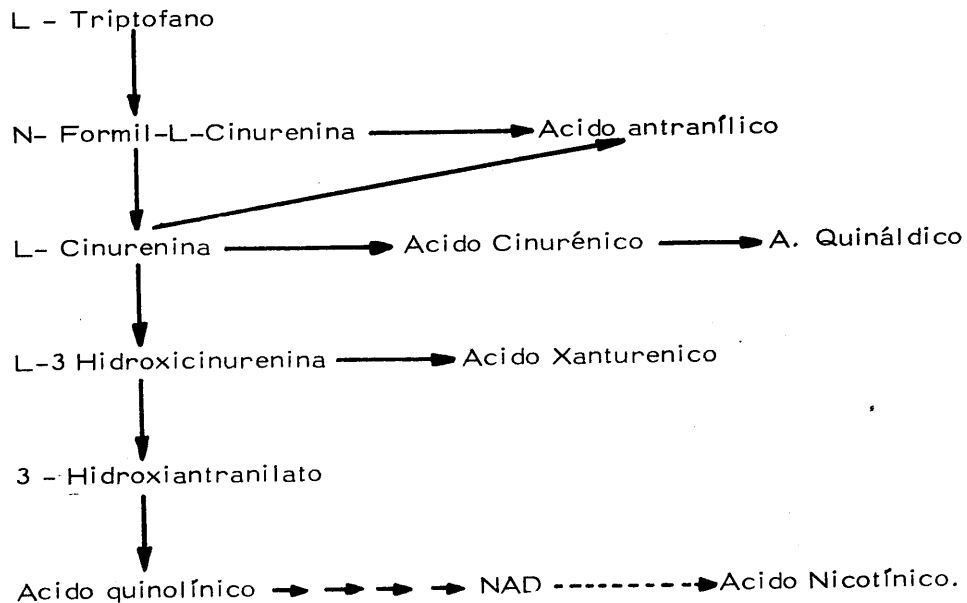
inhibidores específicos de la gluconeogénesis, inhibidores que se han revelado en muchos casos como excelentes medios de estudio de este proceso.

### 1.2.1. - Triptofano y ácido quinolínico

El 1966, Foster y col. ( 135 ) encontraron que el triptofano causaba un incremento en la actividad de la PEPCK hepática. Este rápido incremento no era resultado de síntesis "de novo" de la proteína sino que representaba una activación de la enzima presente ( 136 ). Sin embargo, este incremento en la actividad enzimática no iba acompañado por una subida paralela en la velocidad de la gluconeogénesis, sino que, de hecho, el triptofano inhibía la gluconeogénesis inducida por hidrocortisona (136 ).

La medida de las concentraciones de varios metabolitos intermediarios gluconeogénéticos en hígado de ratas tratadas con triptófano demostraba que piruvato, lactato, citrato, malato, aspartato, y oxalacetato aumentaban considerablemente, mientras que PEP, 2PGA y 3PGA y hexoxas monofosfato disminuían de forma apreciable en comparación con las concentraciones normales de estos metabolitos (137). Parecía por tanto, que el bloqueo de la gluconeogénesis ocurría a nivel de la reacción catalizada por la PEPCK, enzima que aparentemente era activado por la administración de triptofano ( 135 ).

Los estudios realizados con hígado perfundido de rata demuestran que no solo el triptofano, sino también los productos metabólicos de su degradación, L-cinurenina, L-3hidroxicinurenina, ácido 3 hidroxiantranílico y ácido quinolínico son capaces de inhibir la gluconeogénesis ( 138 ).



Puesto que el ácido quinolínico es el más efectivo de estos compuestos y solo él puede inhibir la actividad PEPCK "in vitro" se puede concluir que es éste el verdadero inhibidor, mientras que los otros metabolitos del triptofano sólo son activos por su capacidad de conversión en ácido quinolínico. El ácido nicotínico y

otros compuestos derivados metabólicamente del triptofano no son activos. El ácido quinóldico inhibe la gluconeogénesis pero por - otros mecanismos.

Los estudios llevados a cabo para el conocimiento del mecanismo de inhibición del ácido quinóldico muestran que este compuesto no ejerce inhibición "in vitro" cuando se agregan iones  $Mn^{++}$  como efectores de la reacción mientras que la inhibición es muy fuerte cuando se utilizan iones  $Fe^{++}$  como efectores. Ello sugiere que los efectores metálicos naturales son los iones ferroso, actuando el quinolinato retirando estos iones necesarios para la actividad enzimática ( 139 ).

#### 1. 2. 2. - Hidrazinas

La hidrazina, monometilhidrazina y dimetilhidrazina se conocen desde hace tiempo como agentes con poder hipoglucemiante ( 140 ,141). La administración de hidrazina a ratas produce una elevación en las concentraciones de malato y OAA y un decrecimiento en las concentraciones de los intermediarios fosforilados de la gluconeogénesis. Estos hechos indican que su inhibición "in vitro" es a nivel de la PEPCK, aunque esta inhibición no ha sido todavía - estudiada con detalle.

Estudios recientes llevados a cabo por Ros y col. ( 142 ) muestran además un efecto inhibitor de la hidrazina sobre las transaminasas, lo que parece indicar que son ambos efectos los responsables de su acción hipoglucemiante.

### 2.3.3. Acido quináldico y derivados del ácido indol carboxílico.

Veneziale y col. ( 138 ) encontraron que el ácido quináldico era capaz de inhibir la gluconeogénesis en hígados de ratas perfundidos a partir de alanina, mientras investigaban la inhibición de la gluconeogénesis por triptofano y sus productos de degradación.

El perfil de metabolitos acumulados en los hígados inhibidos por ácido quináldico, presentaba una gran diferencia con los que se observaban en hígados tratados con ácido quinolínico ( 143 ). El ácido quináldico produce agotamiento del glucógeno hepático y causa una severa hipoglucemia en ratas adrenalectomizadas ( 143 ).

Durante el curso de estos estudios, Bauman y col. encontraron la actividad hipoglucémica del ácido 5 metoxi-indol-2 carboxílico (MICA). Tanto el ácido quináldico como el MICA presentan un similar mecanismo de inhibición, siendo este último más efectivo ( 144 ).

La administración de ácido quináldico o MICA, hace que la concentración de piruvato hepático se eleve hasta valores de 66 veces la concentración normal. De esta forma, la razón piruvato/lactato se encuentra muy elevada, indicando una carencia de equivalentes reductores en el citosol hepático de ratas tratadas con estos ácidos heterocíclicos ( 143 ).



Debido a que los ácidos grasos son capaces de regenerar el poder reductor en el citosol hepático ( 145 ), Hanson y col. estudian el efecto del octanoato sobre la gluconeogénesis en hígados perfundidos de ratas suministrando ácido quináldico o MICA al medio de perfusión. Los inhibidores suprimen casi completamente la formación de glucosa a partir de lactato, pero no influye en la - conversión de glicerol o fructosa a glucosa ( 143 ). La adición de - octanoato al medio de perfusión restablece completamente la gluco- neogénesis en hígados perfundidos con ácido quinaldico o MICA ( 143 ).

La relación entre estos inhibidores heterocíclicos y ácidos grasos ha sido estudiada también en mitocondrias aisladas de hígado. Ambos inhibidores, MICA y ácido quináldico, inhiben fuertemente la oxidación del piruvato, así como la carboxilación para formar compuestos de 4 átomos de carbono.

La adición de octanoato 1 mM paraliza la oxidación del piruvato ( 146 ), pero restablece casi completamente la utilización de piruvato para la síntesis de malato y citrato ( 143 ). Estos efectos del octanoato sobre el metabolismo del piruvato en mitocondria aislada de hígado suministran una adecuada explicación sobre el restablecimiento de la gluconeogénesis en hígado perfundido de rata.

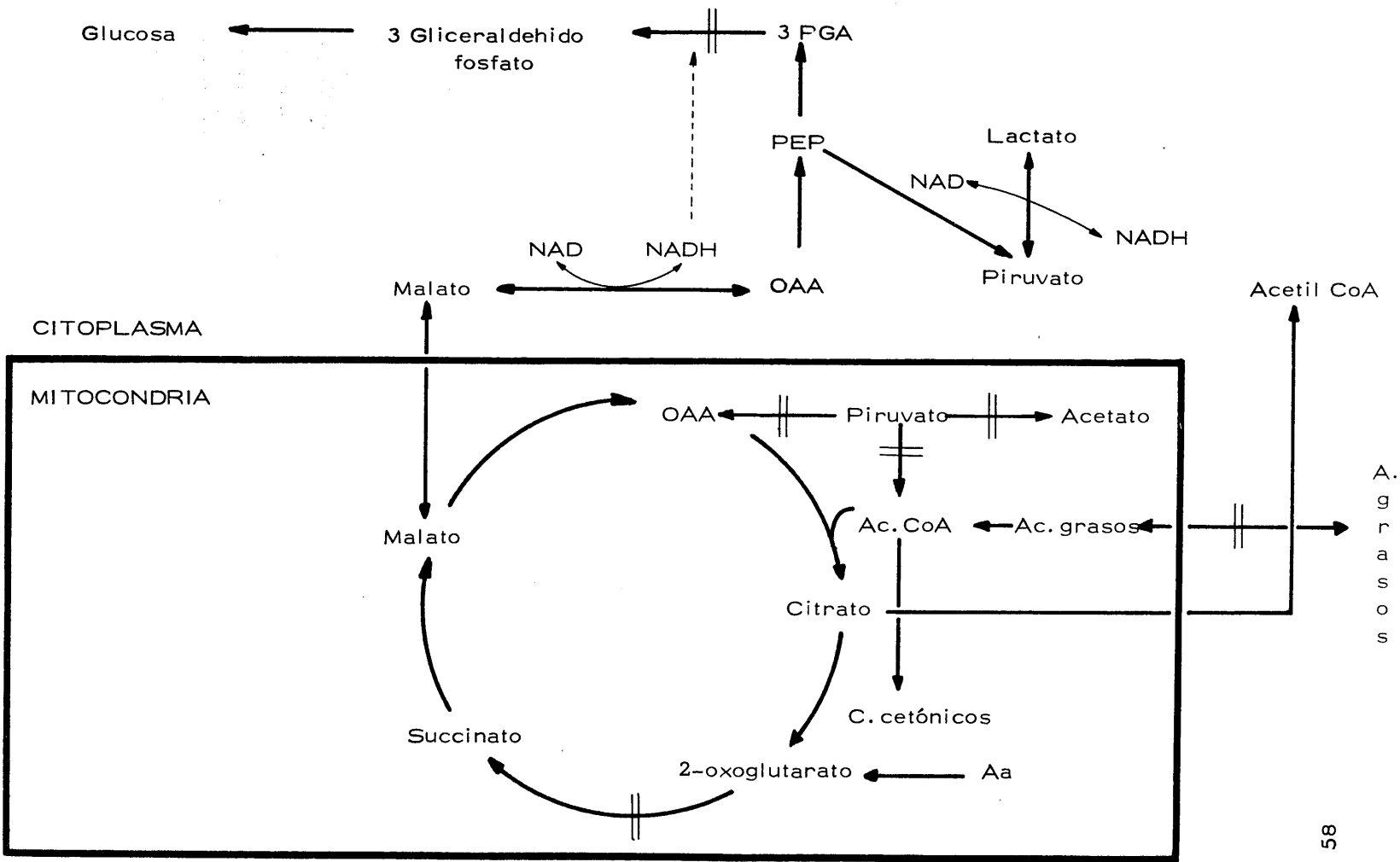
En lo que se refiere al mecanismo inhibitor del - MICA y del ácido quináldico, Bauman y Hill ( 147 ) habían encontrado que estos compuestos inhibían la piruvato y la 2 oxoglutarato deshidrogenasas y que esta inhibición se impedía por ácido lipico. Por otra parte, Reed y Lardy habían encontrado que la mitocondria de hígado aislada acumulaba estos inhibidores, MICA y ácido quinaldico, hasta

concentraciones de 30 veces las que se encuentran en el medio de suspensión ( 148, 151 ). Tanto el octanoato como el 2,4-dinitrofenol reducían esta acumulación y revertían también la inhibición de la oxidación del piruvato ( 151 ). Por otra parte la mitocondria de riñón no acumulaba en su matriz estos inhibidores, ni compuestos que bloqueen las oxidaciones mitocondriales ( 151-153).

El sitio de inhibición tanto del MICA como del ácido quinaldico parece ser la lipoil deshidrogenasa ya que el inhibidor acumulado dentro de la mitocondria inhibe significativamente el enzima aislado de mitocondria de hígado de rata ( 151. 154).

Recientemente Schillinger y Loge han probado una serie de derivados del indol sobre la gluconeogénesis y han encontrado que todos ellos se comportan como unos fuertes inhibidores incluso más potentes que el MICA ( 155).

A continuación realizamos una descripción esquemática de los productos más importantes de interferencia del MICA en el metabolismo glucídico ( 155):



#### 1.2.4. - Acido 4 pentonóico

El ácido 4 pentenoico, como su análogo químico, hipoglicina, inhibe la oxidación de ácidos grasos de larga cadena y produce una profunda hipoglucemia cuando es administrado a animales intactos ( 156 ). Sin embargo, el ácido 4 pentenoico incrementa un poco la utilización de glucosa periférica ( 156 ), siendo al parecer su efecto primario la inhibición de la gluconeogénesis hepática. En efecto, el ácido 4 pentenoico inhibe casi completamente la gluconeogénesis a partir de alanina en hígado perfundido de rata a una concentración de 1 mM ( 157 ). Estudios "in vitro" con ácido 4-pentenoico muestran que inhibe la oxidación de ácidos grasos de larga cadena en cortes de piel ( 158 ), homogenados de miocardio ( 156 ) y mitocondria de hígado ( 159 ). También se ha encontrado que desacopla la fosforilación oxidativa e inhibe la oxidación del piruvato ( 160 ).

Evidencias preliminares indican que la inhibición de la gluconeogénesis tiene lugar entre los sitios donde glicerol y - aspartato entran en la ruta gluconeogénica. El decrecimiento en la velocidad de la gluconeogénesis está asociado con un decrecimiento de producción de cuerpos cetónicos y un descenso muy fuerte en las variaciones  $\beta$ -hidroxibutarato/acetoacetato y lactato/piruvato.

Recientemente, estudiando el perfil de metabolitos hepáticos de ratas tratadas con el inhibidor se observa más precisamente que la gluconeogénesis es inhibida en primer lugar a nivel de - la gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (E. C. 1.2.1.12) (GAPDH),



Recientemente, Willianson y col. han concluido que los efectos inhibidores del ácido 4-pentenoico sobre la gluconeogénesis deben interpretarse en términos de alteraciones del control alostérico de la piruvato carboxilasa y disminución de la velocidad de producción y transporte de equivalentes reducidos sobre la mitocondria hasta el citosol (168).

B. - Efecto de la administración del ácido 5-metoxi-oxilico sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal.

C. - Estudio del efecto producido por la administración de MICA sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal de varias especies.

D. - Efecto de la administración de ácido 5-metoxi-oxilico sobre la actividad de algunos enzimas implicados en el metabolismo del hígado y corteza renal.

E. - Estudio de las concentraciones de los intermediarios de la gluconeogénesis en hígado y riñón de ratas administradas con ácido 5-metoxi-oxilico.

F. - Efecto de la administración de ácido 5-metoxi-oxilico sobre la glucemia a lo largo del tiempo después de la inyección del inhibidor.

### 1. 3. - ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO.

A la vista de los antecedentes bibliográficos expuestos y los comentarios realizados en la introducción, el presente trabajo ha sido realizado bajo el siguiente esquema.

A. - Estudio de efecto "in vitro" de algunos inhibidores específicos de la gluconeogénesis hepática sobre la capacidad gluconeogénica renal.

B. - Efecto de la administración del ácido 5 metoxindol carboxílico (MICA) sobre la capacidad gluconeogénica hepática.

C. - Estudio del efecto producido por la administración de MICA sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal a partir de varios sustratos.

D. - Efecto de la administración de ácido 5-metoxindol carboxílico sobre la actividad de algunos enzimas implicados en el proceso gluconeogénico de hígado y corteza renal.

E. - Estudio de las concentraciones de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en hígado y riñón de ratas tratadas con ácido 5 metoxindol carboxílico.

F. - Efecto de la administración de ácido 5 metoxindol carboxílico sobre la glucemia a lo largo del tiempo después de la administración del inhibidor.

2.1. Introduction  
2.2. Objectives  
2.3. Methodology  
2.4. Results  
2.5. Discussion  
2.6. Conclusion

## II. - PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Experimental Setup  
3.2. Data Collection  
3.3. Data Analysis  
3.4. Results  
3.5. Discussion  
3.6. Conclusion



1. The first part of the report is devoted to a general introduction of the subject and to a brief review of the literature.

2. The second part is devoted to a detailed description of the experimental apparatus and the method of measurement.

3. The third part contains the results of the measurements and a discussion of the experimental errors.

4. The fourth part is devoted to a comparison of the experimental results with the theoretical predictions.

5. The fifth part contains the conclusions of the work and some suggestions for further research.

6. The sixth part is devoted to a summary of the work and to a list of references.

THE PARTIAL EXPERIMENTAL

7. The seventh part is devoted to a detailed description of the experimental apparatus and the method of measurement.

8. The eighth part contains the results of the measurements and a discussion of the experimental errors.

9. The ninth part is devoted to a comparison of the experimental results with the theoretical predictions.

10. The tenth part contains the conclusions of the work and some suggestions for further research.

## II. - PARTE EXPERIMENTAL

### 2. 1. - MATERIAL

#### 2. 1. 1. - Especie ensayada

Se ha experimentado con ratas de raza Wistar hembras, de peso aproximado entre 150 y 200 gramos, alimentadas con dieta estandar y suministradas por el servicio de animales de la Universidad de Granada.

#### 2. 1. 2 - Material usado en las diferentes técnicas

Las pesadas se realizaron en Balanza Mettler H 20 T (p. máximo = 160 g  $\pm$  0,01 mg)

Para la medida del pH se utilizó un pehachimetro Beckman Expandomatic SS-2 (pH  $\pm$  0,005).

Los cortes de corteza renal se realizaron con un microtomo manual (A. 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 pistilo de vidrio sin esmerilado.

Las centrifugaciones en frío a gran velocidad se realizaron en las centrífugas refrigeradas MSE (High Speed 18) y BECKMAN J21B. En los demás casos se utilizó una centrífuga angular 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 para la medida de su capacidad gluconeogénica se realizaron en los aparatos Gallenkamp IH-350, y Grant SS30.

La adición de sustratos y enzimas se realizó con micropipetas "EMIL WORKS" de enrase automático por estrangulamiento (Auto Cerc High precisión).

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 con registro gráfico, incorporado y compartimento de cubetas termostatzado. Se utilizaron cubetas TSL de 1 cm. de espesor.

En la técnica del congelado instantáneo se utilizó: Un vaso Dewar de 25 l. para contener el nitrógeno líquido. Pinzas de aluminio diseñadas al efecto. Vaso cilíndrico de 10 l. de capacidad -

para contener el nitrógeno líquido de uso inmediato en el enfriamiento de las pinzas. Vaso Dewar de 1 litro de capacidad para las adiciones frecuentes de nitrógeno líquido a los morteros de porcelana con pistilos del mismo material.

La diálisis del enzima se realizó en tubo especial tipo Wisking Tubing 8/32.

Los gases se han realizado con bomboras de carbógeno ( $O_2$ :  $CO_2$ ) (95:5) y  $CO_2$  puro.

Se ha utilizado sangre humana como fuente de hematies conservadas por el espacio de 3-4 semanas a  $4^{\circ}C$  en solución anticoagulante citrato-dextrosa. Las soluciones anticoagulantes empleadas de acuerdo con las indicaciones de la USP vigente eran de la marca comercial Baxter. Los hematies así conservados poseen capacidad de transporte de oxígeno pero no presentan capacidad glucolítica.

La albúmina utilizada en el medio de perfusión ha sido Albúmina bovina (Fracción V, Powder) suministrada por Armour Pharmaceutical Co, Ltd. Eastbourne, Sussex, Inglaterra.

La perfusión hepática se realizó en una cabina diseñada al efecto, termostaticada, con una bomba peristáltica (Watson-Marlow Limited) y pulmón de vidrio para el gaseo del medio.

## 2.2. - PRODUCTOS

En la preparación de tampones, soluciones salinas y demás reactivos generales se han utilizado productos PROBUS (España) y MERCK (Darmstad, Alemania). El hidrato de hidracina y el indicador universal interno procedían de la firma BDH Chem. LTD (Poole, Inglaterra). El naranja de metilo de la firma Merck.

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

Las enzimas fueron suministradas en general por Boehringer. La peroxidasa y ácido quinolínico procedían de Sigma.

La heparina procedía de los laboratorios Leo - (Madrid) y la ortocianisidina y ácido 4-pentenoico procedían de Fluka, Ab. Bush S. G. Suiza.

El ácido 5-Metoxíndol-2-carboxílico procedía de Aldrich-Europe. Belgica.

El nembutal, cortesía de los laboratorios ABBOT.

## 2.3. - METODOS

### 2.3.1. - Tratamiento de los animales

#### 2.3.1.1. - Acido 5-metoxindol-2-carboxilico (MICA)

El MICA se administró en dosis de 50 mg y 200 mg/Kg de peso de animal, por intubación gástrica de 9 ml con jeringa provista de una cánula de plástico y por inyección intraperitoneal de 1 ml. El tratamiento se hizo siempre 3 horas antes del sacrificio de la rata. La solución de MICA era neutralizada con NaOH.

#### 2.3.1.2. - Ayuno

Las ratas sometidas a este tratamiento lo estuvieron durante 48h, para lo cual se separaban en jaulas privandoles del alimento pero con libre acceso al agua.

### 2.3.2. - Tratamientos de los tejidos para la determinación de actividades enzimáticas.

#### 2.3.2.1. - Glucosa-6-Pasa

En la determinación de la actividad enzimática de la glucosa 6P-asa de hígado y corteza renal se ha 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-Pasa por un espacio de 2 horas cuando se conserva en frío.

#### 2.3.2.2. - FDP-asa, PEPCK, LDH

En la determinación de la fructosa 1-6dP-asa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa y lactato deshidrogenasa de hígado y corteza renal se ha homogenizado 100 mg 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 20 min. En el sobrenadante se determinan las actividades de FDP-asa PEPCK y LDH como se describe en las secciones correspondientes a cada enzima.

#### 2.3.3. - Tratamiento de los tejidos para la determinación de metabolitos

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 algunos de ellos se inducen por la situación de estrés producidos 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" (169, 170).

En el "congelado instantáneo" se mata la rata por dislocación cervical. Rápidamente se practica 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.

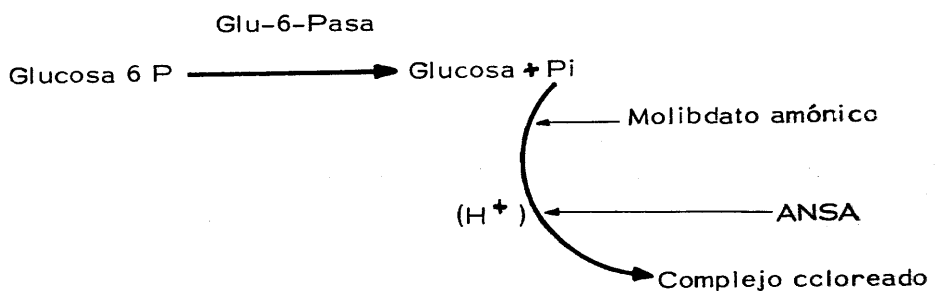
El homogenizado se centrifuga a 30.000 x g y 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante es decantado y se neutraliza con KOH al 20%, en frío, hasta pH 3.5 visualizado con el indicador interno naranja de metilo. Se vuelve a centrifugar para eliminar el precipitado de  $\text{ClO}_4\text{K}$  formado. El sobrenadante formado se emplea en la determinación de los metabolitos. Se conserva congelado y no se debe descongelar-congelar más de una vez.



## 2.3.4.- Determinaciones de actividades enzimáticas

### 2.3.4.1.- 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 (171).



#### a) Reactivos

Tampón citrato 0.1 M pH 6.5

Solución extemporánea de glucosa 6P al 33%

Acido tricloroacético al 10%

Solución estandar de fosfato  $5 \times 10^{-4}$  M.

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

Homogenado obtenido según se refiere en la sección 2.3.2.1.

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 2.3.2.1. 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 6 P	0.1 ml	- - -	0.1 ml
Se incuban durante 15 minutos exactamente 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.

## Determinación de fosfato inorgánico

Se ha realizado según la técnica de Fiske y Subarow (172) siguiendo el orden indicado en el siguiente protocolo:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>	<u>Ciego</u>	<u>Standar</u>
Molibdato	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Sobrenadante	1 ml	1 ml	1 ml	--
S. estandar 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 colorimétrica a 660 nm. El cero se ajusta con el ciego y se lee la D.O. correspondiente a cada tubo.

### d) Cálculos

La actividad de la glucosa 6 Pasa se expresa en nmoles de fosfato liberados de la glucosa 6 P en 1 minuto por miligramo de proteína.

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

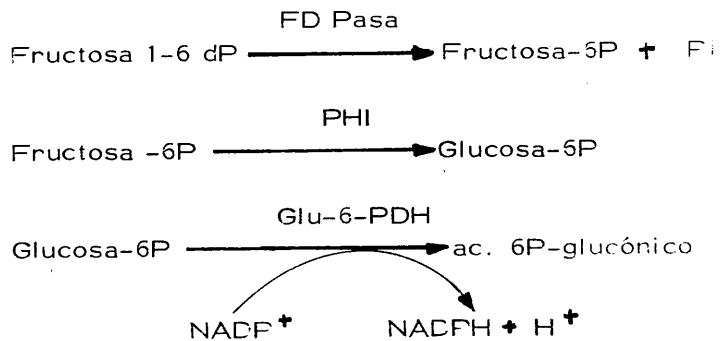
$$\text{nmoles} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1} = \frac{(\text{D.O.}_M - \text{D.O.}_{Bl})}{\text{D.O.}_{St}} \times 0,5 \times 2,2 \times \frac{1000}{15 \times P \times V}$$

Siendo:

- D. O. <sub>M</sub> = Densidad óptica del problema  
D. O. <sub>Bl</sub> = Densidad óptica del blanco  
D. O. <sub>St</sub> = Densidad óptica del estándar de fosfato.  
0.5 =  $\mu$ moles de fosfato existente en 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  
P = mg de proteínas por ml de homogenado  
1000 = Para expresar la actividad por nmoles  
V = 0.1 ml de muestra homogenado

#### 2.3.4.2. - 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 (173). 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 NADP - NADPH. Estas reacciones son:



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

#### a) Reactivos

Tampón glicocola 0,04 M, pH 9.4  
 Solución de  $Cl_2Mn$  0.5 mM  
 Solución extemporánea de FDP 1 mM  
 Solución extemporánea de NADP 0.5 mM  
 Fosfohexosa somerasa (E.C. 5.3.1.9) (PHI) 10 uml por determinación  
 Glucosa 6P deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.4.9) 20 uml por determinación  
 Homogenado obtenido según se refiere en la sección 2.3.2.2.

#### 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
$Cl_2Mn$	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 los nmoles de fructosa 6P producidos en un minuto y miligramo de proteína.

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

$\Delta E$  = Valor medio del incremento de la D.O. en un min.

V = Volumen total de la cubeta

$\epsilon$  =  $6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$  = coeficiente de extinción molar  
aproximado del NADPH a 340 nm

d = Espesor de la cubeta

v = 0.050 ml de homogenado

1000 = Para expresarlo en nmoles.

P = mg de proteína por ml de homogenado.

### 2.3.4.3. - Determinación de la actividad enzimática de la fosfoenolpiruvato carboxicinas

La determinación de la fosfoenolpiruvato carboxicinas en la dirección carboxilante con el sistema málico deshidrogenasa-NAD/NADH acoplado se ha realizado por el método puesto a punto en nuestro Departamento por Pilar Antonio Oriola (174), descrito en su tesina.

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

## 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 <sub>2</sub> Mn	0.10 ml	0.10 ml
PEP	0.10 ml	0.10 ml
IDP	0.15 ml	0.15 ml
H <sub>2</sub> O Destilada	0.80 ml	0.90 ml
GSH	0.20 ml	0.20 ml
CO <sub>3</sub> 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 min. con CO<sub>2</sub> 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 nmoles de OAA producidos por minutos y mg de proteína. Los cálculos son similares a los anotados en la sección 2.3.4.2.



2.3.4.4. - 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. (175) cuyo fundamento es el siguiente:



a) Reactivos

Tampón fosfato 0.05, pH 7.5

Solución extemporánea de NADH  $8 \times 10^{-3}$  M

Solución extemporánea de Piruvato Sódico  $1 \times 10^{-3}$  M

Extracto: Obtenido según 2.3.2.2. 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	2.91 ml	3.00 ml
Piruvato	0.10 ml	0.10 ml
NADH	0.05 ml	0.01 ml
Extracto	0.05 ml	- -

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

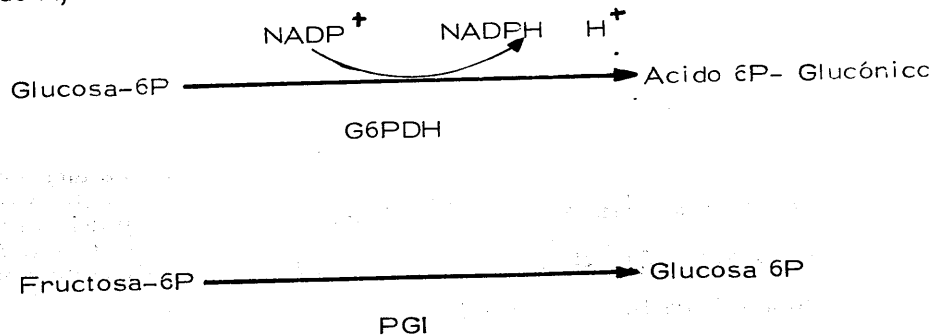
### c) Cálculos

La cantidad de lactato producido en nmoles por miligramo de proteína y minuto, expresa la actividad de este enzima. Los cálculos se hacen de igual manera a lo citado en la sección 2.3.4.2.

### 2.3.5. - Determinación enzimática de metabolitos

#### 2.3.5.1. - Determinación enzimática de glucosa 6P y fructosa 6P

La observación de la cantidad de glucosa 6P y fructosa 6P de una muestra preparada según 2.3.3. 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 (176).



### a) Reactivos

Tampón Trietanolamina, 0,4 M, pH 7.6

Solución de  $Cl_2Mg$  0,5 M

Solución extemporánea de NADP  $2 \times 10^{-2}$  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 2.3.3.

### 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	--
$Cl_2Mg$	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  $\Delta E_1$  aparecido tras la adición de G6PDH corresponde a la glucosa -6P de la muestra. El  $\Delta E_2$  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 nmoles por gramo de tejido fresco.

$$\text{nmoles/g tejido fresco} = \frac{\Delta E \times 2.5}{\epsilon \times 10^{-6} \times V} \times \text{F.n.} \times \frac{V_t}{P} \times 1000$$

donde:

$\Delta E$  = incremento de la densidad óptica

2.5 = volumen total de la cubeta

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

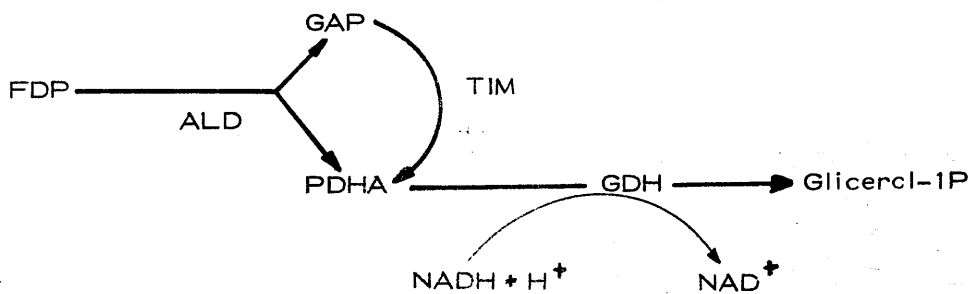
V = ml de muestra neutralizado

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

P = peso en gramos del tejido fresco.

