

T-7/49

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

**EFFECTO DEL EJERCICIO Y DEL ESTRES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA  
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA DE CORTEZA RENAL DE RATA**

ROSARIO A. MUÑOZ CLARES

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1976

R:29.741

<b>BIBLIOTECA UNIVERSITARIA</b>	
<b>GRANADA</b>	
Nº Documento	<u>13602974</u>
Nº Copia	<u>15635995</u>

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

EFECTO DEL EJERCICIO Y DEL ESTRES SOBRE  
LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CAR-  
BOXICINASA DE CORTEZA RENAL DE RATA.

ROSARIO A. MUÑOZ CLARES

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 1 SET. 1976  
ENTRADA NUM. 3669



MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias por la Licenciada Dña Rosario A. Muñoz Clares

Director de esta Tesis.

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



Licenciada Dña. Rosario A. Muñoz Clares  
Aspirante al Grado de Doctor en Ciencias



Granada, Septiembre 1. 976

El trabajo que presentamos ha sido realizado en el LABORATORIO DEL DEPARTAMENTO INTERFACULTATIVO DE BIOQUIMICA de la Universidad de Granada durante los cursos 1.973-1.974, 1.974-1.975, 1.975-1.976.

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

Mi más sincero agradecimiento al Prof. Dr. D. Fermín Sanchez de Medina, director de esta Memoria Doctoral, mi maestro. Sus enseñanzas han hecho posible no sólo este trabajo, sino cuantos en un futuro yo pueda realizar.

A mis compañeros de equipo cuya colaboración desinteresada nunca me ha faltado. A vosotros, Marisa Pita, M<sup>a</sup> José Faus, Josefa P. García Ruiz, Alberto Vargas, Pilar Morata, José A. Lupiañez y Paloma Hortelano gracias por vuestra ayuda y vuestra amistad.

Quiero recordar en esta página de agradecimientos al resto de mis compañeros y al personal auxiliar y técnico del Departamento de Bioquímica, en especial a M<sup>a</sup> Dolores Franco Sedano cuya callada y valiosa ayuda agradezco de corazón.

A mis padres

## ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
ALD	Aldolasa
AMP	Adenosín monofosfato
ATP	Adenosín trifosfato
E. C.	Comisión internacional de enzimas
EDTA	Acido etilendiamino-tetracético
ENO	Enolasa
FDP	Fructosa 1-6 difosfato
F6P	Fructosa 6-fosfato
GAP	Gliceraldehido fosfato
GAPDH	Gliceraldehidofosfato deshidrogenasa
GDH	Glicerol 1-fosfato deshidrogenasa
GIDH	Glutamato deshidrogenasa
GOD	Glucosa deshidrogenasa
GSH	Glutation reducido
G6P	Glucosa 6-fosfato
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
3-HBDH	3-Hidroxibutirato deshidrogenasa
HK-GK	Hexocinasa-glucocinasa
IDP	Inosín difosfato
ITP	Inosín trifosfato
$\alpha$ -KG	Acido $\alpha$ -cetoglutárico
LAC	L-lactato
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAL	Malato
MDH	Malato deshidrogenasa
MICA	Acido 5 metoxi-2-indol carboxílico
NAD <sup>+</sup>	Nicotín adenín dinucleótido
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NADP <sup>+</sup>	Nicotín adenín dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido

OAA	Oxalacetato
PC	Piruvato carboxilasa
PDHA	Fosfodihidroxiacetona
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicina
PFK	Fosfofructocinasa
PGI	Fosfoglucoisomerasa
PGM	Fosfoglicero mutasa
2PGA	2-fosfoglicerato
3PGA	3-fosfoglicerato
PHI	Fosfohexosa isomerasa
PIR	Piruvato
PK	Piruvato cinasa
POD	Peroxidasa
TIM	Triosafosfato isomerasa
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
TRP	Triosas fosfato
RNA	Acido ribonucleico



	<u>Página</u>
II. - PARTE EXPERIMENTAL.....	
2. 1. - Material.....	61
2. 1. 1. - Especie ensayada.....	63
2. 1. 2. - Material usado en las diferentes técnicas.....	63
2. 2. - Productos.....	65
2. 3. - Métodos.....	66
2. 3. 1. - Tratamiento de los animales de experimentación.....	66
2. 3. 1. 1. - Ejercicio.....	66
2. 3. 1. 2. - Bicarbonato sódico.....	66
2. 3. 1. 3. - Actinomicina D.....	66
2. 3. 1. 4. - Cicloheximida.....	67
2. 3. 1. 5. - Ayuno.....	67
2. 3. 1. 6. - Acido 5-metoxindol-2-carboxilico (MICA).....	67
2. 3. 1. 7. - Estrés térmico.....	67
a) Agua fria .....	67
b) Temperatura ambiental elevada .....	68
2. 3. 1. 8. - Situación estresante de corta duración.....	69
2. 3. 2. - Determinación de la actividad enzimática de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas.....	69
2. 3. 3. - Determinación enzimática de las concentraciones "in vivo" de metabolitos intermediarios del proceso gluconeogénico.....	71
2. 3. 3. 1. - Tratamiento de los tejidos. Técnica del congelado instantáneo.....	72
2. 3. 3. 2. - Determinación enzimática de glucosa 6P y fructosa 6 P.....	73
2. 3. 3. 3. - Determinación enzimática de fosfodihidroxiacetona, gliceraldehido-3-fosfato y fructosa 1-6-difosfato.....	75

	<u>Página</u>
2. 3. 3. 4. - Determinación enzimática de p <u>iruv</u> ato, fosfoenolpiruvato, 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato.....	77
2. 3. 3. 5. - Determinación enzimática de L-mal <u>a</u> to.....	79
2. 3. 3. 6. - Determinación enzimática de oxalac <u>e</u> tato.....	80
2. 3. 3. 7. - Determinación enzimática de L-lac <u>t</u> ato.....	82
2. 3. 4. - Determinación de la capacidad gluconeogénica hepática. Técnica de perfusión hepática.....	83
2. 3. 5. - Determinación de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal.....	84
2. 3. 6. - Determinación enzimática de glucosa.....	84
2. 3. 7. - Determinación de glucosa en sangre.....	87
2. 3. 8. - Determinación de L-lactato en sangre.....	88
2. 3. 9. - Determinación del pH, pCO <sub>2</sub> y concentración de CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup> en sangre.....	89
2. 3. 10. - Determinación de β-hidroxibutirato en sangre.....	89
2. 3. 11. - Determinación de acetoacetato en sangre.....	91
2. 3. 12. - Determinación de L-alanina en sangre.....	92
2. 3. 13. - Determinación de amoníaco en sangre.....	93
2. 3. 14. - Determinación de urea en plasma.....	95
2. 3. 15. - Determinación de la capacidad ureogénica hepática mediante perfusión.....	97
2. 3. 16. - Determinación de la capacidad de consumo de cuerpos cetónicos por el riñón.....	97
III. - RESULTADOS .....	99
3. 1. - Acidosis láctica y actividad de la fosfoenolpiruvato carboxinasa renal durante el ejercicio.....	101

	<u>Página</u>
3. 1. 1. – Concentración de ácidos no volátiles en sangre durante el ejercicio.....	102
3. 1. 1. 1. – Acido láctico.....	102
3. 1. 1. 2. – Cuerpos cetónicos.....	103
3. 1. 2. – Valores de pH, pCO <sub>2</sub> y concentración de bicarbonato en sangre durante el ejercicio.....	106
3. 1. 2. 1. – Animales normales.....	106
3. 1. 2. 2. – Animales tratados con bicarbonato..	107
3. 1. 3. – Efecto de la administración previa de bicarbonato sobre los primeros quince minutos de ejercicio.....	109
3. 1. 3. 1. – Concentración de ácido láctico en sangre.....	109
3. 1. 3. 2. – Concentración de glucosa en sangre	110
3. 1. 3. 3. – Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal.....	110
3. 1. 3. 4. – Capacidad gluconeogénica.....	110
3. 1. 4. – Naturaleza de la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa por el ejercicio.....	115
3. 1. 4. 1. – Efecto de la actinomicina D.....	116
3. 1. 4. 2. – Efecto de la cicloheximida.....	117
3. 1. 5. – Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa a las dos horas del comienzo de un periodo de ejercicio de quince minutos.....	122
3. 2. – Otros estudios metabólicos en el ejercicio.....	124
3. 2. 1. – Concentración sanguínea de algunas sustancias metabólicas durante el ejercicio.....	124
3. 2. 1. 1. – Glucosa.....	124
3. 2. 1. 2. – Alanina.....	124

	<u>Página</u>
3. 2. 1. 3. – Amoniaco y urea .....	128
3. 2. 2. – Efecto del ejercicio sobre la capacidad gluconeogénica hepática en ratas ayunadas.....	130
3. 2. 3. – Efecto del ejercicio sobre el funcionamiento de la gluconeogénesis renal en ratas con gluconeogénesis hepática disminuida.....	134
3. 2. 3. 1. – Concentración en hígado de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas ejercitadas tratadas con MICA.....	134
3. 2. 3. 2. – Concentración en riñón de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis de ratas ejercitadas tratadas con MICA.....	135
3. 2. 4. – Efecto del ejercicio sobre la capacidad de consumo de cuerpos cetónicos por la corteza renal....	
3. 2. 5. – Efecto del ejercicio sobre la capacidad ureogénica hepática.....	140
3. 3. – Efecto del estrés sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa.....	143
3. 3. 1. – Efecto de la inmersión en agua a 22°C sin ejercicio.....	144
3. 3. 2. – Efecto de la temperatura ambiental antes de la realización del ejercicio.....	146
3. 3. 3. – Efecto de una situación estresante de corta duración.....	148
3. 3. 3. 1. – Concentración de lactato en sangre....	148
3. 3. 3. 2. – Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática.....	148

	<u>Página</u>
3.3.3.3. – Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal.....	149
3.3.3.4. – Concentración de glucosa en sangre...	149
IV. – DISCUSION.....	155
4.1. – Acidosis láctica y actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal durante el ejercicio.....	155
4.2. – Otros estudios metabólicos en el ejercicio.....	162
4.3. – Efecto del estrés sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa.....	164
V. – CONCLUSIONES.....	171
VI. – BIBLIOGRAFIA.....	177

INTRODUCCION



" Las bases moleculares de la patología -  
constituyen hoy uno de los campos mas apa-  
sionantes y atractivos de la investigación  
bioquímica y permiten explicar la raíz, la  
etiología de múltiples afecciones clínicas,  
el fundamento de muchos tratamientos tera-  
peuticos y de muchos datos utilizados en  
el diagnóstico".

F. Mayor

## INTRODUCCION

Una de las entidades clínicas que mayor atención está reci-  
biendo en los quince últimos años es la acidosis láctica, que aparece  
por diversas circunstancias, tales como el "shock" hemorrágico,  
efecto secundarios de medicamentos, diabetes, leucemia, ingestión de  
alcohol, etc.

Como se ha señalado recientemente, "en la última década se  
han realizado avances importantísimos, principalmente por bioquími-  
cos y fisiólogos en la comprensión de las vías metabólicas y del con-  
trol del metabolismo del lactato, y parece aconsejable intentar ya la  
síntesis de las informaciones clínicas, bioquímicas y fisiológicas".  
(★).

---

(★) R. D. Cohen y H. F. Woods "Clinical and Biochemical Aspects of  
Lactic Acidosis" Blackwell Scientific Publications, Oxford (1976)

.La acidosis láctica es, por otra parte, algo tradicionalmente conocido como una consecuencia del ejercicio, situación en la que existe una relativa anoxia que lleva a la sobreproducción de ácido láctico por el tejido muscular. Se trata en este último caso de una circunstancia que podemos calificar de normal o fisiológica pero que lógicamente debe tener muchos puntos de analogía con la acidosis láctica de tipo patológico.

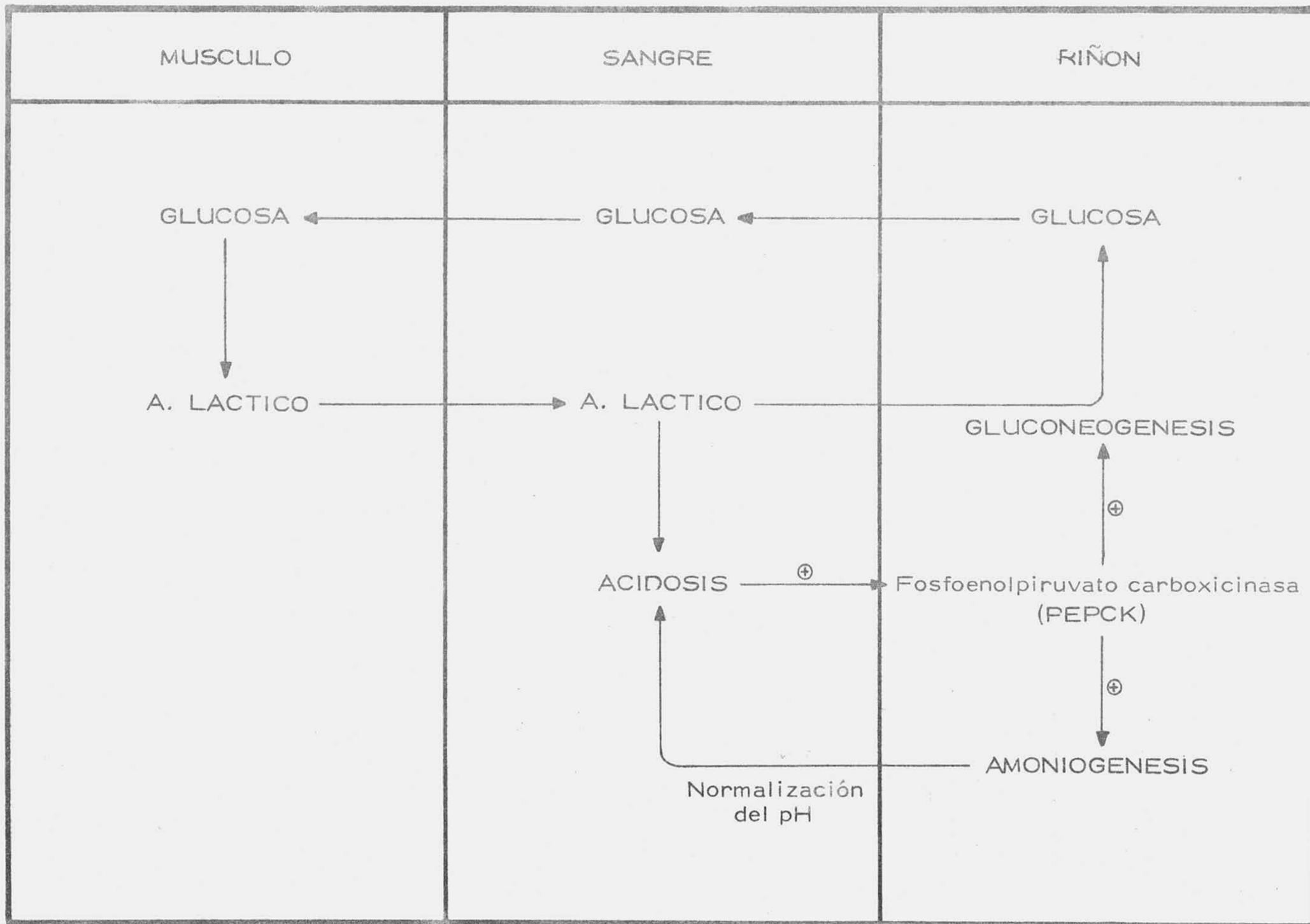
Gran parte del contenido de esta memoria está relacionado con el estudio de la acidosis láctica que se produce como consecuencia del ejercicio muscular. Precisamente, el primer objetivo de esta tesis era confirmar que en nuestras condiciones experimentales de actividad muscular forzada (natación en agua a 22°C) existía de hecho una acidosis metabólica originada por la sobreproducción de ácido láctico, a la que se podría por tanto atribuir el estímulo sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasasa renal, que se había demostrado previamente en nuestro Departamento.

La fosfoenolpiruvato carboxicinasasa de la corteza renal es una enzima de un interés extraordinario dentro de este tejido en el que parece desempeñar un papel fundamental. Por una parte es una enzima clave de la gluconeogénesis, proceso que contribuye en forma considerable a la homeostasis glucémica. Por otra parte es una enzima cuya actuación resulta crucial para la formación de amonio a nivel tubular, formación que contribuye decisivamente a la restauración del equilibrio ácido-básico del medio interno en respuesta a la acidosis.

Dado que durante el ejercicio existe una fuerte demanda de glucosa por parte del músculo, al mismo tiempo que aumentan las concentraciones sanguíneas de ácido láctico (formado por el propio tejido muscular) y se produce acidosis, el funcionamiento incrementado de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas podría acelerar al menos potencialmente, el consumo de ácido láctico (que pasaría a glucosa), al mismo tiempo que se tendería a la normalización del pH sanguíneo, tanto por la desaparición del lactato como por la formación de amonio (véase esquema en la página siguiente).

No cabe duda, por tanto, de que el estudio de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas renal en relación a la acidosis láctica del ejercicio tiene un gran interés fisiológico, pero que podría trascender a lo patológico por su posible proyección sobre algunas situaciones clínicas relacionadas. En este sentido parece oportuno añadir que el papel del riñón en esta situación clínica ha sido frecuentemente subestimado al compararlo con la importante función del hígado en el metabolismo del lactato. Es probable que un mejor conocimiento bioquímico del riñón permita señalar para este tejido una contribución mayor a dicho metabolismo.

Como hemos mencionado anteriormente, el presente trabajo se ha emprendido con el fin principal de confirmar la vinculación del efecto activante del ejercicio sobre la fosfoenolpiruvato carboxicinasas renal a la acidosis láctica que debe acompañar a esta situación fisiológica. Dentro de este planteamiento se han realizado las oportunas expe



Función metabólica de la fosfoenolpiruvato carboxicinasasa renal durante el ejercicio.

riencias encaminadas a poner de manifiesto la existencia real de dicha acidosis láctica y se ha procurado aumentar el número de datos adicionales que permitieran la adscripción de nuestro hallazgo experimental a la circunstancias bien definidas bioquímicamente de la acidosis metabólica.

Por otra parte, se han realizado otros estudios metabólicos relacionados con el ejercicio, tales como los relativos a la producción de urea por el hígado ó al consumo de compuestos cetónicos por el riñón. Por último, tratando de dilucidar la influencia del estrés en la respuesta renal al ejercicio en nuestras condiciones experimentales, se han llevado a cabo algunas experiencias de tipo preliminar sobre el efecto de una situación estresante sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas. Es destacable el hallazgo de una respuesta de esta enzima a dicha situación tanto en el hígado como en la corteza renal, respuesta que se caracteriza por su rapidez y transitoriedad y que podría presumiblemente abrir una nueva perspectiva en el área de su regulación.



I. - PARTE TEORICA



## I. - PARTE TEORICA

### I.1. - FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA

#### I.1.1. - Generalidades y compartimentación celular

La fosfoenolpiruvato carboxicinasasa (PEPCK), (EC 4.1.32) (GTP = oxalacetato carboxilasa transfosforilante) una de las más importantes de las enzimas propias de la gluconeogénesis, cataliza la descarboxilación dependiente de guanosina trifosfato (GTP) o inosina trifosfato (ITP) del oxalacetato, según la reacción reversible formulada:



La actividad de la PEPCK fue inicialmente encontrada en hígado de pollo por Utter y Kurahashi en 1953 (1.2). Posteriormente se ha comprobado su existencia normal en hígado y riñón de todo tipo - de animales superiores (3), y existe también en menor proporción en otros tejidos no gluconeogénicos (4,7).

La fosfoenolpiruvato carboxicinasasa se encuentra así mismo ampliamente difundida en vegetales (8) y microorganismos (9-11).

Existen notables diferencias en la compartimentación intracelular de esta enzima en las especies comúnmente ensayadas, teniendo la mayoría de ellas dos formas de la enzima: una mitocondrial y otra ci

toplasmática.

En hígado de rata adulta, así como de ratón y de hamster, la PEPCK es una enzima predominantemente citoplasmática (12) mientras que está fundamentalmente o completamente localizada en la mitocondria de hígado de pollo, paloma (13, 14) y conejo (12). En cerdo (15) cobaya (16) y hombre (17, 18) la enzima se encuentra tanto en el citoplasma como en la mitocondria, aunque en cantidad ligeramente mayor en esta última. Datos recientes de levadura muestran que su enzima es extra mitocondrial (19).

La distribución subcelular de la PEPCK en riñón es bastante similar a la de hígado, especialmente en el caso de la rata (20). Sin embargo, en esta misma especie la enzima es mitocondrial en la mucosa intestinal (21) y citoplasmática en el tejido adiposo (22).

### 1.1.2. - Características de la enzima

#### 1.1.2.1. - Propiedades físicas

Los trabajos más extensos realizados sobre estas propiedades de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas han sido llevados a cabo por Chang y Lane (23) sobre la fracción mitocondrial purificada de hígado de cerdo. Estos autores han hallado que ésta enzima tiene un peso molecular de 73.000. En cambio para la enzima de hígado de rata (fracción citoplasmática) Foster encontró un peso de 56.000 (24), mientras Ballard y Hanson obtienen un peso de 74.000 (25).

### 1. 1. 2. 2. - Cinética

Los datos bibliográficos disponibles sobre las características cinéticas de la PEPCK son discrepantes, dependiendo en gran parte de los procedimientos utilizados para su obtención.

Los primeros trabajos señalaban una Km para el oxalacetato muy superior a la concentración habitual de este metabolito en el hígado. Así se indicaban valores para la enzima citoplasmática y mitocondrial de hígado de cobaya de  $9 \times 10^{-4}$  y  $3 \times 10^{-3}$  M respectivamente (26) y de  $1,4 \times 10^{-4}$  M para la enzima mitocondrial de hígado de cerdo (27) y para la fracción citoplasmática de hígado de rata (24, 28), siendo los niveles de oxalacetato en el citoplasma en la mitocondria de hígado de rata de  $5.10 \times 10^{-6}$  M y  $1.7 \times 10^{-7}$  M (29, 30, 31) y de igual orden en los mismos compartimentos celulares de cobaya (32). Ballard ha hallado valores de  $2.5 \times 10^{-5}$  M tanto para la enzima mitocondrial de hígado de cerdo o pollo como para la fracción citoplásmica de hígado de rata o cordero. Utilizando  $Mn^{++}$  en vez de  $Mg^{++}$ , la enzima de origen mitocondrial exhibe una Km aún más baja:  $9 \times 10^{-6}$  M. En todos los casos el malato a alta concentración inhibe competitivamente ( en presencia de  $Mn^{++}$ ). Cuando se utiliza  $Mg^{++}$ , la inhibición es competitiva para la enzima mitocondrial y no competitiva para la fracción soluble. De todas formas, esta inhibición no es fisiológica ( $K_i = 2.5 \times 10^{-2}$  M) y tampoco debe tener importancia "in vivo" la Km que exhibe la enzima mitocondrial en presencia de  $Mn^{++}$ , dada la escasa cantidad de este ión que existe en mitocondria (33).