### 2.3.5.2. - 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 (DP), se han observado en la misma determinación espectrofotométrica según el método de T. Bücher (177) con el fundamento siguiente:



### a) Reactivos

Tampón: Trietanolamina 0,4 M, pH 7.6

Solución extemporánea de  $\text{NADH } 5 \times 10^{-3} \text{ M}$

Glicerol-1P deshidrogenasa (GDH) (E. C. 1. 1. 1. 8) comercial.

Triosafosato isomerasa (TIM) (E. C. 3. 3. 1. 1.) comercial

Aldolasa (ALD) (E. C. 4. 1. 2. 7.) comercial.

### b) Técnica

Se han preparado probetas 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  $\Delta E$  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

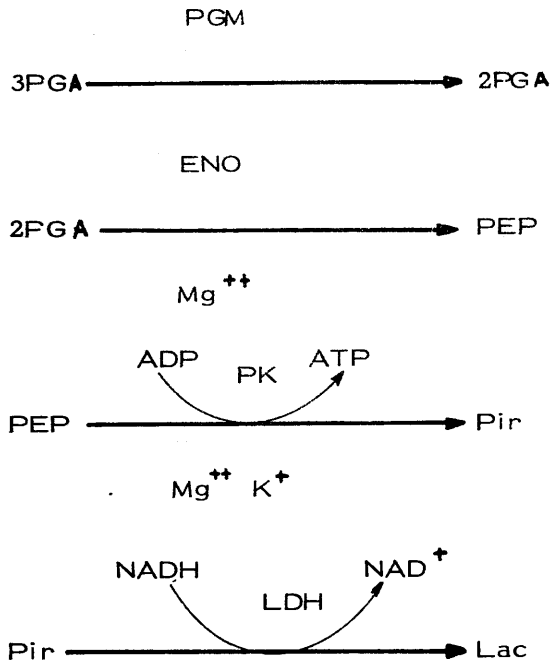
Se expresa en nmoles de metabolito transformado por gramo de tejido fresco. Hay que tener presente que por cada FDP se consumen 2 de NADH. Los cálculos son iguales a los de la sección 2.3.5.1.

### 2.3.5.3. - 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. (178).

El fundamento es el siguiente:

Piruvato (Pir) (E.C. 1.1.1.3) (E.C. 1.1.1.3) (E.C. 1.1.1.3) (E.C. 1.1.1.3)  
Fosfoenolpiruvato (PEP) (E.C. 1.1.1.1) (E.C. 1.1.1.1) (E.C. 1.1.1.1) (E.C. 1.1.1.1)  
2-Fosfoglicerato (2PG) (E.C. 1.1.1.4) (E.C. 1.1.1.4) (E.C. 1.1.1.4) (E.C. 1.1.1.4)  
3-Fosfoglicerato (3PG) (E.C. 1.1.1.13) (E.C. 1.1.1.13) (E.C. 1.1.1.13) (E.C. 1.1.1.13)



a) Reactivos

Tampón trietanolamina 0,4 M, pH 7.6

Solución de ClK 2 M

Solución de  $SO_4$  Mg 0,5 M

Solución extemporánea de ADP 0.01M

Solución extemporánea de 2-3 dPG 0.01 M

Solución extemporánea de NADH  $5 \times 10^{-3}$  M

Fosfogliceromutasa (FGM) (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>Blanco</u>
Tampón	0,50 ml	2,64 ml
CIK	0,20 ml	--
SO <sub>4</sub> Mg	0,10 ml	--
ADP	0,20 ml	--
2-3 d P6	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  $\Delta E$  encontrado en la determinación espectrofotométrica a 340 nm y temperatura ambiente, seguidos a la adición de los enzimas por el orden del protocolo y esperando siempre que se consuma el NADH correspondiente a cada metabolito antes de añadir el siguiente enzima, corresponden a:

- $\Delta E_1$       piruvato
- $\Delta E_2$       fosfoenolpiruvato
- $\Delta E_3$       2 fosfoglicerato
- $\Delta E_4$       3 fosfoglicerato



### c) Cálculos

Se expresa en nrooles de metabolito existente en gramo de tejido fresco, según lo citado en la sección 2.3.5.1.

#### 2.3.5.4. - Determinación enzimática de L-malato

El L-malato se ha determinado oxidandolo enzimáticamente a oxalacetato mediante la enzima málico deshidrogenasa a pH 9.5 según ha descrito H. J. Hohorst (179)



### a) Reactivos

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

Solución extemporánea de NAD  $5 \times 10^{-2}$  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  $\Delta E$  debido a la formación del NADH paralelo al consumo de malato.

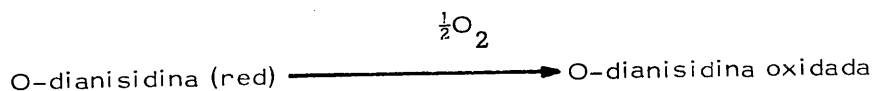
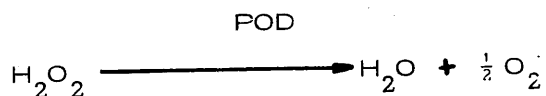
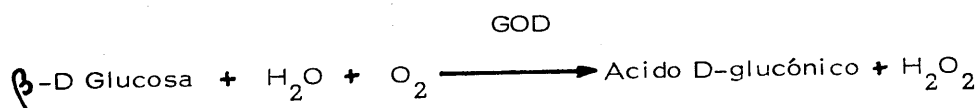
### c) Cálculos

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

### 2.3.5 5. - 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. (180) 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  $\alpha$ -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 estandar de glucosa 0, 2 mM

Glucosa-oxidada (GOD) (E. C. 1. 1. 3. 4) comercial 9. 3mg 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:

	<u>Blanco</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>	<u>S3</u>	<u>Muestra</u>
Solución estandar de glucosa	-	0.5 ml	0.75 ml	1 ml	-
H <sub>2</sub> O	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	-	0.5 ml
Muestra neutralizada	- -	- -	- -	-	0.5 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.

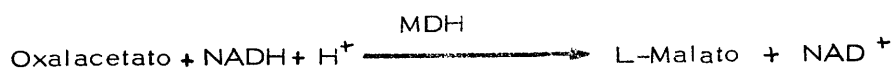
### c) Cálculos

Para hallar los  $\mu$ moles de glucosa de la muestra es necesario representar una recta patrón con las densidades ópticas de los estandar y sus respectivas concentraciones de 0.1, 0.15 y 0.200  $\mu$ moles de glucosa. Así se obtiene los  $\mu$ moles de glucosa existentes en 0.5 ml de muestra neutralizada.

Los cálculos son diferentes dependiendo de que la muestra proceda de una toma de sangre, del medio de perfusión hepática ó 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.

### 2.3.5.6. – Determinación enzimática de oxalacetato

El oxalacetato se ha determinado reduciendolo enzimáticamente a malato mediante la enzima L-malato deshidrogenasa a pH 7.6 según ha descrito A.W. Wahlefeld (193)



#### Reactivos:

Tampón trietanolamina 0.4 M pH 7.6

Solución extemporanea de NADH  $5 \times 10^{-3}$  M

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

#### Técnica:

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

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	1.00 ml	2.50 ml
NADH	0.02 "	--
Muestra	1.50 "	--
MDH	0.01 "	--

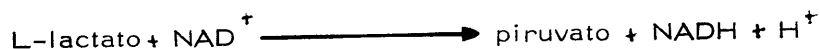
La determinación espectrofotométrica se realiza a 340 nm y temperatura ambiente anotando el  $\Delta E$  debido al consumo de NADH paralelo al de OAA.

#### Cálculos:

Las cantidades de OAA existentes se expresan en nmoles de OAA transformado por g de tejido fresco.

### 2.3.5.7.- 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 A. W. Wahlefeld (195).



#### Reactivos:

Tampón hidracina:glicocola 0.9:1 M, pH 9.5

Solución extemporánea de NAD al 0.5%

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

#### Técnica:

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

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

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

#### Cálculos:

Las cantidades de L-lactato existentes se expresan en nmoles de L-lactato transformado por gramo de tejido fresco.

### 2.3.6. - Determinación de la capacidad gluconeogénica hepática. Técnica de perfusión hepática.

El método de perfusión hepática basado en las técnicas de Miller y col. (181) y Schimassek (182) ha sido descrito por Hens y col. (183) y ha sido puesto a punto en nuestro departamento por J. M. Medina en su tesis Doctoral (184).

El medio de perfusión está compuesto por solución salina Krebs-Henseleit (185), albúmina bovina fracción V disuelta en solución salina y filtrada a través de Millipore 1,2  $\mu$  y hematíes procedentes de sangre humana, conservada por un espacio de 3-4 semanas a  $-4^{\circ}\text{C}$  en solución anticoagulante citratodextrosa. El volumen final del medio de perfusión es 150 ml usándose las siguientes concentraciones finales: Albúmina 2.6% (p/v), Hemoglobina 2.5% (p/v). el pH es de 7.4. Los sustratos se añaden en una concentración de 10 mM. El tiempo total de perfusión ha sido 135 min. dejando los 40 primeros para su estabilización.

### 2.3.7. - Determinación de la capacidad gluconeogénica renal

Se ha empleado el método de Krebs y col. (186) que ha sido puesto a punto y descrito detalladamente por J. P. García Ruiz en su Tesina de Licenciatura (187).

El método consiste en la incubación de cortes de la corteza renal en un medio de Krebs-Henseleit (185) durante una hora dándole una agitación que favorece el contacto del tejido con el sustrato puesto (10 mM) en el medio y el gas carbógeno para su respiración. Los líquidos resultantes de la incubación se desnaturalizan y neutralizan y se determinan en ellos la glucosa producida como se indica en la sección 2.3.5.5., respectivamente. Los resultados se expresan en  $\mu$ moles de glucosa producidos durante la hora de incubación y 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.

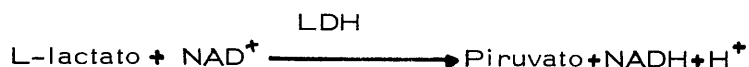
#### 2.3.8. - Determinación de la glucosa en sangre

La sangre se obtiene practicando un corte en la yugular. La sangre se recoge en un tubo que contiene 0.85 mg de heparina. De ella se toman 0,5 ml y se desnaturalizan con 4 ml de ácido perclórico al 2%. De la muestra desnaturalizada y neutralizada se determina la glucosa como se indicó en la sección 2.3.5.5. Los resultados se expresan en  $\mu$ moles de glucosa existente en 1 ml de sangre. Necesitamos tener presente el volumen de sangre fluida de la rata para conocer la dilución debida a la heparina y el factor de neutralización.



### 2.3.9. Determinación de L-lactato en sangre

La obtención y tratamiento de las muestras se ha descrito anteriormente (sección 2.3.8.). Una vez neutralizadas y centrifugadas las muestras se determina la cantidad de lactato observando en el espectrofotómetro la formación de NADH paralela al consumo de lactato por lactato deshidrogenasa a pH 9.5. El procedimiento ha sido descrito por Hohorst y col. (194).



#### Reactivos:

Tampón Hidracina; glicocola 0.4; 1 M, pH 9.5

Solución extemporánea de NAD al 0.5%

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

#### 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 "	0.20 "	0.40 "
Muestra	0.50 "	--	--
Agua destilada	0.70 "	1.40 "	1.20 "
LDH	0.02 "	0.02 "	--

El curso de la reacción es detectado espectrofotométricamente midiendo a 340 nm el  $\Delta E$  debido a la formación de NADH.

### Cálculos:

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

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

siendo:

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

V = volumen de la cubeta

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar aproximado del NAD

d = espesor de la cubeta

v = volumen de la muestra

$F_1$  = factor de neutralización

F = factor de dilución

### 2.3.10.- Determinación de glucógeno hepático

Se determina el glucógeno al estado de glucosa, después de hidrólisis enzimática mediante una preparación enzimática comercial ( "Dyazime" ).

El enzima comercial libera glucosa a partir de glucógeno, almidón y oligosacáridos intermedios, hidrolizando las uniones  $\alpha$ -(1-6) y las  $\alpha$ -(1-4) con baja actividad transglucosodásica e inapreciable de invertasa. El procedimiento experimental ha sido descrito por Krebs y col. (106).

Los resultados se expresan en equivalentes de glucosa,  $\mu$ moles referido a gramo de hígado fresco.

$\Delta A = \frac{\Delta V}{V} \times 100$   
 El x, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente  
 $\Delta \lambda = \frac{\Delta \lambda}{\lambda} \times 100$   
 El y, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente  
 El z, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente

El x, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente  
 El y, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente  
 El z, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente  
 El x, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente  
 El y, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente  
 El z, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente

3.1.10 - Determinación de la longitud de onda de la luz incidente

El x, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente  
 El y, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente  
 El z, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente

El x, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente  
 El y, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente  
 El z, % de variación de la longitud de onda de la luz incidente

## II. - INTRODUCCION

El presente estudio se realizó en el Instituto de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional de Tucumán, en el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, bajo la dirección del Dr. Carlos A. Basso.

Actualmente en nuestro departamento se ha estado desarrollando un programa de investigación de la función hepática en relación con la actividad de la fosfopiruvato carboxilasa y de la hexoquinasa glucocogénica. La actividad de estas enzimas se ha estudiado en ratas hepáticas experimentales inducidas por galactosemia, en las que la concentración de glucosa en sangre se había disminuido (1963).

En el presente estudio se ha buscado determinar el efecto de la galactosemia sobre la actividad de la fosfopiruvato carboxilasa y de la hexoquinasa glucocogénica en ratas hepáticas experimentales. Para ello se ha estudiado la actividad de estas enzimas en ratas hepáticas experimentales inducidas por galactosemia, en las que la concentración de glucosa en sangre se había disminuido. Los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos en ratas hepáticas normales.

## III. - RESULTADOS

En el presente estudio se ha buscado determinar el efecto de la galactosemia sobre la actividad de la fosfopiruvato carboxilasa y de la hexoquinasa glucocogénica en ratas hepáticas experimentales. Para ello se ha estudiado la actividad de estas enzimas en ratas hepáticas experimentales inducidas por galactosemia, en las que la concentración de glucosa en sangre se había disminuido. Los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos en ratas hepáticas normales.

III - RESULTADOS

### III.- RESULTADOS

#### 3.1.- EFECTO "IN VITRO" DEL ACIDO 4-PENTENOICO, ACIDO QUINOLINICO Y ACIDO 5 METOXI-2 INDOL CARBOXILICO (MICA) SOBRE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA DE LA CORTEZA RENAL.

Anteriormente en nuestro departamento se habfa puesto de manifiesto un aumento de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas y de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal de ratas con degeneración hepática experimental inducida por galactosamina, en las que la formación de glucosa por el hfgado estaba disminuida ( 188 ).

Con estos preliminares se ha querido seguir estudiando la respuesta renal a una serie de inhibidores "específicos" de la gluconeogénesis hepática, descritos en la literatura bioquímica tales como Ac. 4 pentenoico, ácido quinolínico y ácido 5 metoxíndolcarboxílico (MICA), en lo que refiere a la capacidad gluconeogénica de dicho tejido.

Para ello era necesario en primer lugar realizar un estudio del efecto "in vitro" sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal de estos inhibidores de la gluconeogénesis hepática, para poder seleccionar después los menos activos sobre el riñón para inhibir de la forma más selectiva posible la gluconeogénesis hepática "in vivo".

Las concentraciones utilizadas para cada inhibidor fueron las encontradas en la bibliografía con un claro poder inhibidor hepático (138, 147, 151, 160) y que corresponden a 1 mM para el ácido 4-pentenoico, 2.4 mM para el ácido quinolínico y de 0.2 y 0.8 mM para el ácido 5-metoxindolcarboxílico (MICA).

Los ensayos de la capacidad gluconeogénica renal en presencia de estos inhibidores se realizaron a partir de L-lactato a una concentración 10 mM, tanto en ratas alimentadas como ayunadas 48 horas.

Como se puede observar en la Tabla nº 1 y Gráfica nº 1, el ácido 5-metoxindolcarboxílico presenta el menor grado de inhibición "in vitro" de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal, mientras que el ácido quinolínico presenta el efecto inhibidor más fuerte, tanto en ratas alimentadas como en ratas ayunadas 48 horas, aunque en estos últimos animales, influye mucho más la concentración de MICA que en los animales bien alimentados.

TABLA nº 1

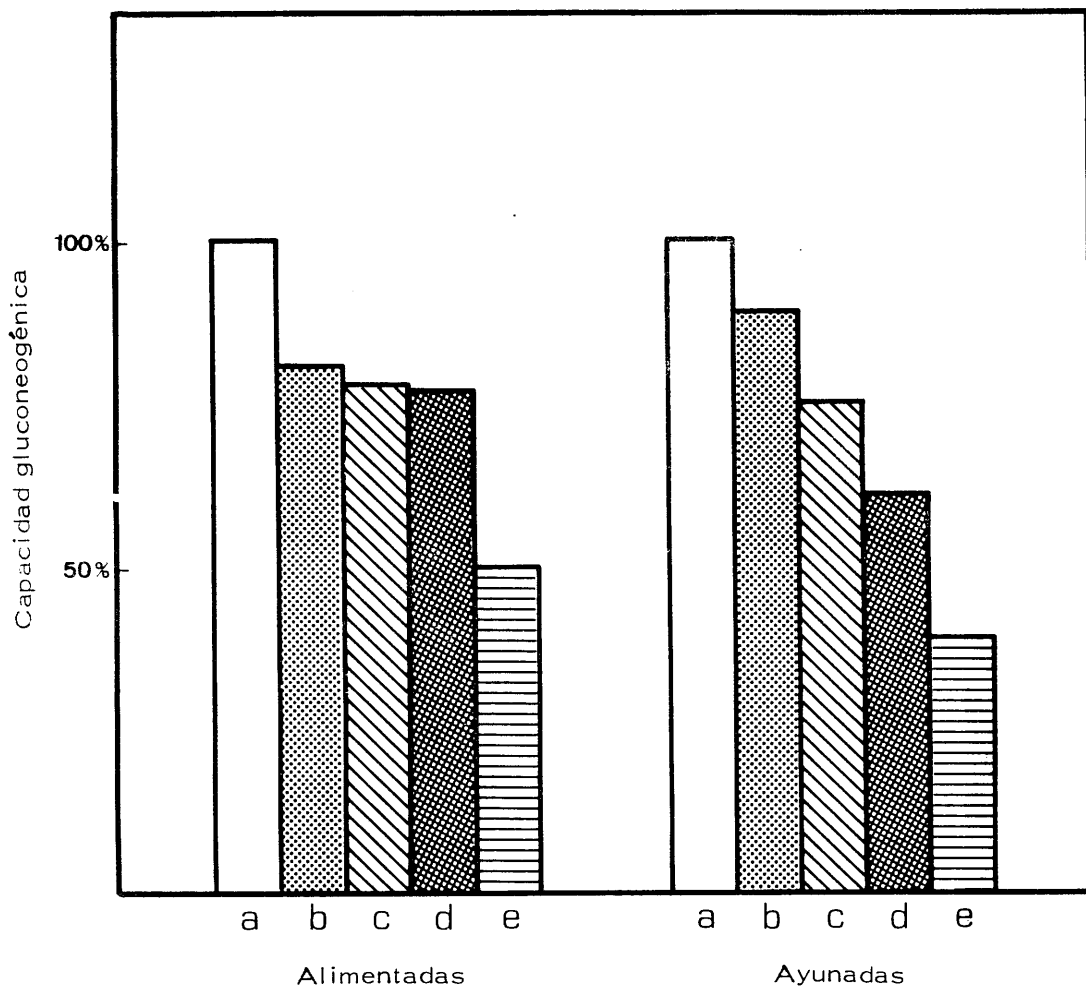
Efecto de la adición "in vitro" de algunos inhibidores específicos de la gluconeogénesis hepática sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal a partir de L-lactato a concentración 10 mM. en ratas alimentadas y ayunadas 48 horas.

Los valores de glucosa producida se expresan en  $\mu\text{moles}$  de glucosa  $\times$  hora<sup>-1</sup> de incubación  $\times$  gramo<sup>-1</sup> de tejido seco. El  $\pm$  representa el Error estandar de la media.

	RATAS ALIMENTADAS			RATAS AYUNADAS (48 h.)		
	Nº exp.	Glucosa producida	% Inhibición	Nº exp.	Glucosa producida	% Inhibición
Control	17	113.2 $\pm$ 2.1		5	235.4 $\pm$ 4.1	
MICA 0.2 mM	7	93.6 $\pm$ 4.4	19	5	208.7 $\pm$ 4.2	11
MICA 0.8 mM	7	90.1 $\pm$ 4.1	20	5	177.9 $\pm$ 3.1	25
Ac. 4-pentenoico 1mM	7	87.6 $\pm$ 2.7	23	4	142.3 $\pm$ 5.2	39
Ac. quinolfnico 2.4mM	7	57.0 $\pm$ 3.1	50	4	90.1 $\pm$ 3.4	61



GRAFICA nº 1



Efecto de la adición "in vitro" de algunos inhibidores específicos de la gluconeogénesis hepática sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal a partir de L-lactato a concentración 10 mM de ratas alimentadas y ayunadas 48 horas. La capacidad gluconeogénica se expresa como porcentajes de actividad respecto a los controles (a), siendo (b): MICA 0.2 mM; (c): MICA 0.8 mM; (d): ácido 4-pentenoico 1 mM; (3): ácido quínicico 2, 4 mM.

### 3.2.- INHIBICION "IN VITRO" DEL ACIDO 5-METOXI-2-INDOL-CARBOXILICO (MICA) SOBRE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA HEPATICA.

Una vez seleccionado el ácido 5-metoxindol carboxílico (MICA) como el inhibidor específico de la gluconeogénesis hepática que menos afectaba a la capacidad gluconeogénica renal "in vitro", se ha procedido a comprobar la inhibición a nivel de la capacidad gluconeogénica hepática en nuestras condiciones experimentales.

Para ello y debido a que los cortes de hígado o los homogenados de dicho tejido no realizan la síntesis de glucosa de forma satisfactoria se recurrió a la técnica de perfusión del órgano ( 182, 183 ). Por otra parte, debido a que en los animales alimentados, el hígado contiene glucógeno, lo que dificulta mucho la obtención de datos experimentales y altera además el propio funcionamiento del hígado en lo que se refiere a la producción de glucosa, las experiencias se han realizado solamente en animales ayunados durante 48 horas a fin de agotar el glucógeno hepático.

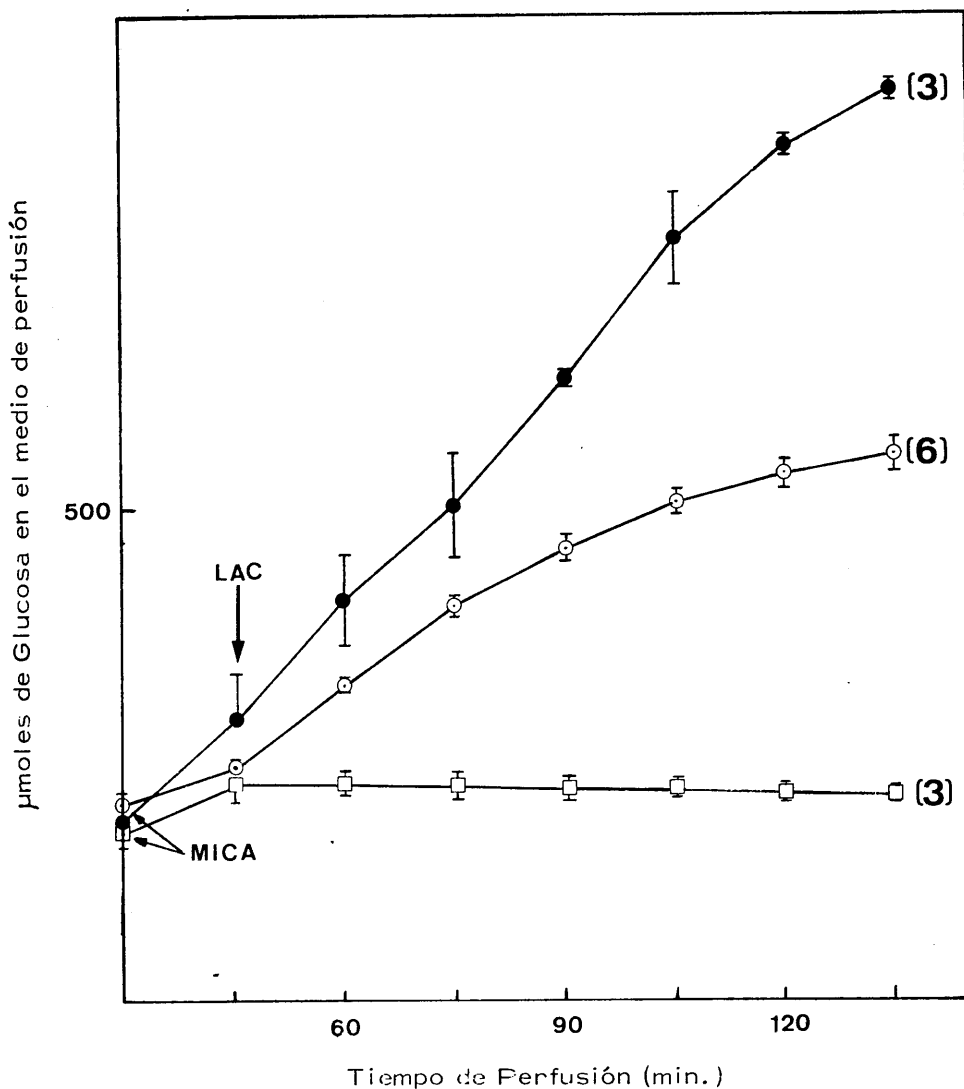
Se ha utilizado como precursor gluconeogénico el lactato ya que se comporta como excelente sustrato de este proceso ( 87 ). En todos los casos se ha utilizado este sustrato a concentración 10 mM.

Los inhibidores fueron añadidos al medio de perfusión a los 45 minutos de iniciada la misma mientras que el sustrato se añade a los 30 minutos.

Los resultados obtenidos se han expresado de dos maneras:

- a) Producción total de glucosa en el medio de perfusión ( $\mu\text{moles}/150\text{ ml}$ ) respecto al tiempo (Gráfica nº 2).
- b)  $\mu\text{moles}$  de glucosa formados por gramo de hígado seco y por hora de perfusión (Tabla nº 2.)

Se corrobora el clarísimo efecto inhibitor del - MICA, pues a una concentración de **0.2 mM** inhibe la gluconeogénesis hepática en un **56%** y a **0.8 mM** esta inhibición llega a ser del **100%**.



Efecto de la adición "in vitro" de ácido 5-metoxi-2-indol carboxílico (MICA) sobre la capacidad gluconeogénica de hígado perfundido de ratas ayunadas 48 horas. Glucosa encontrada en el medio de perfusión a partir de L-lactato a concentración 10 mM, (●); L-lactato 10 mM + MICA 0.2 mM, (○); L-lactato 10 mM + MICA 0.8 mM, (□). El inhibidor era añadido a los 30 min. y el sustrato a los 45 min. Las barras verticales representan el Error estándar de la media. El número de experiencias se indican entre parentesis. LAC indica L-lactato. Los pesos medios de los hígados secos fueron 1.63 g para los controles; 1.65 g para MICA 0.2 mM; 2.16 g para MICA 0.8 mM:

TABLA nº 2

Efecto de la adición "in vitro" de MICA sobre la capacidad gluconeogénica de hígado perfundido de ratas ayunadas 48 horas a partir de L-lactato a concentración 10 mM.

A los medios de perfusión controles se les añadió solución salina y a los problemas las cantidades correspondientes de MICA (0.2 y 0.8 mM). Los resultados de glucosa producida se expresan en  $\mu\text{moles de glucosa} \times \text{hora}^{-1}$  de perfusión  $\times \text{gramo}^{-1}$  de hígado seco. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. Los pesos medios de los hígados secos han sido 1.63g para los controles; 1.65 g para MICA 0.2 mM; 2.16 g para MICA 0.8 mM.

	Nº exp.	Glucosa producida	% Inhibición
Control	6	294.4 $\pm$ 25.2	
MICA 0.2 mM	7	129.1 $\pm$ 6.2	56
MICA 0.8 mM	3	-4.0 $\pm$ 6.2	102

### 3.3. - EFECTO DE LA INTUBACION GASTRICA DE MICA SOBRE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA HEPATICA A PARTIR DE L-LACTATO.

Una vez comprobado el claro efecto inhibidor del MICA sobre la capacidad gluconeogénica hepática se procedió a corroborar el efecto "in vivo" del inhibidor sobre dicha capacidad. Para ello se ensayó en primer lugar la intubación gástrica del MICA a dos concentraciones diferentes, midiendo tres horas después la capacidad gluconeogénica en hígado perfundido a partir de lactato.

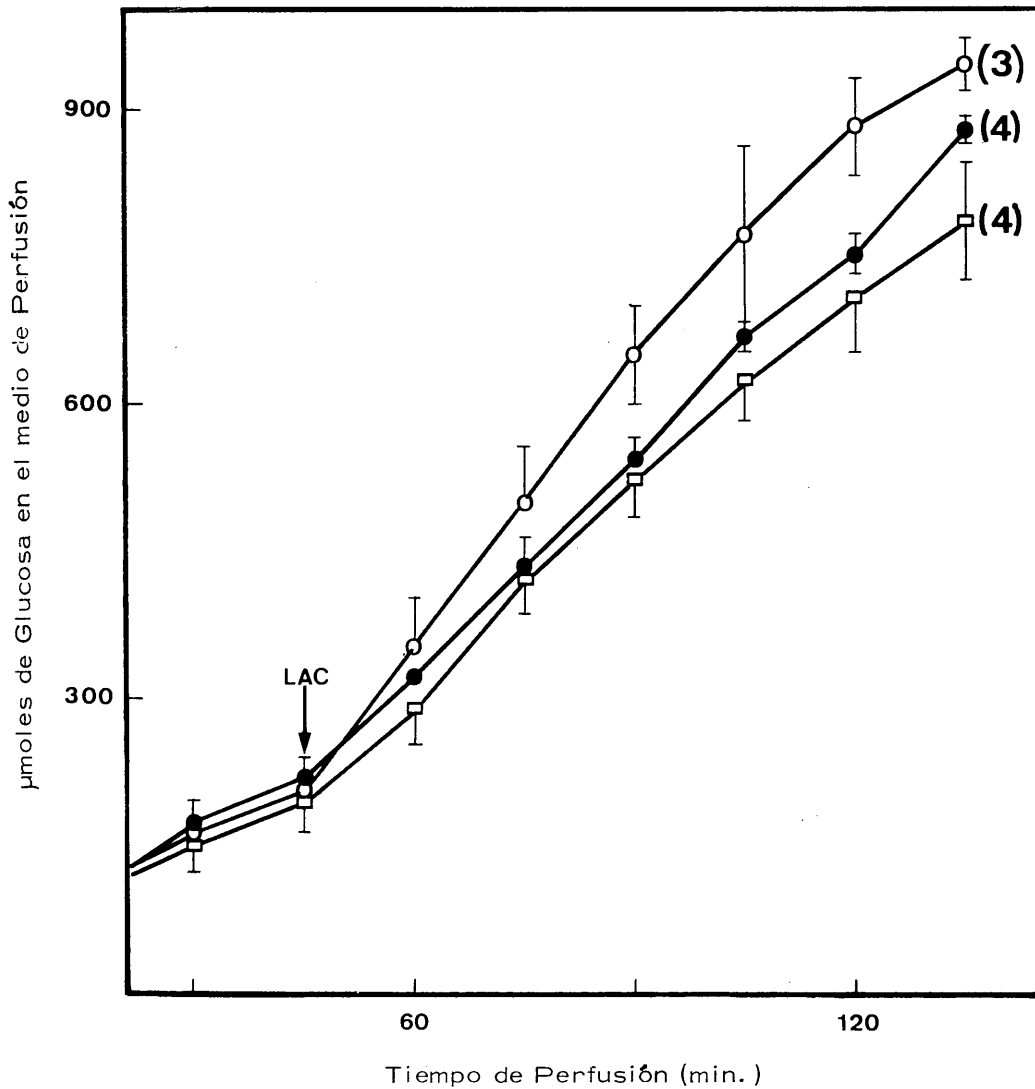
Al contrario de lo que ocurre por adición de MICA al medio de perfusión, la intubación gástrica de esta sustancia a animales ayunados durante 48 h. a concentración de 50 mg de MICA por Kg de peso de rata no produce variaciones significativas en la velocidad de producción de glucosa a partir de L-lactato a concentración 10mM. Cuando se utiliza una concentración de 200 mg de MICA por Kg de peso de rata la inhibición que se observa es pequeña y poco significativa. Estos resultados pueden observarse en la Tabla nº 3 y Gráficas nº 3 y 6.

TABLA nº 3

Efecto de la intubación gástrica de MICA sobre la capacidad gluconeogénica de hígado perfundido de ratas ayunadas 48 horas a partir de L-lactato a concentración 10 mM.

Los animales controles fueron intubados gástricamente con 10 ml de solución salina; los animales problema fueron intubados con las cantidades correspondientes de MICA (50 y 200 mg/Kg de peso de rata) en un volumen de 10 ml, todos tres horas antes de iniciarse la perfusión. Los resultados de glucosa producida se expresan en  $\mu\text{moles de glucosa} \times \text{hora}^{-1}$  de perfusión  $\times \text{gramo}^{-1}$  de hígado seco. El  $\pm$  representa el error estándar de la media. P indica el grado de significancia. Los pesos medios de los hígados secos fueron 1.44 g para los controles; 1.65 g para MICA 50 mg/Kg de peso de rata y 1.55 g para MICA 200 mg/Kg de peso de rata.

	Nº exp.	Glucosa producida	% Inhibición	P
Control	4	307.5 $\pm$ 12.8		
MICA 50 mg/kg	3	303.7 $\pm$ 13.0	2	<0.90
MICA 200 mg/kg	4	255.3 $\pm$ 16.4	17	<0.05



Efecto de la intubación gástrica de MICA sobre la capacidad gluconeogénica hepática a partir de L-lactato de ratas ayunadas 48 horas. Glucosa encontrada en el medio de perfusión de animales con controles ( ● ); animales tratados con MICA a dosis de 50 mg/Kg de peso de rata ( ○ ); animales tratados con MICA a dosis de 200 mg/Kg de peso de rata ( □ ). El sustrato se añadió a los 45 min. Las barras verticales representan el error estandar de la media. El número de experiencias se indican entre parentesis. LAC indica L-lactato. Los pesos medios de los hígados secos han sido 1.44 g para controles; 1.65 g para MICA 50mg/Kg de peso de rata y 1.55 g para MICA 200 mg/Kg de peso de rata.



### 3.4. - EFECTO DE LA INYECCION INTRAPERITONEAL DE MICA SOBRE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA HEPATICA. A PARTIR DE L-LACTATO.

Al observar que la intubación gástrica de MICA no producía una inhibición de la capacidad gluconeogénica hepática acorde con la encontrada por adición al medio del inhibidor se procedió a inyectarlo intraperitonealmente, con el fin de obviar en lo posible las pérdidas anejas a aquella vía de administración.

Se empleó la inyección intraperitoneal de 1ml de solución salina para los animales controles y 1 ml de solución de MICA para los animales problemas.

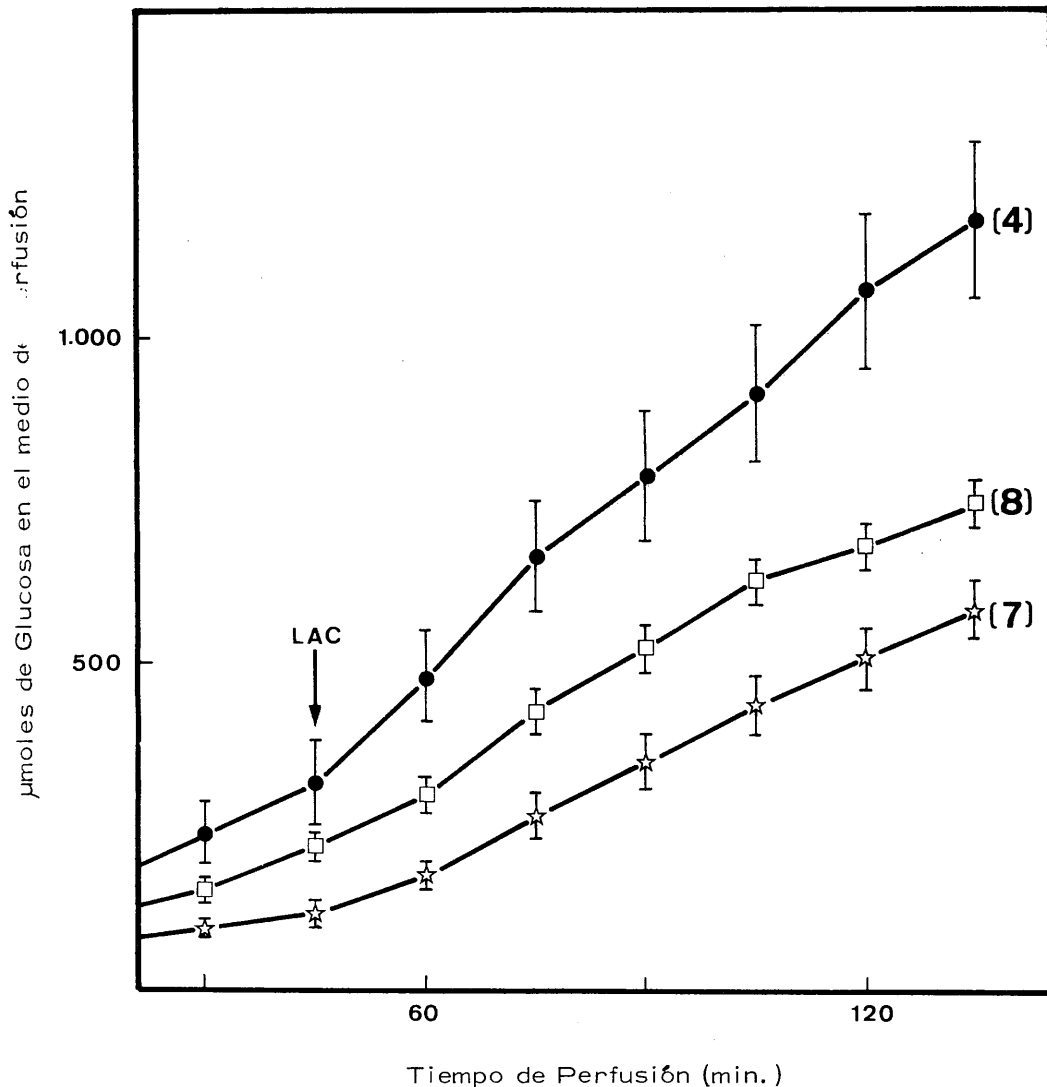
Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla nº 4 y Gráficas nº 4 y 6. Puede observarse un claro efecto inhibidor, pues a una dosis de 50 mg de MICA por Kg de peso de rata la inhibición alcanza un 44%, y a dosis de 200 mg de MICA por Kg de peso de rata la inhibición llega a ser de un 50%.

TABLA nº 4

Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA sobre la capacidad gluconeogénica de hígado perfundido de ratas ayunadas 48 horas a partir de L-lactato a concentración 10 mM.

Los animales controles fueron inyectados intraperitonealmente con 1 ml de solución salina; los animales problemas fueron inyectados con las cantidades correspondientes de MICA (50 y 200 mg / Kg de peso de rata) en un volumen de 1 ml, todos tres horas antes de iniciarse la perfusión. Los resultados de glucosa producida se expresan en  $\mu\text{moles}$  de glucosa por hora<sup>-1</sup> de perfusión x gramo<sup>-1</sup> de hígado seco. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia . Los pesos medios de los hígados secos fueron 1.45 g para los controles; 1.58 g para MICA 50 mg/Kg de peso de rata y 1.56 para MICA 200 mg/Kg de peso de rata.

	Nº exp.	Glucosa producida	% Inhibición	P
Control	4	396.0 $\pm$ 26.0		
MICA 50 mg/kg	8	221.6 $\pm$ 8.5	44	<0.001
MICA 200 mg/kg	7	198.7 $\pm$ 6.0	50	<0.001



Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA sobre la capacidad gluconeogénica hepática a partir de L-lactato de ratas ayunadas 48 horas. Glucosa encontrada en el medio de perfusión de animales controles ( ● ); animales tratados con MICA a dosis de 50 mg/Kg de peso de rata ( □ ); animales tratados con MICA 200 mg/Kg de peso de rata ( ☆ ). El sustrato se añadió a los 45 min. Las barras verticales representan el error estándar de la media. El número de experiencias se indica entre parentesis. LAC indica L-lactato. Los pesos medios de los hígados secos fueron de 1.45 g para los controles; 1.58 g para MICA 50 mg/Kg de peso de rata y 1.56 g para MICA 200 mg/Kg de peso de rata.

### 3. 5. - EFECTO DE LA INYECCION INTRAPERITONEAL DE MICA SOBRE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA HEPATICA A PARTIR DE PIRUVATO.

Durante la gluconeogénesis a partir de piruvato el NADH necesario es suministrado por la mitocondria al citosol por un sistema en el que están involucrados los ácidos dicarboxílicos de 4 átomos de carbono (143). De acuerdo con este esquema el piruvato es convertido a oxalacetato dentro de la mitocondria y reducido a malato, el cual sale de la mitocondria. La oxidación de malato a oxalacetato en el citosol suministra el sustrato para la fosfoenolpiruvato carboxinasas así como el NADH para la reducción del 3 fosfoglicerato a gliceraldehído 3 fosfato. (Ver esquema página siguiente).

Dado que el mecanismo de inhibición por MICA de la gluconeogénesis hepática está relacionado con la supresión del poder reductor (NADH) necesario para pasar el oxalacetato a malato dentro de la mitocondria, parecía interesante estudiar el efecto inhibitor sobre la capacidad gluconeogénica del hígado a partir de piruvato. Se evitaba así la fuente de NADH extramitocondrial que significa el lactato como sustrato gluconeogénico, puesto que el primer paso de su camino para convertirse en glucosa es su oxidación a piruvato:



Por ello, la gluconeogénesis a partir de lactato no necesita poder reductor mitocondrial, saliendo el oxalacetato de la mitocondria como aspartato y no como malato (189, 190).

Los resultados obtenidos como puede observarse en la Tabla nº 5 y Gráficas nº 5 y 6 fueron semejantes a los obtenidos a partir de lactato, aunque las inhibiciones de la capacidad gluconeogénica hepática fueron algo inferiores.

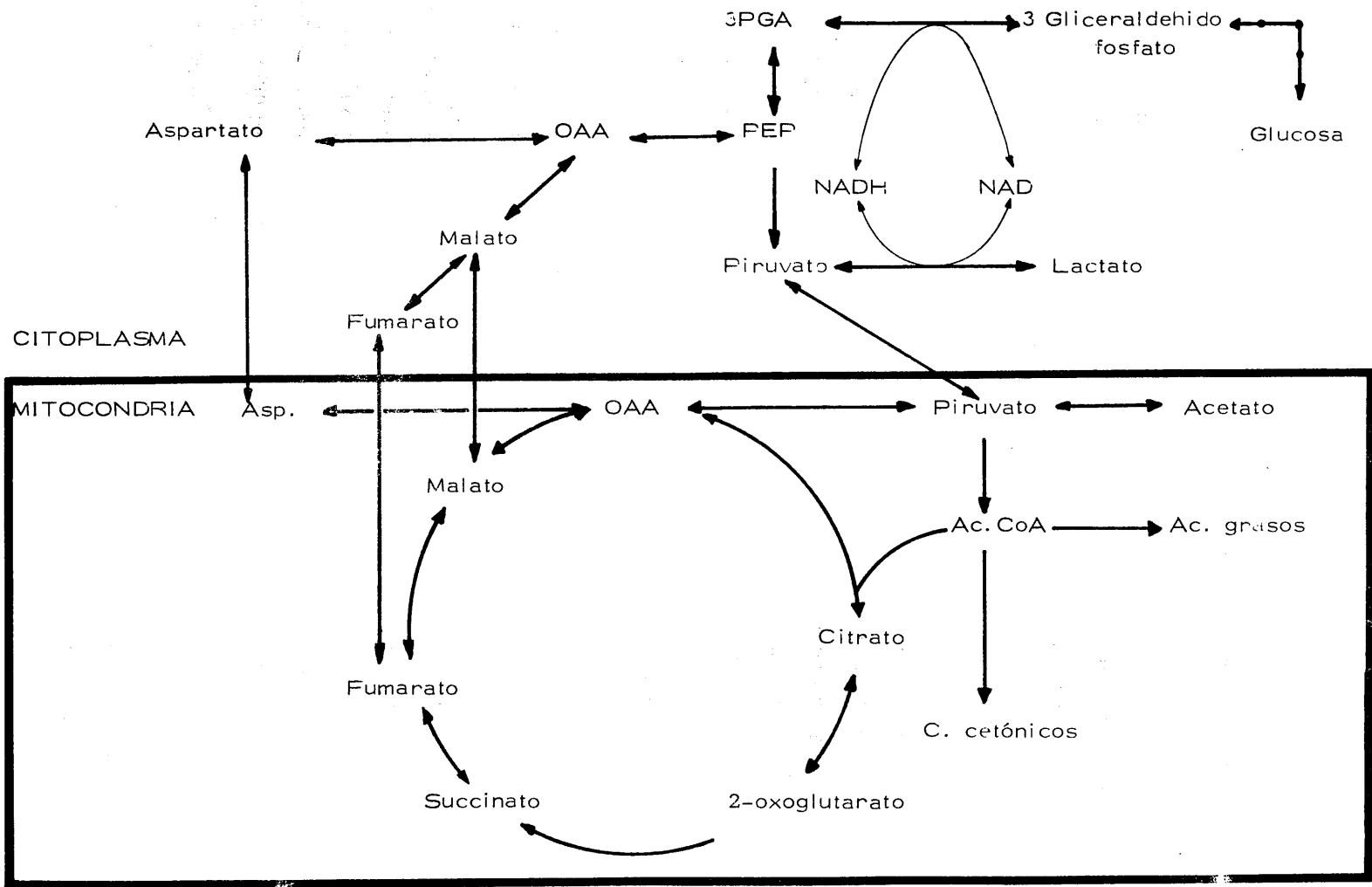
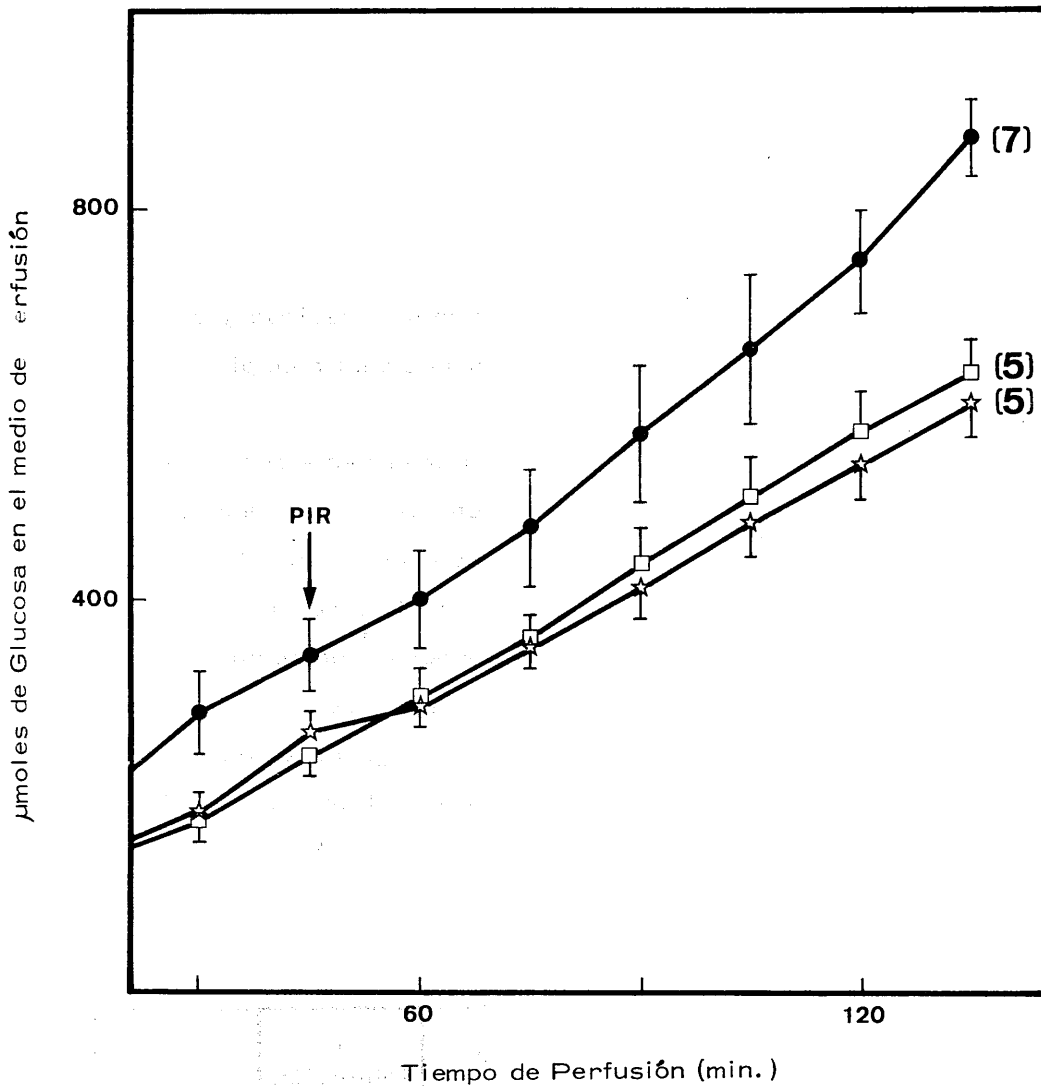


TABLA nº 5

Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA sobre la capacidad gluconeogénica de hígado perfundido de ratas ayunadas 48 horas a partir de piruvato a concentración 10 mM.

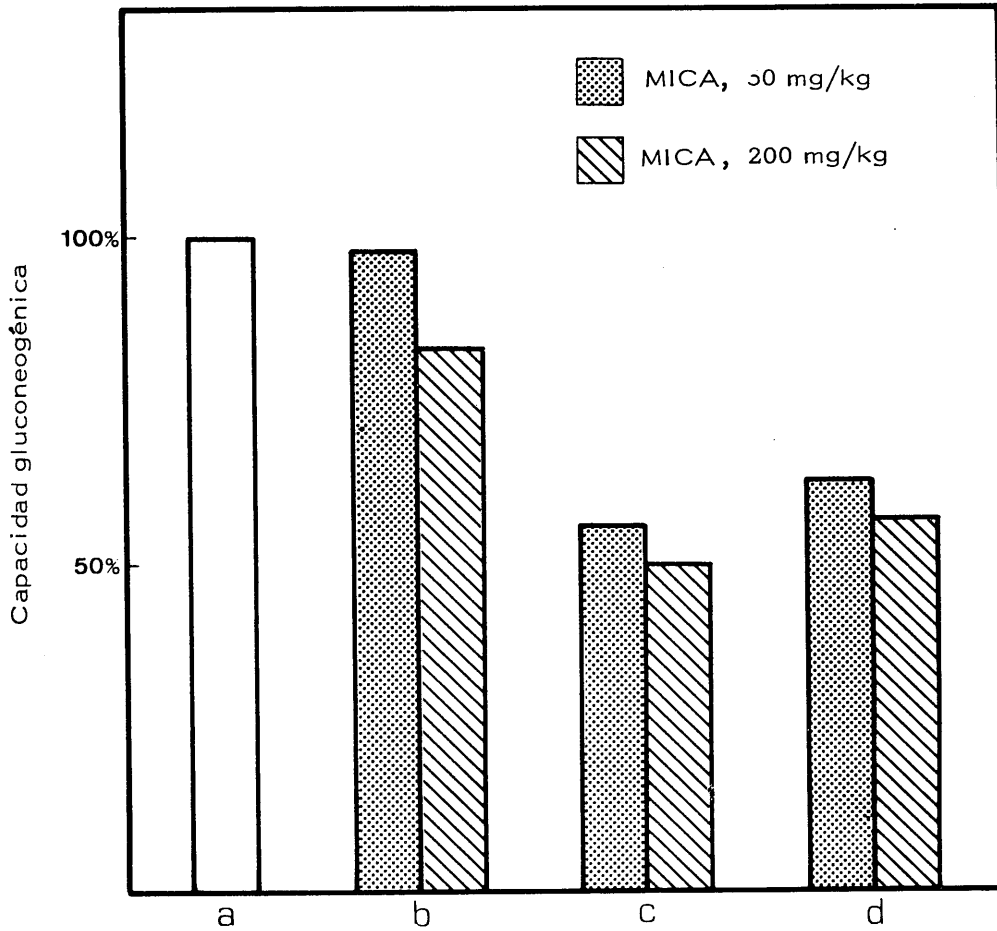
Los animales controles fueron inyectados intraperitonealmente con 1ml de solución salina, los animales problemas fueron inyectados con las cantidades correspondientes de MICA (50 y 200 mg/Kg de peso de rata) en un volumen de 1 ml; todos tres horas antes de iniciarse la perfusión. Los resultados de glucosa producida se expresan en  $\mu\text{moles de glucosa} \times \text{hora}^{-1}$  de perfusión  $\times$   $\text{gramo}^{-1}$  de hígado seco. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia. Los pesos medios de los hígados secos fueron de 1.43 g para los controles; 1,70 g para MICA 50 mg/Kg y 1.59 g para MICA 200 mg/Kg.

	Nº exp.	Glucosa producida	% Inhibición	P
Control	6	246.3 $\pm$ 13.8		
MICA 50 mg/kg	5	155.4 $\pm$ 2.1	37	<0.001
MICA 200 mg/kg	5	141.2 $\pm$ 8.9	43	<0.001



Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA sobre la capacidad gluconeogénica hepática a partir de piruvato de ratas ayunadas - 48 horas. Glucosa encontrada en el medio de perfusión de animales controles ( ● ); animales tratados con MICA 50 mg/Kg ( □ ); animales tratados con MICA 200 mg/Kg ( ☆ ). El sustrato se añadió a los 45 mín. Las barras verticales representan el error estándar de la media. El número de experiencias se indican entre paréntesis. PIR representa piruvato. Los pesos medios de los hígados secos fueron 1.43 g para los controles; 1.70 g para MICA 50 mg/Kg; y 1.59 g para MICA 200 mg/Kg.

GRAFICA nº 6



Efecto de la administración de MICA sobre la capacidad gluconeogénica hepática. La capacidad gluconeogénica hepática se expresa como porcentajes de actividad respecto a los controles (a), - siendo (b); capacidad gluconeogénica hepática a partir de L-lactato de animales tratados con MICA por intubación gástrica; (c): capacidad gluconeogénica hepática a partir de L-lactato de animales tratados con MICA por inyección intraperitoneal; (d): idem a partir de piruvato.



### 3.6.- EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE MICA SOBRE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA DE LA CORTEZA RENAL

Una vez verificado el efecto inhibitor que presenta "in vivo" el ácido 5 metoxindol carboxílico (MICA) sobre la capacidad gluconeogénica hepática, se procedió a estudiar la capacidad gluconeogénica de la corteza renal en estas condiciones.

#### 3.6.1.- Capacidad gluconeogénica renal a partir de L- lactato en ratas alimentadas y con intubación gástrica de MICA.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla nº 6. Puede observarse como a ambas concentraciones, la producción de glucosa fué mayor significativamente en las ratas sometidas a la intubación gástrica con dosis de 50 y 200 mg por Kg de peso de rata, con incrementos del 39% y 58% respectivamente.

#### 3.6.2.- Capacidad gluconeogénica de la corteza renal a partir de L-lactato, piruvato, glutamina y fructosa en ratas alimentadas y con inyección intraperitoneal de MICA.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla nº 7 y Gráfica nº 7. Puede observarse que en todos los casos, excepto cuando el sustrato gluconeogénico es la fructosa, la producción de glucosa aumenta en los animales inyectados con MICA a dosis de 50 y 200 mg por Kg de peso de rata con incrementos variables entre el 39 y el 72% sobre los valores controles.

TABLA nº 6

Efecto de la intubación gástrica de MICA sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal de ratas alimentadas a partir de L-lactato a concentración 10mM.

A los animales controles se les administró 10 ml de solución salina por intubación gástrica; a los animales problema se les administró 10 ml de solución de MICA (50 y 200 mg/Kg de peso de rata) por intubación gástrica, todos tres horas antes de la muerte. Los valores de glucosa producida se expresan en  $\mu\text{moles de glucosa} \times \text{hora}^{-1}$  de incubación  $\times \text{gramo}^{-1}$  de tejido seco. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

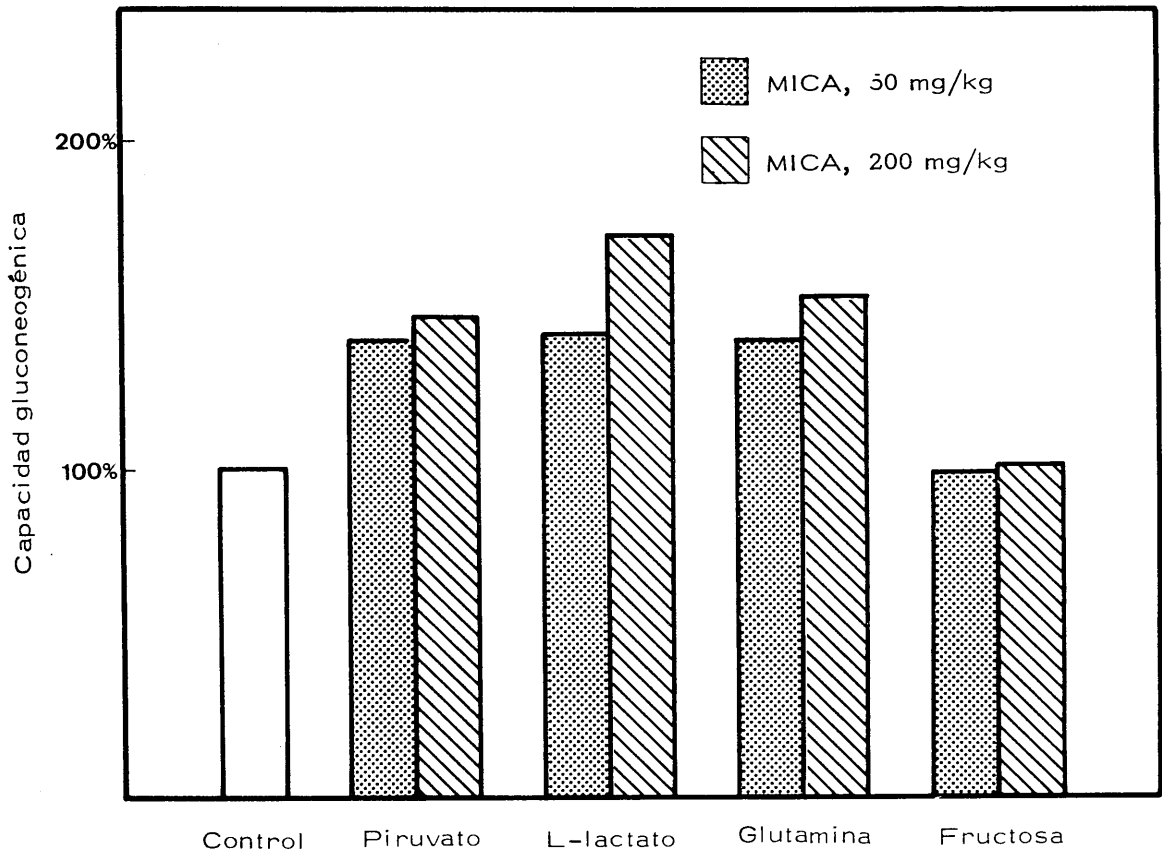
	Nº exp.	Glucosa producida	% Activación	P
Control	13	106.2 $\pm$ 3.4		
MICA 50 mg/kg	6	147.5 $\pm$ 4.6	39	<0.001
MICA 200 mg/kg	10	168.1 $\pm$ 6.0	58	<0.001

TABLA nº 7

Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal de ratas alimentadas a partir de piruvato, L-lactato, glutamina y fructosa, todos a concentración 10 mM.

A los animales controles se les inyectó intraperitonealmente 1 ml de solución salina y a los animales problema se les inyectó 1 ml de solución de MICA (50 y 200 mg/Kg de peso de rata), todos tres horas antes de la muerte. Los valores de glucosa producida se expresan en  $\mu\text{moles de glucosa} \times \text{hora}^{-1}$  de incubación  $\times \text{gramo}^{-1}$  de tejido seco. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

	CONTROLES		MICA 50 mg/kg			MICA 200 mg/kg		
	Nº exp.	Glucosa producida	Nº exp.	Glucosa producida	P	Nº exp.	Glucosa producida	P
Piruvato	9	219.4 $\pm$ 6.6	9	305.8 $\pm$ 6.3	<0.001	4	320.6 $\pm$ 11.3	<0.001
L-lactato	17	110.5 $\pm$ 1.9	8	156.4 $\pm$ 5.9	<0.001	7	189.9 $\pm$ 5.1	<0.001
Glutamina	7	115.4 $\pm$ 2.5	3	130.6 $\pm$ 1.7	<0.001	8	175.5 $\pm$ 4.3	<0.001
Fructosa	4	456.5 $\pm$ 31.8	4	447.5 $\pm$ 9.8	<0.90	9	460.3 $\pm$ 16.1	<0.90



Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal a partir de piruvato, L-lactato, glutamina y fructosa en ratas alimentadas tratadas con MICA (50 y 200 mg/Kg de peso de ratas). La capacidad gluconeogénica se expresa como porcentajes de actividad respecto a los controles.

3.6.3.- Capacidad gluconeogénica de la corteza renal a partir de piruvato, L-lactato, glutamina y fructosa en ratas ayunadas 48 horas inyectadas intraperitonealmente con MICA.