Walsh y Chen que han reinvestigado los parámetros cinéticos de la fosfoenolpirúvico carboxinasa utilizando una técnica de determinación

más sensible, encuentran una Km para el oxalacetato de  $1-5 \times 10^{-6}$  M, tanto para la enzima de hígado de rata como para la de cobaya. Estos valores son muy semejantes a los que exhiben las demás enzimas que compiten por el oxalacetato (citrato sintetasa, málico deshidrogenasa y glutamato-oxalacetato transaminasa), indicando que la fosfoenolpiruvato-carboxicinasa debe ser sensible a las modulaciones fisiológicas de las concentraciones de oxalacetato (34).

#### 1.1.2.3. - Mecanismo de acción

La PEPCK tiene una necesidad absoluta de un ión metálico divalente en la reacción que produce PEP ó OAA.  $Mn^{2+}$  es el catión que más eficazmente activa la formación de PEP catalizada por la PEPCK; sin embargo, Noce y Utter encontraron que con GTP como nucleótido la velocidad de reacción era más alta cuando estaban presentes ambos  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  (35).

Los primeros estudios de Utter y Kurahashi (2) sobre la enzima de ave habían revelado un estímulo considerable de la actividad enzimática en presencia de glutatión o cisteína. En efecto, la fosfoenolpirúvico carboxicinasa es rica en grupos sulfihidrílo (15 restos de cisteína por mol, en mitocondria de hígado de cerdo), lo que explica la fuerte inhibición producida por p-cloromercuriobenzoato (a concentraciones del orden de  $10^{-6}$  M) y su reversión por altas concentraciones de glutatión (23). Los estudios de Barns y Keech (36) sobre la enzima mitocondrial de riñón de carnero demuestran que tales grupos sulfihidrílo son indispensables para la acción catalítica aunque no lo son para la unión con sus sustratos.

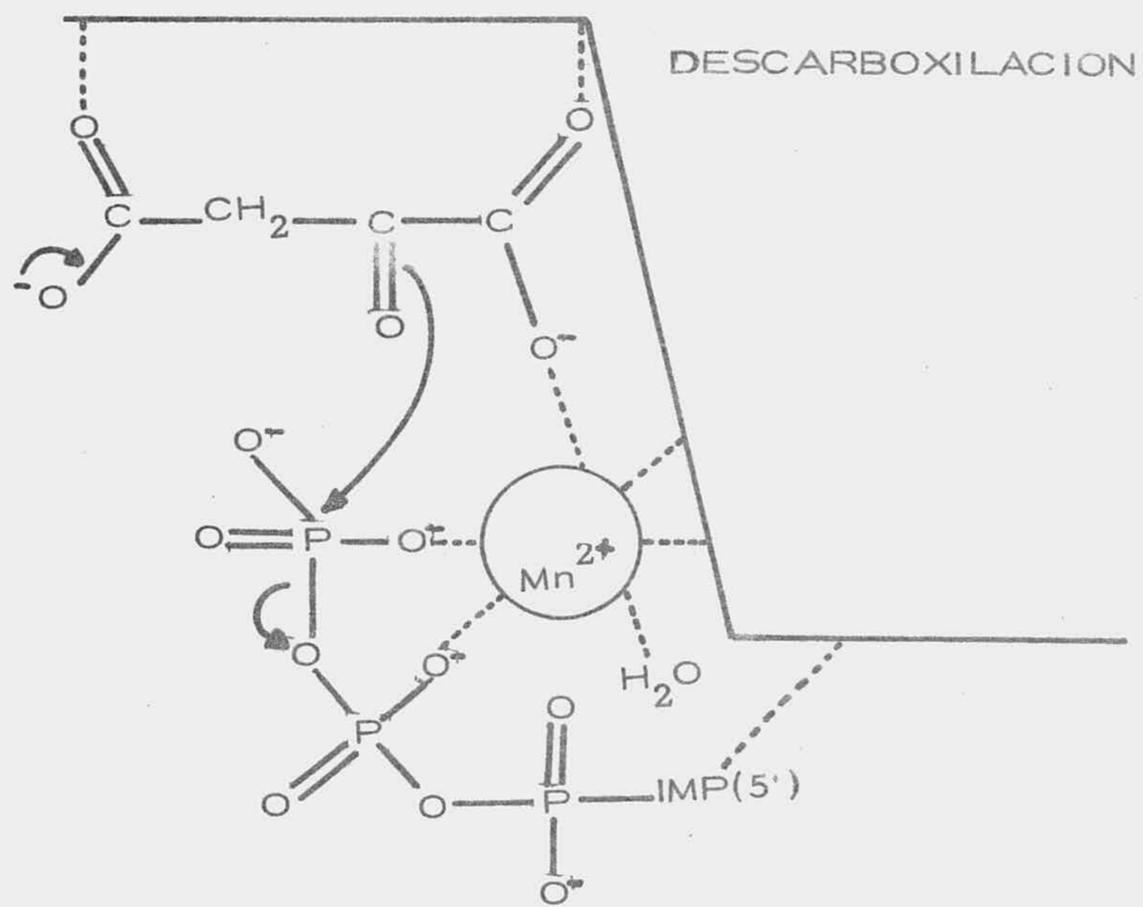
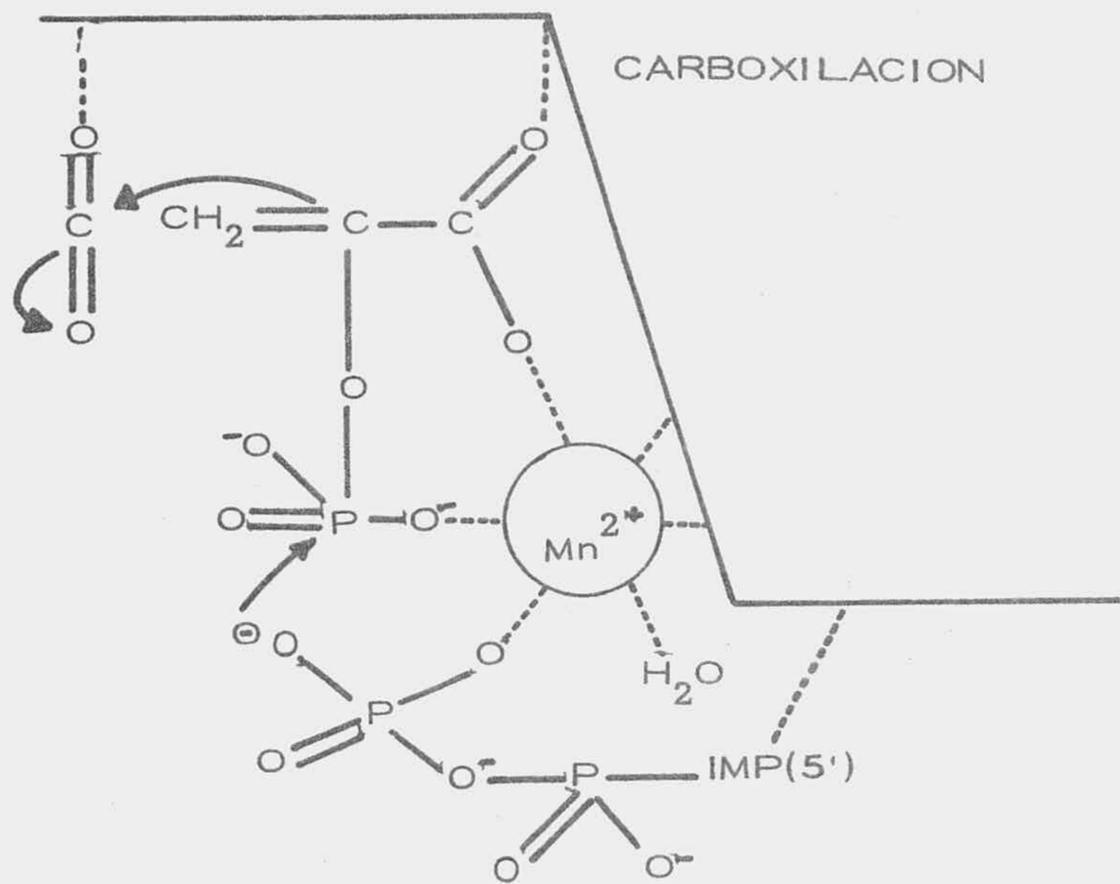
Además de la descarboxilación del oxalacetato y la reacción carboxilante inversa, la fosfoenolpiruvato carboxicinas cataliza también un intercambio independiente de ITP (o GTP) y  $Mn^{++}$  entre  $H^{14}CO_3^-$  y oxalacetato (2). Los estudios comparativos realizados por Chang y colaboradores (27) a pH 6.8, 7.3 y 8.0 sobre la enzima mitocondrial de hígado de cerdo revelan que el intercambio  $H^{14}CO_3^-$ -OAA es mucho más rápido que las reacciones de carboxilación y descarboxilación. A pH 6.8 las velocidades relativas de las reacciones carboxilante y descarboxilante y de intercambio  $H^{14}CO_3^-$ -OAA son 1.0, 8.2 y 30 respectivamente.

Los resultados obtenidos en estos trabajos junto a los realizados sobre la unión del  $Mn^{++}$  y los sustratos a la proteína enzimática (37) y los estudios cinéticos e isotópicos sobre estos últimos complejos, han permitido a Miller y Lane (38) proponer un mecanismo de acción para esta reacción enzimática. Este mecanismo supone la formación de un complejo intermedio central entre la enzima y el resto de los componentes de la reacción (véase esquema en la página siguiente).

La estereoquímica de la reacción ha sido estudiada por Rose y col. (39) utilizando  $3-^3HPEP$ , demostrándose que la carboxilación se realiza en el lado "si", lo que relaciona esta reacción enzimática con las catalizadas por enolasa, fumarasa y fosfohexosa-isomerasa.

### 1.1.3. - Función biológica

El descubrimiento de la PEPCK se interpretó como la respuesta al problema de la fijación de  $CO_2$  y de la síntesis de ácidos dicarboxílicos en el hígado, pero posteriores hallazgos demostraron que su misión prin



principal es la síntesis del fosfoenolpiruvato dentro de la ruta de síntesis de hidratos de carbono.

Acoplada con la piruvato carboxilasa (EC 6.4.11) que cataliza la reacción:



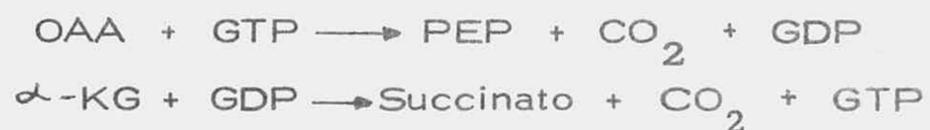
permite a la célula evitar la conversión, termodinámicamente desfavorable, del piruvato en fosfoenolpiruvato, paso catalizado por la piruvato-cinasa en el proceso glucolítico.

El único tejido no gluconeogénico en el cual se ha establecido claramente el papel metabólico de la PEPCK es el tejido adiposo. En alguna manera este es análogo a su papel en tejidos gluconeogénicos: suministrar fosfoenolpiruvato a partir de precursores como piruvato, lactato o alanina. Pero a diferencia de aquellos tejidos el producto final formado es  $\alpha$ -glicerofosfato, puesto que el tejido adiposo carece de dos de las más importantes enzimas gluconeogénicas: fructosa 1-6 difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa (40). Meynhas y col. han señalado una  $K_m$  para el oxalacetato de  $2.2 \times 10^{-5}$  para la enzima de este tejido. El malato se comporta -al igual que en el hígado- como un inhibidor, siendo este efecto impedido por piruvato, pero solo en el tejido adiposo (41).

En tejido muscular, en el que tiene una distribución variable, puesto que es fundamentalmente mitocondrial en músculo rojo y cardíaco

y fundamentalmente citoplasmática en músculo blanco, no se ha demostrado claramente cual es su función. En músculo blanco la actividad total es menor lo que sugiere que esta enzima cataliza una etapa limitante de la gluconeogénesis muscular (42). La función de la fosfoenolpirúvico carboxicinasa en músculo rojo podría ser la de regular el sistema malato aspartato de transporte de equivalentes reducidos a la mitocondria (4, 42).

La fosfoenolpirúvico carboxicinasa de cerebro se encuentra en la fracción mitocondrial. Cheng y Cheng (43) sugieren que esta enzima funciona acoplada a la fosforilación a nivel de  $\alpha$ -cetoglutarato:



Diamant y Shafrir han encontrado muy recientemente fosfoenolpiruvato carboxicinasa en placenta de rata, lo que sugiere la posibilidad de gluconeogénesis en este tejido. Sin embargo la placenta exhibe una alta actividad glucolítica mientras que la fosfoenolpiruvato carboxicinasa presenta una actividad muy baja, por lo que su significado fisiológico no parece claro (44).

#### 1.1.4. - Regulación

##### 1.1.4.1. - A nivel de actividad enzimática

En contraste con los numerosos datos bibliográficos relacionados con la regulación de la PEPCK por factores fisiológicos, existe muy poca información en lo que concierne a los factores que pueden regular directamente la actividad de esta enzima.

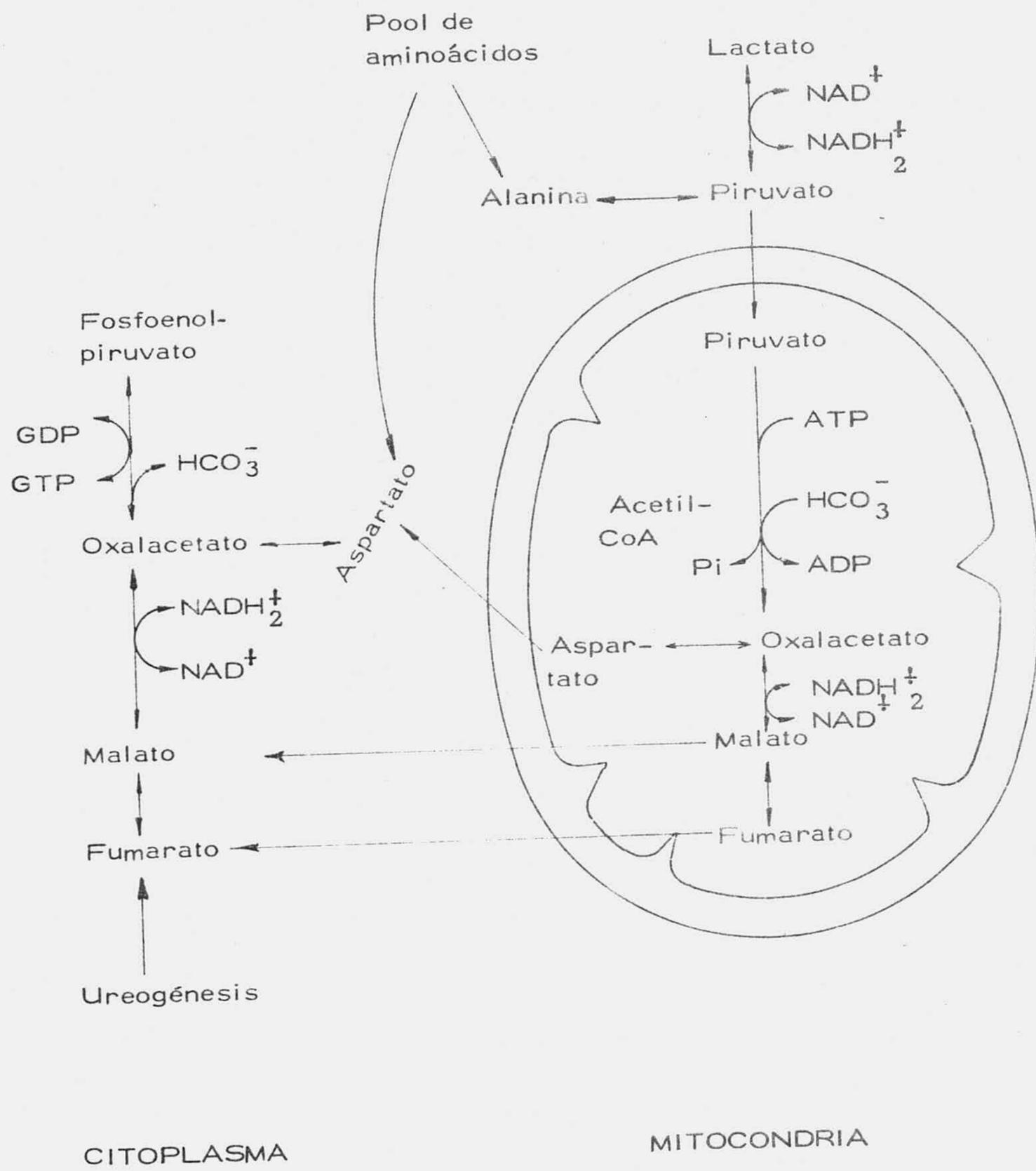
No hay establecido hasta el momento un modelo adecuado para la regulación de la PEPCK por efectores. Holten y Nordlie (26) han encontrado un efecto inhibitorio del AMP sobre la enzima mitocondrial de hígado de cobaya en sentido descarboxilante. Un efecto inhibitorio semejante es aducido también por Gevers (45) para la enzima de hígado de paloma y apoyado por los resultados obtenidos por Söling (46) en hígado perfundido de rata. Por otra parte, la enzima de hígado de cerdo es inhibida por bicarbonato y por GDP y GMP en la dirección descarboxilante (27). Los trabajos de Foster (24) sobre la enzima de hígado de rata han establecido que el  $Mg^{++}$  actúa en la formación del complejo  $Mg - ITP$  mientras que  $Mn^{++}$  se combina directamente con la enzima. Un efecto semejante al del  $Mn^{++}$  tiene el  $Fe^{++}$ , que parece ser el activador fisiológico ya que su quelación por quinolinato produce la inhibición "in vivo" de la gluconeogénesis a nivel de la PEPCK (47, 48).

Alteraciones en la concentración de OAA pueden regular la actividad de esta enzima. Dado que, como ha sido descrito en la sección 1.1.1., la PEPCK de hígado y riñón de algunas especies ani

males, rata entre ellas, es preferentemente extramitocondrial, mientras que la piruvato carboxilasa se localiza en el interior de la mitocondria el oxalacetato debe salir al espacio citoplasmático para convertirse en fosfoenolpiruvato. Ello introduce un nuevo factor en la regulación de la formación de fosfoenolpiruvato por ser la membrana mitocondrial impermeable al oxalacetato. Este metabolito debe ser convertido previamente en aspartato o malato, sustratos que pasan fácilmente esta membrana y que son reconvertidos en oxalacetato en el citoplasma. Esto es posible gracias a la existencia de sendas isoenzimas de la malato deshidrogenasa y de la glutamato oxalacetato transaminasa situadas en ambos compartimentos celulares. Este esquema para la formación de fosfoenolpiruvato en hígado de rata a partir de aminoácidos y ácidos dicarboxílicos ha sido propuesto por Shrago y Lardy en 1966 (49). y confirmado después utilizando isótopos (50) (ver esquema pag. 39 ).

Posteriormente Williamson (51, 52) ha precisado que el oxalacetato sale de la mitocondria como malato en la gluconeogénesis a partir de piruvato o alanina, y como aspartato en el caso de que sea lactato el compuesto precursor. Esto es lógico si se piensa que el malato no es solo el precursor citosólico del fosfoenolpiruvato sino que proporciona además el poder reductor requerido para convertir el 1-3 fosfoglicerato en fosfogliceraldehido, y que el piruvato o alanina al contrario que el lactato, no lo pueden proporcionar sino a través de su oxidación mitocondrial.

Berry y Kun han sugerido que la actividad de estos sistemas



de salida del oxalacetato de la mitocondria pueden ser limitantes con respecto a la velocidad del proceso gluconeogénico, y constituir por tanto un punto de control (53).

En aquellas especies cuya fosfoenolpiruvato carboxicinasasa es preferentemente mitocondrial, el fosfoenolpirúvico formado dentro de la mitocondria debe salir al espacio citoplasmático para ser metabolizado hasta glucosa. El fosfoenolpirúvico es transferido al citoplasma por el sistema de transporte de los ácidos tricarbóxicos y parece que no constituye en este caso una etapa limitante (54, 55).

Igualmente la actividad de la PEPCK se influencia por los estados de fosforilación relativos de los adenin y guanin nucleótidos, así Noce y Utter observaron que la velocidad de formación de PEPCK se incrementaba por ATP (35) y Gevers (14) encontró que la síntesis de PEP se inhibe en suspensiones de mitocondrias de hígado de paloma en presencia de agentes como dinitrofenol, que hacen disminuir la razón ATP-ADP. Ballard y col. señalan una relación semejante entre la síntesis de PEP y el estado energético celular en mitocondria de hígado de cobaya y en hígado de fetos de rata (56, 57).

Las reacciones que suministran GTP ocurren en la mitocondria, cuya membrana interna es impermeable al GDP. Ello plantea un problema análogo al de translocación del OAA. Aún no existen pruebas que permitan afirmar si existen mecanismos transportadores de GTP a través de la membrana o si existen reacciones de transfosforilación para los guanin nucleótidos en el citoplasma. Puesto que los guanin nucleótidos están presentes en el citoplasma (58) se ha postulado que la adenilatocinasasa (EC 2.7.4.3), enzima localizada en el compartimento externo de la mitocondria y por tanto con libre acceso a las sustancias

del citoplasma, puede equilibrar los adenin y guanin nucleótidos. La reacción debe ocurrir de izquierda a derecha:



Este mecanismo podría ser el responsable de los altos niveles de AMP observados en hígado de rata durante periodos de intensa gluconeogénesis. Por todo ello se ha seguido que la fuente de GTP sea el paso a nivel del cual se relaciona el metabolismo energético de la mitocondria con el control de formación del PEP.