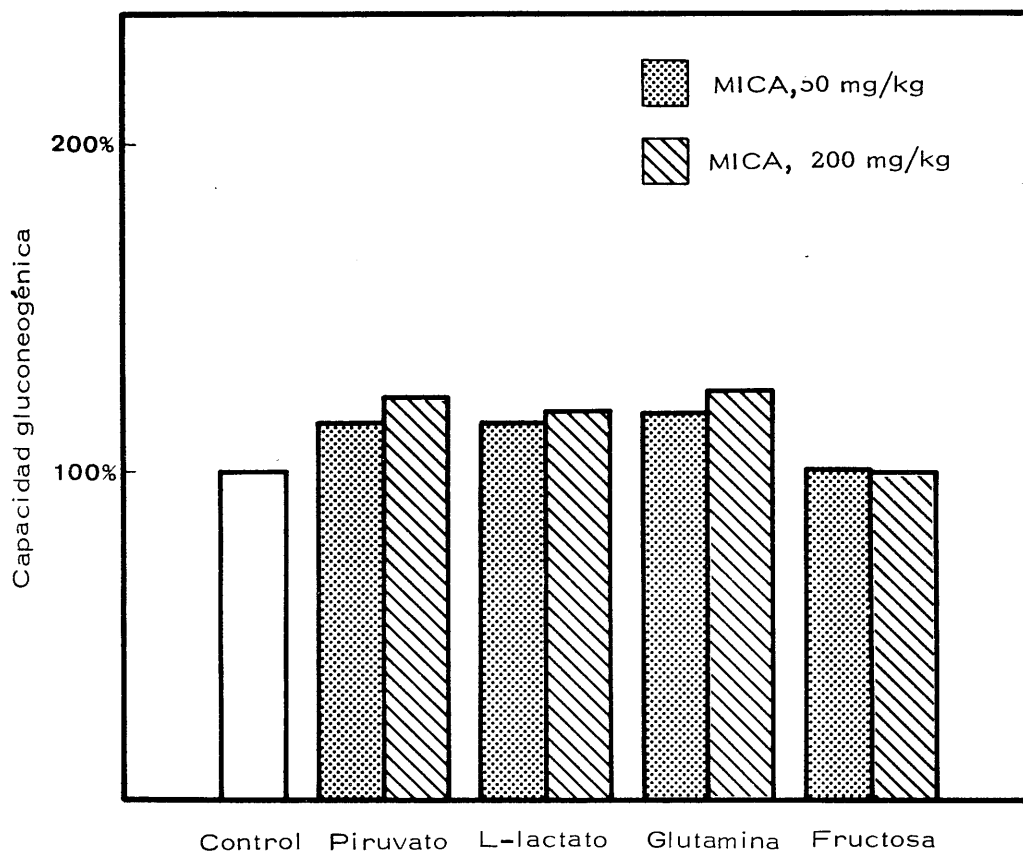
Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla número 8 y Gráfica nº 8. Puede observarse que en todos los casos, excepto cuando el sustrato gluconeogénico es fructosa, la producción de glucosa es mayor en los animales inyectados con MICA a dosis de 50 y 200 mg por Kg de peso de rata con incrementos variables entre el 15 y 26% sobre los valores controles.

TABLA nº 8

Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal de ratas ayunadas 48 horas a partir de piruvato, L-lactato, glutamina y fructosa, todos a concentración 10 mM. A los animales controles se les inyectó intraperitonealmente 1 ml de solución salina y a los animales problema se les inyectó 1 ml de solución de MICA (50 y 200 mg/Kg de peso de rata), todos tres horas antes de la muerte. Los valores de glucosa producida se expresan en  $\mu\text{moles de glucosa} \times \text{hora}^{-1}$  de incubación  $\times \text{gramo}^{-1}$  de tejido seco. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

	CONTROLES		MICA 50 mg/kg			MICA 200 mg/kg		
	Nº exp.	Glucosa producida	Nº exp.	Glucosa producida	P	Nº exp.	Glucosa producida	P
Piruvato	7	261.1 $\pm$ 8.9	9	300.4 $\pm$ 12.9	<0.05	4	321.5 $\pm$ 1.9	<0.001
L-lactato	10	218.8 $\pm$ 3.6	8	252.2 $\pm$ 2.8	<0.001	4	261.2 $\pm$ 3.5	<0.001
Glutamina	8	155.5 $\pm$ 2.1	3	184.3 $\pm$ 5.3	<0.01	3	195.6 $\pm$ 6.8	<0.001
Fructosa	3	506.3 $\pm$ 2.7	6	511.5 $\pm$ 4.7	<0.90	4	508.7 $\pm$ 2.1	<0.90

GRAFICA nº 8



Efectos de la inyección intraperitoneal de MICA sobre la capacidad gluconeogénica de la corteza renal a partir de piruvato, L-lactato, glutamina y fructosa en ratas ayunadas 48 horas y tratadas con MICA (50 y 200 mg/Kg de peso de rata). La capacidad gluconeogénica se expresa como porcentajes de actividad respecto a los controles.

### 3.7.- EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE MICA SOBRE LAS ACTIVIDADES DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA, FRUCTOSA DIFOSFATASA, GLUCOSA-6-FOSFATASA Y LACTICO DESHIDROGENASA DE HIGADO Y CORTEZA RENAL.

Los resultados obtenidos anteriormente en nuestro Departamento en ratas con degeneración hepática experimental producida por galactosamina señalaban claramente una función principal de la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa en el aumento de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal (188). Teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados expresados en el apartado anterior se ha realizado la determinación de esta enzima y de otras enzimas implicadas en la gluconeogénesis en las condiciones ya reseñadas.

#### 3.7.1.- Actividades enzimáticas de hígado y corteza renal de ratas alimentadas y con intubación gástrica de solución de MICA con dosis de 50 mg por Kg de peso de rata.

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas números 9 y 10 y Gráficas números 9 y 10. Se observa que en hígado no hay variaciones significativas en ninguna de las cuatro enzimas ensayadas, mientras que en riñón solamente la fosfoenolpiruvato carboxicinasa presenta un aumento de casi un 70% con alto grado de significancia ( $P < 0.001$ ).

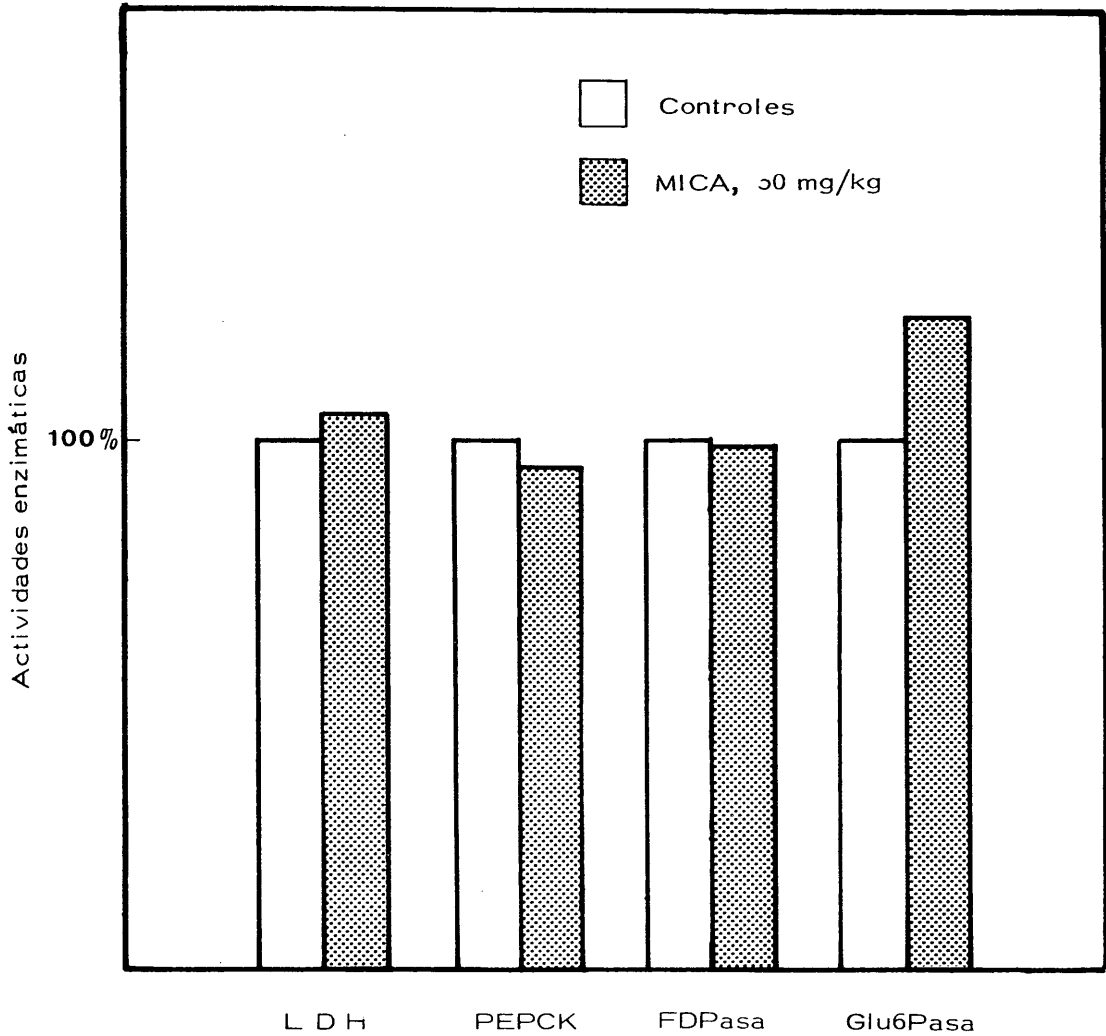


TABLA nº 9

Efecto de la intubación gástrica de MICA, 50 mg/kg de peso de rata, sobre las actividades de los enzimas, lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinas, fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa de hígado de ratas alimentadas.

A los animales controles se les administró por intubación gástrica, 10 ml de solución salina y a los animales problema, 10 ml de solución de MICA 50 mg/kg de peso de rata, todos tres horas antes de la muerte. Los valores de actividad enzimática se expresan en  $\mu\text{moles}$  de sustrato transformado  $\times \text{minuto}^{-1} \times \text{gramo}^{-1}$  de tejido fresco. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

	CONTROLES		MICA 50 mg/kg		
	Nº exp.	Actividad enzimática	Nº exp.	Actividad enzimática	P
LDH	5	382.15 $\pm$ 47.31	5	401.53 $\pm$ 40.27	<0.5
PEPCK	6	2.06 $\pm$ 0.05	6	1.93 $\pm$ 0.05	<0.5
FDPasa	8	4.20 $\pm$ 0.16	8	4.14 $\pm$ 0.23	<0.5
Glu6Pasa	7	16.30 $\pm$ 2.41	7	20.20 $\pm$ 3.25	<0.5



Efecto de la intubación gástrica de MICA sobre las actividades de los enzimas, lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa de hígado de ratas alimentadas. Las actividades enzimáticas se expresan como porcentajes de actividad respecto a los valores controles.

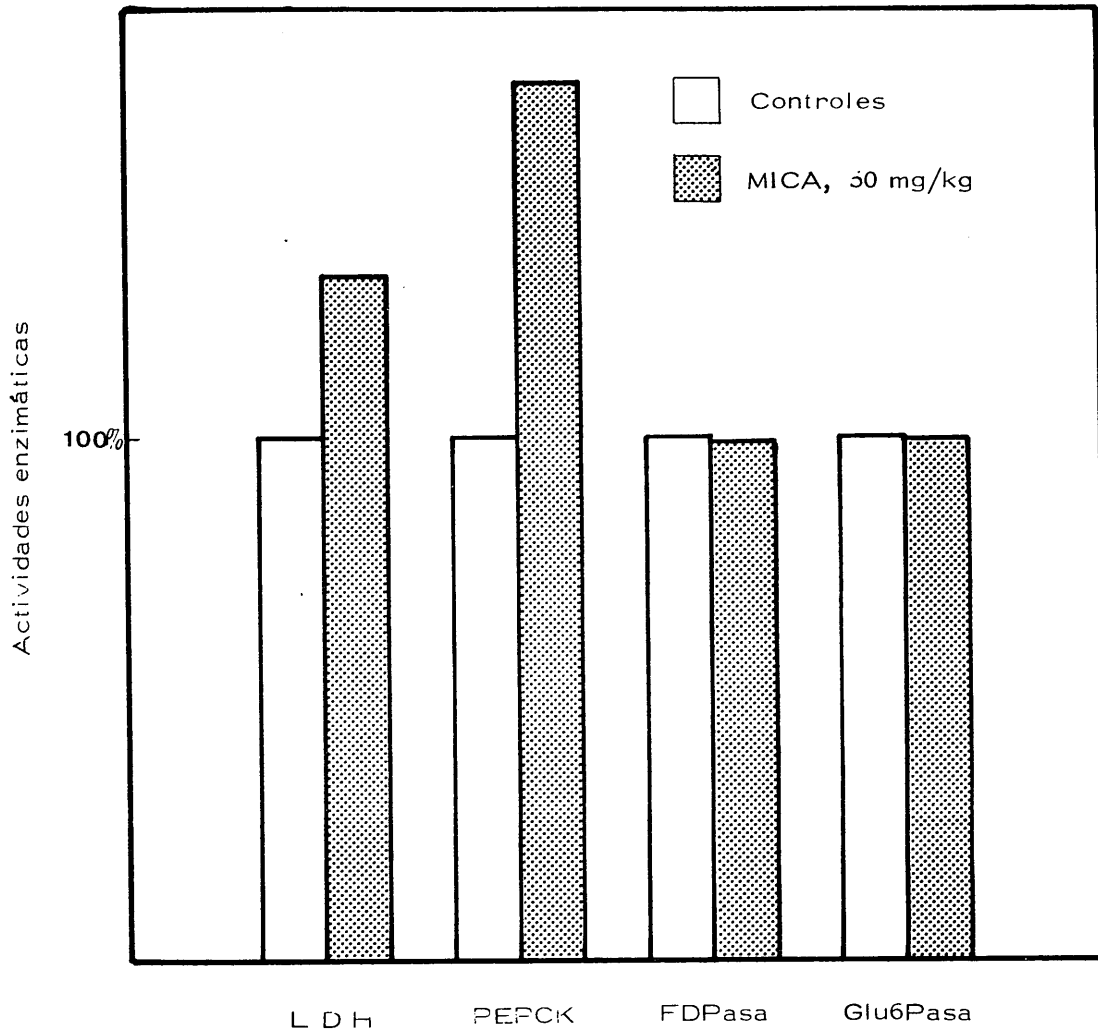
TABLA nº 10

Efecto de la intubación gástrica de MICA, 50 mg/kg de peso de rata, sobre las actividades de los enzimas, lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa, de corteza renal de ratas alimentadas.

A los animales controles se les administró por intubación gástrica, 10 ml de solución salina y a los animales problema 10 ml de solución de MICA 50 mg/kg de peso de rata; todos tres horas antes de la muerte. La actividad enzimática se expresa en  $\mu\text{moles}$  de sustrato transformado  $\times \text{minuto}^{-1} \times \text{gramo}^{-1}$  de tejido fresco. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

	CONTROLES		MICA 50 mg/kg		
	Nº exp.	Actividad enzimática	Nº exp.	Actividad enzimática	P
LDH	5	168.24 $\pm$ 31.12	7	222.13 $\pm$ 21.40	<0.9
PEPCK	6	2.63 $\pm$ 0.37	6	4.40 $\pm$ 0.65	<0.001
FDPasa	6	5.34 $\pm$ 0.21	7	5.42 $\pm$ 0.31	<0.9
Glu6Pasa	6	22.21 $\pm$ 1.95	7	22.13 $\pm$ 2.08	<0.9

GRAFICA nº 10



Efecto de la intubación gástrica de MICA sobre las actividades de los enzimas, lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa de corteza renal de ratas alimentadas. Las actividades enzimáticas se expresan como porcentajes de actividad respecto a los valores controles.

3.7.2. – Actividades enzimáticas de hígado de ratas alimentadas con  
inyección intraperitoneal de solución de MICA a dosis de  
50 y 200 mg por Kg de peso de rata.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla nº 11. Se puede observar como ninguna de las cuatro enzimas ensayadas muestran, en hígado, diferencias con respecto a los valores - controles.

3.7.3. – Actividades enzimáticas de hígado de ratas ayunadas con  
inyección intraperitoneal de solución de MICA a dosis de  
50 y 200 mg por Kg de peso de rata.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla nº 12. Al igual que en el caso de ratas alimentadas, las actividades hepáticas de las enzimas ensayadas tampoco presentan variaciones significativas respecto a los valores controles.

TABLA nº 11

Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre las actividades de los enzimas, lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicina, fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa de hígado de ratas alimentadas.

A los animales controles se les inyectó intraperitonealmente, 1 ml de solución salina, y a los animales problema 1 ml de solución de MICA(50 y 200 mg/kg de peso de rata); todos tres horas antes de la muerte. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado x minuto<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup> de proteína. El ± representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

	CONTROLES		MICA 50 mg/kg			MICA 200 mg/kg		
	Nº exp.	Actividad enzimática	Nº exp.	Actividad enzimática	P	Nº exp.	Actividad enzimática	P
LDH	7	4.272 ± 401	12	3.839 ± 273	<0.50	4	5.303 ± 624	<0.20
PEPCK	6	23 ± 2	7	25 ± 1	<0.50	7	22 ± 1	<0.50
FDPasa	10	104 ± 4	10	93 ± 5	<0.10	6	103 ± 4	<0.90
Glu6Pasa	7	64 ± 6	8	57 ± 4	<0.50	5	59 ± 11	<0.50

TABLA nº 12

Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre las actividades de los enzimas , lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa de hígado de ratas ayunadas 48 horas.

A los animales controles se les inyectó intraperitonealmente 1 ml de solución salina, y a los animales problema 1 ml de solución de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata); todos tres horas antes de la muerte. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado  $\times$  minuto<sup>-1</sup>  $\times$  mg<sup>-1</sup> de proteína. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

	CONTROLES		MICA 50 mg/kg			MICA 200 mg/kg		
	Nº exp.	Actividad enzimática	Nº exp.	Actividad enzimática	P	Nº exp.	Actividad enzimática	P
LDH	3	6.259 $\pm$ 944	5	6.500 $\pm$ 220	<0.90	5	5.975 $\pm$ 654	<0.90
PEPCK	8	33 $\pm$ 1	8	32 $\pm$ 4	<0.90	9	28 $\pm$ 3	<0.20
FDPasa	4	115 $\pm$ 16	3	141 $\pm$ 6	<0.20	4	111 $\pm$ 12	<0.90
Glu6Pasa	7	119 $\pm$ 13	6	129 $\pm$ 14	<0.50	8	103 $\pm$ 11	<0.50

3.7.4. - Actividades enzimáticas de corteza renal de ratas alimentadas con inyección intraperitoneal de solución de MICA a dosis de 50 y 200 mg por Kg de peso de rata.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla nº 13 y Gráfica nº 11. Se puede observar como la única variación, con un alto grado de significancia ( $P < 0.001$ ) la presenta la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa que alcanza un 82% del valor control con la dosis de 50 mg por Kg, y 91% con la dosis de 200 mg por Kg. de peso de rata.

3.7.5. - Actividades enzimáticas de corteza renal de ratas ayunadas 48 horas con inyección intraperitoneal de solución de MICA a dosis de 50 y 200 mg por Kg de peso de rata.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla nº 14 y Gráfica nº 12. Como se puede observar la actividad enzimática de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa presenta también una variación significativa frente al valor control, pero en este caso, tanto el aumento como el grado de significancia de esta variación ( $P < 0.02$ ) es menor que el encontrado en ratas alimentadas.



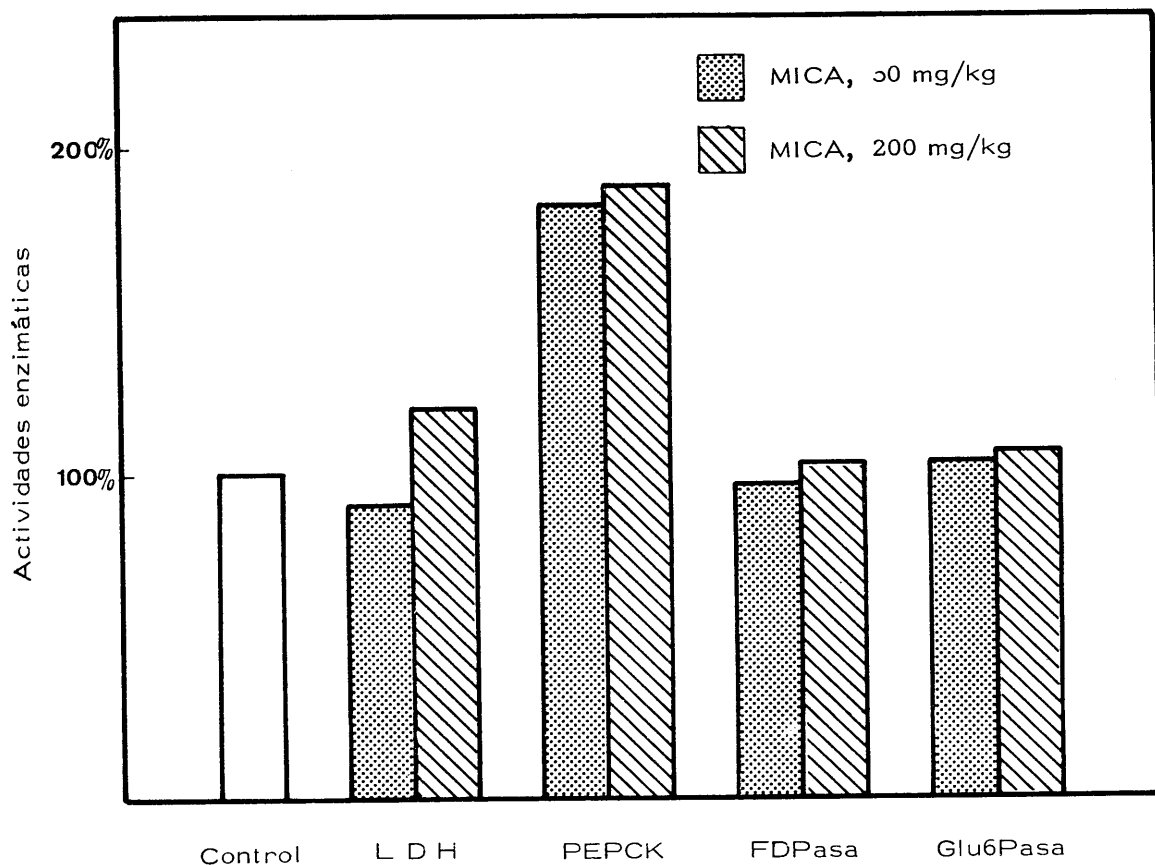
TABLA nº 13

Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre las actividades de los enzimas, lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa de corteza renal de ratas alimentadas.

A los animales controles se les inyectó intraperitonealmente 1 ml de solución salina, y a los animales problema 1 ml de solución de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata); todos tres horas antes de la muerte. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado x minuto<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup> de proteína. El ± representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

	CONTROLES		MICA 50 mg/kg			MICA 200 mg/kg		
	Nº exp.	Actividad enzimática	Nº exp.	Actividad enzimática	P	Nº exp.	Actividad enzimática	P
LDH	7	3.044 ± 332	10	2.750 ± 277	<0.90	6	3.647 ± 308	<0.30
PEPCK	9	34 ± 2	6	62 ± 3	<0.001	5	65 ± 2	<0.001
FDPasa	10	157 ± 7	11	150 ± 10	<0.90	6	162 ± 7	<0.90
Glu6Pasa	7	113 ± 7	7	116 ± 9	<0.90	6	120 ± 15	<0.50

GRAFICA nº 11



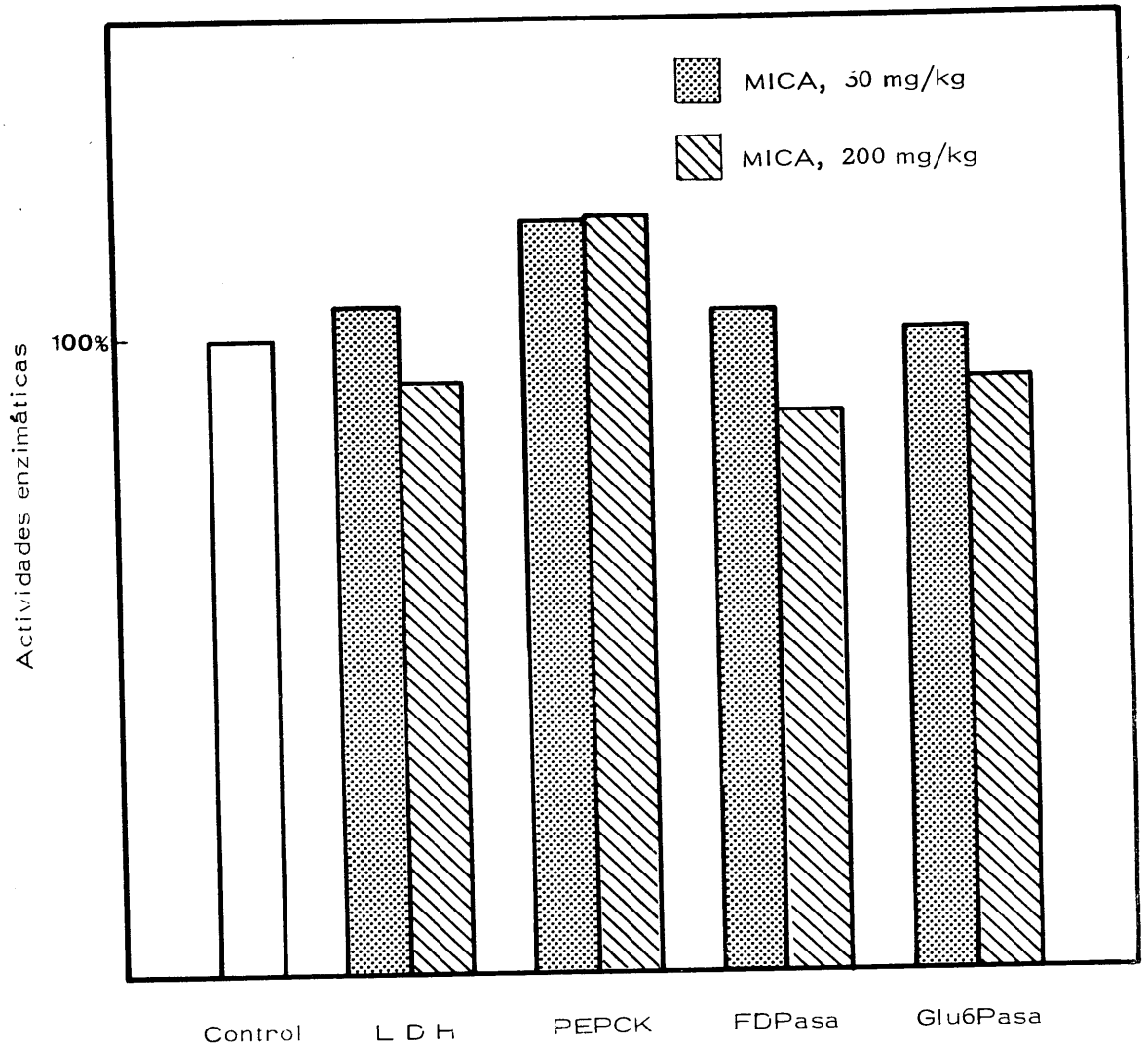
Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre las actividades de los enzimas, lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa de corteza renal de ratas alimentadas. Las actividades enzimáticas se expresan como porcentajes de actividad respecto a los valores controles.

TABLA nº 14

Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA(50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre las actividades de los enzimas, lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa de corteza renal de ratas ayunadas 48 horas.

A los animales controles se les inyectó intraperitonealmente 1 ml de solución salina, y a los animales problema 1 ml de solución de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata); todos tres horas antes de la muerte. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado x minuto<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup> de proteína. El ± representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

	CONTROLES		MICA 50 mg/kg			MICA 200 mg/kg		
	Nº exp.	Actividad enzimática	Nº exp.	Actividad enzimática	P	Nº exp.	Actividad enzimática	P
LDH	4	4.637 ± 1.089	3	4.870 ± 481	<0.90	8	4.305 ± 637	<0.90
PEPCK	7	79 ± 4	5	95 ± 3	<0.02	6	96 ± 3	<0.02
FDPasa	3	186 ± 19	3	194 ± 6	<0.90	5	163 ± 14	<0.50
Glu6Pasa	7	137 ± 26	5	140 ± 5	<0.90	5	127 ± 13	<0.50



Efecto de la inyección intraperitoneal de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre las actividades de los enzimas, lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa de corteza renal de ratas ayunadas 48 horas. Las actividades enzimáticas se expresan como porcentajes de actividad respecto a los valores controles.

### 3. 8. - EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE ACTINOMICINA D Y CICLOHEXIMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOENOL PIRUVATO CARBOXICINASA RENAL EN RATAS ALIMENTADAS TRATADAS CON MICA.

Uno de los procedimientos para establecer la naturaleza de la activación de una enzima es el empleo de antibióticos inhibidores de la síntesis proteíca tales como actinomicina D y cicloheximida.

La actinomicina D actúa inhibiendo la síntesis de RNA mensajero (191) mientras que la cicloheximida bloquea la síntesis de las cadenas peptídicas a nivel ribosómico (192). En ambos casos, se produce inhibición de la síntesis proteica. Si la administración de tales sustancias bloquea la activación enzimática provocada por un determinado agente causal se puede establecer que esa activación se debe a la síntesis "de novo" de la proteína enzimática. Si por el contrario no bloquea dicha activación se puede establecer que se debe a una activación propia de la proteína enzimática existente.

La dosis de actinomicina D empleada en estas experiencias (12.5 µg/100 g de peso corporal) es muy pequeña, para evitar la mortalidad de las ratas a dosis mayores. La eficacia de la dosis empleada se comprobó observando la inhibición producida en la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas por la administración de triamcinolona (111).

3.8.1. – Efecto de la Actinomicina D sobre la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal de ratas tratadas con MICA.

La solución de MICA a una dosis de 50 mg por Kg se inyectó intraperitonealmente, así como en actinomicina D en dosis de 12.5 µg por 100 g de peso de rata (contenido en 1 ml de solución salina fisiológica) treinta minutos antes del tratamiento con MICA (en forma habitual). Los controles recibieron sendas inyecciones de solución salina en cada caso. La triamcinolona se inyectó intramuscularmente en dosis de 2.5 mg por rata tres horas antes de la muerte del animal. El tratamiento completo fué el siguiente:

a) Ratas controles :

- Inyección de solución salina.
- Inyección de solución salina a los treinta minutos.

b) Ratas tratadas unicamente con triamcinolona:

- Inyección de solución salina.
- Inyección de triamcinolona a los treinta minutos.

c) Ratas tratadas unicamente con Actinomicina D:

- Inyección de Actinomicina D.
- Inyección de solución salina a los treinta minutos.

d) Ratas tratadas unicamente con MICA:

- Inyección de solución salina
- Inyección de MICA a los treinta minutos.

e) Ratas tratadas con triamcinolona y actinomicina D:

- Inyección de actinomicina D.
- Inyección de triamcinolona 30 minutos después.

f) Ratas tratadas con MICA y actinomicina D.

- Inyección de actinomicina D
- Inyección de MICA 30 minutos después.

En todos los casos los animales se sacrificaron tres horas después de la segunda inyección. Desde el inicio del tratamiento todos los animales ayunaron y tuvieron libre acceso al agua.

Los resultados se muestran en la Tabla nº 15 y Gráfica nº 13. Como puede observarse la administración de Actinomicina D impide la activación de la fosfoenolpiruvato carboxícinasa renal estimulada tanto por MICA como por triamcinolona.