Uno de los inhibidores más interesantes de la actividad de la fosfoenolpirúvico carboxicinasas es el ácido quinolínico, sobre todo por su utilidad en el estudio de la gluconeogénesis. Foster y col. (24) ensayaron "in vivo" (a concentraciones de  $2 \times 10^{-3}$  M) el efecto de todos los metabolitos de la glucólisis, ciclo tricarboxílico y relacionados, así como las coenzimas habituales sobre la actividad de la fosfoenolpirúvico-carboxicinasas. Solo el D-L glicerofosfato mostró cierto efecto inhibitor (23 %) pero la concentración empleada era mayor que las correspondientes a ratas ayunadas "in vivo" (59) por lo que la inhibición por glicerofosfato no parece tener implicaciones fisiológicas.

Dado que el glucagon produce un incremento en la actividad de la fosfoenolpirúvico carboxicinasas (12), siendo también un estimulante del catabolismo de aminoácidos (60) y comprobando asimismo el efecto activador de las dietas proteídicas sobre esta enzima (61) Foster y Lardy (62) ensayaron también el posible papel efector de los aminoácidos. De todos ellos, sin embargo, sólo el triptófano mostró un efecto

activante sobre la fosfoenolpiruvato carboxicinasas, efecto que se apreciaba en ratas normales o adrenalectomizadas, pero no "in vitro". El incremento producido se debe en gran parte a la modificación de la enzima puesto que es insensible a la puromicina o actinomicina D. La enzima activada tiene idénticas propiedades que la normal, excepto en lo que se refiere a su conservación. En efecto, mientras la normal no pierde actividad al conservarse a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante varios meses, la enzima modificada, que es más activa al comienzo, desciende a los niveles habituales en un lapso de diez días, y se conserva luego como en el otro caso. El cambio producido debe ser muy sutil y relacionado con grupos  $-\text{SH}$ , porque si la conservación se realiza en presencia de un protector de estos grupos, no hay pérdida alguna de actividad (24).

En contraposición con el aumento de actividad ensayable de la fosfoenolpirúvico carboxicinasas producida por el triptófano se aprecia un menor rendimiento en la gluconeogénesis, debido precisamente a la inhibición "in vitro" de dicha enzima. Efectos similares al triptófano se consiguen con L-cinurenina, L-hidroxicinurenina, 3-hidro-xiantranilato y quinolinato (48), que son productos de su metabolismo, por lo que se desprende que es el quinolinato el responsable directo de la acción. Este último metabolito es, además, el único capaz de inhibir la enzima "in vitro", en determinadas condiciones (ausencia de  $\text{Mn}^{++}$ ). Si se utiliza  $\text{Fe}^{++}$  como efector basta la adición de  $\text{Mn}^{++}$  para que se revierta por completo la inhibición producida por quinolato, tanto "in vitro" como en hígado perfundido con quinolinato. De ello se desprende que el activador natural de la enzima es el  $\text{Fe}^{++}$ .

El efecto del quinolinato "in vivo" sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa ha sido corroborado por Williamson, Mayor y Veloso (47), en hígado de rata. Snoke, Johnston y Lardy han aportado recientemente datos experimentales que refuerzan el papel del  $Fe^{++}$  como activador natural de la enzima en hígado y sugieren que la alta actividad que resulta por administración de quinolinato debe resultar de la disociación del quinolinato a partir del complejo terciario quinolinato  $Fe^{++}$  enzima al diluir el tejido (65).

La fosfoenolpiruvato carboxicinasa de corteza renal de rata es estimulada tras la ingestión de DDT, junto con las demás enzimas clave de la gluconeogénesis (66). La ingestión de ácido acetil salicílico provoca por su parte la inhibición de la enzima hepática y renal de rata (67). La enzima hepática de rata se inhibe por el tratamiento con teofilina. En este caso también se inhibe la piruvato carboxilasa y fructosa difosfatasa (68).

El consumo dietético de 1-3 butanodiol, hace aumentar esta actividad de la enzima de hígado de rata, en un 43% (69). El efecto quizás se deba en parte a que el butanodiol reemplaza parcialmente a los glúcidos en la dieta.

La actividad de la fosfoenolpirúvico carboxicinasa se relaciona también con las toxinas de origen microbiano, Berry y col. han observado que estas sustancias impiden la inducción de la enzima por los corticoides o el ayuno y reducen la activación por triptófano (70, 71).

La actividad de la fosfoenolpirúvico-carboxicinasa decrece en los hepatomas, lo mismo que la glucosa-6-fosfatasa y fructosadifosfatasa, lo que concuerda perfectamente con el carácter acusadamente glucolítico de estos tumores, que exhiben un marcado decrecimiento de la capacidad gluconeogénica (72, 73).

El carbacol (carbamil colina) reduce la actividad de la fosfoenolpiruvato-carboxicinasa de hígado de rata, sobre todo en los animales previamente alimentados con dieta rica en proteína (74). El efecto de este agente parasimpático mimético es muy interesante porque supone una nueva acción reguladora directa del sistema nervioso sobre activadores enzimáticos.

La exposición al frío hace aumentar la actividad de la fosfoenolpirúvico carboxicinasa (75), en parte por el aumento en la producción de tiroxina, pero en parte también por un efecto independiente de esta secreción hormonal, ya que también ocurre en animales tiroidectomizados (76).

#### 1.1.4.2. - A nivel de síntesis "de novo" de la enzima

Al igual que las demás enzimas llave de la gluconeogénesis la fosfoenolpiruvato carboxicinasa está sujeta a una regulación hormonal que señañe como sistema de modulación al poder autorregulador de las células hepáticas y renales.

La fracción citoplasmática de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa del hígado de la mayoría de las especies es marcadamente adap

tativa respondiendo a alteraciones hormonales y de la dieta (77) por el contrario la forma mitocondrial permanece inalterada por estos cambios, comportándose como constitutiva (78, 79). El hecho de que las dos formas de la enzima se regulen por mecanismos completamente diferentes sugirió que pudiesen ser proteínas químicamente distintas. Ello ha sido confirmado por estudios inmunológicos sobre la enzima mitocondrial y citoplasmática de hígado de rata (25), de hombre (80) y de pollo (81).

La enzima citoplasmática está ausente en hígado de fetos de rata y se desarrolla rápidamente en el momento del nacimiento (82, 83). Puede inducirse por varios agentes: glucagon, isoproterenol y AMP cíclico (84), mientras que no tiene ningún efecto sobre ella la insulina, que sin embargo bloquea la acción de estos tres agentes. La eliminación del AMP cíclico del tejido produce la inmediata interrupción del proceso de inducción (85). Yeung y Oliver (83, 86) demostraron que la PEPCK de este tejido se inducía por un parto prematuro o por inyección de glucagon, adrenalina, noradrenalina o AMP cíclico a los fetos de rata dentro del útero.

Igualmente en hígado de rata adulta la actividad de la PEPCK se incrementa por la administración de  $N^6, 21$  dibutiril AMP cíclico (87) y por catecolaminas (83). El mismo efecto poseen sobre esta enzima el ayuno y la diabetes aloxánica, efecto que puede eliminarse con una dieta de carbohidratos o por la inyección de insulina respectivamente (77, 62, 88). Se ha demostrado que este descenso en la actividad enzimática se debe a una rápida interrupción de la síntesis "de novo" de la enzima (89, 90). El dibutiril AMP cíclico previene la deinducción provocada por alimentación o por insulina (85).

Tomando como base estos resultados se ha sugerido que la PEPCK citoplasmática de hígado de rata se regula fundamentalmente por AMP cíclico a nivel post-transcripcional (85).

Hasta ahora existe gran confusión en la literatura sobre el efecto que la administración de corticoides tiene en la actividad de la PEPCK hepática. Numerosos trabajos (77, 62, 87, 91, 92) demuestran que inyecciones múltiples o sencillas de cortisona, cortisol o triamcinolona a ratas alimentadas intactas o adrenalectomizadas producen un incremento en la actividad de la enzima hepática. Similar efecto poseen las glucocorticoides sobre la actividad de la PEPCK de células de hepatoma Reuber H 35 en cultivo (93, 94). Por otra parte, algunos autores han señalado que los glucocorticoides no tienen efecto sobre la actividad de esta enzima en animales alimentados (95) mientras que decrecen su actividad en ratas ayunadas (95, 96, 62) y la incrementan en ratas diabéticas (97, 98). Estudios muy recientes de Ballard y col. parecen indicar que en la regulación de la PEPCK hepática "in vivo" está implicada una interacción insulina-glucocorticoides (99).

#### 1.1.5.- Estudio especial de la enzima de origen renal.

La fosfoenolpiruvato carboxicinaso renal a diferencia de la hepática, no parece estar vinculada tan estrechamente a la hipoglucemia, sino que está fuertemente influenciada por el estado ácido básico del organismo. En principio se pensó que su regulación no difería fundamentalmente de la de la enzima de hígado, a la vista de los resultados obtenidos por diversas manipulaciones nutricionales y hormonales. Su actividad aumenta en respuesta a la administración de glucocorticoides.

des (100) ayuno y diabetes (79). Sin embargo, los trabajos de Goodman y col. en 1966 pusieron de manifiesto que la capacidad gluconeogénica renal se incrementa por la acidosis metabólica, inducida, por ejemplo, por ingestión de cloruro amónico (101), demostrándose posteriormente que la regulación tiene lugar a nivel de la fosfoenolpiruvato carboxicinasasa (102, 103).

Kamm y Cahill han demostrado que el conocido efecto que el ayuno y la diabetes tienen sobre la PEPCK no tiene lugar cuando se previene la acidosis metabólica concomitante por ingestión de bicarbonato (104). La fosfoenolpiruvato carboxicinasasa tampoco aumenta su actividad en ratas diabéticas no acidóticas (105). Por otra parte, la ingestión de bicarbonato hace retornar lentamente a los valores basales la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasasa elevada por el ayuno (106).

Estos datos señalan que la fosfoenolpiruvato carboxicinasasa de riñón, y con ella la producción de glucosa por este órgano, está regulada fundamentalmente por las condiciones ácidobásicas del animal.

La actividad incrementada de la fosfoenolpiruvato carboxicinasasa contribuye de una manera importante a la mayor excreción de amonio urinario y, por tanto, al restablecimiento de pH normal.

## 1.2. - ACIDOSIS LACTICA

Dentro del rango fisiológico de pH el ácido láctico existe en la sangre predominantemente como lactato ionizado.

La acidosis láctica se caracteriza por un incremento en el contenido total de lactato en el cuerpo, suficiente para alterar la homeostasis ácido-base. Aunque algunos autores utilizan este término para designar una hiperlactacidemia, la expresión acidosis láctica debe reservarse para situaciones en las que a una concentración elevada de lactato en sangre se acompaña un pH arterial por debajo del valor normal.

A continuación describimos algunos de los aspectos metabólicos más importantes relacionados con la acidosis láctica. Recientemente este tema ha sido ampliamente revisado por Oliva (107) y por Cohen y Woods (108).

#### 1.2.1. - Control de la concentración de lactato en sangre

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

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

##### 1.2.1.1.- Glucolisis.

En casi todos los tejidos, excepto en tejido adiposo e hígado, la glucolisis es la ruta utilizada para producir ATP. En músculo los estudios de Margaria (109) demostraron que bajo condiciones de máximo ejercicio la provisión de energía via la glucolisis es esencial. Bajo condiciones anaerobias el único producto de la glucolisis es el ácido láctico.

En hombre y rata (110, 111) la concentración sanguínea de lactato está incrementada en el periodo neonatal, llegando a ser la concentración

hepática cinco veces la normal (112). Este incremento se debe a la alta capacidad glucolítica de los tejidos del recién nacido, hecho confirmado en el caso de la corteza renal (111), y que puede ser el responsable, como Krebs ha sugerido, de la capacidad del recién nacido para sobrevivir largos periodos de anoxia (113).

En hígado la función de la glucolisis es la conversión de carbohidratos en grasas más que la producción de ATP. En este órgano la velocidad de formación anaerobia de lactato se corresponde con la velocidad aerobia de síntesis de ácidos grasos, como parece indicar el hecho de que la velocidad de síntesis de triglicéridos en hígado de rata sea muy comparable a la velocidad de la glucolisis anaerobia. (114).

#### 1.2.1.2. - Gluconeogénesis

Mientras todos los tejidos tienen capacidad para producir lactato solo fundamentalmente dos tejidos tienen la capacidad gluconeogénica: hígado y riñón.

El hecho más importante en el control del metabolismo del lactato por la gluconeogénesis es la alta velocidad de consumo mediante este proceso de las principales precursores de glucosa: lactato y alanina, siendo ambos compuestos vehículos para el transporte de unidades de tres átomos de carbono del músculo al hígado.

Se sabe que el principal punto de control de la síntesis de glucosa a partir de lactato es la reacción catalizada por la fosfoenol-piruvato carboxinasa. Por ello muchos de los aspectos de regulación del proceso gluconeogénico están descritos en la sección 1.1. de esta memoria donde se estudian detalladamente los mecanismos de control de esta enzima. Han sido publicados magníficas revisiones bibliográficas sobre este tema por M. C. Scrutton y M. F. Utter (115), J. H. Exton (116), Hanson y col (117, 118) y New-

sholme y Start (119) revisiones que han sido descritas por los doctores L. Sanchez-Urrutia (120) y J. P. García Ruiz (121) en sus tesis doctorales.

#### 1.2.1.3. - Oxidación del lactato

La velocidad de oxidación del lactato depende más que de la enzima láctico dehidrogenasa de la enzima piruvato deshidrogenasa, cuya actividad decide si el carbohidrato pasa a convertirse en acetyl-CoA o si se resintetiza glucosa en hígado y riñón a partir de lactato.

Actualmente existe poca información acerca de la extensión en que el lactato se utiliza como fuente de energía cuando existe a concentraciones normales. Sin embargo se sabe que cuando se añade lactato a altas concentraciones, 10 mM, a cortes de cerebro, músculo cardíaco, músculo esquelético, testículo, hígado, riñón y retina se incrementa el consumo de oxígeno por estos tejidos (122). En hígado y riñón este mayor consumo puede reflejar la energía necesaria para el proceso gluconeogénico.

Existen dos situaciones en que la oxidación del ácido láctico alcanza proporciones importantes: durante el periodo neonatal, en el que los tejidos, principalmente cerebro, pueden utilizar el lactato como combustible, y cuando existe alteración en el almacenamiento de glucógeno. En esta enfermedad la degradación de glucógeno inducida por glucagón o ayuno produce un incremento en la concentración de lactato en sangre debido a que la glucosa 6-fosfato deriva hacia este metabolito al no poder convertirse en glucosa a una velocidad normal.

### 1.2.2. - Función del hígado en el metabolismo del lactato

En experiencias realizadas en hígado perfundido de rata con una concentración inicial de lactato en el medio baja, se produce lactato, piruvato y glucosa a gran velocidad durante los primeros 30 minutos de perfusión (114), momento en que se estabiliza al alcanzarse niveles de concentración similares a los encontrados en sangre de ratas alimentadas. Igual ocurre en hígados perfundidos de ratas sometidas a ayuno. Sin embargo, el hígado de ratas alimentadas incrementa la formación aerobia de lactato al añadir glucosa 200 mM. Este hecho puede deberse a la saturación de las rutas de conversión de la glucosa 6 fosfato en glucógeno o ácidos grasos. En hígado ayunado no se produce acúmulo de lactato en estas condiciones porque la actividad de la hexocinasa "in situ" es demasiado baja para iniciar una velocidad de glucolisis significativa.

En lo que concierne al hígado, datos procedentes de experiencias en órganos aislados y perfundidos sugieren que bajo condiciones normales solo una pequeña parte del lactato es convertido en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (123, 124). La mayor parte se convierte en glucosa-6-P y luego en glucosa o glucógeno. Esta evidencia está de acuerdo con el concepto del ciclo de Cori, en el que el lactato producido por glucolisis en tejidos extrahepáticos es rápidamente convertido en glucosa en el hígado, manteniendo así los niveles de glucosa sanguínea y evitando la pérdida de un combustible como el lactato, cuando la glucolisis excede al metabolismo oxidativo.

Berry (125) ha señalado el papel central del hígado en todas las formas de acidosis láctica. A partir de datos experimentales de la producción

de lactato por tejidos periféricos y consumo por el hígado, concluye que este órgano puede metabolizar más lactato del que se puede producir incluso bajo condiciones de máxima producción por tejidos extra hepáticos. Este autor sugiere que el acúmulo de lactato durante shock o durante hiperventilación se debe no solo a la sobre producción de lactato, sino también en gran parte a un menor consumo por el hígado, como consecuencia de una disminución de la circulación esplácnica y hepática.

Por otra parte, existen evidencias de que acidosis graves (pH 7.1) "per se" pueden reducir el consumo hepático de lactato circulante (123). Esta reducción parece ser en gran parte debida a los efectos que tiene un pH intracelular bajo sobre la enzima piruvato carboxilasa, enzima que cataliza el paso limitante de la velocidad del proceso gluconeogénico en hígado. La piruvato carboxilasa requiere como efector alostérico obligatorio al acetil CoA (126), cuya acción sobre la enzima hepática depende del pH intracelular, haciéndose menor al disminuir éste (126, 127, 128, 129). La enzima de pollo es inactiva "in vitro" por debajo de un pH 7.0 (115).

### 1.2.3. - Función del riñón en el metabolismo del lactato

El tejido renal puede realizar tanto la gluconeogénesis como la glucólisis, puesto que la médula tiene una amplia capacidad glucolítica y la corteza posee capacidad gluconeogénica.

El consumo de lactato por el riñón se debe a oxidación o gluconeogénesis. Mediante estos procesos se pueden eliminar considerables cantidades de ácido láctico.

La capacidad gluconeogénica renal a partir de lactato es igual ya sea medida mediante incubación de cortes de tejido o por perfusión del órgano aislado (130). Con respecto al hígado perfundido de ratas ayunadas, la capacidad gluconeogénica del riñón perfundido es cinco veces inferior. Sin embargo, "in vivo" el riñón tiene aproximadamente la mitad de la capacidad del hígado para consumir lactato. Owen y col. estimando la importancia relativa de los dos órganos en la eliminación del lactato sanguíneo en hombre encontraron que una cuarta parte del lactato era convertido en glucosa por el riñón y el resto por el hígado (131). Muy recientemente Yudkin y Cohen han señalado que la velocidad de desaparición de lactato de la circulación en ratas alimentadas a las que se ha administrado previamente ácido láctico, se reduce en un 30% tras nefrectomía bilateral. En estas condiciones la velocidad de eliminación de lactato se disminuye por acidosis metabólica, como ocurre en hígado perfundido, pero este descenso no ocurre en animales que no han sufrido la nefrectomía. Parece por tanto que los riñones compensan parcialmente el efecto negativo que la acidosis tiene sobre el consumo de lactato por el hígado, incrementando su contribución en la eliminación de lactato (132).

Los resultados obtenidos por Sanchez Medina y col. en ratas sometidas a ejercicio hacen pensar que igualmente en estas condiciones una parte considerable del ácido láctico producido es convertido en glucosa por el riñón (133).

Los trabajos de Bowman (134) mostraron que si la actividad de la piruvato carboxilasa renal se anula por un pH bajo, esta no es la enzima limitante de la velocidad de la gluconeogénesis en este órgano. Parece ser que

más bien es la fosfoenolpiruvato carboxicinasa el punto de control en el riñón, ya que la actividad de esta enzima se incrementa durante la acidosis metabólica, inducida por ingestión de cloruro amónico (102, 103, 135) tal como se ha descrito en la sección 1.1.5., lo que constituye un mecanismo por el cual se incrementa la amoniogénesis renal durante la acidosis.

El amonio excretado proviene de la glutamina por acción de la glutaminasa dependiente de fosfato; el otro producto de la reacción, el glutamato, produce una inhibición "feedback" de la glutaminasa. La actividad incrementada de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa conduce a un incremento en la gluconeogénesis a partir de glutamato, así como de  $\alpha$ -cetoglutarato u oxalacetato que impide la inhibición de la glutaminasa y conduce a una mayor amoniogénesis para tamponar el ión hidrógeno secretado (101)(Ver esquema en la página siguiente).

El descubrimiento del incremento en la capacidad gluconeogénica renal durante la acidosis metabólica mereció la atención de numerosas investigaciones dando origen a un gran número de trabajos y revisiones bibliográficas (136-142).