TABLA nº 15

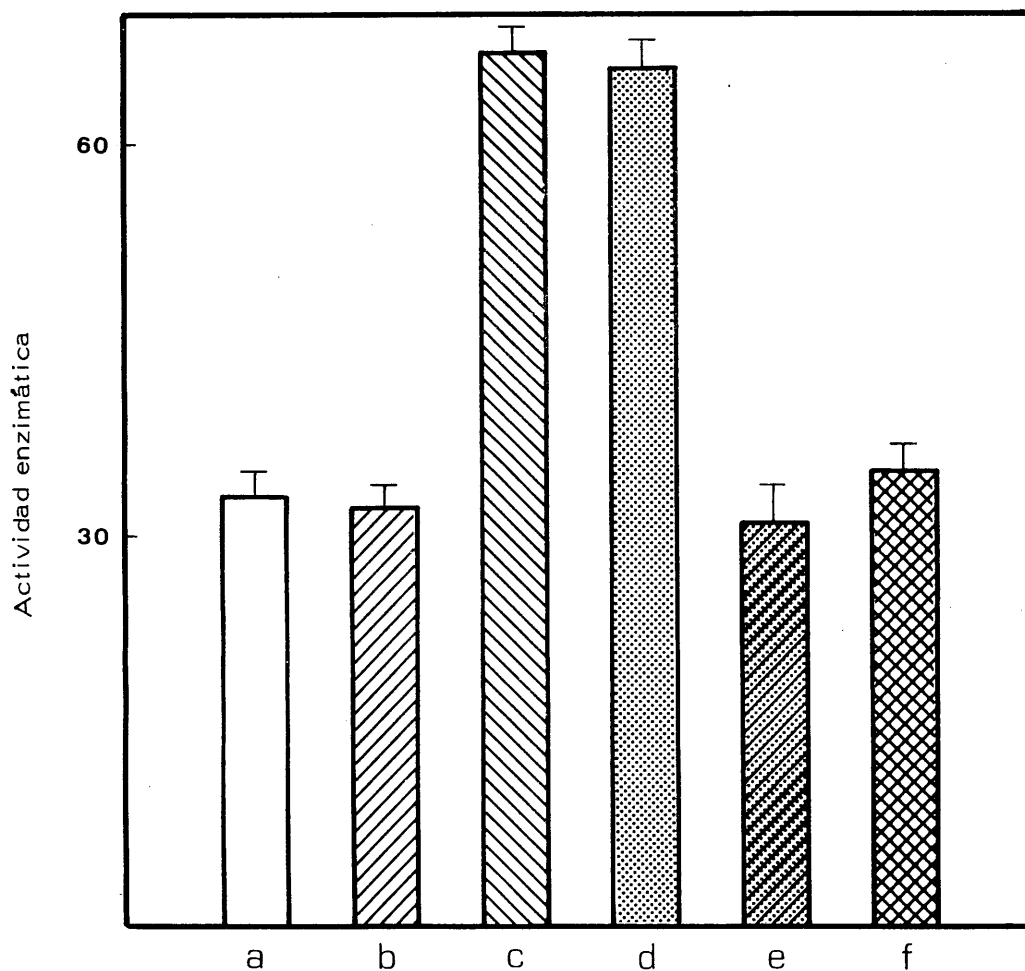
Efecto de la actinomicina D sobre la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de corteza renal de ratas alimentadas tratadas con MICA 50 mg/Kg de peso de rata. .

El tratamiento completo se describe en la Sección 3. 8. 1. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado x minuto<sup>-1</sup> y x mg<sup>-1</sup>. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

	Nº exp.	Actividad enzimática	P
Control	6	33 $\pm$ 2	
Actinomicina D	6	32 $\pm$ 2	<0.90
Triamcinolona	7	67 $\pm$ 3	<0.001
MICA 50 mg/kg	7	66 $\pm$ 2	<0.001
MICA+ Actinomicina D	6	31 $\pm$ 3	<0.90
Triamci. + Actino. D	7	35 $\pm$ 2	<0.50



GRAFICA nº 13



Efecto de la actinomicina D sobre la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinas renal de ratas alimentadas tratadas con MICA 50 mg/Kg de peso de rata. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado  $\times$  minuto<sup>-1</sup>  $\times$  mg<sup>-1</sup> de proteína; siendo (a): controles; (b): actinomicina D; (c): triamcinolona; (d): MICA 50 mg/Kg; (e): MICA 50 mg/Kg+ actinomicina D; (f): triamcinolona + actinomicina D. Las barras verticales representan el error estandar de la media.

### 3.8.2. - Efecto de la cicloheximida sobre la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal de ratas tratadas con MICA.

La cicloheximida se inyectó intraperitonealmente en dosis de 1 mg (en 1 ml de solución salina) cinco y dos horas y media antes de sacrificar a los animales. El MICA se inyectó junto a la triamcinolona tres horas antes del sacrificio de los animales. Los controles recibieron en cada caso las correspondientes inyecciones de solución salina. A los animales que no recibían se les inyectaba al mismo tiempo solución salina. Todos los animales se sacrificaban a las cinco horas de iniciado el tratamiento.

La Tabla nº 16 y Gráfica nº 14 describen los resultados obtenidos en estos tratamientos. Se observa claramente que la cicloheximida hace retornar a sus valores basales la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa estimulada por el tratamiento con MICA y triamcinolona, lo que indica que el aumento de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa por MICA se debe a la síntesis "de novo" de la proteína enzimática.

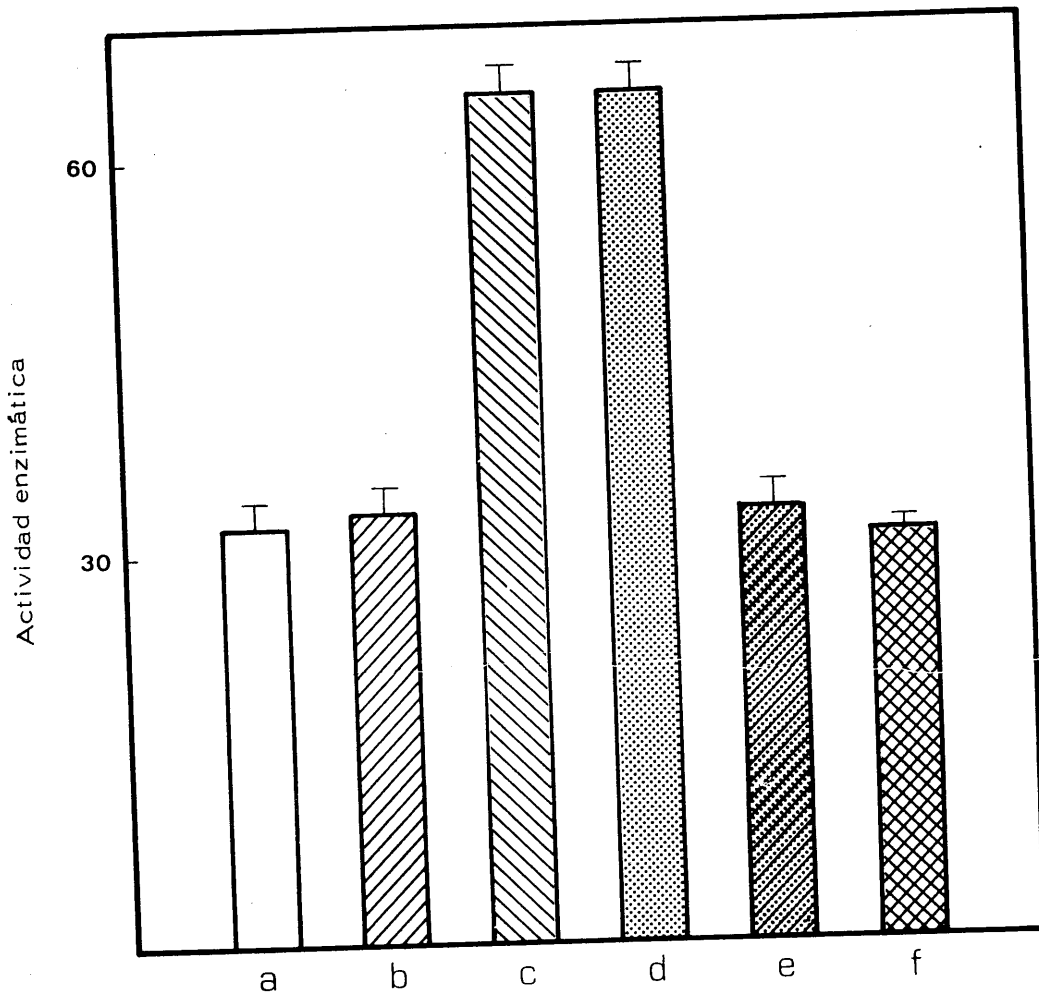
TABLA nº 16

Efecto de la cicloheximida sobre la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de corteza renal de ratas alimentadas tratadas con MICA 50 mg/Kg de peso de rata.

El tratamiento completo se describe en la Sección 3.8.2. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado x minuto<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup>. El ± representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

	Nº exp.	Actividad enzimática	P
Control	6	32 ± 2	
Cicloheximida	6	33 ± 2	<0.90
Triamcinolona	6	65 ± 2	<0.001
MICA 50 mg/kg	7	65 ± 2	<0.001
MICA + Ciclohexim.	7	33 ± 2	<0.90
Triam. + Ciclohexim.	7	31 ± 1	<0.90

GRAFICA nº 14



Efecto de la cicloheximida sobre la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal de ratas alimentadas tratadas con MICA 50 mg/Kg de peso de rata. La actividad enzimática se expresa en  $\text{nmoles de sustrato transformado} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína; siendo (a): controles; (b): cicloheximida; (c): triamcinolona; (d): MICA 50 mg/Kg; (e): MICA 50 mg/Kg+cicloheximida; (f): triamcinolona + cicloheximida. Las barras verticales representan el error estandar de la media.

### 3.9.- CONCENTRACION DE LOS INTERMEDIARIOS METABOLICOS DE LA GLUCONEOGENESIS HEPATICA Y RENAL DE RATAS TRATADAS CON MICA.

Estas experiencias se han realizado con el fin de tener un mayor conocimiento del funcionamiento "in vivo" de la gluconeogénesis en ratas tratadas con MICA, tanto en lo que se refiere al proceso hepático como al renal. Para la determinación de los metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis se ha recurrido a la técnica del congelado instantáneo del tejido con nitrógeno líquido con lo que se logra reducir al mínimo los cambios que se originan "post mortem" de las concentraciones de estos metabolitos.

#### 3.9.1.- Concentración hepática de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas alimentadas tratadas con MICA.

Las ratas problema eran inyectadas intraperitonealmente con solución de MICA en dosis de 50 y 200 mg/Kg de peso de rata, mientras que las controles lo eran con solución salina. La muerte del animal era exactamente a las 3 horas, no transcurriendo más de 10 segundos sin que el tejido fuera congelado.

En los resultados expuestos en la Tabla nº 17 y Gráficas números 15 y 19 puede apreciarse como el piruvato, fosfoenolpiruvato, 2 fosfoglicerato y 3 fosfoglicerato aumentan significativamente con ambas dosis de MICA, siendo el aumento más pronunciado con la dosis de 200 mg/Kg. de peso de rata. Por otra parte es interesante destacar los descensos del malato y de las hexosas monofosfato y el

aumento del lactato, sobre todo a dosis más alta. Conviene hacer mención del descenso en la razón lactato/piruvato en las ratas tratadas, siendo este descenso de un 57% para las tratadas con MICA a dosis de 50 mg/Kg de peso de rata y de 87% para las de 200 mg/Kg de peso de rata.

### 3.9.2. - Concentración hepática de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis de ratas ayunadas 48 horas tratadas con MICA.

En los resultados expresados en la Tabla nº 18 y Gráficas números 16 y 19 puede apreciarse, de igual manera que en el caso de ratas alimentadas, como el piruvato, fosfoenolpiruvato, 2 fosfoglicerato y 3 fosfoglicerato aumentan significativamente respecto a los controles, así como el lactato (de modo muy significativo con la dosis de 200 mg/Kg de peso de rata) y hay un descenso de las hexosas monofosfato y malato. La razón lactato/piruvato desciende significativamente.

### 3.9.3. - Concentración renal de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis de ratas alimentadas tratadas con MICA.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla nº 19 y Gráficas números 17 y 20. Como puede observarse en el caso de las ratas tratadas con MICA (50 mg/Kg de peso de rata), la mayoría de los metabolitos se encuentran disminuidos en su concentración respecto a los valores controles. La razón lactato/piruvato no solo no se encuentra disminuida sino que por el contrario aumenta en un 10%.

En el caso de dosis de MICA de 200 mg/Kg de peso de rata, se puede observar como el piruvato, fosfoenol piruvato, 2 fosfoglicerato y 3 fosfoglicerato aumentan ligeramente frente a los controles, mientras que la razón lactato/piruvato disminuye en un 20%.

3.9.4. - Concentración renal de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis de ratas ayunadas 48 horas tratadas con MICA.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla nº 20 y Gráficas números 18 y 20. Con dosis de 50 mg/Kg de peso de rata se puede observar que existen aumentos significativos en las concentraciones de lactato, fosfoenolpiruvato, 2 fosfoglicerato y 3 fosfoglicerato, mientras que descienden las concentraciones de triosas fosfato fructosa difosfato y hexosas monofosfato. Por otra parte el OAA baja en un 25% del valor control y la razón lactato/piruvato no se altera.

Con dosis de 200 mg/Kg de peso de rata se observan aumentos significativos en las concentraciones de lactato, piruvato fosfoenolpiruvato, 2 fosfoglicerato y 3 fosfoglicerato, descendiendo la razón lactato piruvato en un 40 %.

TABLA nº 17

Efecto de la administración de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre la concentración en hígado de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas alimentadas.

Intermediarios metabólicos en hígado, tres horas después del tratamiento, por inyección intraperitoneal, con MICA. Los valores se expresan en  $\mu\text{moles} \times \text{gramo}^{-1}$  de tejido fresco. El  $\pm$  representa el error estándar de la media. El número de observaciones se indica debajo de los valores. LAC, indica lactato; PIR, piruvato; MAL, malato; PEP, fosfoenolpiruvato; 2PGA, 2-fosfoglicerato; 3PGA, 3-fosfoglicerato; TRP, triosa fosfato; FDP, fructosa 1-6 difosfato; F6P, fructosa 6-fosfato; G6P, glucosa 6-fosfato.

	LAC	PIR	MAL	OAA	PEP	2PGA	3PGA	TRP	FDP	F6P	G6P
CONTROLES	1.470 $\pm$ 0.105 9	0.063 $\pm$ 0.012 6	0.606 $\pm$ 0.045 9	0.013 $\pm$ 0.002 3	0.121 $\pm$ 0.009 10	0.100 $\pm$ 0.009 9	0.438 $\pm$ 0.015 12	0.046 $\pm$ 0.006 6	0.021 $\pm$ 0.001 9	0.089 $\pm$ 0.010 11	0.558 $\pm$ 0.049 10
MICA 50 mg/kg	1.729 $\pm$ 0.127 7	0.179 $\pm$ 0.012 7	0.400 $\pm$ 0.036 7	0.015 $\pm$ 0.002 3	0.220 $\pm$ 0.034 6	0.156 $\pm$ 0.003 5	0.616 $\pm$ 0.028 5	0.052 $\pm$ 0.004 7	0.025 $\pm$ 0.002 7	0.080 $\pm$ 0.006 7	0.332 $\pm$ 0.025 7
Veces control	1.17	2.84	0.66	1.15	1.82	1.56	1.41	1.13	1.19	0.90	0.59
MICA 200mg/kg	2.155 $\pm$ 0.100 10	0.558 $\pm$ 0.100 10	0.179 $\pm$ 0.023 11	0.015 $\pm$ 0.001 6	0.535 $\pm$ 0.048 11	0.194 $\pm$ 0.011 11	1.446 $\pm$ 0.076 10	0.042 $\pm$ 0.003 11	0.019 $\pm$ 0.002 11	0.049 $\pm$ 0.003 6	0.208 $\pm$ 0.013 7
Veces control	1.47	8.86	0.30	1.15	4.42	1.94	3.30	0.91	0.90	0.55	0.37



TABLA nº 18

Efecto de la administración de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre la concentración en hígado de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas ayunadas 48 horas

Intermediarios metabólicos en hígado, tres horas después del tratamiento, por inyección intraperitoneal, con MICA. Los valores se expresan en  $\mu\text{moles} \times \text{gramo}^{-1}$  de tejido fresco. El  $\pm$  representa el error estándar de la media. El número de observaciones se indica debajo de los valores. 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.

	LAC	PIR	MAL	OAA	PEP	2PGA	3PGA	TRP	FDP	F6P	G6P
CONTROLES	0.756±0.089 6	0.044±0.003 5	0.366±0.048 6	0.017±0.005 6	0.109±0.011 6	0.106±0.006 6	0.259±0.017 6	0.029±0.005 6	0.022±0.004 6	0.047±0.007 6	0.145±0.021 6
MICA 50 mg/kg	0.868±0.150 5	0.165±0.034 5	0.222±0.019 5	0.013±0.001 5	0.161±0.025 5	0.161±0.018 5	0.521±0.099 5	0.035±0.001 4	0.012±0.001 4	0.030±0.003 5	0.076±0.008 5
Veces control	1.15	3.75	0.61	0.76	1.48	1.52	2.00	1.16	0.55	0.64	0.52
MICA 200mg/kg	4.045±0.458 6	0.675±0.026 6	0.176±0.013 5	0.016±0.001 5	0.778±0.034 6	0.284±0.005 6	2.015±0.082 6	0.037±0.001 4	0.016±0.001 4	0.025±0.001 6	0.059±0.006 6
Veces control	5.35	15.34	0.48	0.94	7.14	2.68	7.78	1.28	0.73	0.53	0.41

TABLA nº 19

Efecto de la administración de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre la concentración en riñón de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas alimentadas.

Intermediarios metabólicos en riñón, tres horas después del tratamiento, por inyección intraperitoneal, con MICA. Los valores se expresan en  $\mu\text{moles} \times \text{gramo}^{-1}$  de tejido fresco. El  $\pm$  representa el error estándar de la media. El número de observaciones se indica debajo de los valores. 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.

	LAC	PIR	MAL	OAA	PEP	2PGA	3PGA	TRP	FDP	F6P	G6P
CONTROLES	1.923±0.114 10	0.047±0.002 10	0.386±0.015 8	0.010±0.000 4	0.039±0.003 10	0.031±0.003 10	0.140±0.016 10	0.038±0.006 5	0.025±0.001 6	0.016±0.001 7	0.039±0.002 8
MICA 50 mg/kg	1.734±0.069 5	0.039±0.004 6	0.379±0.037 6	0.005±0.000 5	0.048±0.004 6	0.034±0.005 6	0.139±0.007 6	0.032±0.004 6	0.028±0.004 5	0.016±0.000 3	0.038±0.002 3
Veces control	0.90	0.83	0.98	0.50	1.23	1.09	0.99	0.84	1.12	1.00	0.97
MICA 200 mg/kg	2.009±0.225 8	0.063±0.009 5	0.336±0.028 9	0.005±0.000 4	0.053±0.006 9	0.035±0.005 11	0.183±0.022 10	0.038±0.002 5	0.026±0.002 6	0.015±0.001 4	0.030±0.005 7
Veces control	1.05	1.34	0.87	0.50	1.36	1.13	1.25	1.00	1.04	0.94	0.77

TABLA nº 20

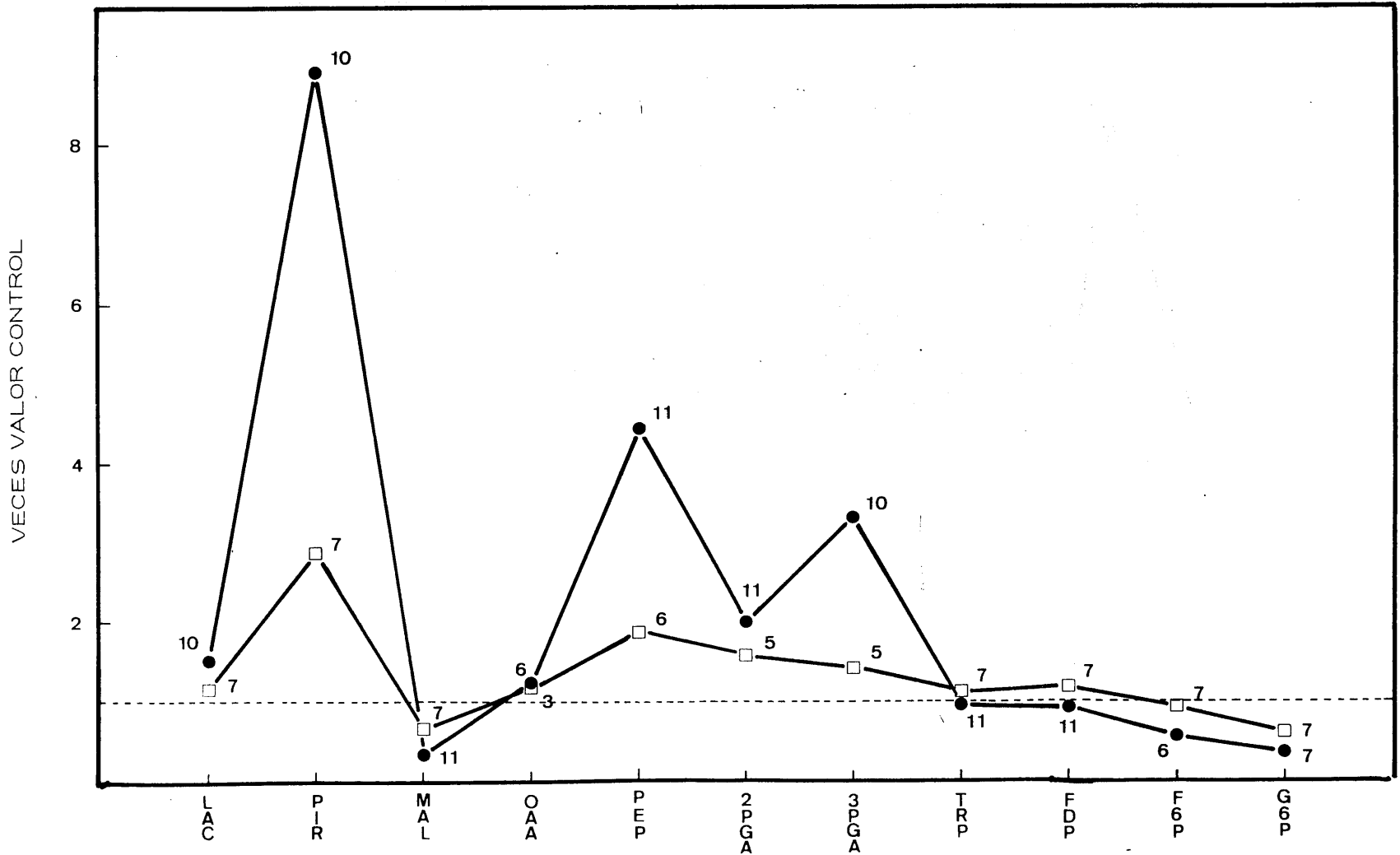
Efecto de la administración de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre la concentración en riñón de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas ayunadas 48 horas.

Intermediarios metabólicos en riñón, tres horas después del tratamiento, por inyección intraperitoneal, con MICA. Los valores se expresan en  $\mu\text{moles} \times \text{gramo}^{-1}$  de tejido fresco. El  $\pm$  representa el error estándar de la media. El número de observaciones se indica debajo de los valores. 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.

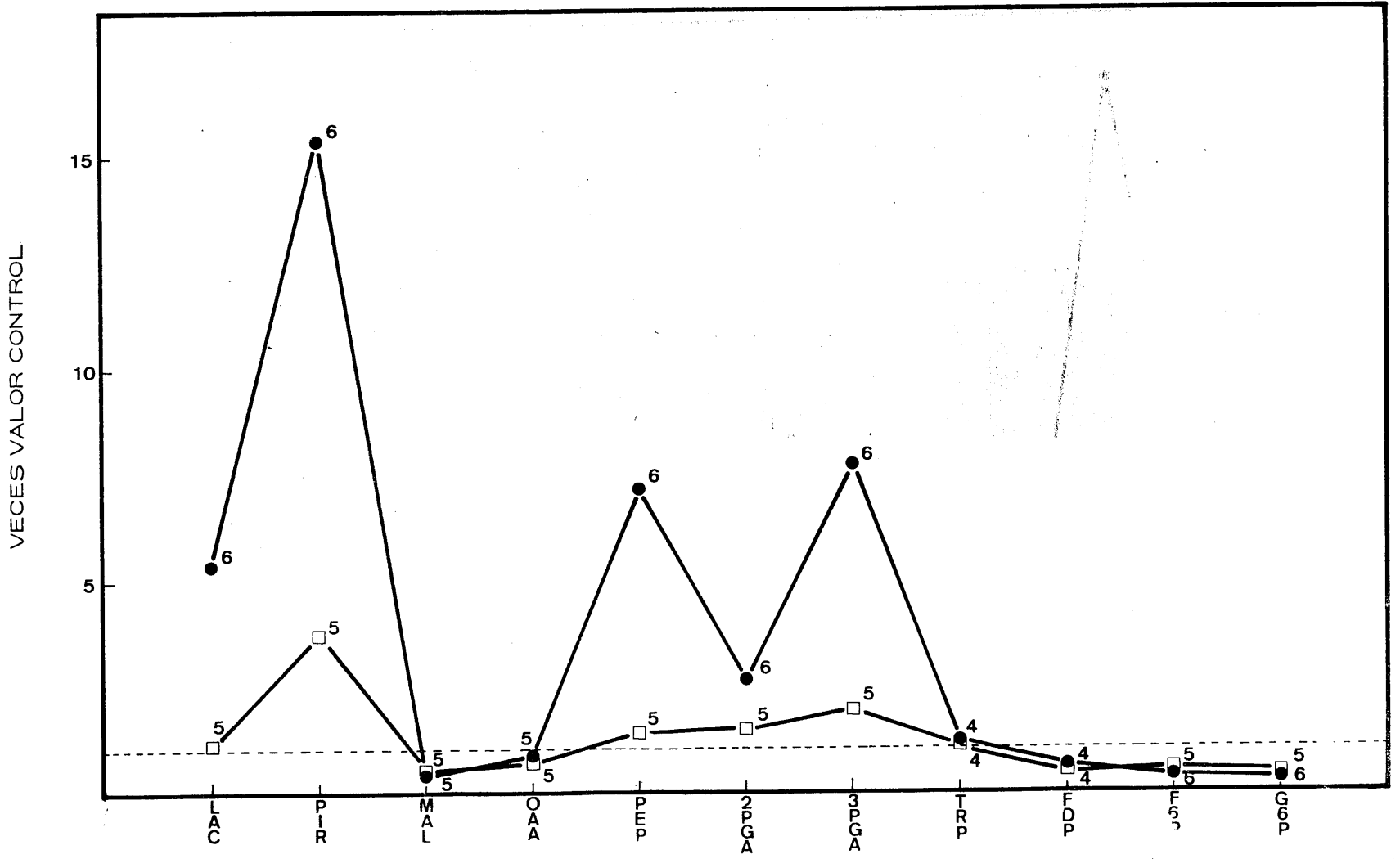
	LAC	PIR	MAL	OAA	PEP	2PGA	3PGA	TRP	FDP	F6P	G6P
CONTROLES	1.247 $\pm$ 0.094 6	0.055 $\pm$ 0.003 6	0.315 $\pm$ 0.021 6	0.016 $\pm$ 0.003 6	0.054 $\pm$ 0.009 6	0.044 $\pm$ 0.004 6	0.163 $\pm$ 0.011 6	0.041 $\pm$ 0.004 6	0.025 $\pm$ 0.001 6	0.031 $\pm$ 0.005 6	0.066 $\pm$ 0.004 6
MICA 50 mg/kg	1.544 $\pm$ 0.227 5	0.063 $\pm$ 0.002 5	0.282 $\pm$ 0.037 5	0.012 $\pm$ 0.003 5	0.127 $\pm$ 0.009 5	0.057 $\pm$ 0.004 5	0.300 $\pm$ 0.017 5	0.032 $\pm$ 0.002 4	0.022 $\pm$ 0.003 4	0.025 $\pm$ 0.002 5	0.064 $\pm$ 0.006 5
Veces control	1.24	1.14	0.90	0.75	2.35	1.30	1.84	0.78	0.88	0.81	0.97
MICA 200mg/kg	7.143 $\pm$ 0.539 4	0.601 $\pm$ 0.136 4	0.288 $\pm$ 0.016 5	0.013 $\pm$ 0.001 5	0.190 $\pm$ 0.028 5	0.077 $\pm$ 0.007 5	0.465 $\pm$ 0.060 5	0.032 $\pm$ 0.003 4	0.027 $\pm$ 0.003 4	0.018 $\pm$ 0.001 5	0.065 $\pm$ 0.006 5
Veces control	5.73	10.93	0.91	0.81	3.52	1.75	2.85	0.78	1.08	0.58	0.98

... de la administración de MICA (50 y 200 mg/día de base de fósforo) ...  
 ... en niños, tres horas después del nacimiento ...  
 ... el número de ...  
 ...

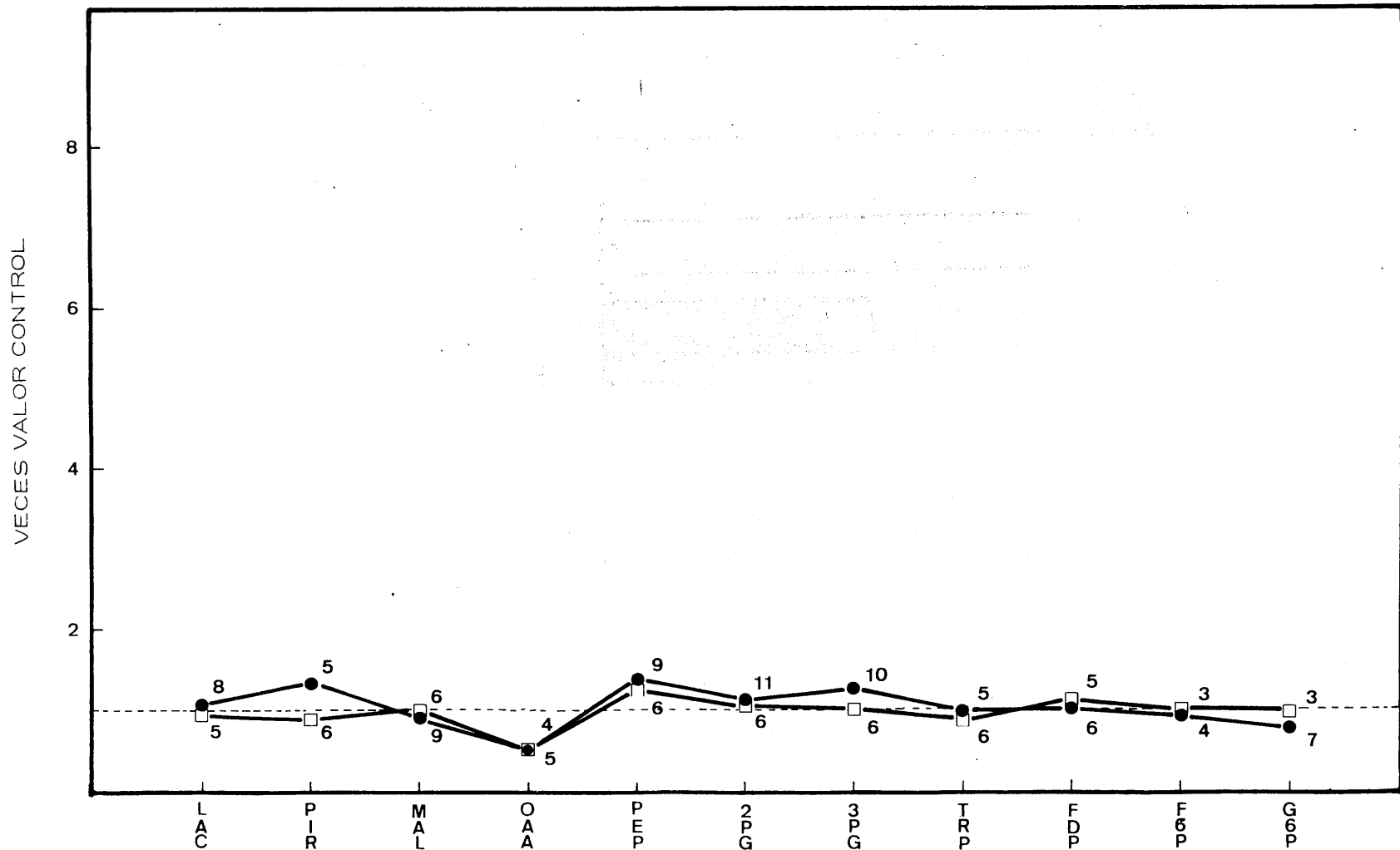
0.40	0.80	1.60	3.20	6.40
0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000
0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000
0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000
0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000
0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000



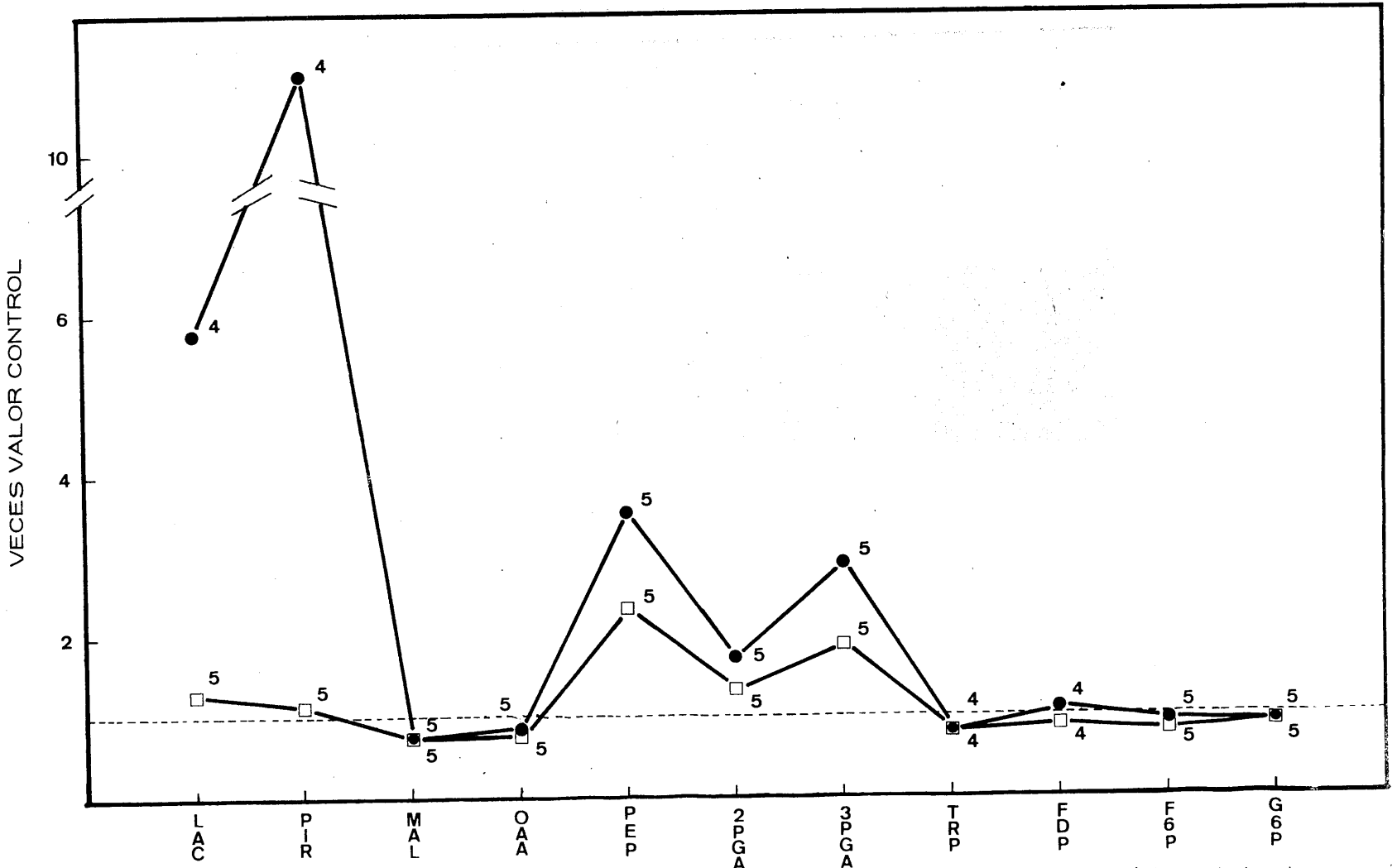
Efecto de la administración de MICA sobre las concentraciones de los intermediarios metabólicos de la gluconeogé-  
 sis en hígado de ratas alimentadas. Los datos se expresan como múltiplos de los valores controles, siendo (□): MI-  
 CA 50 mg/kg; (●): MICA 200 mg/kg. El número de observaciones se indica al lado de cada punto.



Efecto de la administración de MICA sobre las concentraciones de los intermediarios metabólicos de la gluconeogé-  
 nesis en hígado de ratas ayunadas 48h. Los datos se expresan como múltiplos de los valores de control, siendo (□) MICA 50 mg/kg (●) MICA 200 mg/kg. El número de observaciones se indica al lado de cada punto.



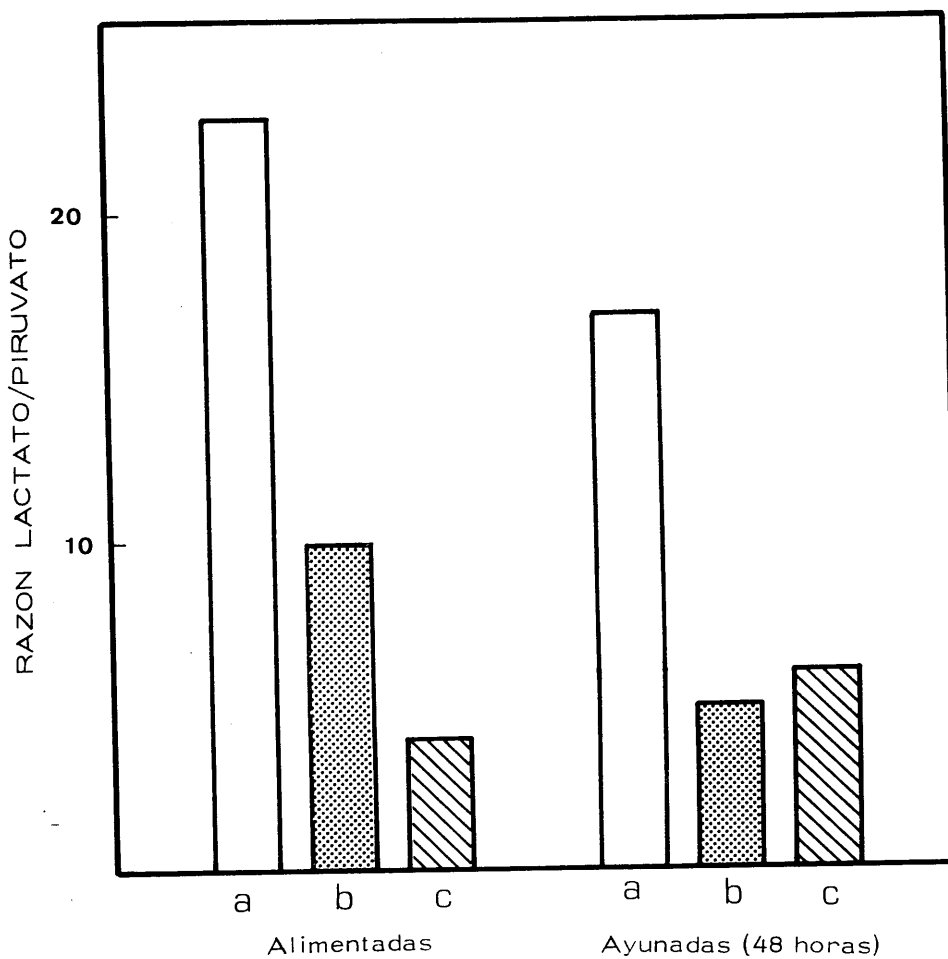
Efecto de la administración de MICA sobre las concentraciones de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en riñón de ratas alimentadas . Los datos se expresan como múltiplos de los valores controles, siendo (□): MICA 50 mg/kg; (●): MICA 200 mg/kg. El número de observaciones se indicará al lado de cada punto.



Efecto de la administración de MICA sobre las concentraciones de los intermediarios metabólicos de la gluconeogé-  
 sis en riñón de ratas ayunadas 48 horas. Los datos se expresan como múltiplos de los valores controles, siendo  
 MICA 50 mg/kg (□); MICA 200 mg/kg. (●). El número de observaciones se indica al lado de cada punto.

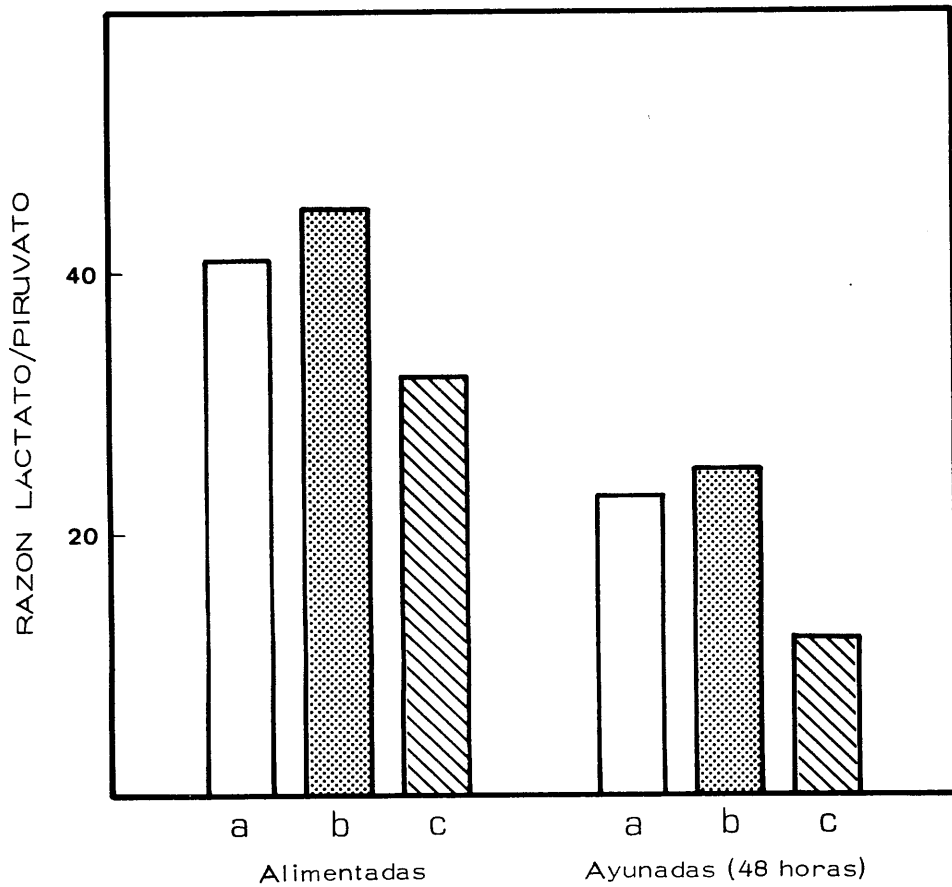


GRAFICA nº 19



Efecto de la administración de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre la razón Lactato/Piruvato en hígado de ratas alimentadas y ayunadas 48 horas. Siendo (a): Razón lactato/piruvato control; (b): MICA 50 mg/kg; (c): MICA 200 mg/kg.

GRAFICA nº 20



Efecto de la administración de MICA (50 mg y 200 mg/kg de peso de rata) sobre la razón Lactato/Piruvato en riñón de ratas alimentadas y ayunadas 48 horas. Siendo (a): Razón lactato/piruvato control; (b): MICA 50 mg/kg; (c): MICA 200 mg/kg.

### 3. 10.- EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE MICA SOBRE LOS NIVELES DE GLUCOSA Y LACTATO EN SANGRE Y GLUCOGENO HEPATICO.

Como en el caso anterior (Sección 9), estas experiencias se han realizado con el fin de obtener información acerca del efecto de la administración de MICA sobre el metabolismo glucídico "in vivo". Para ello se ha determinado en estos animales la glucemia, la reserva de glucógeno hepático y el contenido de lactato en sangre.

#### 3. 10. 1. - Efecto de la administración de MICA sobre los niveles de glucosa y lactato en sangre y glucógeno hepático en ratas alimentadas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla nº 21 y Gráfica nº 21. Se puede observar que el lactato no varía de una forma significativa respecto a los valores controles; la glucosa desciende significativamente en ambos casos. El glucógeno, confirmando lo reseñado en la bibliografía (143) desciende hasta desaparecer en el caso de la dosis de 200 mg/Kg de peso de rata.

#### 3. 10. 2. - Efecto de la administración de MICA sobre los niveles de glucosa y lactato en sangre y glucógeno hepático de ratas ayunadas 48 horas.

Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla nº 22 y Gráfica nº 21. Se observa un descenso en los niveles de lactato y glucosa en sangre, no existiendo prácticamente glucógeno en ningún caso, como corresponde a animales ayunados.

TABLA nº 21

Efecto de la administración de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre los niveles de glucosa y lactato en sangre y glucógeno hepático en ratas alimentadas.

A los animales controles y problemas se les aplicó el tratamiento correspondiente en la forma habitual. La concentración de glucosa y lactato viene expresada como  $\mu\text{moles}$  de glucosa y lactato  $\times \text{ml}^{-1}$  de sangre. El glucógeno hepático se expresa como equivalentes de glucosa  $\mu\text{moles} \times \text{gramo}^{-1}$  de hígado fresco. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

	CONTROLES		MICA 50 mg/kg			MICA 200 mg/kg		
	Nº exp.	Concentración	Nº exp.	Concentración	P	Nº exp.	Concentración	P
Lactato	5	1.975 ± 0.443	7	1.515 ± 0.184	<0.50	5	2.557 ± 0.190	<0.30
Glucosa	5	6.143 ± 0.140	10	4.602 ± 0.302	<0.001	5	1.888 ± 0.273	<0.001
Glucógeno	5	25.882 ± 0.541	8	3.730 ± 1.791	<0.001	4	0.010 ± 0.000	<0.001

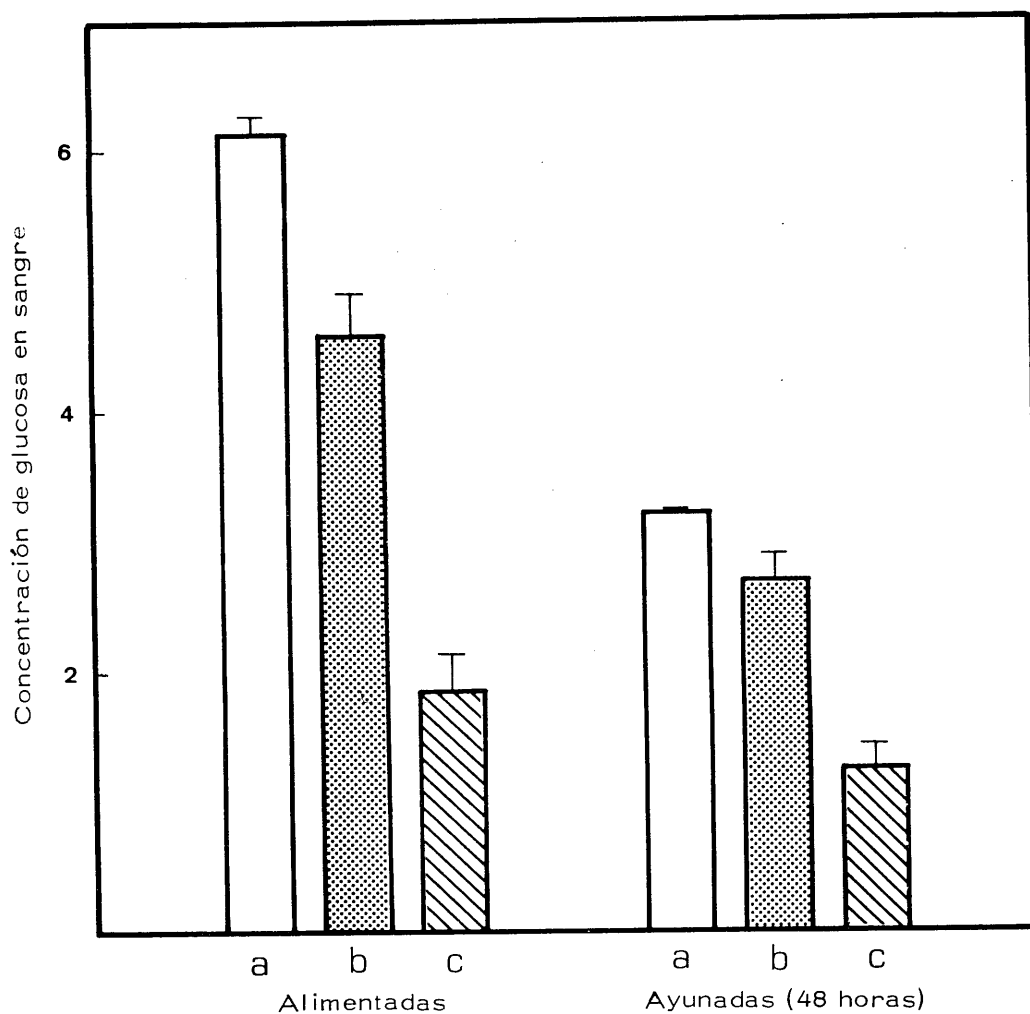
TABLA nº 22

Efecto de la administración de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre los niveles de glucosa y lactato en sangre y glucógeno hepático en ratas ayunadas 48 horas.

A los animales controles y problemas se les aplicó el tratamiento correspondiente en la forma habitual. La concentración de glucosa o lactato viene expresada como  $\mu\text{moles}$  de glucosa o lactato  $\times \text{ml}^{-1}$  de sangre. El glucógeno hepático se expresa como equivalentes de glucosa  $\mu\text{moles} \times \text{gramo}^{-1}$  de hígado fresco. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia.

	CONTROLES		MICA 50 mg/kg			MICA 200 mg/kg		
	Nº exp.	Concentración	Nº exp.	Concentración	P	Nº exp.	Concentración	P
Lactato	3	$2.191 \pm 0.065$	5	$1.474 \pm 0.186$	<0.02	4	$1.411 \pm 0.147$	<0.02
Glucosa	3	$3.221 \pm 0.001$	4	$2.701 \pm 0.185$	<0.05	4	$1.255 \pm 0.176$	<0.001
Glucógeno	5	$0.296 \pm 0.142$	4	$0.019 \pm 0.000$	<0.10	4	$0.015 \pm 0.000$	<0.10

GRAFICA nº 21



Efecto de la administración de MICA (50 y 200 mg/kg de peso de rata) sobre la glucemia en ratas alimentadas y ayunadas 48 horas. Los valores de glucosa en sangre se expresan en  $\mu\text{moles de glucosa} \times \text{ml}^{-1}$  de sangre, siendo (a): glucemia control; (b): MICA 50 mg/kg; (c): MICA 200 mg/kg de peso de rata. Las barras verticales representan el error estándar de la media.

### 3.11. - EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE MICA SOBRE LA GLUCEMIA A LO LARGO DEL TIEMPO, DESPUES DE LAS TRES HORAS DE SU ADMINISTRACION.

Los resultados expuestos en la Sección 6 indicaban una mayor capacidad gluconeogénica de la corteza renal tras el tratamiento con MICA muy especialmente en ratas alimentadas. Por otra parte, los niveles de glucemia en estos animales descienden considerablemente, incluso a la dosis de 50 mg de inhibidor / Kg de peso de rata. Parecía interesante por tanto determinar la glucemia en el periodo inmediatamente posterior al ya estudiado, con el fin de observar si existía una recuperación de los valores de glucosa, tal como parecía probable dada la mayor capacidad gluconeogénica renal.

Tras los primeros ensayos, y teniendo en cuenta la gran mortalidad producida después de las tres horas del tratamiento con MICA a dosis de 200 mg/Kg de peso de rata, se seleccionó la dosis de 50 mg/Kg de peso de rata.

Los resultados obtenidos en el transcurso de las tres a las seis horas después de la administración se expresan en la Tabla nº 23 y Gráfica nº 22, donde se puede observar como efectivamente a la quinta hora se restablece la glucemia a sus valores iniciales .

TABLA nº 23

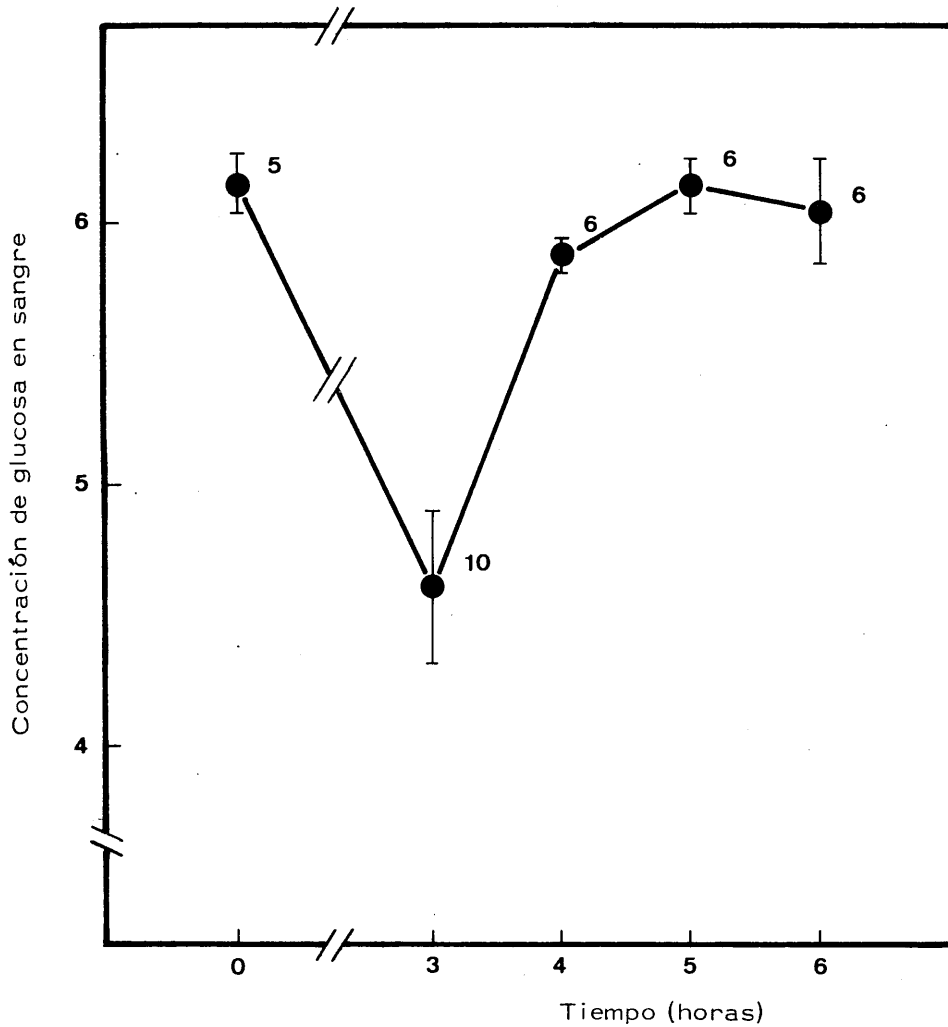
Efecto de la administración de MICA sobre la glucemia a lo largo del tiempo después de las tres horas de su administración.

Los animales correspondientes a 0 horas fueron inyectados con solución salina, los demás animales lo fueron con solución de MICA 50 mg/kg de peso de rata, midiéndose la glucemia a las 3, 4, 5 y 6 horas del tratamiento. Los valores de glucosa en sangre se expresan en  $\mu\text{moles de glucosa} \times \text{ml}^{-1}$  de sangre. El  $\pm$  representa el error estándar de la media. P indica el grado de significancia.

	Nº exp.	Glucosa en sangre	P
0 horas	5	6.143 $\pm$ 0.140	
3 horas	10	4.602 $\pm$ 0.302	<0.001
4 horas	6	5.880 $\pm$ 0.069	<0.02
5 horas	6	6.149 $\pm$ 0.089	<0.90
6 horas	6	6.051 $\pm$ 0.200	<0.90



GRAFICA nº 22



Efecto de la administración de MICA (50 mg/kg de peso de rata) sobre la glucemia a lo largo del tiempo despues de las tres horas de su administración. Los valores de glucosa en sangre se expresan en  $\mu\text{moles}$  de glucosa  $\times \text{ml}^{-1}$  de sangre. Las barras verticales representan el error estandar de la .media. El número de observaciones se indica al lado de cada punto.

### 3. 12.- CAPACIDAD GLUCONEOGENICA DEL HIGADO A LAS SEIS HORAS DE LA ADMINISTRACION DE MICA

Dada la interferencia que produce la reserva de glucógeno –aunque es pequeña en estas condiciones– en las ratas alimentadas para la medida de la capacidad gluconeogénica tras la administración de MICA (50 mg/Kg de peso de rata), se ha investigado la capacidad de formación de glucosa a partir de piruvato en hígado perfundido procedente de animales ayunados 48 horas y tratados con MICA a las 6 horas del tratamiento. Se pretendía comprobar si en estas condiciones existía o no una recuperación del funcionalismo hepático.

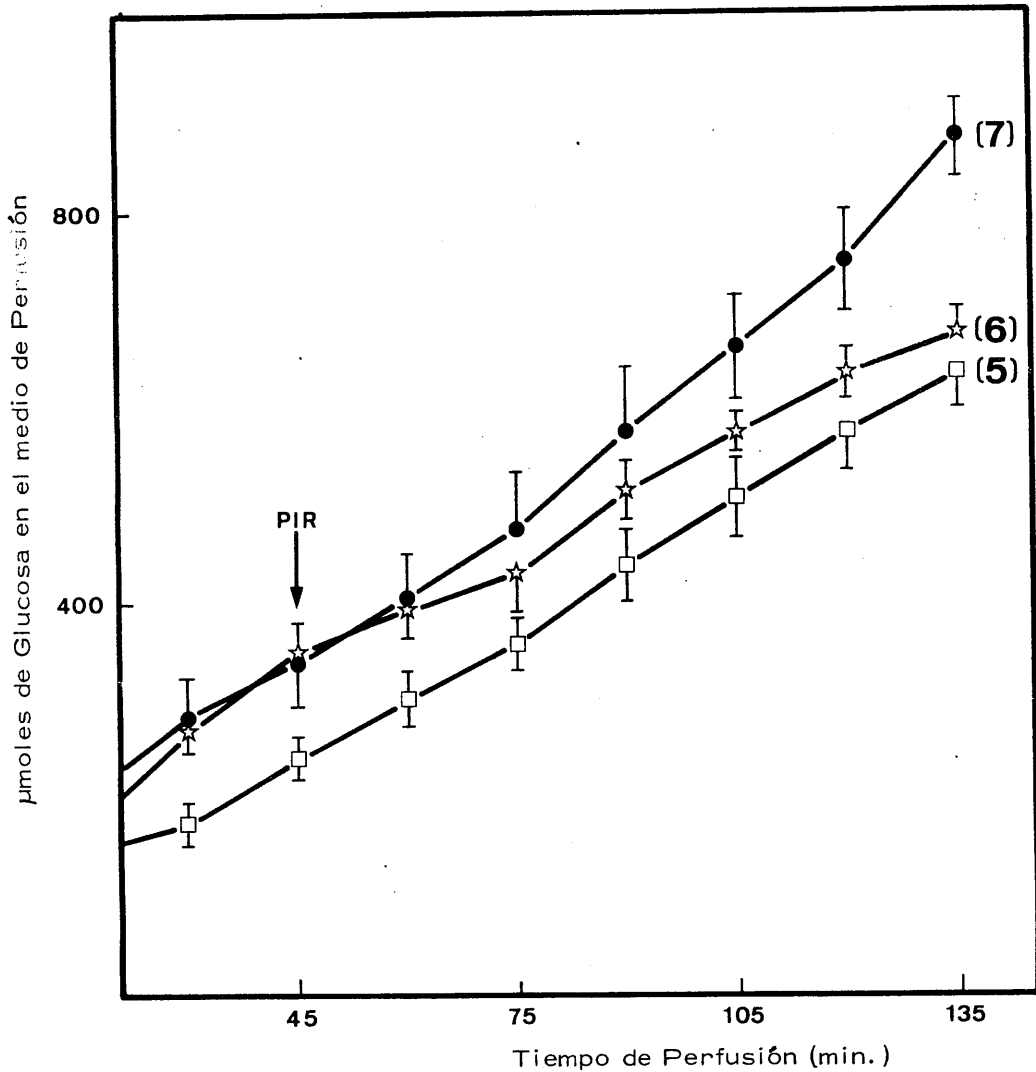
Los resultados se muestran en la Tabla nº 24 y Gráfica nº 23. Se puede observar como a las seis horas después del tratamiento con MICA la capacidad gluconeogénica hepática no es mayor que la exhibida a las tres horas.

TABLA nº 24

Efecto de la administración de MICA (50 mg/kg de peso de rata) sobre la capacidad gluconeogénica de hígado perfundido a las seis horas del tratamiento con el inhibidor a partir de piruvato a una concentración 10 mM.

Los valores de glucosa producida se expresan en  $\mu\text{moles de glucosa} \times \text{hora}^{-1}$  de perfusión  $\times \text{gramo}^{-1}$  de hígado seco. El  $\pm$  representa el error estandar de la media. P indica el grado de significancia. Los pesos medios de los hígados secos fueron 1.43 g para los controles, 1.70 g para MICA 50 mg/kg a las tres horas, 1.59 g para MICA 200 mg/kg a las seis horas.

	Nº exp.	Glucosa producida	% Inhibic.	P
0 horas	6	246.3 $\pm$ 13.8		
3 horas	5	155.4 $\pm$ 2.1	37	<0.001
6 horas	6	144.1 $\pm$ 8.2	41	<0.001



Efecto de la administración de MICA (50 mg/kg de peso de rata) sobre la capacidad gluconeogénica hepática a las seis horas del tratamiento con el inhibidor, a partir de piruvato a concentración 10 mM. (●): glucosa encontrada en el medio de perfusión control; (□): MICA 50 mg/kg a las tres horas; (☆): MICA 50 mg/kg a las seis horas. - Las barras verticales representan el error estándar de la media. - El número de experiencias se indican entre paréntesis. PIR indica piruvato. Los pesos medios de los hígados secos fueron 1.43 g para los controles (0 horas), 1.70 g para MICA 50 mg/kg a las tres horas, 1.59 g para MICA 50 mg/kg a las 6 horas.

The first part of the paper discusses the general approach to the study of the structure of the nucleus. It is shown that the structure of the nucleus is determined by the interaction of the nucleons, which are the building blocks of the nucleus. The interaction between nucleons is described by the strong force, which is the most powerful of the four fundamental forces of nature. The strong force is responsible for the binding of nucleons together in the nucleus, and it is the only force that can overcome the repulsive force between protons. The structure of the nucleus is therefore determined by the balance between the attractive strong force and the repulsive electrostatic force between protons.