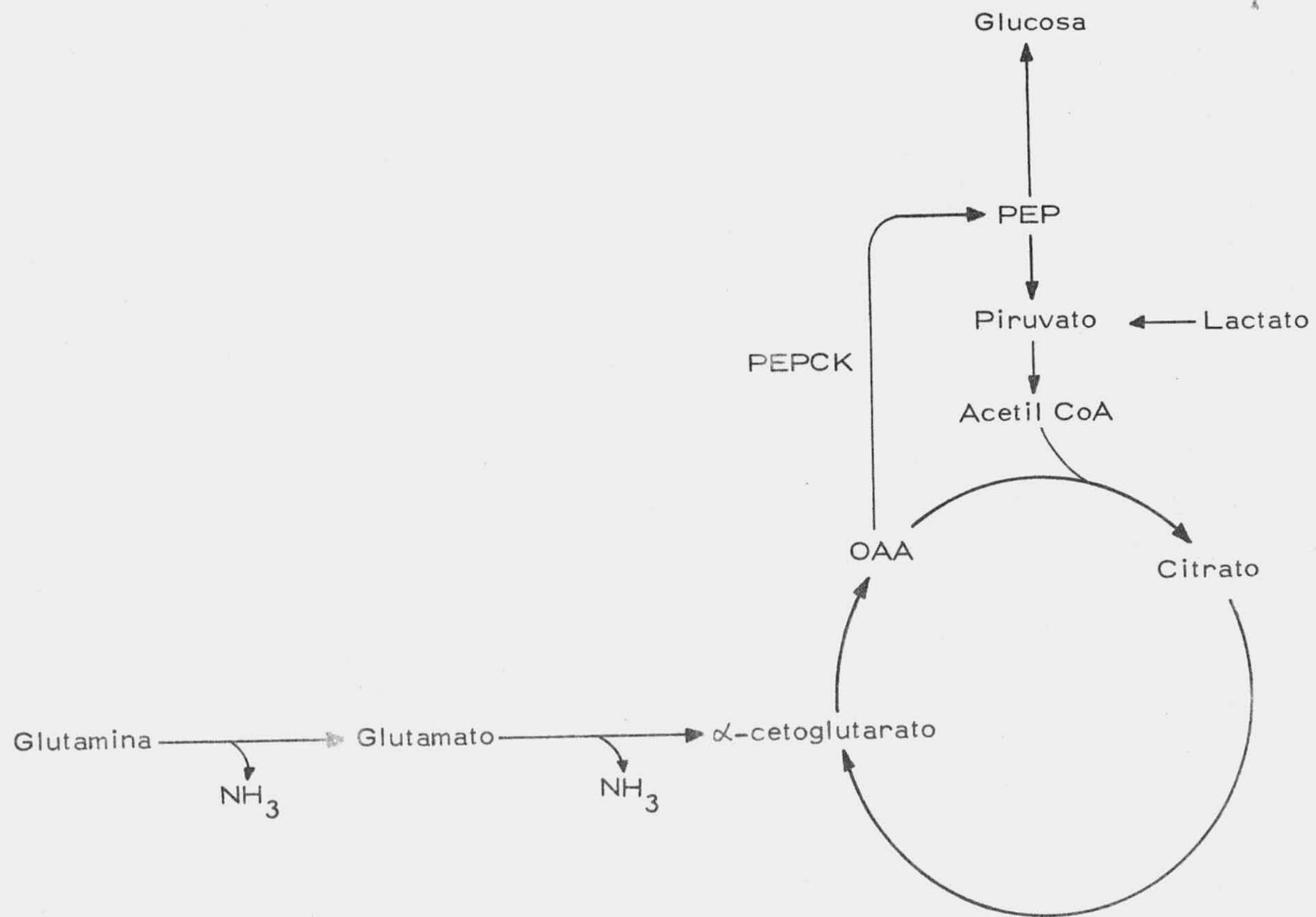
#### 1.2.4. - Tipos de acidosis láctica

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



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

$$\text{Lactato} = \text{Piruvato} \times \text{NADH} / \text{NAD}^+$$



Relaciones entre la producción de amonio y la gluconeogenesis en la corteza renal

PEP = Fosfoenolpiruvato, PEPCK = Fosfoenolpiruvato carboxicinas, OAA = Oxalacetato

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

Teóricamente entonces, un incremento en la concentración de lactato puede ocurrir por dos mecanismos: A) alteración de la concentración de lactato por cambios en la concentración de piruvato sin cambio de la razón  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ , o B) alteración en la concentración de lactato por cambios en el estado de oxidación del  $\text{NAD}^+$  sin cambio en el piruvato. Este último caso raramente ocurre en la forma pura puesto que normalmente se acompaña de un ligero incremento en la concentración de piruvato debido a un cambio de ventilación, glucosa o pH.

La situación A puede alcanzarse de varias maneras. Por ejemplo, por inyección intravenosa de bicarbonato sódico (143) o por administración oral o intravenosa de glucosa (143, 144). La razón lactato: piruvato a menudo se incrementa también durante hiperventilación.

Por otra parte, la situación B se produce por cualquier causa de hipoxia tisular. El estado de oxidación del  $\text{NAD}$  varía constantemente dependiendo del suministro de oxígeno a los tejidos. La hipoxia se traduce en un incremento en la forma reducida del  $\text{NAD}$  y consecuentemente en una acumulación de lactato, que no puede ser oxidado. En estas condiciones el incremento en la concentración de lactato no está asociado a un incremento en la concentración de piruvato. Por tanto la razón lactato: piruvato aumenta. Huckabee ha llamado al lactato así formado lactato en exceso (143).

A pesar de que este concepto está plenamente aceptado, Olson (145) y Alpert (146) ponen en duda la validez de igualar la razón lactato: piruvato en sangre con el estado de oxidación del tejido. Estos autores arguyen que puesto

que existen pools separados de  $\text{NADH}$  y  $\text{NAD}^+$  en citoplasma y mitocondria y puesto que la razón lactato : piruvato sanguínea depende sobre todo del sistema  $\text{NAD}^+$ -  $\text{NADH}$  citoplasmático, esta razón puede no reflejar los cambios sufridos por el sistema  $\text{NAD}^+$ -  $\text{NADH}$  mitocondrial, sistema que en definitiva es el último determinante de la oxidación del tejido. Sin embargo aunque la mitocondria sea relativamente impermeable al  $\text{NAD}^+$ -  $\text{NADH}$  citoplasmática, existen sustancias transportadoras, como glicerofosfato y acetoacetato, que transfieren hidrógeno de  $\text{NAD}^+$  citoplasmático al mitocondrial.

#### 1.2.4.2. - Acidosis láctica producida por el ejercicio muscular.

Está perfectamente establecido que durante el ejercicio se incrementa la glucólisis anaerobia en las células del músculo esquelético con la consiguiente sobreproducción de lactato.

Cuando la cantidad de ATP que se regenera por fosforilación oxidativa es menor que la cantidad ATP usado en la contracción muscular, la  $\text{pO}_2$  intracelular decrece y las razones  $\text{ADP} / \text{ATP}$  y  $\text{AMP} / \text{ATP}$  se incrementan. De acuerdo con Krebs y Veech (147) los cambios en el sistema de los nucleótidos adenílicos citoplasmáticos están ligados a cambios en las razones  $\text{NADH} / \text{NAD}^+$  y  $\text{NADPH} / \text{NADP}^+$  mitocondriales, los cuales a su vez se reflejan en cambios en las razones citoplasmáticas. Por tanto un suministro insuficiente de  $\text{O}_2$  tiende a incrementar la concentración citoplasmática y mitocondrial de  $\text{NADH}$ , y con ello la concentración de lactato.

Sin embargo la producción de lactato varía considerablemente de acuerdo con las condiciones del ejercicio, y muy especialmente, para el caso de la natación, con la temperatura del agua. Así por ejemplo Gollnick (148-150)

no encuentra variaciones significativas de lactato en sangre en ratas tras 30 minutos de natación en agua a 35 ° C. Por otra parte, Dawson y col (151) ha determinado los valores de lactacidemia en ratas que nadaron en agua a 37°C y a 22°C. En el primer caso, los animales fueron capaces de completar 30 minutos de natación sin dar señales de agotamiento, siendo el incremento de lactato en sangre desde 1.8 mM hasta 5,2 mM en los primeros 3 minutos y bajando hasta 2.3 mM a los 30 minutos. En las ratas que nadaron en agua a 22°C, el incremento en la concentración de lactato sanguíneo fue muy grande en los 3 primeros minutos (10.5 mM), decreciendo al mismo ritmo que en el caso anterior.

Jervell (152) fue uno de los primeros que observó que la concentración de lactato en sangre podía descender a mayor velocidad, si durante el periodo de recuperación se hacía un ejercicio moderado en lugar de reposo. Varios investigadores señalaron la importancia del hígado en la eliminación de lactato durante el ejercicio (153, 154, 155). Además del hígado, el músculo esquelético y otros tejidos pueden consumir lactato durante el trabajo muscular (156, 157, 158, 159). De acuerdo con Rowell y col. (160, 161) el 50% aproximadamente de la cantidad total de lactato eliminado en estas condiciones era consumido por el hígado.

#### 1.2.2. - Acidosis láctica producida por una situación de estrés

Se sabe que la administración de adrenalina eleva los niveles de lactato en sangre en animales de experimentación y en hombre (162, 163).

Dos factores podrían ser los responsables de este incremento. El primero de ellos sería el efecto glucogenolítico en músculo de la adrenalina y el segundo la anoxia tisular resultante de una preponderancia del efecto vasoconstrictor sobre el efecto vasodilatador de la adrenalina. Sin em-

bargo, la noradrenalina es mucho menos eficaz que la adrenalina causando niveles elevados de lactato sanguíneo a pesar de que es un vasoconstrictor mucho más potente (164, 165). Además la administración de adrenalina en dosis relativamente pequeñas incrementa el riego sanguíneo hepático en hombre, mientras que la noradrenalina produce una ligera reducción (164). Estos hallazgos indican que la producción de lactato por la adrenalina no está relacionada con la anoxia resultante de la disminución de riego sanguíneo.



II. - PARTE EXPERIMENTAL



## 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 estándar 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 ± 0,01 mg).

Para la medida del pH se utilizó un pHómetro Beckman Expandomatic SS-2 (pH ± 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 esmerilar.

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: ± 0,1°C).

Las incubaciones de los cortes de tejido de corteza renal 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 ambos 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 de la enzima se realizó en tubo especial tipo Wis-king Tubing 8/32.

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

Se ha utilizado sangre humana como fuente de hematies conservados por espacio de 3-4 semanas a 4°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

hematíes 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.

Las medidas de pH y  $pCO_2$  en sangre fueron hechas en un pH meter 72 MK2 Digital Acid-Base Analyzer (BM 83 MK2 Blood Micro System) (Radiometer, Copenhagen, Deunmark).

## 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 procedía de Sigma

La heparina procedía de los laboratorios Leo (Madrid) y la ortodiansidina procedía de Fluka, Ab. Bush S. G. Suiza. El nembutal, cortésa de los laboratorios ABBOT.

## 2. 3. - METODOS

### 2. 3. 1. - Tratamiento de los animales de experimentación

#### 2. 3. 1. 1. - Ejercicio

Las ratas han sido forzadas a nadar en recipientes de plástico con capacidad de 50 l. llenos de agua hasta una altura próxima al borde, de manera que no pueden descansar en el fondo ni asirse a las paredes.

Se han empleado distintos tiempos de natación: 5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos.

#### 2. 3. 1. 2. - Bicarbonato sódico

El bicarbonato sódico se administró en dosis de 10 ml. de solución 200mM por intubación gástrica con jeringa provista de una cánula de plástico.

En todos los casos los animales que se utilizaron como controles recibieron idéntico tratamiento, sustituyendo el bicarbonato por solución salina fisiológica.

#### 2. 3. 1. 3. - Actinomicina D

La actinomicina se inyectó intraperitonealmente en una sola dosis de 1 g / Kg peso de rata, disuelta en 1 ml. de solución salina treinta minutos antes de comenzar un periodo de natación de dos horas.

A los controles se les inyectó el mismo volumen de solución salina.

#### 2. 3. 1. 4. - Cicloheximida

La cicloheximida se inyectó intraperitonealmente en una sola dosis de 1 g/Kg de peso de rata, disuelta en 1 ml. de solución salina tres horas antes del comienzo de la natación y cinco horas antes de la muerte del animal.

A los controles se les inyectó el mismo volumen de solución salina.

#### 2. 3. 1. 5. - Ayuno

Las ratas fueron sometidas a este tratamiento durante 48 ó 12 horas. Para ello se separaron en jaulas privándoles de alimento, pero dejándoles libre acceso al agua.

#### 2. 3. 1. 6. - Acido 5-metoxindol-2-carboxílico (MICA)

El MICA se administró en dosis de 50 mg/Kg de peso de animal por inyección intraperitoneal de 1 ml. El tratamiento se hizo 3 horas antes del sacrificio de la rata. La solución de MICA era previamente neutralizada con NaOH.

#### 2. 3. 1. 7. - Estrés térmico

##### a) Agua fría

Los animales fueron mantenidos en recipientes de plástico de 50 l.

de capacidad con agua hasta una altura que les permitía apoyarse en el fondo y permanecer cubiertos casi en su totalidad, evitándose así que hiciesen ejercicio.

La duración del tratamiento ha sido de 15 y 120 minutos. El agua se mantuvo a 22°C durante las experiencias.

#### b) Temperatura ambiental elevada

Los animales estuvieron sometidos a una temperatura ambiental aproximadamente 30°C, tanto de día como de noche.

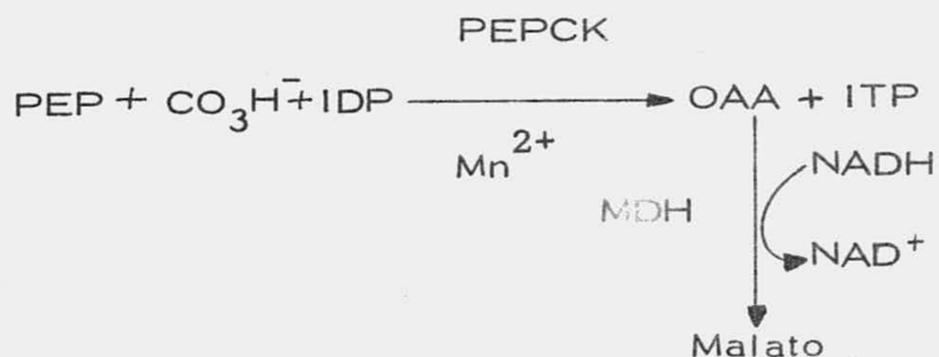
#### 2.3.1.8. - Situación estresante de cada duración

Los animales fueron suspendidos durante un periodo de tiempo variable (2, 5, 10 y 15 minutos) en una malla, que era movida continuamente.

### 2.3.2. - Determinación de la actividad enzimática de la fosfoenolpiruvato carboxilasa

La determinación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa en la dirección carboxilante con el sistema málico deshidrogenasa-NAD<sup>+</sup>/NADH acoplado se ha realizado por el método puesto a punto en nuestro Departamento por Pilar Antonio Oriola ( 166 ), descrito en su tesina.

La carboxilación enzimática del PEP se realiza con CO<sub>3</sub>HNa, utilizando IDP como nucleótido coenzimático y Cl<sub>2</sub>Mn como efector. Para proteger los grupos -SH de la enzima se adiciona al medio glutatión reducido. El OAA formado se reduce a malato en presencia de NADH y málico deshidrogenasa.



#### a) Obtención del extracto de tejido

Se han homogenizado 200 mg de tejido fresco, hígado o corteza renal, en 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 a 4°C durante 40 minutos. En el sobrenadante se determina la actividad de la fracción citoplasmática de la enzima.

## b) Reactivos

Tampón Tris-Clorhídrico 0.1 M, pH 7.4

Tampón Fosfato-Sódico 0.01 M, pH 7.5

Tampón Tris-sacarosa 0.01:0.25 M pH 7.4

Solución de  $Cl_2Mn$  1/33 M

Solución extemporánea de fosfoenolpiruvato 1/33 M

Solución extemporánea de IDP 1/33 M

Solución extemporánea de glutation reducido (GSH) 0.01M

Solución de  $CO_3HNa$  0.1M gaseada con carbógeno momentos antes de llenar las cubetas.

Málico deshidrogenasa (MDH) (E. C. 1.1.1.37) dializada en 1/200 ml de tampón fosfato sódico 0.01 M, pH 7.5 durante 12 horas.

Extracto obtenido al 1/10 en tampón Tris-sacarosa 0.01:0.25 M, pH:7.4

## c) Técnica

Se preparan las cubetas según el siguiente protocolo:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón Tris-ClH	1.00 ml	1.00 ml
$Cl_2Mn$	0.10 ml	0.10 ml
PEP	0.10 ml	0.10 ml
IDP	0.15 ml	0.15 ml
$H_2O$ destilada	0.80 ml	0.90 ml
GSH	0.20 ml	0.20 ml
$CO_3HNa$	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.

#### d) Cálculos

La actividad se expresa en nmoles de OAA producidos por minutos y mg de proteína. Para el cálculo se tienen en cuenta las diluciones sufridas por el extracto durante el proceso:

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

- $\Delta E$  = Valor medio del incremento de la densidad óptica en un minuto  
 $V$  = Volumen total de la cubeta  
 $\epsilon$  =  $6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$  = coeficiente de extinción molar del NADH 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

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

### 2.3.3.1. - Tratamiento de los tejidos. Técnica del congelado instantáneo

Ha sido demostrado que la concentración de ciertos metabolitos varía entre otros motivos con la duración de la muerte del animal, debido a que no se paran los sistemas enzimáticos e incluso algunos de ellos se inducen por la situación de estrés producida en los momentos que preceden inmediatamente a la muerte. Para sorprender las concentraciones de los metabolitos lo más cercano posible al estado "in vivo" se ha empleado la técnica del "congelado instantáneo" ( 167, 168 ).

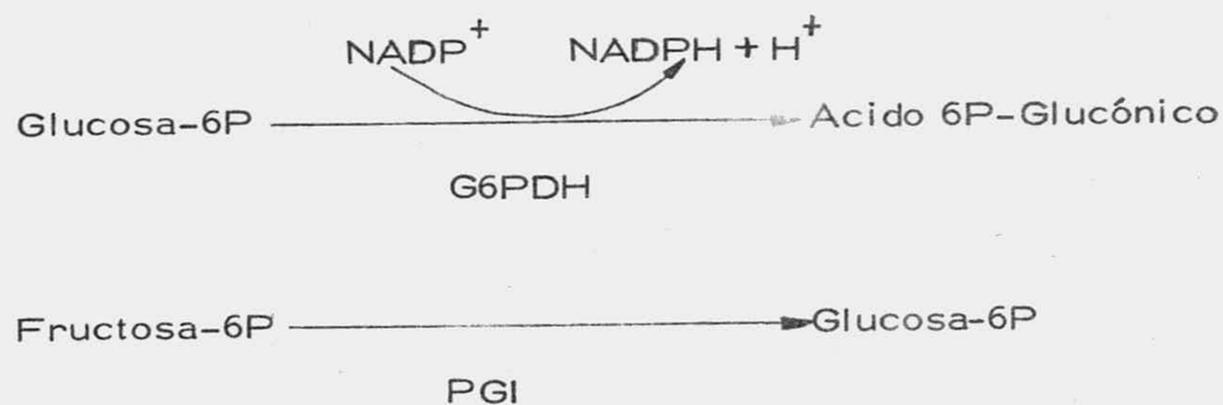
En el "congelado instantáneo" se mata la rata por dislocación cervical. Rápidamente se practica una incisión abdominal y se extrae el hígado o riñones que son comprimidos entre dos placas de aluminio enfriadas en nitrógeno líquido. El tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la congelación no 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-Elvehjeim 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.

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

La observación de la cantidad de glucosa-6P y fructosa-6P de una muestra preparada según 2.3.3.1. se ha hecho espectrofotométricamente por la formación de NADPH paralela a la oxidación de glucosa-6P y fructosa-6P seguida a la adición de glucosa 6P-deshidrogenasa (G6PDH) y fosfoglucosa isomerasa (PGI) a pH 7.6 según el método de H. Klotzsch ( 169 ).



#### a) Reactivos

Tampón Trietanolamina 0,4 M, pH 7.6

Solución de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  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. 1.

#### 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 <sub>2</sub> Mg	0. 01 ml	--
Muestra	1. 50 ml	--
G6PDH	0. 01 ml	--
PGI	0. 01 ml	--

La lectura se hace a 340 nm y temperatura ambiente. El  $\Delta E_1$  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  $\text{cm}^2 / \text{M}$

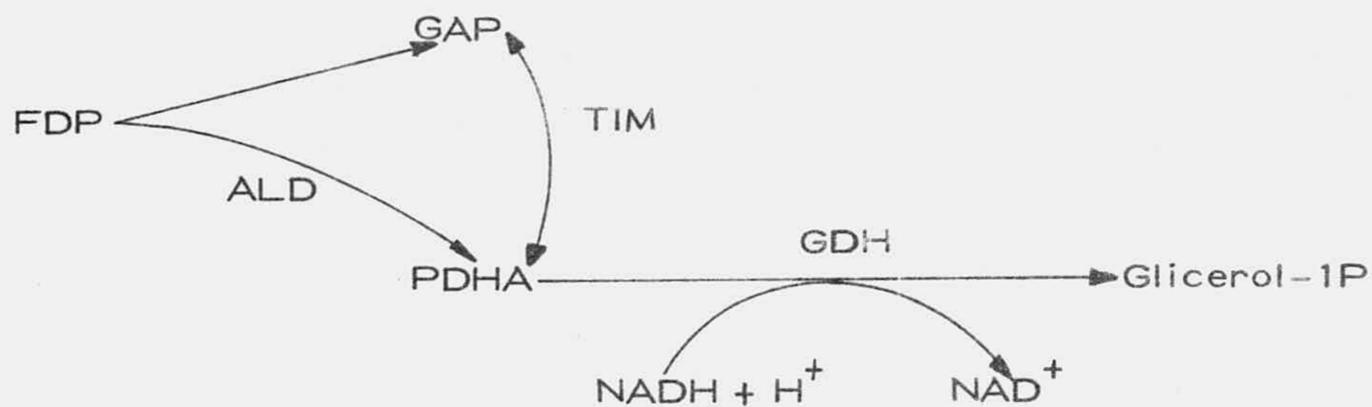
V = ml de muestra neutralizada

$V_t$  = volumen total del extracto ácido = volumen inicial de neutralización  
- peso en gramos de tejido x 0.75

P = peso en gramos del tejido fresco

### 2.3.3.3. - Determinación enzimática de fosfodihidroxiacetona, gliceral - dehido-3-fosfato y fructosa 1-6 difosfato

Los tres metabolitos, fosfodihidroxiacetona (PDHA), gliceraldehido-3 fosfato (GAP) y fructosa 1-6 difosfato (FDP), se han observado en la misma determinación espectrofotométrica según el método de T. Bücher ( 170 ) con el fundamento siguiente:



#### a) Reactivos

Tampón Trietanolamina 0,4 M, pH 7.6

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

Glicerol-1P deshidrogenasa (GDH) (E.C. 1.1.1.8) comercial

Triosafosfato isomerasa (TIM) (E.C. 5.3.1.1.) comercial

Aldolasa (ALD) (E.C. 4.1.2.7.) comercial.

#### b) Técnica

Se han preparado 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.

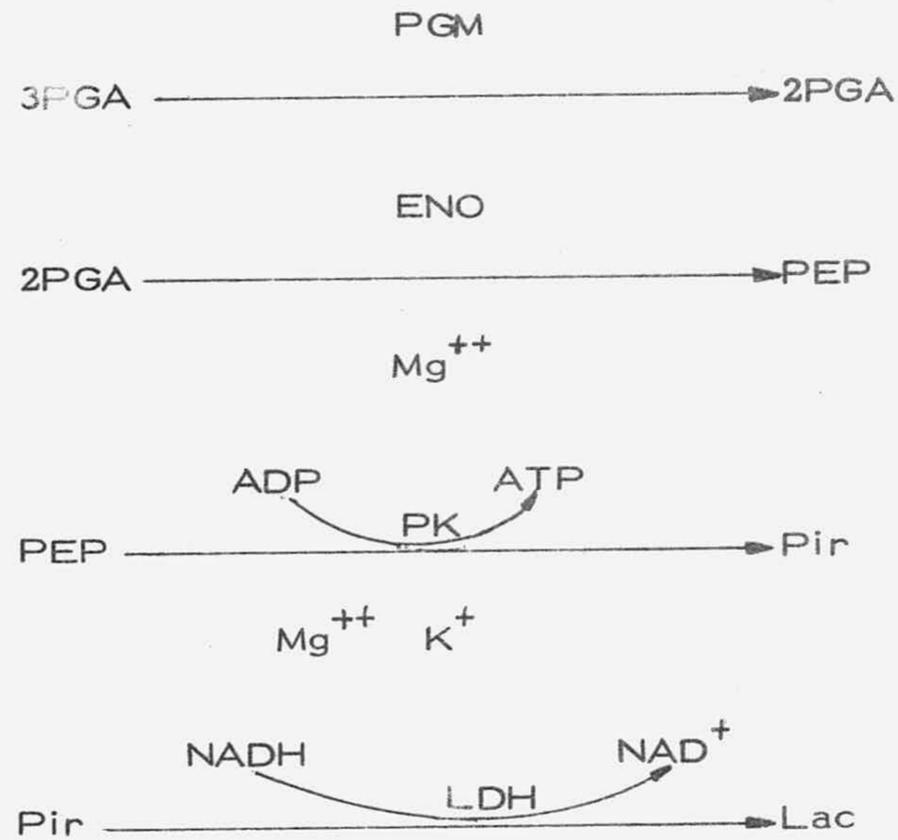
#### c) Cálculos

Se expresa en nmoles de metabolito transformado por gramo de tejido fresco. Hay que tener en cuenta que por cada FDP se consumen 2 de NADH. Los cálculos son iguales a los de la sección 2.3.3.2.

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

El análisis de piruvato (Pir), fosfoenolpiruvato PEP, 2-fosfoglicerato (2PG) y 3-fosfoglicerato (3PG) se ha realizado en una sola determinación escalonada, según el método de Bergmeyer y col. ( 171 ).

El fundamento es el siguiente:



a) Reactivos

Tampón trietanolamina 0,4 M, pH 7.6

Solución de ClK 2 M

Solución de  $\text{SO}_4\text{Mg}$  0,5 M

Solución extemporánea de ADP 0.01 M  
 Solución extemporánea de 2-3 dPG 0.01 M  
 Solución extemporánea de NADH  $5 \times 10^{-3}$  M  
 Fosfogliceromutasa (PGM) (E.C. 2.7.5.3.)comercial  
 Enolasa (ENO) (E.C. 4.2.1.11) comercial  
 Piruvato cinasa (PK) (E.C. 2.7.1.40) comercial  
 L-lactato deshidrogenasa(LDH) (E.C. 1.1.1.27)  
 comercial.

b) Técnica

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

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	0,50 ml	2,64 ml
ClK	0,20 ml	--
SO <sub>4</sub> Mg	0,10 ml	--
ADP	0,20 ml	--
2-3 dPG	0,05 ml	--
NADH	0,05 ml	--
Muestra	1,50 ml	--
LDH	0,01 ml	--
PK	0,01 ml	--
Eno	0,01 ml	--
PGM	0,01 ml	--

Los  $\Delta E$  encontrados en la determinación espectrofotométrica a 340 nm y temperatura ambiente, seguidos a la adición de los enzimas por el orden de protocolo y esperando siempre que se consuma el NADH correspondiente a cada metabolito antes de añadir el siguiente enzima, 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 nmoles de metabolito existente en gramo de tejido fresco, según lo citado en la sección 2.3.3.2.

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

El L-malato se ha determinado oxidándolo enzimáticamente a oxalacetato mediante la enzima málico deshidrogenasa a pH 9.5 según ha descrito H. J. Hohorst ( 172 )



### 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.

### 2.3.3.6. - Determinación enzimática de oxalacetato

El oxalacetato se ha determinado reduciéndolo enzimáticamente a malato mediante la enzima L-malato deshidrogenasa a pH 7.6 según ha descrito A. W. Wahlefeld ( 173 )



a) Reactivos

Tampón trietanolamina 0.4 M pH 7.6  
 Solución extemporánea de NADH  $5 \times 10^{-3}$  M  
 L-Malato deshidrogenasa (MDH) (E. C. 1. 1. 1. 37)

b) Técnica

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

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

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

c) Cálculos

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

### 2.3.3.7. - Determinación enzimática de L-lactato

El L-lactato se determina enzimáticamente oxidándolo con NAD mediante el enzima lactato deshidrogenasa (LDH) a pH 9.5 según ha descrito K. GAWEHN (174)



#### a) Reactivos

Tampón hidrazina-glicocola 0.9:1 M, pH 9.5

Solución extemporánea de NAD al 0.5%

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

#### b) Técnica

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

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

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.

### c) Cálculos

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

### 2.3.4. - Determinación de la capacidad gluconeogénica hepática.

#### Técnica de perfusión hepática

El método de perfusión hepática basado en las técnicas de Miller y col ( 175 ) y Schimassex ( 176 ) ha sido descrito por Hems y col. ( 177 ) y ha sido puesto a punto en nuestro Departamento por J.M. Medina en su tesis Doctoral ( 178 ).

El medio de perfusión está compuesto por solución salina Krebs-Henseleit ( 179 ), 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°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. El lactato se añade en una concentración de 10mM. El tiempo total de perfusión ha sido 135 min. dejando los 40 primeros para su estabilización.

### 2.3.5. - Determinación de la capacidad gluconeogénica de la corteza renal

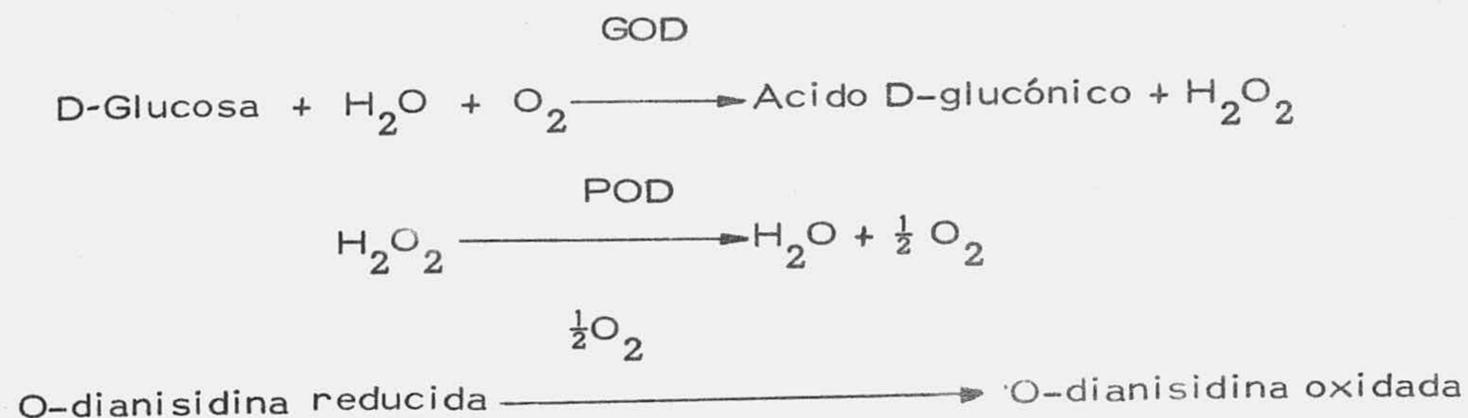
Se ha empleado el método de Krebs y col. (180) que ha sido puesto a punto y descrito detalladamente por J.P. García Ruiz en su Tesina de Licenciatura (181).

El método consiste en la incubación de cortes de la corteza renal en un medio Krebs-Henseleit (179) 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 indicará en la sección 2.3.6. 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.

### 2.3.6. - 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. (182). 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  $\beta$ -D glucosa que puedan existir en las muestras también se determinan al estar la GOD comercial acompañada de pequeñas cantidades de mutarrotasa.

#### a) Reactivos

Tampón Fosfato, Tris-ClH 0, 2:0, 1 M pH 7. 3

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

Solución estándar de glucosa 0, 2 mM

Glucosa-oxidasa (GOD) (E. C. 1. 1. 3. 4)comercial 9. 3 mg para 75 ml de mezcla enzimática.

Peroxidasa (POD) (E. C. 1. 11. 1. 7)comercial, 3 mg para 75 ml de mezcla enzimática.

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

### b) Técnica

Se preparan los siguientes tubos con las cantidades siguientes:

	<u>Blanco</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>	<u>S3</u>	<u>Muestra</u>
Solución estándar 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 estándar y sus respectivas concentraciones de 0.1, 0.15 y 0.20  $\mu$ moles de glucosa. Así se obtiene los  $\mu$ moles de glucosa existentes en 0.5 ml de muestra neutralizada.

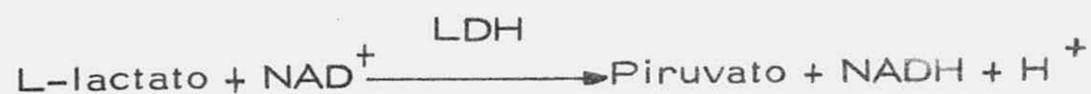
Los cálculos son diferentes dependiendo de que la muestra proceda de una toma de sangre, del medio de perfusión hepática ó del líquido de incubación de los cortes de corteza renal, teniendo en cuenta el volumen de que proceden y la neutralización o dilución realizada en cada caso, y la expresión a que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

### 2.3.7 - Determinación de glucosa en sangre

La sangre se extrae de la aorta abdominal de ratas anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg) con jeringa heparinizada. De ella se toman 0.5 ml que se desnaturalizan con 4 ml de perclórico al 2% (v/v). En la muestra desnaturalizada y neutralizada se determina la glucosa como se indicó en la sección 2.3.6. Los resultados se expresan en  $\mu$ moles de glucosa existentes en 1 ml de sangre.

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

La obtención y tratamiento de las muestras se ha descrito anteriormente (sección 2.3.7.). 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 (172)



#### a) Reactivos

Tampón Hidrazina:glicocola o. 4: 1 M, pH 9.5

Solución extemporánea de NAD al 0.5%

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

### b) Técnica

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

	<u>Muestra</u>	<u>Control</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	1.50 ml	1.50 ml	1.50 ml
NAD	0.40 ml	0.20 ml	0.40 ml
Muestra	0.50 ml	--	--
Agua destilada	0.70 ml	1.40 ml	1.20 ml
LDH	0.02 ml	0.02 ml	--

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

### c) Cálculos

Los  $\mu\text{moles}$  de L-lactato por ml de sangre, vienen dados por la expresión:

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

siendo:

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

V = volumen de la cubeta

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

d = espesor de la cubeta

v = volumen de la muestra

F<sub>1</sub> = factor de neutralización

F = factor de dilución

### 2.3.9. - Determinación del pH, pCO<sub>2</sub> y concentración de CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> en sangre

La sangre se obtiene de la aorta abdominal de ratas anestesiadas (60 mg pentobarbital sódico/kg de peso) extraída con jeringa heparinizada. Las medidas se hacen en condiciones anaerobias introduciendo por inyección pequeñas cantidades de sangre (50 µl aproximadamente) en la cámara dispuesta a este efecto en el aparato. Se mide el pH y pCO<sub>2</sub> en este orden. Para obtener la concentración de bicarbonato en sangre (mEq/l sangre) se ha utilizado un monograma de líneas de Siggaard-Andersen.

### 2.3.10. - Determinación de 3-hidroxiacetato en sangre

Se ha utilizado el método enzimático descrito por D.H. Williamson y J. Mellanby (1933), consistente en la oxidación del 3-hidroxiacetato por la enzima 3-hidroxiacetato deshidrogenasa (3-HBDH) y NAD.



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

### a) Reactivos

Tampón Tris 0,1 M, pH 8.5

Tampón Tris-hidrazina pH 8.5

Se prepara mezclando 1 ml de hidrato de hidrazina, 20 mg de EDTA -  $\text{Na}_2\text{H}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$ , 5 ml de ClH 1N y 14 ml de tampón tris 0.2 M. Debe prepararse cada día.

Solución de  $\beta$ -NAD 14 mM

3-Hidroxibutirato deshidrogenasa (3-HBDH)

E.C. 1.1.1.30

### b) Técnica

Se preparan las cubetas siguiendo el protocolo:

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

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

### c) Cálculos

Las cantidades de 3-hidroxiacetato se expresan en  $\mu$ moles existentes en 1 ml de sangre.

### 2.3.11.- Determinación de acetoacetato en sangre

El acetoacetato se ha determinado por reducción enzimática a 3-hidroxiacetato mediante la enzima 3-hidroxiacetato deshidrogenasa según el método de S. Mellanby y D.H. Williamson descrito en la sección anterior (2.3.10)

#### a) Reactivos

Tampón fosfato 0.1 M; pH 7.0

Solución de  $\beta$ -NADH 6 mM

3-Hidroxiacetato deshidrogenasa (3-HBDH)

E.C. 1.1.1.30

#### b) Técnica

Pipetear en las cubetas:

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

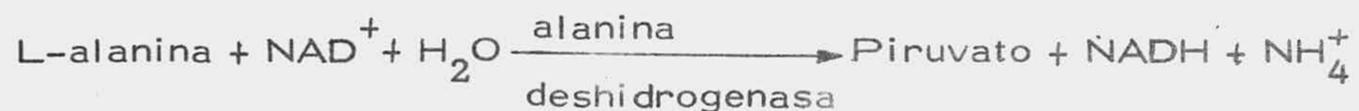
El descenso de extinción debido a la oxidación del NADH es proporcional a la cantidad de acetoacetato presente. Medir a 340 nm y a temperatura ambiente.

### c) Cálculos

Los cálculos son iguales a los de la sección 2.3.7. Los valores obtenidos se expresan en  $\mu$ moles de acetoacetato por ml - de sangre.

### 2.3.12. - Determinación de L-alanina en sangre

Se ha realizado según el método de D.H. Williamson ( 184 ) que utiliza la enzima L-alanina deshidrogenasa.



### a) Reactivos

Solución de tris 0.2 M

Tampón tris-hidrazina (tris 40 mM, hidrazina 1 M, EDTA 1.4 mM; pH 10.0)

Solución de  $\beta$ -NAD 24 mM

L-alanina deshidrogenasa. Preparación enzimática dializada frente a tampón fosfato 20 mM, pH 7.4 para eliminar los iones  $\text{NH}_4^+$

## b) Técnica

Pipetear en las cubetas:

	<u>Muestra</u>	<u>Control</u>	<u>Blanco</u>
Tampón tris- hidrazina	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Solución de NAD	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Muestra	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
Alanina deshi- drogenasa	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml

El incremento en la extinción a 340 nm debido a la formación de NADH es una medida de la alanina existente

## c) Cálculos

Los valores hallados se expresan como  $\mu\text{moles /ml}$  de sangre.

### 2.3.13. - Determinación de amoníaco en sangre

La muestra de sangre se obtiene como se ha descrito anteriormente en la sección 2.3.8. El amoníaco se ha determinado enzimáticamente según el método de E. Kun y E. B. Kearney (1955). El método utiliza la aminación reductora de 2-cetoglutarato catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GIDH).



### a) Reactivos

Tampón fosfato 0.2 M ; pH 7.6

Solución de NADH al 0.5 %

Solución de ADP 0.1 M

Solución de  $\alpha$ -KG 0.3 M

Glutamato deshidrogenasa (GIDH)(E.C. 1.4.1.2. )  
disuelta en glicerol.

### b) Técnica

Pipetear dentro de las cubetas:

	<u>Muestra</u>	<u>Control</u>	<u>Blanco</u>
Tampón fosfato	1.5 ml	1.5 ml	3.1 ml
H <sub>2</sub> O desionizada	0.4 ml	1.4 ml	--
NADH	0.1 ml	0.1 ml	0.05 ml
ADP	0.01 ml	0.01 ml	--
$\alpha$ -KG	0.1 ml	0.1 ml	--
Muestra	1 ml	--	--
GIDH	0.02 ml	0.02 ml	--

Las medidas se hacen a temperatura ambiente y a  
340 nm.

### c) Cálculos

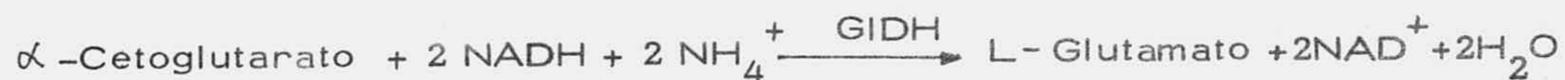
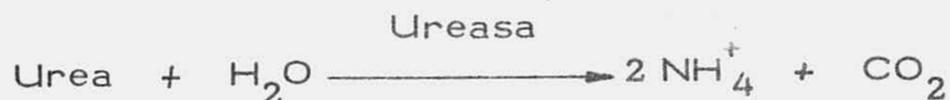
Los resultados se expresan como  $\mu$ moles de amoníaco por ml de sangre.

### 2.3.14. - Determinación de urea en plasma

El plasma se ha obtenido a partir de sangre extraída como se describe en la sección 2.3.9. Para ello las muestras de sangre se han centrifugado durante 20 minutos a baja velocidad y a 4°C.

La urea se ha determinado mediante una hidrólisis enzimática con ureasa que conduce a la formación de amoníaco y de CO<sub>2</sub>.

El amoníaco formado se determina con la ayuda de la glutamato deshidrogenasa tal como se describió en la sección anterior (2.3.13) ( 185 ).



#### a) Reactivos

Tampón trietanolamina 0.2 M ; pH 8.6

Solución de 2-cetogluturato 0.3 M neutralizada

Solución de  $\beta$ -NADH al 0.5%

Solución de ADP 0.1 M

Glutamato deshidrogenasa (GIDH) (E.C. 1.4.1.2)

disuelta en 50% glicerol.

Ureasa (E.C. 3.5.1.5.) disuelta en 50% glicerol.

### b) Técnica

Llenar las cubetas según el protocolo siguiente:

	<u>Muestra</u>	<u>Control</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	1.9 ml	1.9 ml	3.1 ml
H <sub>2</sub> O desionizada	0.9 ml	1.02 ml	--
ADP	0.01 ml	0.01 ml	--
α-KG	0.1 ml	0.1 ml	--
NADH	0.1 ml	0.1 ml	0.05 ml
Muestra	0.1 ml	--	--
Ureasa	0.02 ml	--	--
GIDH	0.02 ml	0.02 ml	--

Los cambios de extinción se miden a 340 nm y a temperatura ambiente.

### c) Cálculos

Hay que tener en cuenta que cada molécula de urea da lugar a dos de amoníaco. Los valores hallados se expresan como  $\mu$ moles de urea en un ml de plasma.

2.3.15. - Determinación de la capacidad ureogénica hepática mediante perfusión

Se ha determinado mediante el método de perfusión hepática descrito en la sección 2.3.4. utilizando como sustrato  $\text{CINH}_4$  10mM y midiendo la desaparición del ion amonio del medio y la aparición de urea durante el tiempo de perfusión. Tanto el ion amonio como la urea se han determinado por análisis enzimático como se ha descrito en las secciones 2.3.13. y 2.3.14. respectivamente.

2.3.16. - Determinación del consumo de cuerpos cetónicos por el riñón

Se ha empleado el método de Krebs y col (180) ya descrito en la sección 2.3.5. consistente en la incubación de cortes de la corteza renal en medio Krebs-Henseleit durante una hora a 40°C con oxigenación y agitación. Al medio de incubación se añade como sustrato acetoacetato 2 mM. Una vez finalizada la incubación se mide el consumo de acetoacetato así como la aparición de 3-hidroxiacetirato. Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles}$  de acetoacetato consumido o de 3-hidroxiacetirato formado durante la hora de incubación por gramo de tejido seco. Ambos metabolitos se determinan por análisis enzimático según los métodos descritos en las secciones 2.3.10. y 2.3.11.



### III. - RESULTADOS



### III. - RESULTADOS

#### 3. 1. - ACIDOSIS LACTICA Y ACTIVIDAD DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA RENAL DURANTE EL EJERCICIO

En trabajos realizados anteriormente en el Département se ha puesto de manifiesto que el ejercicio muscular realizado en determinadas condiciones (natación en agua a 22° de temperatura) lleva consigo un incremento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de la corteza renal (133) y de la capacidad gluconeogénica de dicho tejido (159). Este efecto había sido atribuido a la acidosis metabólica que presumiblemente acompaña al ejercicio, dadas las concentraciones de lactato en sangre en estas circunstancias, y a la probable naturaleza de dicha activación enzimática, que parecía similar a la que tiene lugar durante la acidosis clorhídrica experimental (120).

Las experiencias que se describen a continuación se han realizado con el fin de confirmar la vinculación del efecto activante del ejercicio sobre la fosfoenolpiruvato carboxicinasas a la acidosis láctica característica de dicha situación fisiológica.

### 3.1.1. - Concentración de ácidos no volátiles en sangre durante el ejercicio.

#### 3.1.1.1. - Acido láctico

Los trabajos citados anteriormente mostraban un brusco incremento en la concentración de lactato sanguíneo a los 15 minutos de comenzado el ejercicio, representando este momento el punto máximo en la concentración de este metabolito en sangre, que descendía rápidamente después (120). Parecía por tanto interesante completar estos resultados, sobre todo estudiando la evolución del lactato sanguíneo en el periodo de tiempo comprendido entre los cero y quince minutos de ejercicio.

A los cinco minutos de ejercicio los niveles de lactato en sangre son dos veces los de los controles, y a los diez minutos se alcanza la concentración más alta, que es casi cuatro veces la basal. A partir de este momento descienden hasta alcanzar valores normales (tabla nº 1 y gráfica nº 1).

Como puede observarse, existe un desfase de cinco minutos con los resultados citados, justificable por el diferente método de extracción de sangre que en nuestro caso requería una operación con anestesia de cinco minutos de duración.

### 3.1.1.2. - Cuerpos cetónicos

Entre los combustibles metabólicos tisulares que se producen en gran cantidad durante el ejercicio para su consumo periférico se encuentran los compuestos cetónicos, según se deduce de las experiencias realizadas en voluntarios humanos por Krebs y col. (186). Dada la acidez de estos compuestos y su posible implicación en la producción de acidosis metabólica durante la actividad muscular pareció aconsejable estudiar sus niveles hemáticos en nuestras condiciones experimentales.