The second part of the paper discusses the experimental methods used to study the structure of the nucleus. It is shown that the structure of the nucleus can be studied by measuring the mass, charge, and spin of the nucleus. The mass of the nucleus is determined by the number of protons and neutrons it contains, and the charge is determined by the number of protons. The spin of the nucleus is determined by the arrangement of the nucleons within the nucleus. The structure of the nucleus can also be studied by measuring the energy levels of the nucleus, which are determined by the interaction of the nucleons. The energy levels of the nucleus are shown to be discrete, and they are determined by the structure of the nucleus. The structure of the nucleus is therefore determined by the interaction of the nucleons, and the experimental methods used to study the structure of the nucleus are described in detail.

#### IV. - DISCUSSION

The structure of the nucleus is determined by the interaction of the nucleons, which are the building blocks of the nucleus. The interaction between nucleons is described by the strong force, which is the most powerful of the four fundamental forces of nature. The strong force is responsible for the binding of nucleons together in the nucleus, and it is the only force that can overcome the repulsive force between protons. The structure of the nucleus is therefore determined by the balance between the attractive strong force and the repulsive electrostatic force between protons.



Time Distance

Graph of Distance vs. Time

DISCUSSION

The graph shows two curves, A and B, representing distance versus time. Both curves start at the origin (0,0) and increase at an increasing rate, indicating constant acceleration. Curve A is steeper than curve B, which means that the object represented by curve A has a greater acceleration than the object represented by curve B. The area under each curve represents the displacement of the object over time.

## IV. - DISCUSION

### 4.1. - Inhibición selectiva de la gluconeogénesis hepática

Existe una amplia bibliografía sobre inhibidores de la gluconeogénesis (véase la sección 1.2. de la parte teórica). Los inhibidores seleccionados para ser utilizados en este trabajo pueden considerarse entre los más característicos del grupo, siendo por una parte suficientemente activos y actuando por otra parte cada uno de ellos por mecanismos diferentes.

El ácido quinolínico es un metabolito normal en el organismo, procedente del catabolismo del triptófano, y es en definitiva el responsable de la inhibición de la gluconeogénesis que provoca la administración en cantidad suficiente del aminoácido. La inhibición se produce a nivel de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa -enzima clave del proceso-, aparentemente por quelación del ión ferroso, que parece actuar como cofactor natural de la reacción enzimática. El ácido quinolínico, a la concentración -relativamente alta (2.4 mM)- a la que resulta eficaz como inhibidor de la gluconeogénesis hepática, produce también una fuerte inhibición de la gluconeogénesis renal. Este resultado, que coincide con experiencias en riñón de rata realizadas con posterioridad a los trabajos del grupo de Lardy sobre hígado (196), excluyen claramente su utilización como inhibidor selectivo de la gluconeogénesis hepática.

El ácido 4-pentenoico actúa como inhibidor de la gluconeogénesis por un mecanismo totalmente diferente al que acabamos de describir para el ácido quinolínico. Se trata en este caso de un mecanismo de competencia, ya que el ácido 4-pentenoico, que es una sustancia extraña al organismo, se metaboliza, sin embargo por la misma vía que los ácidos grasos habituales, utilizando para ello los coenzimas comunes (carnitina y coenzima A). La vía oxidativa del ácido 4-pentenoico se detiene, sin embargo, en la etapa de acil-CoA, provocando por tanto el

agotamiento de coenzima A, e impidiendo la oxidación de otros ácidos grasos. En definitiva, ello se traduce en la falta de poder reductor y de ATP necesarios para la síntesis de glucosa. Dada la importancia de la oxidación de los ácidos grasos como fuente de energía y de equivalentes de reducción para el proceso gluconeogénico no es de extrañar que el ácido 4-pentenoico afecte la síntesis de glucosa también a nivel renal. Este resultado coincide con el reseñado previamente por Senior y Sherratt en ratas ayunadas(197) y descartaba totalmente la utilización del ácido 4-pentenoico como inhibidor selectivo de la gluconeogénesis hepática.

El ácido 5-metoxi-2-indol carboxílico (MICA) produce solamente una ligera inhibición de la gluconeogénesis renal cuando se añade a la concentración de 0.2 y 0.8 mM. La razón del poco efecto de esta sustancia a nivel de la corteza renal parece residir -de acuerdo con los datos bibliográficos recogidos en la parte teórica- en su lenta incorporación a las mitocondrias de las células corticales del riñón, en contraste con la rápida penetración en las mitocondrias hepáticas.

En efecto, la inhibición de la gluconeogénesis por esta sustancia es secundaria a la inhibición del metabolismo mitocondrial del piruvato (oxidación y carboxilación). La carboxilación del piruvato es una etapa intermedia en la incorporación del esqueleto carbonado del lactato, alanina y piruvato en glucosa, mientras que su descarboxilación oxidativa representa una fuente importante de ATP y de equivalentes de reducción para dicho proceso. Por ello resulta evidente que la diferencia de captación de MICA por este orgánulo en ambos tejidos resulta fundamental en la explicación de su efecto sobre la gluconeogénesis. Existe por tanto una especificidad tisular para los efectos del MICA, que parecen residir en la mayor estabilidad estructural de la mitocondria renal (152). Esta especificidad ofrece la posibilidad de utilizar el MICA como inhibidor selectivo de la gluconeogénesis hepática para investigar la respuesta renal en estas condiciones.



Hay que señalar, no obstante, que esta selectividad no es completa, al menos en lo que se refiere a las experiencias realizadas "in vitro". Efectivamente, el MICA inhibe la gluconeogénesis a partir de lactato en hígado perfundido cuando se añade al medio de perfusión a las concentraciones ensayadas en riñón, pero la inhibición solo es prácticamente completa a la concentración de 0.8 mM, concentración que produce una inhibición no despreciable en la gluconeogénesis renal (25%) determinada a partir de lactato en cortes de corteza renal procedentes de ratas ayunadas 48 horas. Aunque no existen datos sobre los mecanismos de metabolización y eliminación de MICA, cabía pensar sin embargo que la administración de esta sustancia provocaría una concentración de la misma –sin las modificaciones químicas previsibles en su metabolismo– en hígado superior a la del riñón, lo que evitaría en parte el efecto directo del inhibidor sobre la gluconeogénesis renal. A este respecto sería ciertamente interesante conocer las concentraciones tisulares de MICA en hígado y riñón tras su administración a los animales de experimentación.

A diferencia del clarísimo efecto inhibitorio de la gluconeogénesis que se obtiene por adición de MICA al hígado perfundido, la administración de este compuesto a las ratas hace disminuir en mucha menor escala la producción de glucosa a partir de lactato, necesitando-se la inyección intraperitoneal de MICA a una fuerte dosis (200 mg/kg de peso del animal) para obtener una inhibición del 50%. No obstante, la inhibición es también muy importante (44%) a una dosis 4 veces menor. Esta claro por otra parte que la intubación intragástrica del inhibidor es poco efectiva –y sujeta a muchas irregularidades, por razones obvias– por lo que este tipo de administración fue abandonado en el transcurso del trabajo.

Contrariamente a lo que cabía esperar, dado el mecanismo de la acción inhibitoria del MICA sobre la gluconeogénesis, la producción de glucosa en hígado perfundido se afecta menos cuando se utiliza

piruvato que cuando se utiliza lactato como precursor gluconeogénico en ratas previamente inyectadas con MICA. Aunque ambos precursores se metabolizan por una vía común –el metabolismo del lactato en la gluconeogénesis pasa por piruvato– el paso de lactato a piruvato produce NADH, con lo que se obvia uno de los mecanismos de la inhibición. Una posible explicación de este hecho residiría en la baja producción de glucosa encontrada en los controles con piruvato, ya que la velocidad de producción de glucosa en el hígado de los animales tratados es claramente menor en presencia de piruvato que en presencia de lactato en valores absolutos. En cualquier caso estos resultados parecen señalar que la falta de poder reductor producida por la administración de MICA no es tan decisiva como el fallo de la carboxilación del piruvato a oxalacetato en la explicación de su mecanismo inhibitorio de la gluconeogénesis.

#### 4.2. – Inducción de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y de la capacidad gluconeogénica renal

Como se ha indicado en la Introducción a esta Memoria, el objeto de este trabajo era investigar la respuesta renal durante la inhibición de la gluconeogénesis hepática, en la hipótesis de que, de forma semejante a lo que ocurría en ratas con degeneración hepática experimental conseguida con galactosamina (188), la disminución funcional del hígado llevaría aparejada una inducción de la gluconeogénesis renal. La búsqueda de un inhibidor selectivo de la gluconeogénesis hepática, que acabamos de considerar, tenía a su vez por objetivo inhibir el proceso gluconeogénico del hígado alterando lo menos posible su complejo funcionamiento bioquímico y fisiológico, que sufría graves perturbaciones con el tratamiento de galactosamina.

Aunque acabamos de subrayar que el MICA no es un inhibidor totalmente selectivo de la gluconeogénesis hepática, según se deduce de los resultados obtenidos "in vitro", las experiencias realiza-

das en orden a determinar la capacidad gluconeogénica de la corteza renal tras su administración a los animales de experimentación hacían suponer la existencia de una selectividad completa "in vivo". En efecto, la administración de MICA a ratas, tanto alimentadas como ayunadas no solo no hace disminuir la capacidad gluconeogénica renal sino que se traduce en un aumento de la misma cuando se determina a partir de lactato, glutamina y piruvato. Este hallazgo contrasta fuertemente con lo que ocurre en el riñón tras la administración de ácido 4-pentenoico. En este caso, la capacidad gluconeogénica de la corteza renal es inhibida, aunque en menor escala que en hígado, hecho este último que es atribuido por los autores del trabajo a la menor concentración renal del inhibidor (197).

Es verdaderamente notable la constancia encontrada en los porcentajes de activación sobre todo para la dosis menor de MICA. Así, el incremento en la capacidad gluconeogénica en ratas alimentadas y tratadas con 50 mg/kg de peso de rata es del 139% para el lactato (intubación gástrica) y de 141, 139 y 139% respectivamente para lactato, piruvato y glutamina (inyección intraperitoneal). El incremento en la capacidad gluconeogénica para ratas ayunadas y tratadas con 50 mg/kg, de MICA oscila entre el 115 y 118%. Para la dosis de 200 mg/kg, del inhibidor, los valores son algo más variables, variando entre 152 y 172% en ratas alimentadas y entre 119 y 126% en ratas ayunadas.

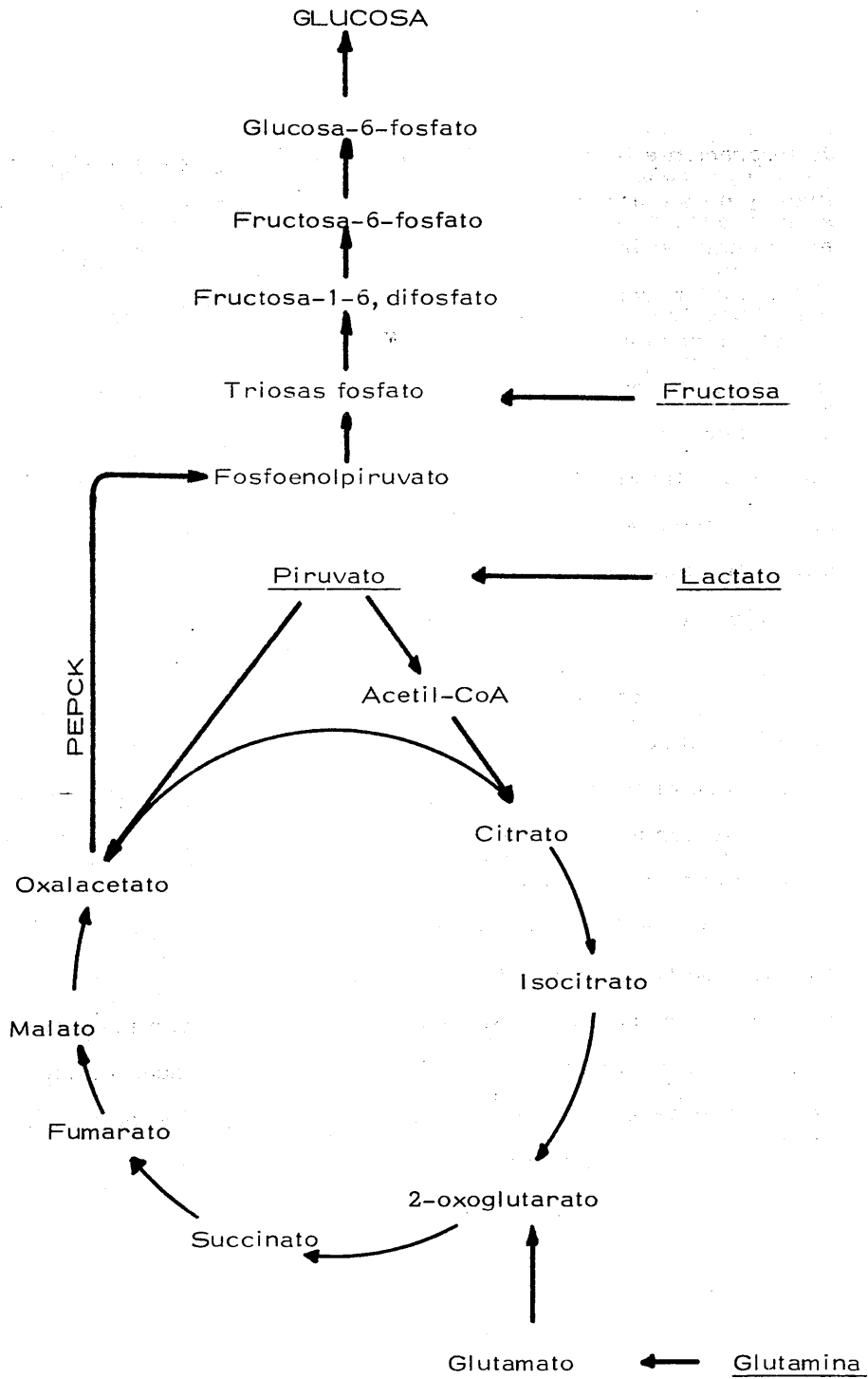
Resulta evidente que la activación del proceso gluconeogénico es mayor en los animales alimentados que en los ayunados. Sin embargo, tanto en un caso como en el otro, existe una notable constancia en la relación dosis-efecto, provocando siempre la dosis más elevada (que producía la inhibición más fuerte en la gluconeogénesis hepática) un incremento superior en la gluconeogénesis renal, lo que refuerza la hipótesis de la existencia de una relación entre ambos fenómenos.

La mayor activación de la gluconeogénesis renal cuando

do se determina a partir de lactato, piruvato y glutamina para las ratas alimentadas que para las ayunadas parece sugerir que el mecanismo del efecto producido por la administración de MICA es el mismo que el responsable -o, mejor dicho, que algunos de los responsables- del aumento en la capacidad gluconeogénica renal por el ayuno. De no ser así, cabría pensar que el porcentaje de aumento debido a la administración de MICA fuera el mismo (o más parecido) en ambas situaciones fisiológicas. En cambio, si el mecanismo es idéntico a algunos de los que operan en el ayuno es lógico pensar que la concurrencia de ambas situaciones (ayuno y tratamiento con MICA) no se traduzca en una suma aritmética de efectos. Como se discutirá más adelante, este mecanismo común podría estar ligado a la presencia de glucocorticoides en sangre.

A diferencia de lo que ocurre cuando se utilizan lactato, piruvato y glutamina como precursores, no hay diferencias significativas en la capacidad gluconeogénica renal por administración de MICA cuando se determina a partir de fructosa. Esta falta de activación sugiere un efecto a nivel de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa, ya que de los cuatro sustratos empleados, la fructosa es el único que no utiliza esta enzima en su camino de conversión en glucosa (véase el esquema de la página siguiente).

Efectivamente, el análisis de algunas de las actividades enzimáticas más importantes implicadas en la gluconeogénesis (lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxikinasa, fructosa difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa) revela un incremento en la actividad ensayable de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa renal, mientras que el resto de las actividades enzimáticas no presenta ninguna modificación. Es interesante resaltar que, al contrario de lo que ocurría en ratas con degeneración hepática experimental producida por administración de galactosamina (188), el incremento en la actividad ensayable de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa renal no se corresponde con una inhibición de dicha enzima en



el hígado.

La activación es mucho mayor en ratas alimentadas (182% del valor control) que en ayunadas (120% del valor control) para la dosis de 50 mg/kg. Al aumentar la dosis a 200 mg/kg, se incrementa solo muy ligeramente la activación en las ratas alimentadas (hasta 192% del control) y no se altera ya la activación correspondiente a las ratas ayunadas. Aunque el incremento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa es mayor que el de la capacidad gluconeogénica renal y se alcanza casi en su totalidad con una dosis de 50 mg/kg, de MICA, existe una notable relación de paralelismo entre ambos fenómenos sobre todo en lo que se refiere a las diferencias que aparecen entre ratas alimentadas y ayunadas. Por ello puede concluirse que el aumento en la capacidad gluconeogénica renal a partir de lactato, piruvato, y glutamina provocado por la administración de MICA se debe fundamentalmente al aumento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa en dicho tejido.

Por lo que se refiere a la naturaleza de la activación enzimática parece claro que se trata de un aumento en la cantidad de proteína ya que el incremento de la actividad ensayable que se produce en nuestras condiciones experimentales no tiene lugar cuando las ratas se tratan con actinomicina D o cicloheximida, antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas, actuando respectivamente a nivel de transcripción (191) y de traducción (192). Las experiencias llevadas a cabo paralelamente con triamcinolona (un esteroide sintético con actividad glucocorticoide) corroboran que las dosis de antibiótico suministradas eran capaces de inhibir la conocida inducción de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa por este tipo de sustancias.

Una vez más, estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente en el Departamento en ratas con degeneración hepática experimental conseguida con galactosamina, situación en la que el aumento de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal se debe también a la síntesis de nueva proteína enzimática (188).

#### 4.3. - Funcionamiento "in vivo" de la gluconeogénesis hepática y renal

La determinación de las concentraciones tisulares de los metabolitos intermediarios de una determinada vía metabólica es un método empleado muy frecuentemente en la investigación bioquímica, sobre todo para conocer el punto o etapa del proceso donde existe inhibición. El procedimiento se basa en que existen concentraciones estacionarias de los intermediarios durante el funcionamiento de la ruta metabólica, concentraciones que son características del estado fisiológico de que se trate. La interrupción, aunque parcial, de una de las etapas del proceso, lleva al acúmulo de los metabolitos anteriores a dicha etapa metabólica mientras que los metabolitos posteriores a la etapa interrumpida decrece en sus concentraciones hasta valores por debajo de la normalidad.

En el "perfil" de metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis obtenido en hígado de ratas alimentadas y tratadas con MICA, que se resume en la gráfica nº 15, pueden observarse muy claramente, sobre todo para la dosis de 200 mg/kg, los puntos de inhibición. Por una parte se observa un fuerte acúmulo de piruvato, frente a las bajas concentraciones de malato y oxalacetato. Por otra parte, también se acumulan fosfoenolpiruvato, 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato, mientras que existen bajas concentraciones de triosas fosfato y hexosas fosfato. El acúmulo de piruvato refleja el primer punto de inhibición por MICA (disminución del metabolismo mitocondrial de este cetoácido). El acúmulo de los otros metabolitos se debe a la disminución de la velocidad de la reacción catalizada por la fosfogliceraldehido deshidrogenasa, que origina triosas fosfato (a partir del ácido 1-3fosfoglicérico, cuya fuerte inestabilidad hace desaconsejable su medida) y hexosas fosfato. Este punto secundario de inhibición se debe concretamente a la falta de NADH requerido para la reducción del ácido 1-3 fosfoglicérico a fosfogliceraldehido. La carencia de NADH es a su vez consecuencia de la inhibición en el metabolismo oxidativo del piruvato a través del ciclo tricarboxílico.

Este perfil de metabolitos indica por tanto una falta de funcionamiento de la gluconeogénesis hepática "in vivo", patente ya a las dosis de 50 mg/kg pero especialmente manifiesta a las tres horas de la administración de 200 mg/kg, de inhibidor. Los resultados son coherentes con la inhibición encontrada en la capacidad gluconeogénica del hígado perfundido procedente de animales tratados con MICA.

De la contemplación de la gráfica nº 17, donde se sumarizan los perfiles de metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis obtenidos en riñón de ratas tratadas con MICA -cuya inhibición de la gluconeogenesis a nivel hepático acabamos de subrayar- se deduce facilmente que a nivel del riñón no hay inhibición de la gluconeogénesis a ninguna de las dosis ensayadas. (Conviene señalar que los datos de hígado y riñón se obtuvieron de los mismos animales). Aunque la concentración de piruvato es mayor que la normal -dosis de 200 mg/kg- y también lo son las concentraciones de fosfoenolpiruvato, 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato, los incrementos son muy pequeños y carecen por tanto de significado fisiológico. En último extremo se podría hablar únicamente de una ligerísima inhibición de la gluconeogénesis renal en estas condiciones, pero de muy poca importancia. La explicación puede residir en la falta de efecto del inhibidor sobre el riñón (demostrada previamente) y en la probable baja concentración del MICA en este órgano.

En cualquier caso, lo que tampoco puede deducirse de este perfil de metabolitos es que exista un mayor funcionamiento "in vivo" de la gluconeogénesis renal en estas condiciones, a pesar del aumento en la capacidad gluconeogénica del tejido. Ello podría quizás explicarse simplemente por el hecho de que la gluconeogénesis renal fuera innecesaria, bien porque la glucemia no hubiera descendido hasta límites anormales, bien porque la producción de glucosa por el hígado fuera todavía suficiente. Ambas alternativas podrían ser válidas para explicar los resultados obtenidos en las experiencias realizadas con dosis de 50 mg/kg,



en las cuales la glucemia se encuentra todavía dentro de los límites de la normalidad y el hígado conserva aún cierta cantidad -aunque ya escasa- de glucógeno. Sin embargo, por lo que se refiere a la dosis de 200 mg/kg, la situación es distinta. En efecto, los valores de glucemia encontrados a las tres horas de la administración son bajísimos y se observa una ausencia casi total de glucógeno hepático. Todo ello es preludio de una alta mortalidad de los animales. Es lógico pensar que en estas condiciones hubiera sido necesario un mayor funcionamiento de la gluconeogénesis renal, paralelo a la mayor capacidad encontrada.

¿Para que entonces la respuesta adaptativa de la corteza renal? ¿Que significado fisiológico puede tener esta adaptación enzimática si no se traduce en un aumento del funcionamiento "in vivo" cuando hace falta? Los resultados reseñados en las secciones 3.11. y 3.12. parecen esclarecer un poco esta paradoja.

Estas experiencias se realizaron con dosis de 50 mg/kg de MICA -menos drástica- y se midieron los valores de glucemia a partir de las tres horas de tratamiento. El hecho de que a las cinco horas se restablezcan casi completamente las concentraciones de glucosa en sangre parece sugerir un funcionamiento progresivo de la corteza renal, teniendo en cuenta la escasa cantidad de glucógeno que existe en el hígado a las tres horas y la clara inhibición de la gluconeogénesis hepática. Puede descartarse que el hígado se haya recuperado en su capacidad de sintetizar glucosa ya que, al menos en ratas ayunadas, la capacidad gluconeogénica del hígado a las seis horas del tratamiento con MICA es ligeramente menor que la exhibida a las tres horas.

Parece por tanto que en estas condiciones, el incremento en la capacidad gluconeogénica del riñón observado ya a las tres horas de tratamiento no empieza a ponerse de manifiesto "in vivo" hasta un poco después de este tiempo, coincidiendo muy probablemente con el agotamiento de las reservas hepáticas de glucógeno, lo que no carece de sentido fisiológico-

co dado el caracter de "emergencia" del proceso gluconeogénico. La determinación de la capacidad gluconeogénica renal, de los metabolitos intermedarios del proceso, del glucógeno hepático y de la glucemia a lo largo del tiempo tras la administración de MICA podrian ayudar muy probablemente a comprender este fenómeno.

El perfil de metabolitos en hígado de ratas ayunadas y tratadas con 200 mg/kg, de MICA coincide con el encontrado por Hanson y col (143) e indica aún mas claramente que<sup>50</sup> los animales alimentados la inhibición de la gluconeogénesis. Con la dosis de 50 mg/kg el perfil encontrado en ratas ayunadas es muy semejante al que se obtiene en ratas alimentadas. Es interesnate señalar que en las experiencias realizadas con la dosis superior, la cantidad de lactato es mas de cinco veces superior a la de los animales controles.

Al contrario de lo que ocurre en animales alimentados, la gluconeogénesis renal tambien se encuentra afectada sobre todoa altas dosis de MICA, y tambien en este caso las concentraciones de lactato son muy superiores (casi seis veces) a la de los animales controles. Se puede concluir por tanto que en los animales ayunados tratados con MICA existe inhibición "in vivo" de la gluconeogénesis tanto en hígado como en riñón, especialmente a dosis altas de MICA.

Conviene recordar que el incremento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas y la capacidad gluconeogénica renal en los animales ayunados era muy poco importante. Pero de todas formas nos encontramos de nuevo con la paradoja de un aumento en la capacidad gluconeogénica del riñón frente a un escaso funcionamiento (incluso menor que en los controles) del proceso "in vivo". Una explicación de esta disociación podrfa radicar en la existencia de una mayor concentración del inhibidor en la corteza renal en los animales ayunados y/o en una mayor sensibilidad de estos animales para la acción del MICA (como sucede "in vitro")

a concentraciones altas del inhibidor). La determinación de la concentración de MICA en la corteza renal y en los cortes de tejido después de la incubación podría ayudar a encontrar una explicación para este fenómeno.

No hay que olvidar por otra parte que mientras que la capacidad gluconeogénica renal se determina en la corteza, los metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis se determinan en riñón entero. Ello puede enmascarar en cierta medida los resultados puesto que, al contrario que la corteza, la médula es un tejido glucolítico.

#### 4. 4. - Consideraciones finales

Aunque quede por resolver definitivamente su operancia "in vivo", y, por tanto, su significado fisiológico, resulta muy clara, sin embargo, la existencia de una adaptación de la corteza renal al tratamiento con MICA, en el sentido de aumentar su capacidad gluconeogénica a partir de determinados precursores (los más importantes). También parece claro que esta adaptación se produce secundariamente a la inducción de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa.

Esta respuesta adaptativa es similar a la que se produce en ratas con degeneración hepática experimental producida con galactosamina (188), aunque de mayor intensidad. También existe una total identidad con los resultados obtenidos por Faus y colaboradores en nuestro Departamento trabajando en ratas con degeneración aguda experimental del hígado producida por tetracloro de carbono (198). Teniendo en cuenta que en todas estas situaciones existe una disminución de la capacidad gluconeogénica hepática pero producida en cada caso por un mecanismo diferente, cabe pensar que la adaptación renal dependa únicamente de la disfuncionalidad del hígado (en lo que a la gluconeogénesis se refiere) y no de la causa de dicha disfuncionalidad. Parece razonable postular que cuando la capacidad gluconeogénica del hígado disminuye -sea cual sea su

causa- aumente la capacidad gluconeogénica del riñón.

Por lo que se refiere al mecanismo de la adaptación -aspecto científicamente importante independiente incluso del todavía no bien conocido sentido fisiológico de esta adaptación- los resultados expuestos en esta Memoria no permiten llegar a una conclusión con base experimental suficiente aunque si proporcionan datos para llegar a una hipótesis razonable.

Existen dos situaciones o mecanismos fundamentales que provocan la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasasa -y por tanto de la gluconeogénesis a nivel renal-. Una de ellas es la acidosis metabólica; la otra está ligada a la presencia en sangre de factores hormonales, principalmente de naturaleza glucocorticoide.

Durante la acidosis metabólica el riñón contribuye a la normalización del pH sanguíneo formando amonio. La fuente de amonio es la glutamina, que es convertida en glutamato y luego en 2-oxoglutarato por desamidación y desaminación sucesivas. El esqueleto del 2-oxoglutarato es finalmente convertido en glucosa gracias a la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasasa (véase esquema de la pag. 175) (112, 113, 199-202). Sin embargo este mecanismo puede excluirse en nuestras condiciones experimentales por dos razones:

a). - No parece existir acidosis metabólica durante el tratamiento con MICA. Los niveles de lactato en sangre, aunque superiores a los normales, son poco elevados para ello. Por otra parte se sabe que en estas condiciones la concentración de cuerpos cetónicos en sangre descienden por debajo de la normalidad (143).

b). - El incremento en la actividad ensayable de la fosfoenolpiruvato carboxicinasasa producido por la acidosis metabólica no se debe a fenómenos de inducción (síntesis de nueva proteína) sino a un cambio de la proteína ya existente que disminuye su sensibilidad a la degradación (111, 203, 204).

La acidosis metabólica es el factor principal responsable del incremento en la capacidad gluconeogénica renal por el ejercicio (118, 119) e interviene también de forma importante cuando el aumento se produce en la diabetes o el ayuno (114). En esta última situación intervienen también en el aumento de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa factores hormonales, especialmente la acción de los glucocorticoides (1).

Excluida la acidosis metabólica como mecanismo de activación de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa que tiene lugar en la corteza renal por la administración de MICA y teniendo en cuenta la falta de acción a nivel renal de las demás hormonas hipergluce-miantes (adrenalina, glucagon) no parece demasiado aventurado suponer que sean los glucocorticoides los responsables de esta adaptación. Conviene subrayar a este respecto que el tipo de acción que ejercen estas hormonas sobre la enzima es similar al encontrado en nuestras condiciones experimentales, de acuerdo con los resultados descritos en la sección 3.8.

...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...

...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...

...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...

...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...

...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...

...the ... of ...  
...the ... of ...  
...the ... of ...



W. J. D. D. D. D. D.



## V. -CONCLUSIONES

1ª. - Se ha ensayado el efecto "in vitro" de tres inhibidores de la gluconeogénesis hepática sobre la gluconeogénesis renal determinada a partir de lactato, siendo el ácido 5-metoxi-2-indol carboxílico (MICA) el que afecta en menor escala a este proceso en el riñon, tanto en ratas alimentadas como en ratas ayunadas 48 horas.

2ª. - El MICA inhibe la gluconeogénesis determinada a partir de lactato en hígado perfundido procedente de ratas ayunadas 48 horas de forma practicamente total cuando se añade al medio de perfusión a la concentración de 0.8 mM. A esta concentración, la inhibición "in vitro" sobre la gluconeogénesis renal determinada a partir de lactato en ratas en idénticas condiciones de ayuno es solamente del 25%. Puede considerarse por tanto que existe una considerable selectividad en la inhibición de la gluconeogénesis hepática por esta sustancia.

3ª. - La administración de MICA a ratas ayunadas 48 horas produce una disminución de la capacidad gluconeogénica hepática determinada a partir de lactato y piruvato, consiguiendose el mayor efecto inhibitor (50%) sobre la gluconeogénesis determinada a partir de lactato por inyección intraperitoneal de MICA a la dosis de 200 mg/kg de peso del animal.

4ª. - La administración de MICA produce un aumento en la capacidad gluconeogénica renal determinada a partir de lactato, piruvato y glutamina pero no a partir de fructosa. Los aumentos son muy parecidos a partir de los tres precursores gluconeogénicos señalados, siendo en todos los casos mayor el efecto en ratas alimentadas y con dosis de 200mg/kg de peso del animal.

5ª.- Se ha determinado la actividad de la lactato des-  
hidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxicinas, fructosa difosfatasa y gluco-  
sa 6-fosfatasa en hígado y riñón de ratas ayunadas y alimentadas tratadas  
con MICA a dosis de 50 y 200 mg/kg. La única variación que se registra es  
un aumento en la actividad ensayable de la fosfoenolpiruvato carboxicinas  
renal. Dicho aumento aparece en todas las condiciones ensayadas, siendo  
máximo (191%) por inyección intraperitoneal de MICA a dosis de 200 mg/kg  
en ratas alimentadas. El incremento que en ratas ayunadas es igual para  
ambas dosis y considerablemente menor que en las ratas alimentadas.