Las medidas se realizaron a iguales tiempos que en el caso anterior (cero, 5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos).

Como puede verse en la tabla nº 1 (y gráfica nº 1), hay una evolución paralela en la concentración de ambos metabolitos -acetoacético y 3-hidroxi-butírico- a lo largo del ejercicio. Así, durante los primeros minutos de ejercicio se produce un descenso en los niveles de ambos, altamente significativo en el caso del 3-hidroxi-butirato. Este descenso inicial es seguido de un incremento en ambos metabolitos, hasta alcanzar valores aproximadamente dobles de los controles a los 120 minutos.

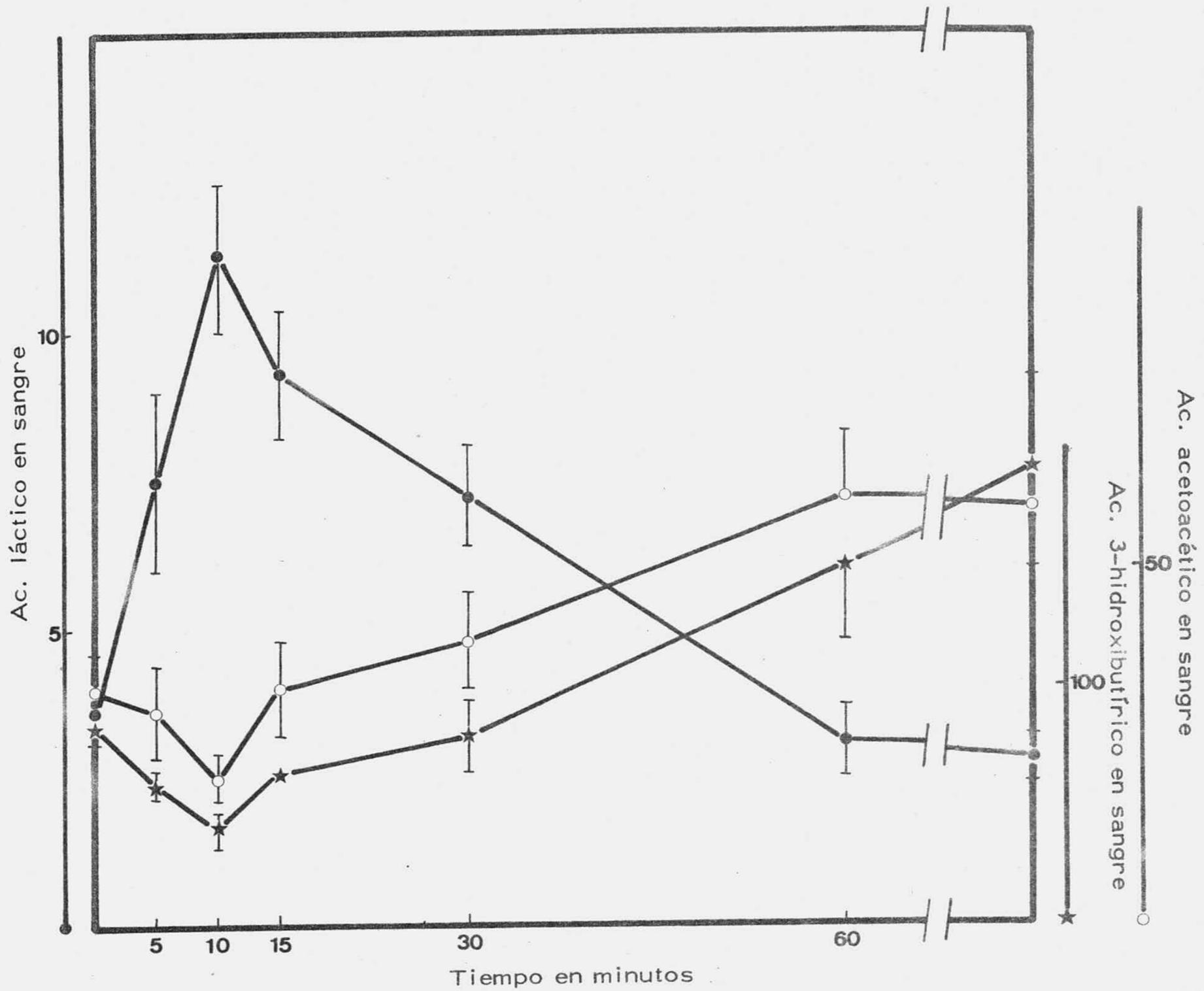
TABLA nº 1

Concentración de ácido láctico y cuerpos cetónicos en sangre durante el ejercicio.

Las concentraciones se expresan en  $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$  de sangre. Los resultados son medias  $\pm$  el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que las diferencias entre las medias no sea significativa.

	Ac. láctico en sangre			Ac. 3-hidroxiбутírico en sangre			Ac. acetoacético en sangre		
	Nº exp.	Concentración	P	Nº exp.	Concentración	P	Nº exp.	Concentración	P
0 minutos	6	3.607 $\pm$ 0.866		8	0.086 $\pm$ 0.008		8	0.033 $\pm$ 0.005	
5 minutos	5	7.552 $\pm$ 1.483	<0.05	6	0.061 $\pm$ 0.006	<0.05	7	0.030 $\pm$ 0.007	<0.90
10 minutos	6	11.249 $\pm$ 1.239	<0.001	8	0.040 $\pm$ 0.008	<0.001	5	0.021 $\pm$ 0.003	<0.10
15 minutos	7	9.279 $\pm$ 1.091	<0.01	4	0.065 $\pm$ 0.002	<0.05	4	0.033 $\pm$ 0.007	<0.90
30 minutos	5	7.241 $\pm$ 0.828	<0.01	5	0.080 $\pm$ 0.015	<0.90	4	0.040 $\pm$ 0.007	<0.90
60 minutos	6	3.124 $\pm$ 0.596	<0.50	4	0.150 $\pm$ 0.029	<0.10	4	0.060 $\pm$ 0.009	<0.05
120 minutos	4	2.815 $\pm$ 0.403	<0.30	5	0.190 $\pm$ 0.039	<0.05	6	0.059 $\pm$ 0.006	<0.01

GRAFICA nº 1



Concentración en sangre de ácido láctico y cuerpos cetónicos durante el ejercicio. Los resultados se expresan igual que en la tabla nº 1, siendo ácido láctico ( ● ); ácido acetoacético ( ○ ); ácido 3-hidroxi-butírico ( ★ ). Las líneas verticales representan el error estándar de la media de los valores hallados en cada punto.

### 3. 1. 2. - Valores de pH, pCO<sub>2</sub> y concentración de bicarbonato en sangre durante el ejercicio

#### 3. 1. 2. 1. - Animales normales

Como se ha descrito en la sección 3. 1. 1. 1. existe un fuerte incremento en la concentración de lactato sanguíneo durante la actividad muscular forzada, realizada según nuestras condiciones experimentales. Por ello era de gran interés comprobar si esta hiperlactacidemia, muy aguda sobretodo en los minutos iniciales del ejercicio, iba asociada con una situación real de acidosis metabólica.

Los animales recibieron 10 ml. de solución salina por intubación gástrica inmediatamente antes del ejercicio, cuya duración fue de 15 o 120 minutos.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla nº 2. Puede observarse un marcado descenso del pH sanguíneo simultáneo a un aumento considerable de la presión parcial de anhídrido carbónico y descenso de la concentración de bicarbonato. Después de 2 horas de ejercicio los valores de pH sanguíneo se han elevado debido a un incremento compensador en la concentración de bicarbonato en sangre, aunque persiste la situación de acidosis.

### 3. 1. 2. 2. - Animales tratados con bicarbonato

El bicarbonato se administró por intubación gástrica inmediatamente antes de comenzar el ejercicio. Los detalles experimentales se describen en la sección 2. 3. 1. 2.

Como puede observarse en la tabla nº 2 la administración de bicarbonato sódico reduce ligeramente la acidosis producida a los 15 minutos de ejercicio y restaura casi por completo el valor normal de pH a los 120 minutos de su administración.

TABLA nº 2

Valores de pH,  $p\text{CO}_2$  y concentración de bicarbonato en sangre de ratas normales y tratadas con bicarbonato durante el ejercicio.

A los animales se les administró inmediatamente antes del ejercicio 10 ml de solución salina o de bicarbonato 200 mM por intubación gástrica. El  $\pm$  representa el error estándar de la media.

	Nº exp.	pH	$p\text{CO}_2$	Bicarbonato mM
Controles	6	$7.36 \pm 0.01$	$41.8 \pm 3.6$	$24.6 \pm 0.4$
Ejercicio 15'	6	$7.06 \pm 0.03$	$63.7 \pm 2.6$	$14.8 \pm 1.8$
Ejercicio 15' + $\text{CO}_3\text{H}^-$	4	$7.11 \pm 0.05$	$48.3 \pm 2.82$	$15.0 \pm 3.1$
Ejercicio 120'	4	$7.12 \pm 0.03$	$77.5 \pm 6.6$	$24.5 \pm 3.6$
Ejercicio 120' + $\text{CO}_3\text{H}^-$	3	$7.30 \pm 0.01$	$68.9 \pm 1.3$	$33.1 \pm 1.3$

### 3. 1. 3. - Efecto de la administración previa de bicarbonato sobre los primeros quince minutos de ejercicio.

En las experiencias anteriores se había puesto de manifiesto que existía una fuerte acidosis metabólica durante los 15 primeros minutos de ejercicio, aun cuando a los animales se les había administrado previamente bicarbonato sódico. El efecto de esta administración no se hacía patente hasta bien comenzado el ejercicio (tabla nº 2), dado el tiempo necesario para la absorción del bicarbonato.

Por ello realizamos esta serie de experiencias en las que el bicarbonato se administró treinta minutos antes de comenzar la natación, con objeto de que desde el primer momento se pudiese contrarrestar la acidosis provocada por el acúmulo de ácido láctico consecuente al ejercicio.

Estudiamos en estas condiciones, y en animales controles a los que se había administrado solución salina, la concentración de ácido láctico y glucosa en sangre y la capacidad gluconeogénica y actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renales a lo largo de los quince primeros minutos del ejercicio.

#### 3. 1. 3. 1. - Concentración de ácido láctico en sangre.

Los animales tratados con bicarbonato muestran un incremento en la concentración de ácido láctico en sangre paralelo al de los animales controles (tabla nº 3). Sin embargo estos valores son muy superiores a los controles en todo momento.

Los valores controles corresponden a los ya expresados en la tabla nº 1.

### 3.1.3.2. - Concentración de glucosa en sangre

Los resultados se expresan en la tabla nº 3 en  $\mu\text{moles}$  de glucosa  $\times \text{ml.}^{-1}$  de sangre.

Los animales controles experimentan un significativo incremento a los 15 minutos de ejercicio.

Los animales tratados con bicarbonato mantienen su glucemia constante a lo largo de este periodo de ejercicio.

### 3.1.3.3. - Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasasa renal

Los resultados obtenidos en animales tratados con bicarbonato fueron significativamente iguales a los controles, como puede observarse en la tabla nº 3, a excepción de los hallados a los treinta minutos de su administración -minuto cero de ejercicio- significativamente más bajos. Son suficientes unos minutos de tratamiento para que los valores de la actividad ensayable de la PEPCK renal alcancen la normalidad.

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

### 3.1.3.4. - Capacidad gluconeogénica renal

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla nº 3, expresándose la capacidad gluconeogénica como  $\mu\text{moles}$  de glucosa producida  $\times \text{gr}^{-1}$  de tejido seco  $\times \text{hora}^{-1}$  de incubación.

Igual que ocurría con la actividad de la PEPCK, la capacidad gluconeogénica renal de ratas tratadas con bicarbonato sin nadar es significativamente inferior a la de los controles. Sin embargo, también de forma paralela a la actividad enzimática, esta capacidad se restaura desde los primeros minutos de ejercicio.

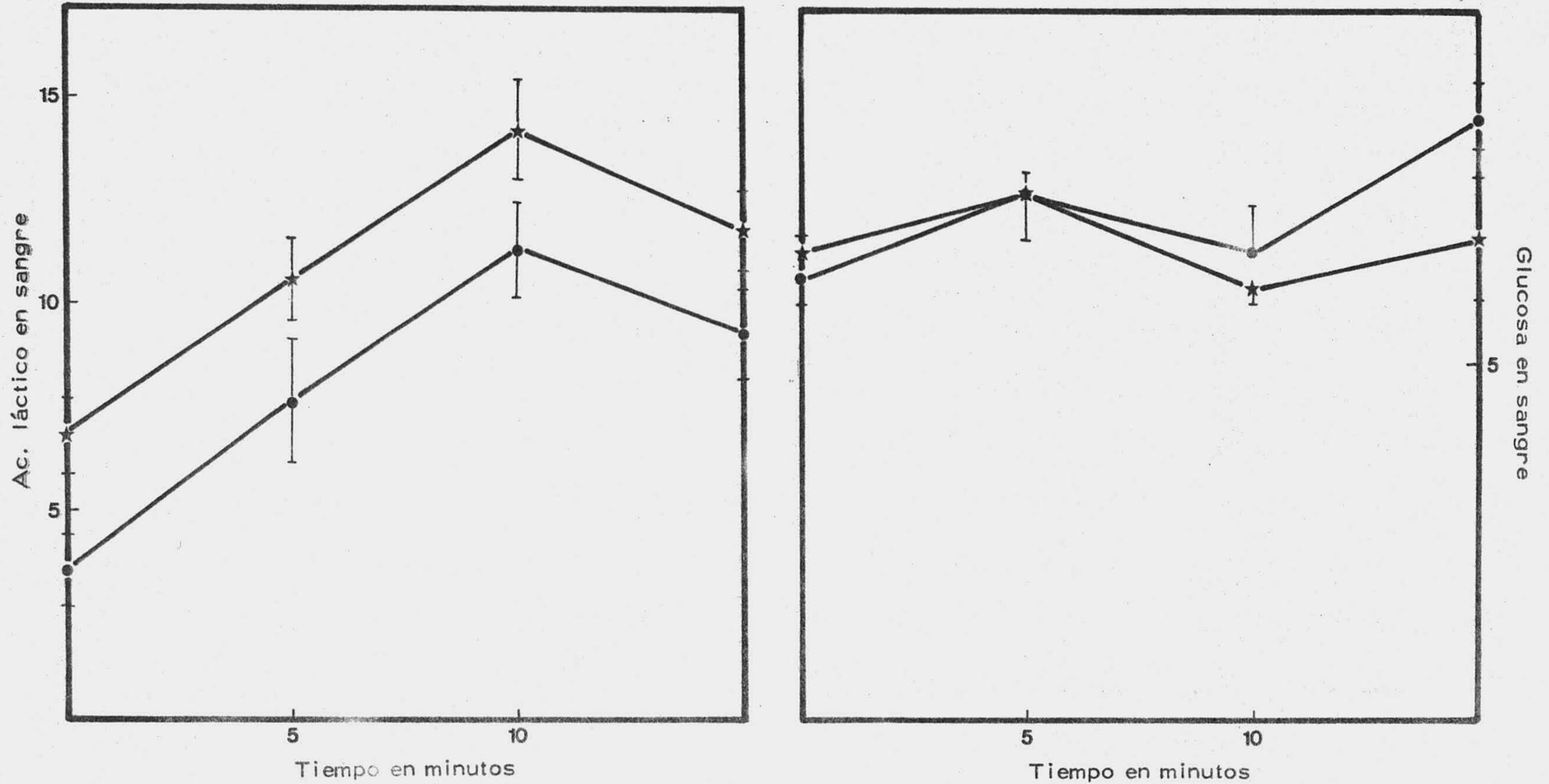
TABLA nº 3

Concentración de ácido láctico y glucosa en sangre, actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinas y capacidad gluconeogénica de la corteza renal en ratas normales y tratadas con bicarbonato durante 15 minutos de ejercicio.

El tratamiento se describe en la sección 2.1.

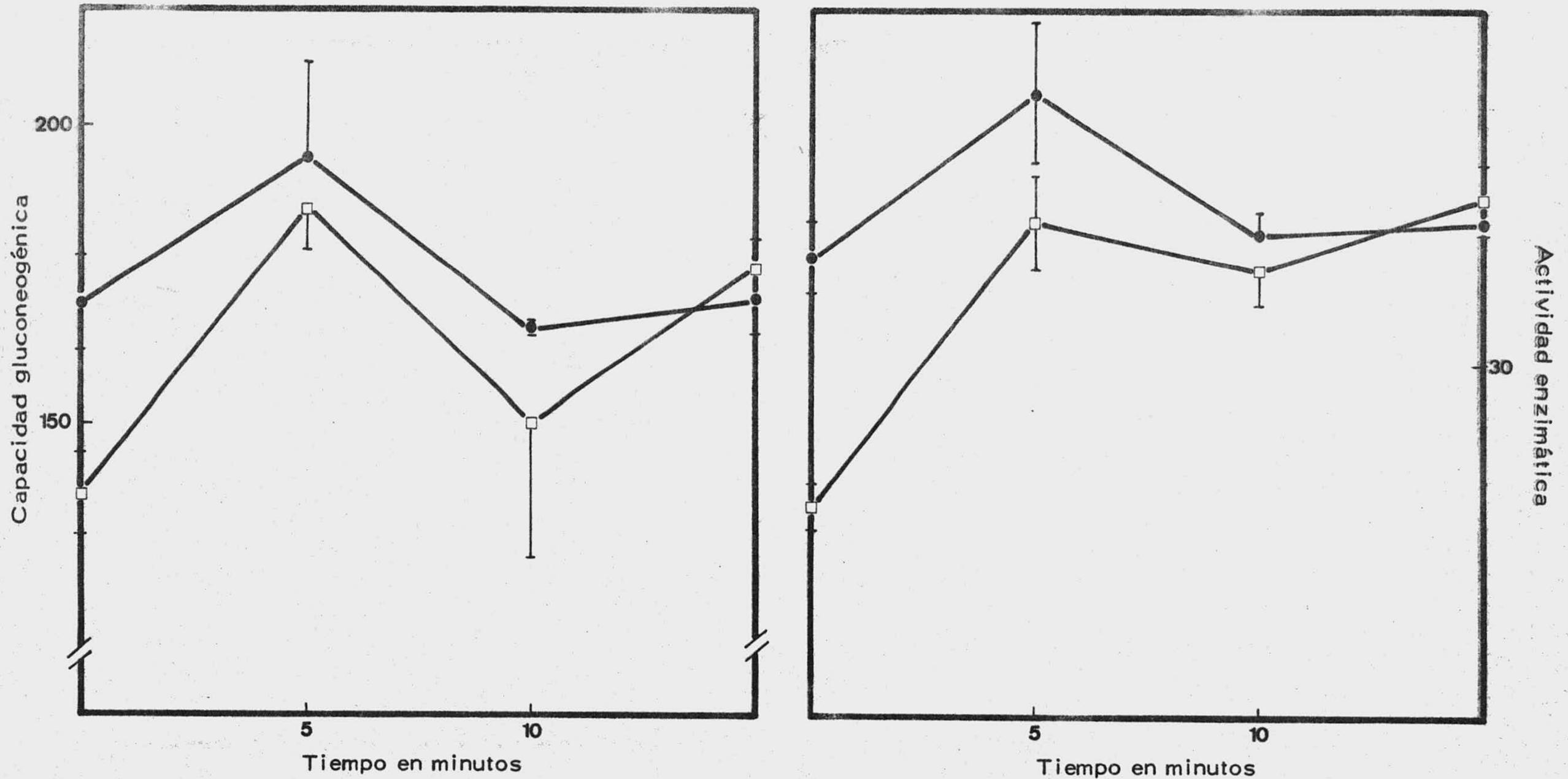
		Gluconeogénesis renal			PEPCK renal			Ac. láctico en sangre			Glucosa en sangre		
		Nº exp.	Glucosa producida	P	Nº exp.	Actividad enzimática	P	Nº exp.	Concentración	P	Nº exp.	Concentración	P
CONTROLES	0 minutos	4	170 ± 8		4	39 ± 3		6	3.607 ± 0.866		5	6.228 ± 0.395	
	5 minutos	4	195 ± 16	<0.30	4	53 ± 6	<0.10	5	7.552 ± 1.483	<0.05	6	7.378 ± 0.377	<0.10
	10 minutos	4	166 ± 1	<0.90	4	41 ± 2	<0.90	6	11.248 ± 1.209	<0.001	8	6.636 ± 0.658	<0.90
	15 minutos	4	171 ± 6	<0.90	4	42 ± 1	<0.50	7	9.279 ± 1.091	<0.01	9	8.491 ± 0.490	<0.01
TRATADAS CON CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>	0 minutos	4	138 ± 1	<0.01	4	18 ± 2	<0.01	4	6.858 ± 0.849	<0.05	4	6.639 ± 0.185	<0.50
	5 minutos	4	186 ± 4	<0.20	4	42 ± 4	<0.90	4	10.614 ± 0.991	<0.001	4	7.356 ± 0.693	<0.20
	10 minutos	4	150 ± 23	<0.50	4	38 ± 3	<0.90	3	14.240 ± 1.247	<0.001	3	6.130 ± 0.237	<0.90
	15 minutos	4	176 ± 5	<0.90	4	44 ± 3	<0.30	4	11.804 ± 1.081	<0.001	3	6.804 ± 0.886	<0.50

GRAFICA nº 2



Concentración de ácido láctico y glucosa en sangre en ratas controles y tratadas previamente con bicarbonato durante 15 minutos de ejercicio. Los resultados se expresan igual que en la tabla nº 3. Las líneas verticales representan el error estándar de la media de los valores hallados en cada punto, siendo animales controles (●) y animales tratados con bicarbonato (★).

GRAFICA nº 3



Capacidad gluconeogénica y actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de la corteza renal en ratas controles y tratadas previamente con bicarbonato durante 15 minutos de ejercicio. Los resultados se expresan igual que en la tabla nº 3. Las líneas verticales representan el error estándar de la media de los valores hallados en cada punto, siendo animales controles (●) y animales tratados con bicarbonato (□).