6ª.- El incremento de la actividad ensayable de la fos-  
foenolpiruvato carboxicinas se debe a la síntesis de nueva proteína enzi-  
mática puesto que dicho aumento se impide completamente por la administra-  
ción de actinomicina D o cicloheximida, antibióticos inhibidores de la sínte-  
sis proteica.

7ª.- La administración intraperitoneal de MICA a dosis  
de 200 mg/kg a ratas alimentadas produce una fuerte inhibición de la gluco-  
neogénesis hepática "in vivo", como se deduce de las concentraciones en  
hígado de los metabolitos intermediarios del proceso. La administración de  
MICA a dosis de 50 mg/kg produce un efecto semejante pero de mucha menor  
intensidad.

8ª.- La determinación en riñón de las concentraciones  
de dichos metabolitos intermediarios en estas condiciones indica que la glu-  
coneogénesis renal no se afecta prácticamente por la administración de MI-  
CA, observándose solo una inhibición comparativamente muy ligera del pro-  
ceso a dosis de 200 mg/kg. Se puede deducir por tanto que el MICA se com-  
porta "in vivo" como inhibidor suficientemente diferencial de la gluconeogé-  
nesis hepática en animales alimentados.

9ª. - La administración de 200 mg/kg, de MICA a animales ayunados produce en el hígado una disminución de la gluconeogénesis mayor aún que la correspondiente a esta dosis en animales alimentados, tal como se desprende de la determinación de los intermediarios metabólicos del proceso. La administración de MICA en dosis de 50 mg/kg produce una inhibición muy semejante a la que ocurre en animales alimentados.

10ª. - La determinación de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en animales ayunados indica la existencia de una inhibición de la gluconeogénesis renal tras el tratamiento con MICA especialmente a la dosis de 200 mg/kg de peso del animal.

11ª. - La administración de MICA a animales alimentados provoca un rápido descenso en las concentraciones hepáticas de glucógeno, que se agota prácticamente a las tres horas del tratamiento con una dosis de 200 mg/kg de peso del animal, del inhibidor.

12ª. - La administración de MICA provoca solamente alteraciones poco significativas en los niveles de lactato en sangre.

13ª. - La glucemia desciende significativamente a las tres horas del tratamiento con 50 mg/kg, del inhibidor siendo extraordinariamente importante el descenso producido por dosis de 200 mg/kg, de MICA. Ello ocurre tanto en animales alimentados como en ayunados 48 horas.

14ª. - A partir de las tres horas del tratamiento con 50 mg/kg, de MICA a animales alimentados, la glucemia vuelve a aumentar, alcanzándose concentraciones muy cercanas a las iniciales a las cinco horas del tratamiento. A las seis horas la capacidad gluconeogénica hepática, determinada en ratas ayunadas, no está aumentada con relación a los valores

encontrados a las tres horas, por lo que, dada la ausencia de glucógeno hepático, la normalización de la glucemia podría explicarse por un funcionamiento acentuado de la gluconeogénesis renal.

---

Conclusión final. - La administración de MICA a ratas alimentadas inhibe de forma casi totalmente selectiva la gluconeogénesis hepática. En estas condiciones se induce la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de la corteza renal con el consiguiente aumento en la capacidad gluconeogénica de este tejido. Aunque el significado fisiológico de esta adaptación enzimática del riñón no está todavía claramente establecido, los resultados descritos en esta Memoria Doctoral sugieren la posibilidad de que se trate de un mecanismo para colaborar a la normalización de la glucemia cuando la aportación hepática esté muy disminuida, y aconsejan ulteriores investigaciones en este sentido.

---

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...
11. ...
12. ...
13. ...
14. ...
15. ...

**VI.- BIBLIOGRAFIA**

The following information was obtained from the records of the  
Department of the Interior, Bureau of Land Management, and the  
Bureau of Reclamation, regarding the land owned by the  
United States in the State of California. The land is located  
in the County of [County Name], and is situated in the  
Township of [Township Name], Range [Range Number], and  
Section [Section Number]. The land is described as follows:  
[Detailed description of the land, including acreage, location,  
and any other relevant information.]

APPENDIX IV

## VI. - BIBLIOGRAFIA

1. - SCRUTTON, M. C. y UTTER, M. F., en "Annual Review of Biochemistry. 37, 249 (1968)
2. - EXTON, J.H., Metabolism, 21, 945, (1972)
3. - SANCHEZ-URRUTIA, L. "Algunos aspectos de la regulación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de hígado y riñón de rata". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Granada, 1972.
4. - GARCIA RUIZ, J. P., "Gluconeogénesis hepática y renal en el ejercicio". Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Granada, 1974.
5. - VENEZIALE, C.M., GABRIELLI, F. y LARDY, H. A., Biochemistry 9, 3960, (1970)
6. - VENEZIALE, C.M., Biochemistry 10, 2793 (1971)
7. - WAGLE, R. S., Biochem. Biophys. Acta, 97, 142 (1965)
8. - ROWSELL, E. V., SNELL, K., CARNIE, J. A. y AL-TAI, A. H., Biochem. J. 115, 1071, (1969)
9. - ROWSELL, E. V., SNELL, K., CARNIE, J. A. y ROWSELL, K. V., Biochem. J. 127, 155 (1972)
10. - GARLAND, P. B. y RANDLE, P. J. Biochem. J. 91, 60 (1964)
11. - UTTER, M. F. y KEECH, D. B., J. Biol. Chem. 236, 2603, (1963)
12. - BERRY, M. N., Biochem. J. 95, 587, (1965)
13. - SHEPHERD, O. y GARLAND, P. B., Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 89 (1966)
14. - JANGAARD, N. O., HATHAWAY, S. A. y ATKINSON, D. E., Fed. Proc. 25, 220 (1966)
15. - SENBERT, W., HENNING, H. V., SCHONER, W. y LIAGE, J. Advan. Enzyme Reg. 6, 153, (1968)
16. - TANAKA, T., SUE, F. y MORIMURA, H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 444, (1967)

17. - GANCEDO, J.M. , GANCEDO,C. y SOLS, A. , Biochem J. 102, 230, (1967)
18. - TAYLOR, C.B. y BAILEY, E. , Biochem. J. 102, 320, (1967)
19. - EXTON, J.H. y PARK, C.R. , J. Biol. Chem. 244, 1424 (1969)
20. - LLORENTE, P. , MARCO, R. y SOLS, A. , Eur. J. Biochem. 13, 45, (1970)
21. - SOLS, A. y MARCO, R. , Curr. Top. Cell. Regul. 2, 227, (1970)
22. - CRISP, D.M. y POGSON, C. I. , Biochem. J. 126, 1009, (1972)
23. - UNDERWOOD, A. H. , y NEWSHOLME, E. A. , Biochem. J. 95, 868, (1965).
24. - PASSERON, S. , JIMENEZ DE ASUA ,L. y CARMINATTI, H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 33, (1967)
25. - WALKER, D. G. , Biochem. Biophys. Acta 77, 209, (1963)
26. - VIÑUELA, E. , SALAS, M. y SOLS, A. , J. Biol. Chem. 238, PC 1175, (1963)
27. - DIPIETRO, D. L. , SHARMA, C. y WEINHONSE, S. , Biochemistry 1, 455, (1962)
28. - BALLARD, F. J. y OLIVER, I. T. , Biochem. J. 90, 261, (1964)
29. - NORDLIE, R. C. y ARION, W. Y. , J. Biol. Chem. 239, 1680, (1964)
30. - HASS, L. F. y BYRNE, W. L. , J. Am. Chem. Soc. 82, 947, (1960)
31. - CRANE, R. K. , y SOLS, A. , J. Biol. Chem. 210, 581, (1954)
32. - PONTREMOLI, S. y GRAZI, E. , En "Carbohydrate metabolism and its disorders", (Academic Press, London, 1968) p. 259
33. - TORRONTEGUI, G. , PALACIAN, E. , LOSADA, M. , Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 227 (1966)
34. - SHRAGO, E. y SHUG, A. L. , Arch. Biochem. Biophys. 130, 393, (1969)
35. - SHRAGO, E. , BRECH, W. y TEMPLETON, K. , J. Biol. Chem. 242, 4060 (1967)



36. - NORDLIE, R. C. y LARDY, K. A. . J. Biol. Chem. 238, 2259, (1963)
37. - CHANG, H. y LANE, M. D. , J. Biol. Chem. 241, 2413 (1966)
38. - KENNETH, R. S. , KUEN, L. CH. , HSIANG, L. CH. , MARVIN. C. y JYSON, L. , Biochim. Biophys. Acta 206, 316 (1970)
39. - ROSS, B. D. , HEMS, R. , FREEDLAM, R. A. y KREBS, H. A. , Biochem. J. 105, 869, (1967)
40. - EXTON, J. M. y PARK, C. R. , J. Biol. Chem. 242, 2622 (1967)
41. - DZURIK, R. y CACHAVANOVA, T. , Physiol. Bonemoslov. 18, 233, (1969)
42. - FOSTER, D. O. , RAY, P. O. y LARDY, H. A. , Biochemistry 5, 555, (1966).
43. - SHRAGO, E. , LARDY, H. A. , NORDLIE, R. C. y FOSTER, D. O. , J. Biol. Chem. 238, 3188, (1963)
44. - LANE, E. A. y MAVRIDES, C. , Can. J. Biochem. 48, 1297, (1970)
45. - SHRAGO, E. , YONNG, J. W. y LARDY, H. A. , Science 158, 1572 (1967)
46. - TREADOW, B. R. y KHAIRALLAH, E. A. , Nature, N. Biol. 239, 131, (1972)
47. - KREBS, H. A. , NOTTON, B. M. y HEMS, R. , Biochem. J. 101, 607, (1966)
48. - MORENO MUÑOZ, F. , MEDINA, J. M. y SANCHEZ-MEDINA, F. , VI-Congreso de la SEB, Sevilla 1975.
49. - MARCO, R. , y SOLS, A. , Metabolic Regulation and Enzyme Action 19, 64, (1969)
50. - JONNG, J. W. , SHRAGO, E. y LARDY, H. A. , Biochemistry, 3, 1687, (1964)
51. - NORDLIE, R. C. , ARION, W. J. , HANSON, T. L. , GILSDORF, J. R. y HORNE, R. N. , J. Biol. Chem. 243, 1140, (1968)

- 52.- FILSELL, O.H., JARRET, I.G., TAYLOR, P.H. y KEECH, B.D.,  
Biochim. Biophys. Acta, 184, 54 (1969)
- 53.- USATENCO, M. S., Biochemical Medicine 3, 298 (1970)
- 54.- WEBER, G., Adv. Enz. Reg. 1, 1, (1963)
- 55.- START, C. y NESHOLME, E.A., FEBS Letters, 6, 171, (1970)
- 56.- LAUGDON, R.G. y WESKLY, D.R., J. Biol. Chem. 214, 167, (1955)
- 57.- BINZ, W. y SENBERT, W., Biochem. Biophys. Res. Commun. 16,  
582, (1964)
- 58.- WEBER, G., SINGHAL, R. L. S. y SRIVASTAVA, S. K. Proc. Nat.  
Acad. Sci. USA 53, 96 (1965)
- 59.- LARDY, H. A., FOSTER, D. O., SHRAGG, E. y RAY, P. D.,  
Adv. Enz. Reg. 2, 39, (1964)
- 60.- WEBER, G., ALLARD, C., DE LAMIRANDE, G. y CANTERO, A.,  
Biochim. Biophys. Acta 16, 618 (1955)
- 61.- ASHMORE, S., HASTING, A. B., NESBETT, F. B. y RENOLD, A. E.,  
J. Biol. Chem. 218, 77, (1956)
- 62.- ASHMCRE, J., WAGLE, S. R. y VETE, T., Adv. Enz. Reg. 2,  
101 (1964)
- 63.- HENNING, H. V., SIEFFERT, I. y SENBERT, W., Biochim.  
Biophys. Acta, 77, 345, (1963)
- 64.- SALAS, M., VIÑUELA, E. y SOLS, A., J. Biol. Chem. 238,  
3535, (1963)
- 65.- SHARMA, C., MANJESHWAR, R. y WEINHONSE, S., J. Biol.  
Chem. 238, 3840 (1963)
- 66.- WEBER, G., SINGHAL, R. L., STAMAN, N. B. y SRIVASTAVA,  
S. K., Fed. Proc. 24, 745 (1965)
- 67.- KREBS, H. A. y EGGLESTON, L. V., Biochem. J. 94, 30 (1965)

- 68.- TANAKA, T., HARANO, Y., MORIMURA, H. y MORI, R.,  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 55 (1965)
- 69.- WEBER, G., STAMM, N. B. y FISHER, E. A., Science 149,  
65. (1965)
- 70.- WEBER, G., SINGHAL, R. L., Life Scie. 4, 1993 (1965)
- 71.- SILLERO, A., SILLERO, M. A. G. y SOLS, A., Eur. J. Biochem.  
10, 351, (1969)
- 72.- ASHMORE, J. y WEBER, G., En "Carbohydrate Metabolism  
and its disorders" (Ac. Press. London 1968) p. 335
- 73.- WEBER, G., CONVERY, H. J. H., LEA, M. A. y STAMM, H. S.,  
Science, 154, 1357 (1966)
- 74.- LEA, M. A. y WEEFF, G., J. Biol. Chem. 243, 1096 (1968)
- 75.- PARVIN, R. y DAKSHINAMURTI, K., J. Biol. Chem. 21, 5773, (1970)
- 76.- WEBER, G., BANERJEE, G. y BRONSTEIN, S. B., Amer. J.  
Physiol. 202, 137, (1962)
- 77.- WEBER, G., SINGHAL, R. L., STAMM, N. B., FISHER, E. A., y  
MENTENDICK, M. A., Adv. Enz. Reg. 2, 1, (1964)
- 78.- WICKS, W. D., J. Biol. Chem. 246, 217 (1971)
- 79.- DUNN, A., CHENOWETH, M. y HEMINGTON, J. B., Biochim.  
Biophys. Acta 237, 192 (1971)
- 80.- MALLETT, L. H., EXTON, I. H. y PARK, C. R., J. Biol. Chem.  
244, 5173, (1969)
- 81.- FELIG, P., POZEFSKY, J. y MARLISS, E., Science, 167,  
1003, (1970)
- 82.- LARNER, J., Ann. N. Y. Acad. Sci. 29, 192, (1967)
- 83.- ROBINSON, A., BUTCHER, R. W., SUTHERLAND, E. W., Ann.  
Rev. Biochem. 37, 149, (1968)
- 84.- BEWSHER, P. D. y ASHMORE, J., Biochim. Biophys. Res. Commun.  
24, 431, (1966)

- 85.- MAHLER, R., STAFFORD, W. S., TARRANT, M. E. y ASHMORE, J., *Diabetes* 13, 297, (1964)
- 86.- EXTON, J. H., JEFFERSON, L. S., BUTCHER, R. W. y PARK, C. R., *Am. J. Med.* 40, 709 (1966)
- 87.- ROSS, B. D., HEMS, R. y KREBS, H. A., *Biochem. J.* 102, 942, (1967)
- 88.- MILLER, L. L., *Federation Proc.* 24, 737, (1965)
- 89.- STRUCK, E., ASHMORE, J. y WILENAD, O., *Adv. Enz. Reg.* 4, 219, (1966)
- 90.- TENFEL, H., MENAHAN, L. A., SCHIPP, J. C., BONING, S. y WIELAND, O., *Eur. J. Biochem.* 2, 182, (1967)
- 91.- EXTON, J. H. y PARK, C. R., *J. Biol. Chem.* 243, 4189, (1968)
- 92.- EXTON, J. H. y PARK, C. R., *Pharmacol. Rev.* 18, 765, (1966)
- 93.- BUTCHER, R. W., SNEYD, J. G. T., PARK, C. R. y SUTHERLAND, E. W., *J. Biol. Chem.* 241, 1651 (1966)
- 94.- YEUNG, D. y OLIVER, y OLIVER, I. T., *Biochemistry*, 7, 3231, (1968).
- 95.- WICKS, W. D., *J. Biol. Chem.* 244, 3941 (1969)
- 96.- PHILIPPIDIS, H. y BALLARD, F. J., *Biochem. J.* 120, 385, (1970)
- 97.- SHARMA, C., MANJESHWAR, R. y WEINHOUSE, S., *J. Biol. Chem.* 239, 3840 (1963)
- 98.- SOLS, A., SALAS, M. y VIÑUELA, E., *Avd. Enz. Reg.* 2, 177 (1964)
- 99.- WEBER, G., SINGHAL, R. L., STAMM, N. B., LEA, M. A. y FISHER, E. A., *Adv. Enz. Reg.* 4, 59 (1966)
- 100.- RASMUSSEN, H. y TENENHOUSE, A., En "Biochemical Action of Hormones" (Academic Press, New York 1970) p. 365
- 101.- RASMUSSEN, H. y NAGATA, H., *Biochim. Biophys. Acta*, 215, 17, (1970).
- 102.- EXTON, J. H., MALLETTE, L. E., JEFFERSON, L. S., WONG, H. A., FRIEDMANN, H. y MILLER, T. B., *Rec. Progr. Horn. Res.* 26, 411 (1970)

- 103.- FRIEDMAN, B., GOODMAN; E.H., SAUNDERS, H.L. y KOSTOS, V., Metabolism, 20, 2 (1971)
- 104.- KRAMER, J.W. y FREEDLAND, R.A., Fed.Proc. 30, 401, (1971)
- 105.- WILLIAMSON, J.R., JAKOE, A. y SCHOLZ, R., Metabolism. 20, 13 (1971)
- 106.- KREBS, H.A., BENNET, D.A.H., GASQUET, P., GASCCYNE, T. y YOSHIDA, T., Biochem.J. 86, 22 (1963)
- 107.- FUWA, H., AOYAMA, Y. y YAMADA, T., Agr.Biol.Chem. 33, 1464, (1969)
- 108.- EISENSTEIN, A.B., SPENCER, S., FLATNESS, S. y BRODSKY, A., Endocrinology 79, 182 (1966)
- 109.- MACKRERER, C.R., SOMBERG, E.W. y MEHLMAN, M.A., Bull.N.Y.Acad.Sci. (Spec.Issue) 84 (1969)
- 110.- KLAIN, G.J. y HANNON, J.I., Fed.Proc. 28, 965, (1969)
- 111.- FLORES, H. y ALLEYNE, G.A.O., Biochem.J. 123, 33, (1971)
- 112.- HEMS, D.À. y BROSNAN, J.T., Biochem.J. 123, 391 (1971)
- 113.- ALLEYNE, G.A.O., y SCULLARD, G.H., J.Clin.Invest. 48, 364 (1969)
- 114.- KAMM, D.E. y CAHILL, G.F. Jr., Amer.J.Physiol. 216, 1207, (1969)
- 115.- BOWMAN, R.H., J.Biol.Chem. 245, 1604, (1970)
- 116.- NOALL, M.W., RIGGS, T.R., WALKER, L.M. y CHRISTENSEN, H.N., Science, 126, 1002 (1957)
- 117.- KREBS, H.A., y YOSHIDA, T., Biochem.Z. 338, 241 (1963)
- 118.- SANCHEZ MEDINA, F., SANCHEZ-URRUTIA, L. MEDINA, J.M., y MAYOR, F., FEBS Letters, 19, 128 (1971)
- 119.- SANCHEZ-MEDINA, F., SANCHEZ-URRUTIA, L. MEDINA, J.M., y MAYOR, F. FEBS Letters, 26, 25 (1972)

- 120.- KREBS, H. A. , Adv. Enz. Reg. 1, 385, (1963)
- 121.- BENDALL, J.R. y TAYLOR, A. A. , Biochem. J. 118, 887 (1970)
- 122.- BOTTCHER, I. , WIELAND, O. , BRDICZKA, D. y PETTE, D. ,  
Eur. J. Biochem. 8, 113 (1969)
- 123.- OPIEL, L. H. y NEWSHOLME, E. A. , Biochem. J. 103, 391, (1967)
- 124.- PETTE, D. , en SCHMIDT, F. Praktische Enzymologie, H. Huber  
Verlag, Bern, 1968, p. 15.
- 125.- NOLTE, J. BRIDICZKA, D. y PETTE, D. , Biochim. Biophys.  
Acta, 284, 497 (1972)
- 126.- ANDERSON, J. W. , Biochim. Biophys. Acta, 206, 165, (1970)
- 127.- BAIRD, G. D. , Biochim. Biophys. Acta, 177, 343, (1969)
- 128.- BALAZS, R. , En "Handbook of Neurochemistry" editado por  
Lajtha, A. , 3, 1, (1970) Plenum Press, New York
- 129.- CHENG, S. C. y CHENG, R. H. C. , Arch. Bioch. Biophys. 151 ,  
501, (1972)
- 130.- MORRISON, A. D. , GOODMAN, D. B. P. , RASMUSSEN; H. y  
WINEGRAD, A. I. , Biochim. Biophys. Acta, 273, 122 (1972)
- 131.- MAGNNS-LEVY, A. , En "Handbuch de Biochemie" 2ª edición, 8,  
358 (Ed. por C. Oppenheimer 1925).
- 132.- EMBDEN, G. , Hofmeisters Beitrage, 6, 44, (1905)
- 133.- KREBS, H. A. , En "Exposés Annuels de Biochimie Médicale",  
Vinght-Sixiem serie (Masson, Paris 1965) p. 13
- 134.- NISMITSUTSUJI, J. M. , RCSS, B. D. y KREBS, H. A. , Biochem.  
J. 103, 852 (1967)
- 135.- FOSTER, D. O. , RAY, P. D. , y LARDY, H. A. , Biochemistry, 5,  
563 (1966)

136. - LARDY, H. A., FOSTER, D. O., y JOHNSTON, J. B.,  
Biochemistry 6, 2120 (1966)
137. - RAY, P. D., FOSTER, D. O., y LARDY, H. A., J. Biol. Chem.,  
241, 4904 (1966)
138. - VENEZIALE, C. M., WALTER, P., KNEER, N., y LARDY,  
H. A., Biochemistry, 6, 2129, (1967)
139. - LARDY, H. A., en "Inhibitors. - Tools in Cell Research"  
Bucher th, y Sies H., Berlin, Springer, 1969, p. 374.
140. - UNDERHILL, F. P., J. Biol. Chem. 10, 159, (1911)
141. - FORTNEY, S. R., CLARK, D. A., y STEIN, E., J. Pharmacol.  
Exp. Ther., 156, 272, (1967)
142. - RAY, P. D., HANSON, R. C., y LARDY, H. A., J. Biol. Chem.  
245, 690, (1970)
143. - HANSON, R. L., RAY, P. D., WALTER, P. y LARDY, H. A.  
J. Biol. Chem. 244, 4351 (1969)
144. - BAUMAN, N., PEASE, B. y HILL, C. Fed. Proc. 26, 507 (1967)
145. - LOFFLER, G., MATSCHINSKY, F. y WIELAND, O.,  
Biochem. Z., 342, 76 (1965)
146. - WALTER, P., PAETKAU, V., y LARDY, H., J. Biol. Chem.,  
241, 2523, (1966)
147. - BAUMAN, N., y HILL, C. J., Biochemistry, 7, 1322 (1958)
148. - GRAVEN, S. N., LARDY, H. A. y ESTRADA, O., S.,  
Biochemistry, 6, 365 (1967)
149. - HARRIS, E. J. y MANCER, J. R., Biochem. J., 109, 239 (1968)
150. - PFAFF, E., KLINGENBERG, M., RITT, E., y VOGELL, W.,  
Eur. J. Biochem., 6, 365 (1967)
151. - REED, J. y LARDY, H. A., J. Biol. Chem. 245, 5297 (1970)

152. - PFAFF, E., en "Mitochondrial structure and compartmentation"  
Adriatica Editrice, Bari, Italy, 1967, p. 195.
153. - KOVACEVIC, Z., McGIVAW, J.D., y CHAPPELL, J.B.,  
Biochem. J. 116, 21P (1970)
154. - MASSEY, V., y GANTHER, H., Biochemistry, 4, 1161, (1965)
155. - SCHILLINGER, E., y LOUE, O. Biochem. Pharmac., 22,  
841 (1973)
156. - CORREDOR, C., BRENDDEL, K., y BRESSLER, R., Proc.  
Nat. Acad. Sci. U.S.A., 58, 2299 (1968)
157. - RUPERMAN, N.B., SHAFRIR, E., y BRESSLER, R., Life  
Sci., 7, 783 (1968)
158. - YARDLEY, H.J. y GODFREY, G., Biochem. J. 88, 16 P (1963)
159. - SENIOR, A.E., y SHERRAT, M.S.A., Biochem. J. 104, 56P (1967)
160. - SHERRAT, M.S.A., Biochem. J. 88, 49 P (1963)
161. - TOEWS, C.J., LOWY, C. y RUDERMAN, N.B., J. Biol. Chem.  
245, 818 (1970)
162. - RUDERMAN, N.B., TOEWS, C.J., LOWY, C. y SHAFRIR, E.,  
En "Regulation of gluconeogenesis" (Verlag, Stuttgart 1971) p. 194.
163. - CORREDOR, C., BRENDDEL, K. y BRESSLER, R., J. Biol.  
Chem. 244, 1212 (1969)
164. - BRENDDEL, K., CORREDOR, C., y BRESSLER, R., Biochem.  
Biophys. Res. Commun. 34, 340 (1969)
165. - BRENDDEL, K., y BRESSLER, R., Am. J. Clin. Nutr., 23, 972 (1970)
166. - FUKAMI, M.H., y WILLIAMSON, J.R., J. Biol. Chem., 246,  
1206 (1971)
167. - FRITZ, I.B., Advan. Lipid. Res. 1, 285 (1963)
168. - WILLIAMSON, J.W., ROSTAND, S.G., y PETERSON, M.J.,  
J. Biol. Chem., 245, 3242 (1970)



- 169.- WOLLENBERGER, A., RISTAN, O. y SCHOFFA, P., Arch. Ges. Physiol. 270, 399, (1967).
- 170.- WILLIANSON, D.H., LUND, P. y KREBS, H.A., Biochem. J. 103, 514, (1967)
- 171.- HARPER, A.E., "Methods of Enzymatic Analysis" (Academic Press, New York, London) 788, (1965).
- 172.- FISKE, C.H. y SUBBAROW, Y., J. Biol. Chem. 66, 375 (1925)
- 173.- MEDICINO, J., OLIVER, R.M. y KRATOWICH, N., J. Biol. Chem. 247, 6643, (1972)
- 174.- ANTONIO ORIOLA, P., "Determinación de fosfoenolpiruvato carboxicinas en tejido hepático de rata". Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia, Granada, 1970.
- 175.- BERGMEYER, H.V., "Methods of Enzymatic Analysis" (Academic Press, New York, London) (1965)
- 176.- KLOTZSCH, H. y BERGMEYER, H.V., "Methods of Enzymatic Analysis" (Academic Press, New York, London), 1156, (1965).
- 177.- BUCHER, T., "Methods of Enzymatic Analysis" (Academic Press New York, London), 246, (1965)
- 178.- BERGMEYER, H.B., "Methods of Enzymatic Analysis" (Academic Press, New York, London), 229, (1965)
- 179.- HOHORST, H.J., "Methods of Enzymatic Analysis" (Academic Press, New York, London), 328, (1965).
- 180.- BERGMEYER, H.V., "Methods of Enzymatic Analysis" (Academic Press, New York, London) 123, (1965)
- 181.- MILLER, L.L., BLIS, C.G., WATSON, M.L. y BALE, W.F., J. Exp. Med. 94, 431, (1951)
- 182.- SCHIMASSEK, H., Biochem. J. 336, 460, (1963)

- 183.- HEMS, R., ROSS, B.D., BERRY, M.M. y KREBS, H.A.,  
Biochem. J. 101, 284, (1966)
- 184.- MEDINA JIMENEZ, J.M., "Efecto de la Fenetil biguanida (Fen-  
formina) sobre la gluconeogénesis en hígado perfundido de rata"  
Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Granada, 1972.
- 185.- KREBS, H.A. y HENSELEIT, K., Hoppe-Seyl. 2, 210, 33 (1932)
- 186.- KREBS, H.A., BENNET, D.A.H., GASQUET, P. GASCOINE, F.  
y YOSHIDA, T., Biochem. 86, 22, (1963)
- 187.- GARCIA RUIZ, J.P., Tesina de Licenciatura, Facultad de Farma-  
cia, Granada, 1972.
- 188.- GARCIA RUIZ, J.P., MORENO, F., SANCHEZ-MEDINA, F., y  
MAYOR, F., FEBS Letters, 34, 113 (1973)
- 189.- WILLIAMSON, J.R., BROWNING, E.T. y OLSON, M.S., Adv.  
Enz. Reg. 6, 67, (1968)
- 190.- ANDERSON, J.H., NIKLAS, W.J., BLANK, B., REFINO, C.  
y WILLIAMSON, J.R., en "Regulation of gluconeogenesis"  
(G. T. Veriag Stuttgart, 1971) p. 293.
- 191.- GOLDBERG, I.H., RABINOWITZ, M. y REICH, E., Proc. Natl.  
Acad. Sci. U. S. 48, 2094, (1962)
- 192.- ENNIS, H.L., y LUBIN, M., Fed. Proc. 23, 269 (1964)
- 193.- WAHLEFELD, A. W., "Methods of Enzymatyc Analisis" (Acade-  
mic Press, New York, London), 1.604 (1.974)
- 194.- HOHORST, L.L., KREITZ, y BUCHER, Th., Biochem. Z. 322,  
18 (1959).
- 195.- GUTMANN, I., y WAHLEFELD, A. W., "Methods of Enzymatyc  
Analisis" (Academic Press, New York, London), 1.464 (1.974)
- 196.- KALHR, S. y SCHOOLWERTH, A.C. Biochem. Biophys. Acta  
279, 157 (1972)

- 197.- SENIOR, A.E. y SHERRATT, H.S.A. Biochem J. 110, 521 (1968)
- 198.- FAUS, M.J., LUPIAÑEZ, J.A., GARCIA-RUIZ, J.P. y SANCHEZ MEDINA, F. VI Congreso de la SEB, Sevilla, 1975.
- 199.- GOODMAN, A.D., FUISZ, R.E., y CAHILL, Jr. G.F. J. Clin. Invest., 45, 612, (1966)
- 200.- WARREN, E.G., RECTOR, F.C. y SELDIN, D.W. Am. J. Physiol. 213, 969 (1967)
- 201.- ALLEYNE, G.A.O. Nature, 217, 847 (1968)
- 202.- ALLEYNE, G.A.O. J. Clin. Invest. 49, 943 (1969)
- 203.- LONGSHAW, I.D., y POGSON, C.I. J. Clin. Invest. 51, 2277 (1972)
- 204.- LONGSHAW, I.D., ALLEYNE, G.A.O. y POGSON, C.I., 51, 2284 (1972)

DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de  
fecha, constituido por:

- D. Federico Mayor Zaragoza
- D. Enrique Montoya Goues
- D. José María Macanilla Greda
- D. Fernán Sánchez de Medina y Antea
- D. Edmundo García Pérez

... juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don  
José Antonio Lupiáñez Cava

acordó por unanimidad otorgar la calificación de sobresaliente cum laude

para que conste, se extiende firmada por los componentes del Tribunal, la presente diligencia.

Granada, a 19 de septiembre de 1975

El Secretario,

El Presidente,

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

Mayor  
Montoya  
Macanilla  
Sánchez de Medina  
García Pérez

Biblioteca Universitaria de Granada



01052526