#### 3.1. 4. - Naturaleza de la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa por el ejercicio

La naturaleza de la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal que tiene lugar en condiciones de acidosis metabólica experimental provocada por la administración de cloruro amónico ha sido estudiada con detalle por Flores y Alleyne (20) y por Longshaw y col. (187, 188). Como resultado de estos estudios se sugirió que los cambios en la actividad en sayable de la PEPCK en estas condiciones no se debían a síntesis de nueva proteína enzimática sino, al menos parcialmente, a una prolongación en la vida media de la enzima o a una conversión de un precursor en una proteína activa.

En trabajos realizados anteriormente en nuestro Departamento se había llegado a una conclusión similar para la activación de la PEPCK renal durante el ejercicio (189). En efecto, la administración de antibióticos inhibidores de la síntesis proteica (actinomicina D o cicloheximida) previamente al ejercicio no suprimía la activación de la enzima en estas condiciones, sugiriendo que dicha activación no se debía a síntesis de nueva proteína enzimática.

Estos resultados concordaban estrechamente con los obtenidos por Flores y Alleyne, quienes habían encontrado que la actinomicina D o la etionina no evitaban el efecto estimulante de la acidosis metabólica experimental sobre la actividad de la PEPCK renal.

Es destacable que la dosis de actinomicina D utilizada en nuestro Departamento fue la misma que la empleada por estos investigadores, dosis muy pequeña, pero que fué sin embargo, suficiente para reprimir completamen

te el incremento en la actividad de la PEPCK producida por la administración de corticoides.

Muy recientemente, Iynedjiand y col. han reexaminado el mecanismo de la activación de la PEPCK renal durante la acidosis metabólica experimental utilizando procedimientos isotópico-inmunoquímicos, llegando a la conclusión de que -al contrario de los postulados anteriores- el fenómeno se debe a síntesis de nueva proteína enzimática (106). Estos investigadores han señalado que dicho efecto puede suprimirse administrando cordicepina o actinomicina D, pero aumentando sustancialmente la dosis de este último antibiótico en relación a la utilizada por Flores y Alleyne (20).

Teniendo en cuenta estos antecedentes hemos procedido a reinvestigar el efecto de la administración de actinomicina D y cicloheximida sobre la activación de la PEPCK renal por el ejercicio, aumentando la dosis de estos antibióticos en relación a las utilizadas anteriormente.

#### 3.1.4.1. - Efecto de la actinomicina D

Este antibiótico reprime la síntesis proteica inhibiendo la formación de RNA mensajero (190). Se ha empleado en esta ocasión una dosis de 1 g / Kg de rata administrada treinta minutos antes del comienzo de un periodo de natación de dos horas. Se ha determinado paralelamente la capacidad gluconeogénica renal a partir de lactato. Los resultados se expresan en la tabla nº 4 y gráfica nº 4.

Como puede observarse, la administración de actinomicina D en estas condiciones bloquea completamente el incremento producido por el ejeru

cicio sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y sobre la capacidad gluconeogénica de corteza renal.

Merece destacarse el incremento que la actinomicina D produce sobre los valores basales de la actividad ensayable de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y de la capacidad gluconeogénica renal, aunque en este último caso no sea significativo.

#### 3.1.4.2. - Efecto de la cicloheximida

Este antibiótico inhibe la síntesis de proteínas a nivel de traducción (191). Se ha empleado en esta ocasión una sola dosis de 1 g/Kg. de rata administrada intraperitonealmente 3 horas antes del comienzo del ejercicio y cinco horas antes de la muerte del animal.

Se ha determinado también de forma paralela la capacidad gluconeogénica renal a partir de lactato. Como puede observarse en la tabla nº 5 y gráfica nº 5, los resultados obtenidos son similares a los hallados con actinomicina D, anulándose el incremento producido por el ejercicio tanto en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa como en la capacidad gluconeogénica.

La cicloheximida provoca además un descenso significativo de los niveles basales de la actividad enzimática.

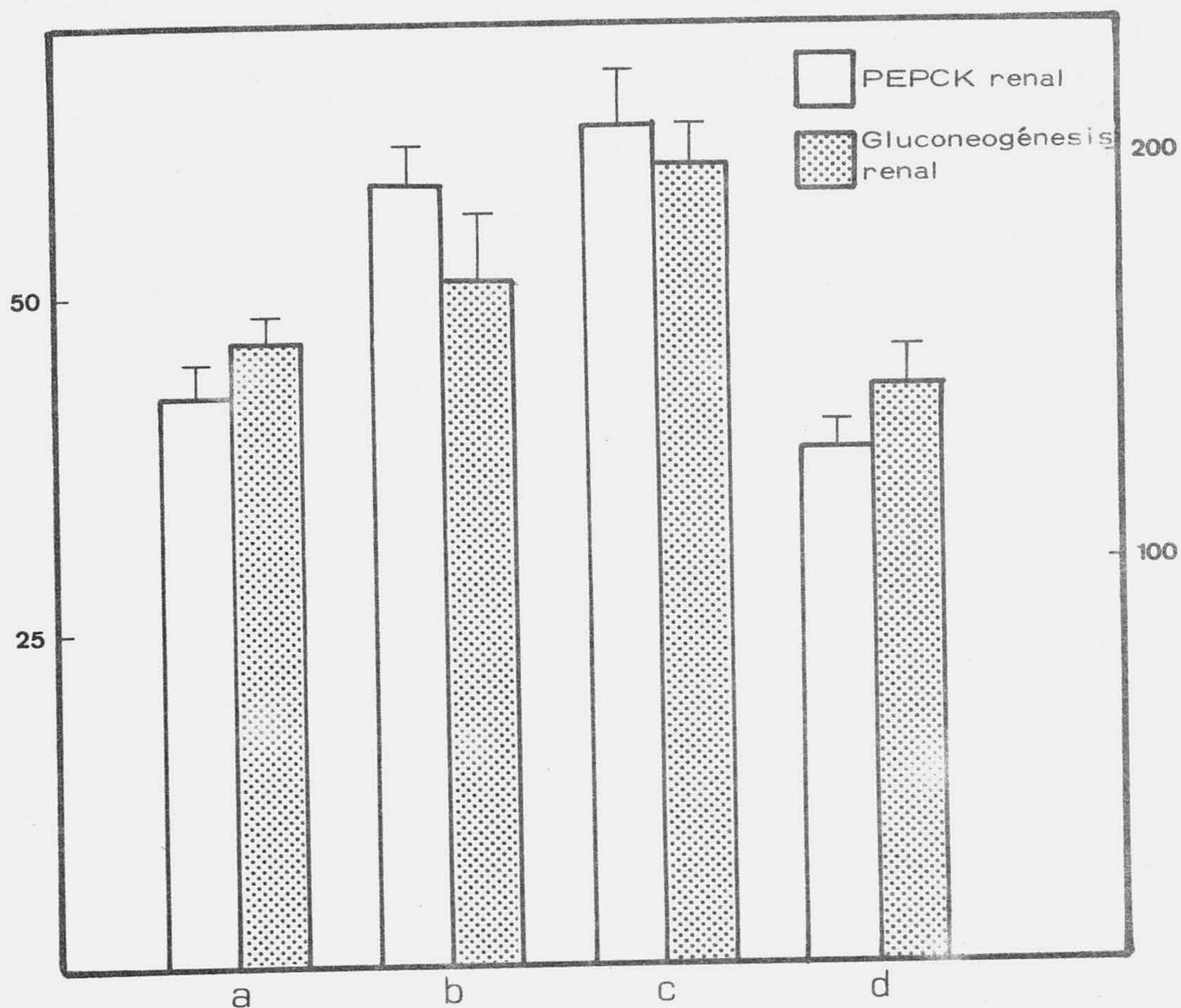
TABLA nº 4

Efecto de la actinomicina D sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y la capacidad gluconeogénica de corteza renal de ratas sometidas a dos horas de ejercicio.

La actividad enzimática se expresa en  $\mu\text{moles de sustrato transformado} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína. La capacidad gluconeogénica se expresa en  $\mu\text{moles de glucosa producida} \times \text{hora}^{-1} \times \text{gramo}^{-1}$  de tejido seco. El  $\pm$  representa el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

	Nº exp.	Actividad enzimática	P	Nº exp.	Capacidad gluconeogénica	P
Controles	12	43 ± 2		12	155 ± 7	
Actinomicina D	8	58 ± 6	<0.05	4	171 ± 16	<0.50
Ejercicio	13	63 ± 4	<0.001	7	198 ± 11	<0.01
Ejercicio+Actinomicina	8	39 ± 2	<0.20	9	143 ± 10	<0.50

GRAFICA nº 4



Efecto de la actinomicina D sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y la capacidad gluconeogénica de corteza renal de ratas sometidas a dos horas de ejercicio. Los resultados están expresados igual que en la tabla nº 4 . Las líneas verticales representan el error estándar de la media. Controles (a); actinomicina D (b); ejercicio dos horas (c); ejercicio y actinomicina D (d).

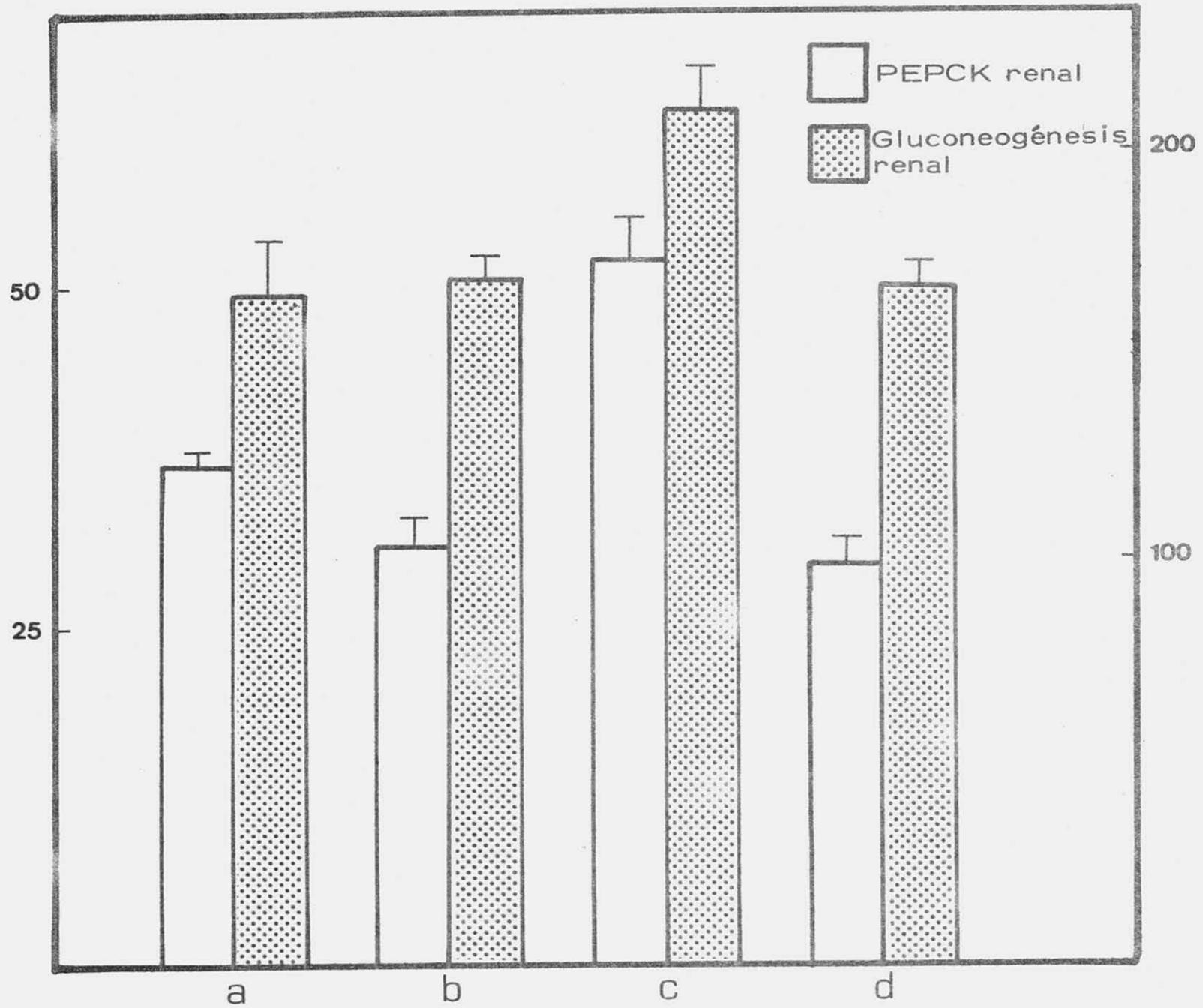
TABLA nº 5

Efecto de la cicloheximida sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas y la capacidad gluconeogénica de corteza renal de ratas sometidas a dos horas de ejercicio.

La actividad enzimática se expresa en  $\mu\text{moles de sustrato transformado} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína. La capacidad gluconeogénica se expresa en  $\mu\text{moles de glucosa producida} \times \text{hora}^{-1} \times \text{gramo}^{-1}$  de tejido seco. El  $\pm$  representa el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

	Nº exp.	Actividad enzimática	P	Nº exp.	Capacidad gluconeogénica	P
Controles	4	37 $\pm$ 1		4	165 $\pm$ 14	
Cicloheximida	8	31 $\pm$ 2	<0.001	9	169 $\pm$ 6	<0.50
Ejercicio	5	52 $\pm$ 3	<0.001	6	202 $\pm$ 10	<0.01
Ejercicio+Ciclohexim.	13	29 $\pm$ 2	<0.01	12	167 $\pm$ 6	<0.50

GRAFICA nº 5



Efecto de la cicloheximida sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y la capacidad gluconeogénica de corteza renal de ratas sometidas a dos horas de ejercicio. Los resultados están expresados igual que en la tabla nº 5. Las líneas verticales representan el error estándar de la media. Controles (a); cicloheximida (b); ejercicio dos horas (c); ejercicio y cicloheximida (d).

3.1.5. - Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa a las dos horas del comienzo de un periodo de ejercicio de quince minutos.

Esta experiencia se ha realizado con el fin de corroborar la estricta vinculación de la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa por el ejercicio a la acidosis láctica concomitante al mismo. Dado que los niveles de ácido láctico en sangre disminuyen drásticamente tras los primeros quince minutos de natación se ha determinado la actividad de la enzima en ratas que nadaron sólo durante esos quince minutos y luego se dejaron reposar hasta finalizar un plazo de dos horas después de iniciar el ejercicio.

Como puede apreciarse en la tabla nº 6 la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa en estas condiciones es sensiblemente igual a la que se manifiesta cuando la natación se realiza durante dos horas completas.

TABLA nº 6

Actividad de la fosfoenopiruvato carboxicinasasa de corteza renal a las dos horas del comienzo del ejercicio.

La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado x minuto<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup> de proteína. Los animales problema fueron mantenidos en reposo después de un periodo de natación de 15 minutos y sacrificados a las dos horas del comienzo del ejercicio. Los resultados son medias ± el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que las diferencias entre las medias no sea significativa.

	Nº exp.	PEPCK renal	P
Controles	3	36 ± 2	
Ejercicio 2 h.	4	59 ± 3	<0.01
Ejercicio 15'	4	60 ± 7	<0.05

### 3.2. - OTROS ESTUDIOS METABOLICOS EN EL EJERCICIO

#### 3.2.1. - Concentración sanguínea de algunas sustancias metabólicas durante el ejercicio

Se ha determinado las concentraciones sanguíneas de algunas sustancias de origen metabólico relacionadas directamente con la gluconeogénesis -glucosa, alanina- o con procesos relacionados, tales como la ureogénesis -amoníaco, urea-, en nuestras condiciones experimentales, con el fin de obtener, un mejor conocimiento del esquema metabólico durante las dos horas de ejercicio.

##### 3.2.1.1. - Glucosa

Anteriores trabajos (121) habían señalado que tras un ejercicio de 2 horas realizado en nuestras condiciones experimentales, la glucemia era ligeramente superior a la de animales controles. Para conocer su evolución durante estas dos horas se midió la concentración de glucosa a los siguientes tiempos de ejercicio: 5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos. Como se refleja en la tabla nº 7 existe ya un incremento significativo de la glucemia a los 15 minutos de ejercicio. Igualmente son altamente significativos los incrementos aparecidos a los 60 y 120 minutos.

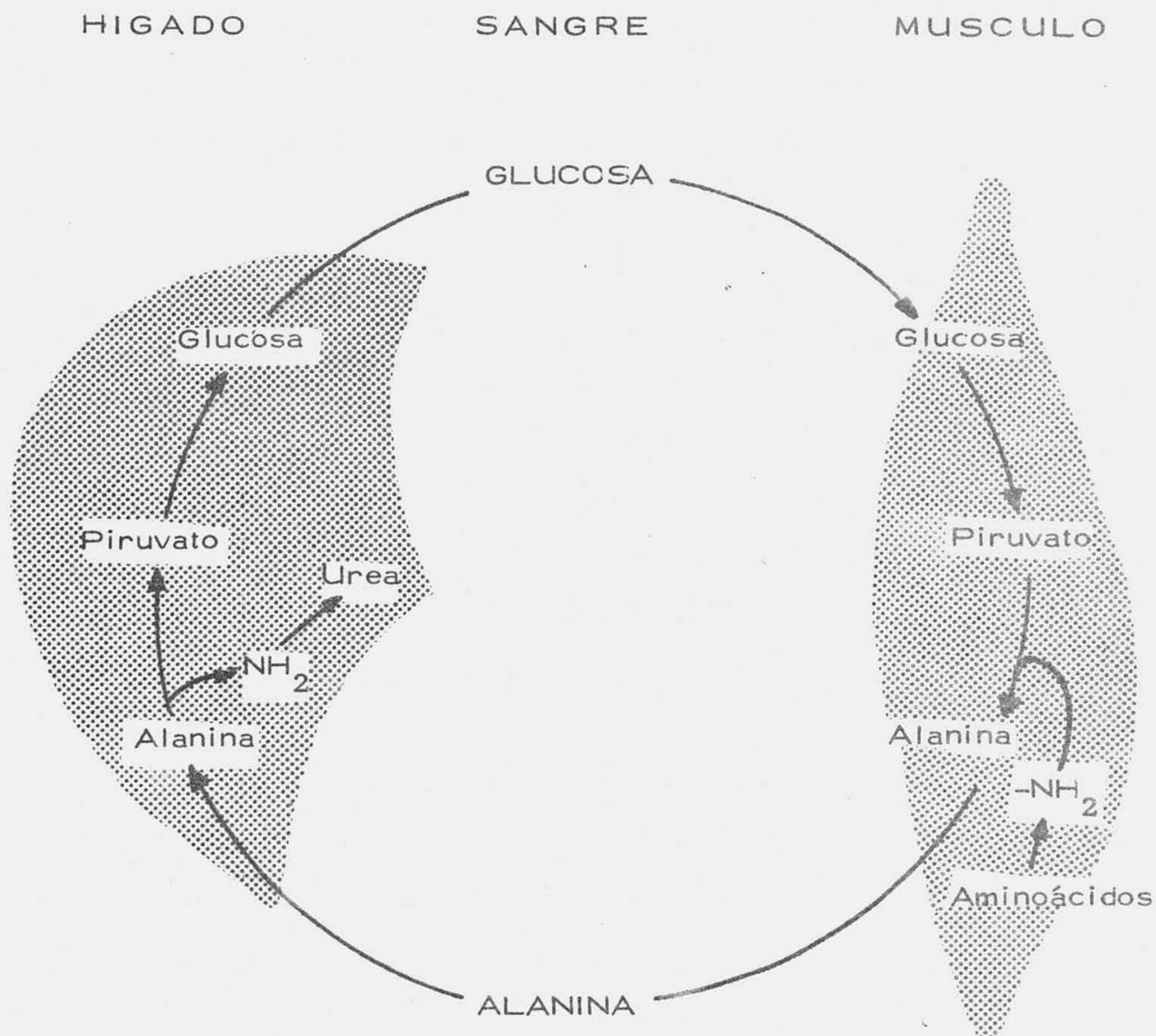
##### 3.2.1.2. - Alanina

Datos experimentales existentes en la bibliografía (192) sugerían que durante el ejercicio existe actividad gluconeogénica en el hígado a partir de alanina, que provendría no solo de la proteólisis del tejido

muscular sino además en gran parte de la transaminación del piruvato obtenido por glucólisis. Incluso se ha postulado la existencia de un ciclo glucosa-alanina tal como se puede ver en el esquema de la página siguiente.

En nuestro Departamento se ha puesto de manifiesto, por otra parte, que durante el ejercicio realizado en nuestras condiciones experimentales existe un fuerte incremento en la alanina aminotransferasa de la corteza renal que se traduce en una mayor capacidad gluconeogénica de este tejido a partir de alanina, muy precaria en condiciones normales lo que parecía sugerir que el riñón estuviera implicado en el ciclo glucosa alanina en estas condiciones (121).

Por todo ello pareció interesante estudiar la concentración de alanina en sangre a lo largo del ejercicio realizado según nuestras condiciones experimentales, encontrando, como se muestra en la tabla nº 7, que no se producen cambios en la concentración de este metabolito.



Ciclo de la "glucosa - alanina"

FELIG, P. y WAHREN, J., En "Muscle Metabolism During Exercise" (Plenum Press, New York y London 1971) p. 205

TABLA nº 7

Concentración de glucosa y alanina en sangre durante el ejercicio. Las concentraciones se expresan en  $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$  de sangre. Los resultados son medias  $\pm$  el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que las diferencias entre las medias no sea significativa.

	Glucosa en sangre			L-Alanina en sangre		
	Nº exp.	Concentración	P	Nº exp.	Concentración	P
0 minutos	5	6.228 $\pm$ 0.395		10	0.296 $\pm$ 0.029	
5 minutos	6	7.378 $\pm$ 0.377	<0.10	4	0.302 $\pm$ 0.027	<0.90
10 minutos	8	6.636 $\pm$ 0.658	<0.50	5	0.308 $\pm$ 0.025	<0.90
15 minutos	9	8.491 $\pm$ 0.371	<0.01	7	0.388 $\pm$ 0.040	<0.20
30 minutos	4	6.338 $\pm$ 1.056	<0.90	3	0.272 $\pm$ 0.014	<0.90
60 minutos	4	8.505 $\pm$ 0.158	<0.001	3	0.310 $\pm$ 0.089	<0.90
120 minutos	4	7.904 $\pm$ 1.074	<0.001	7	0.264 $\pm$ 0.046	<0.50

### 3. 2. 1. 3. - Amoniaco y urea

El ejercicio incrementa la utilización de aminoácidos por la gluconeogénesis hepática, hecho que concuerda con el decrecimiento de la concentración de aspartato, glicocola y serina en hígado y de glutamina en plasma (103) y el decrecimiento en la excreción urinaria de aminoácidos. Igualmente concordante es la inducción de las enzimas del ciclo ureogénico descrita en entrenamiento ( 194).

Por estas razones se procedió al estudio de la concentración en sangre de los dos productos más importantes de la degradación de amino-ácidos: urea y amoniaco en nuestras condiciones de ejercicio.

La tabla nº 8 muestra los resultados obtenidos.

A excepción de un ligero incremento en la concentración de amoniaco a los cinco minutos de ejercicio, no hemos hallado cambios en la concentración sanguínea de estos metabolitos.

TABLA nº 8

Concentración de amoniaco y urea en sangre durante el ejercicio.  
 Las concentraciones se expresan en  $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$  de sangre. Los resultados expuestos son medias  $\pm$  el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

	Urea en sangre			Amoniaco en sangre		
	Nº exp.	Concentración	P	Nº exp.	Concentración	P
0 minutos	5	8.475 $\pm$ 0.237		7	0.936 $\pm$ 0.061	
5 minutos	4	8.227 $\pm$ 0.083	<0.50	4	1.135 $\pm$ 0.059	<0.05
10 minutos	4	7.850 $\pm$ 0.125	<0.20	5	1.032 $\pm$ 0.090	<0.30
15 minutos	4	8.282 $\pm$ 0.092	<0.50	5	0.980 $\pm$ 0.051	<0.50
30 minutos	4	7.045 $\pm$ 0.738	<0.20	3	0.968 $\pm$ 0.040	<0.90
60 minutos	4	9.235 $\pm$ 0.482	<0.20	3	0.910 $\pm$ 0.036	<0.90
120 minutos	4	8.350 $\pm$ 0.127	<0.90	3	0.825 $\pm$ 0.059	<0.50

### 3. 2. 2. - Efecto del ejercicio sobre la capacidad gluconeogénica hepática en ratas ayunadas.

En trabajos realizados anteriormente en el Departamento, se determinó la capacidad gluconeogénica hepática tras el ejercicio en ratas a las que se había privado anteriormente de su contenido en glucógeno hepático por tratamiento con ácido nicotínico (121). Efectivamente, la capacidad gluconeogénica no puede determinarse si existe glucógeno en el hígado, pues durante la perfusión se liberaría glucosa a sangre procedente de la glucogenolisis, enmascarando los resultados. Por otra parte, la existencia de glucógeno hace innecesaria la gluconeogénesis, que carece en estas circunstancias de sentido fisiológico. El ácido nicotínico es un conocido agente lipolítico (195) cuya administración a ratas bien alimentadas produce el agotamiento del glucógeno hepático en unas horas (196). Ello ocurre porque al decrecer los ácidos libres en sangre a consecuencia de la acción antilipolítica sobre el tejido adiposo, los tejidos se ven obligados a aumentar el porcentaje de consumo de glucosa. La demanda de ésta lleva consigo el incremento de la glucogenolisis hepática y el rápido decrecimiento de la reserva glucídica de este órgano.

Las experiencias cuyos resultados se expresan a continuación tenían por objeto estudiar la posible adaptación de la capacidad gluconeogénica hepática al ejercicio, recurriendo simplemente al ayuno para agotar las reservas hepáticas de glucógeno, salvando el efecto no fisiológico del ácido nicotínico. En cambio, al tener que realizar un periodo de 12 horas de ayuno para hacer desaparecer por completo el glucógeno del hígado, podía ocurrir que en estas circunstancias se hubiera producido ya un efecto inductor sobre la gluconeogénesis hepática que hiciera innecesaria una posterior inducción por el ejercicio. Efectivamente como puede observarse en en la gráfica nº 6

y tabla nº 9 no existen diferencias en la capacidad gluconeogénica de hígado perfundido de animales ayunados 12 horas y animales sometidos además a dos horas de ejercicio.

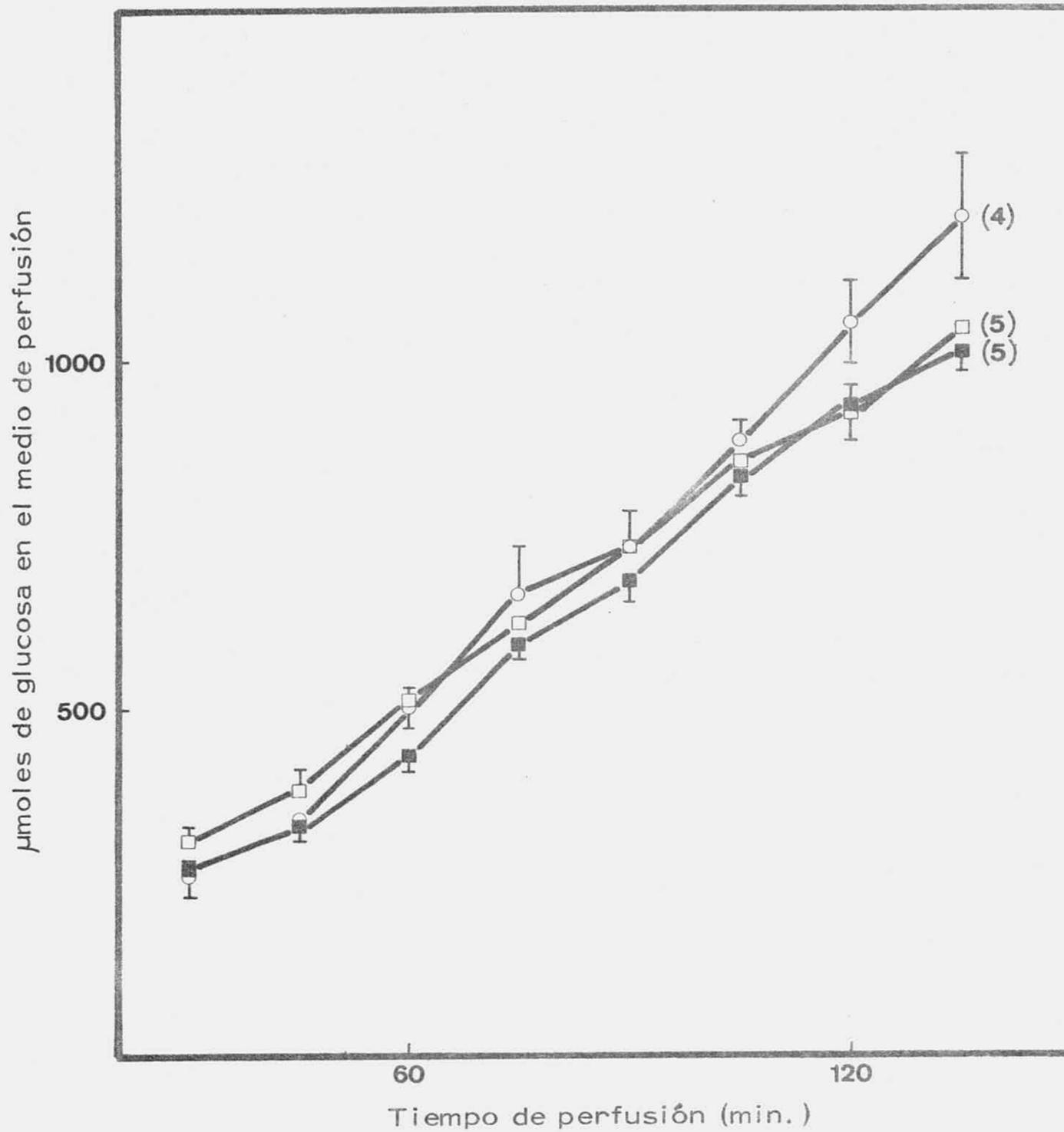
Igualmente puede apreciarse que con doce horas de ayuno la capacidad gluconeogénica hepática medida a partir de lactato está bastante elevada y próxima a la de animales que han sido privados de alimento durante 48 horas.

TABLA nº 9

Efecto del ejercicio sobre la capacidad gluconeogénica de hígado perfundido de ratas ayunadas.

El sustrato, lactato a concentración 10 mM, fué añadido a los 45 minutos del comienzo de la perfusión. La velocidad de formación de glucosa se expresa en  $\mu\text{moles} \times \text{minuto}^{-1}$  de perfusión  $\times \text{gramo}^{-1}$  de hígado seco. Los resultados expuestos son los coeficientes angulares de la recta de regresión  $\pm$  la desviación típica de estos coeficientes.

GLUCOSA PRODUCIDA			
	Nº exp.	$\mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{gr}^{-1}$ tejido seco	P
Ayuno 48 h.	4	$5.4 \pm 0.5$	
Ayuno 12 h.	5	$4.2 \pm 0.4$	<0.20
Ayuno 12 h.+Ejercicio 2 h.	5	$4.1 \pm 0.3$	<0.10



Efecto del ejercicio sobre la capacidad gluconeogénica hepática en ratas ayunadas. Glucosa encontrada en el medio de perfusión de animales ayunados 48 horas (○); animales ayunados 12 horas (□). Animales ayunados 12 horas y sometidos a dos horas de ejercicio (■). Las líneas verticales representan el error estándar de la media de los valores hallados en cada punto. El número de experiencias se expresa entre paréntesis. Los pesos medios de los hígados secos fueron 1,755 mg para los animales ayunados 48 horas; 1,733 g para los ayunados 12 horas; 1,892 g para los sometidos a ayuno y ejercicio.

3. 2. 3. - Efecto del ejercicio sobre el funcionamiento de la gluconeogénesis renal en ratas con gluconeogénesis hepática disminuída.

Con las experiencias que se describen al continuación se ha pretendido introducir un factor adicional en la compleja situación metabólica que caracteriza al ejercicio, con el fin de estudiar la respuesta renal al mismo en condiciones de forzada inactividad hepática.

La inhibición de la gluconeogénesis hepática se ha realizado por administración de ácido 5-metoxi-2-indol carboxílico, (MICA), compuesto que hace decrecer fuertemente dicho proceso en el hígado (197, 198), pero sin afectar a la corteza renal, que, por el contrario, aumenta su capacidad de síntesis de glucosa en estas condiciones, tal como se ha encontrado recientemente en nuestro Departamento (199).

Para la determinación de los metabolitos intermediarios de la gluconeogénesis se ha utilizado la técnica del congelado instantáneo del tejido con nitrógeno líquido con lo que se logra reducir al mínimo los cambios "post mortem" en las concentraciones de estos metabolitos.

3. 2. 3. 1. - Concentración en hígado de los intemediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas ejercitadas tratadas con MICA.

A las ratas problema se les inyectó MICA (50 mg/ kg de peso de rata) una hora antes del comienzo de la natación, que se realizó a lo largo

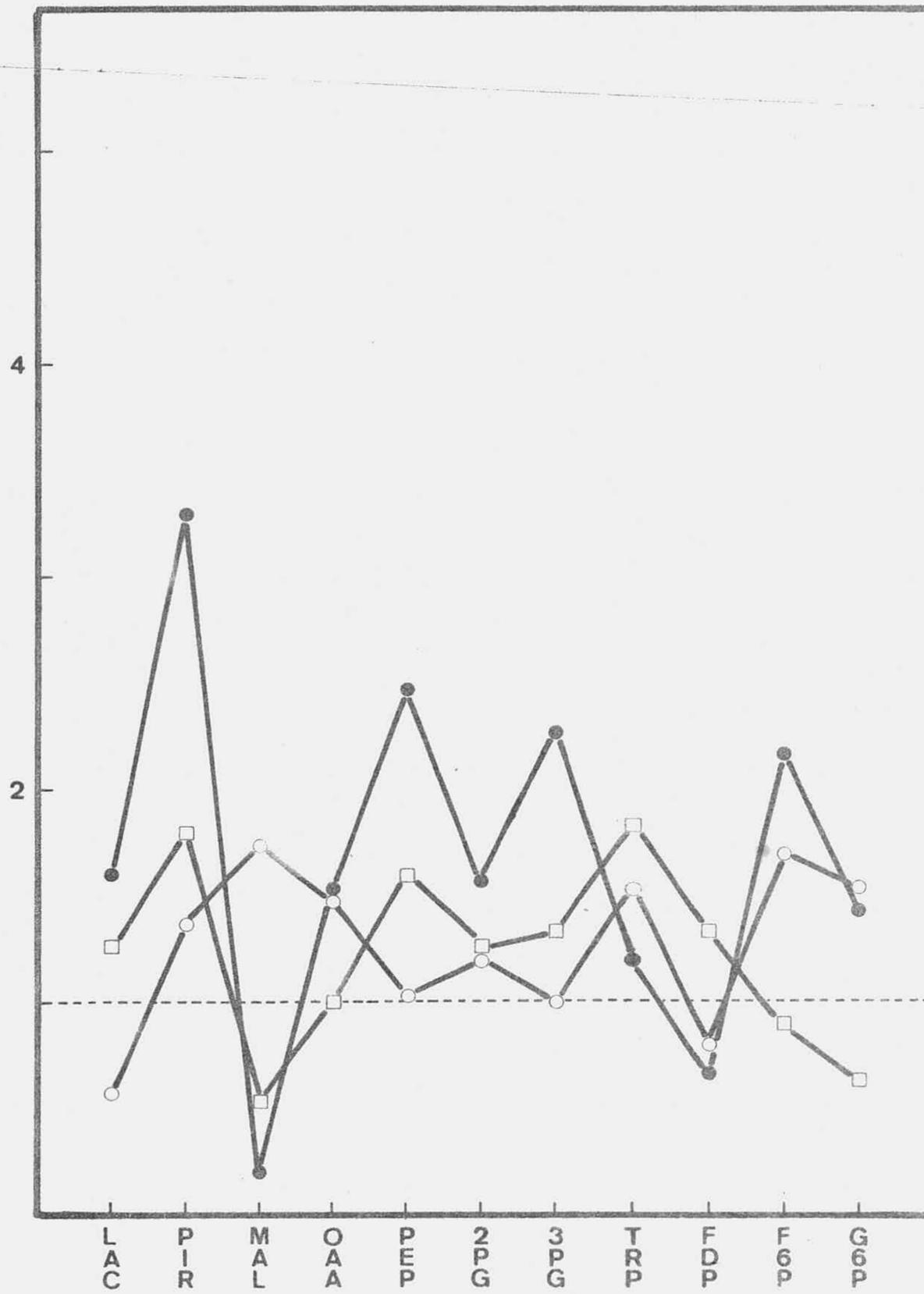
de dos horas.

Los resultados se exponen en la tabla nº 10 y gráfica nº 7.

3.2.3.2. - Concentración en riñón de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis de ratas ejercitadas tratadas con MICA

Los resultados expuestos en la tabla nº 11 y gráfica nº 8, se refieren a muestras tomadas en las mismas condiciones que anteriormente.

GRAFICA nº 7



Concentración en hígado de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas ejercitadas dos horas y tratadas previamente con MICA. Los resultados se expresan como múltiplos de los valores controles, siendo ejercicio (○); MICA (□); ejercicio y MICA (●).

TABLA nº 10

Concentración en hígado de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas ejercitadas dos horas y tratadas previamente con MICA. Los animales fueron inyectados intraperitonealmente tres horas antes de la muerte con 1 ml. de solución salina los controles o con el mismo volumen de solución de MICA los problemas. La natación se llevó a cabo durante las dos últimas horas del tratamiento.

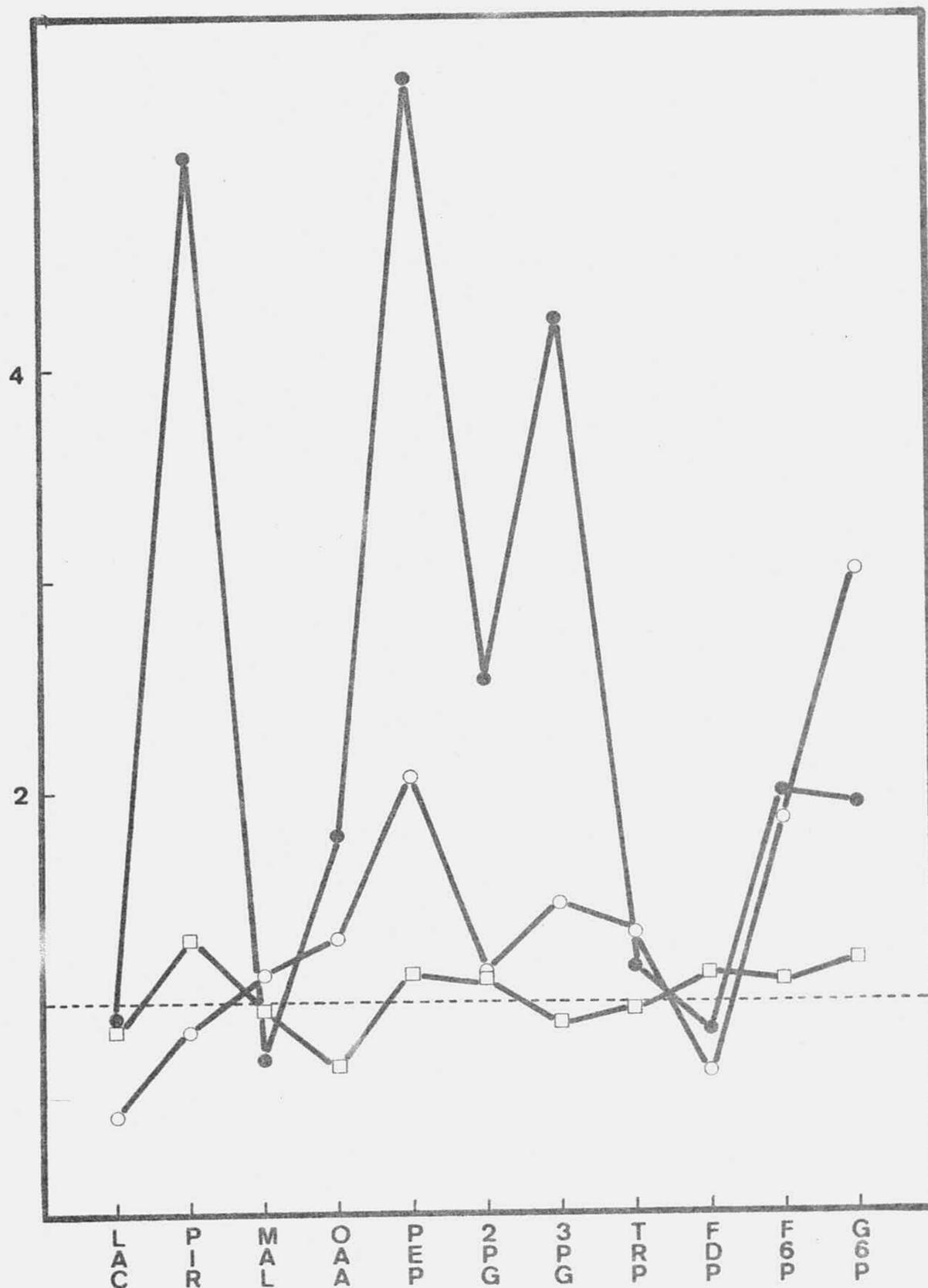
	LAC	PIR	MAL	CAA	PEP	2PG	3PG	TRP	FDP	F6P	G6P
Controles	1.348 ± 0.132 7	0.100 ± 0.016 5	0.702 ± 0.017 5	0.013 ± 0.002 2	0.136 ± 0.014 8	0.100 ± 0.006 7	0.445 ± 0.019 9	0.028 ± 0.006 6	0.019 ± 0.001 6	0.089 ± 0.014 8	0.531 ± 0.069 8
Ejercicio 2h.	0.782 ± 0.040 7	0.138 ± 0.023 7	1.213 ± 0.121 7	0.019 ± 0.003 7	0.141 ± 0.007 5	0.134 ± 0.006 6	0.439 ± 0.037 7	0.043 ± 0.003 7	0.015 ± 0.002 6	0.152 ± 0.012 4	0.819 ± 0.056 7
Veces control	0.58	1.38	1.73	1.46	1.04	1.19	0.99	1.54	0.79	1.71	1.54
MICA 50 mg/Kg	1.701 ± 0.132 7	0.179 ± 0.013 7	0.390 ± 0.041 6	0.013 ± 0.003 4	0.219 ± 0.035 6	0.143 ± 0.008 7	0.590 ± 0.034 6	0.051 ± 0.004 7	0.025 ± 0.003 7	0.080 ± 0.007 7	0.330 ± 0.026 7
Veces control	1.26	1.79	0.55	1.00	1.61	1.26	1.33	1.82	1.32	0.90	0.62
MICA+Ejercicio	2.173 ± 0.135 5	0.330 ± 0.052 6	0.176 ± 0.024 4	0.020 ± 0.003 3	0.335 ± 0.044 6	0.176 ± 0.021 6	1.004 ± 0.104 6	0.034 ± 0.003 6	0.013 ± 0.001 6	0.192 ± 0.014 6	0.763 ± 0.067 5
Veces control	1.61	3.30	0.25	1.54	2.46	1.56	2.26	1.21	0.68	2.16	1.44

TABLA nº 11

Concentración en riñón de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas ejercitadas dos horas y tratadas previamente con MICA. Los animales fueron inyectados intraperitonealmente tres horas antes de la muerte con 1 ml. de solución salina los controles o con el mismo volumen de solución de MICA los problemas. La natación se llevó a cabo durante las dos últimas horas del tratamiento.

	LAC	PIR	MAL	CAA	PEP	2PG	3PG	TRP	FDP	F6P	G6P
Controles	1.867 ± 0.135 8	0.046 ± 0.002 8	0.392 ± 0.021 6	0.010 ± 0.000 4	0.043 ± 0.002 8	0.031 ± 0.003 7	0.152 ± 0.020 8	0.032 ± 0.004 5	0.025 ± 0.002 6	0.016 ± 0.001 7	0.039 ± 0.002 8
Ejercicio	0.870 ± 0.075 6	0.039 ± 0.004 5	0.444 ± 0.026 5	0.013 ± 0.002 6	0.090 ± 0.008 4	0.035 ± 0.004 5	0.223 ± 0.034 5	0.043 ± 0.008 6	0.017 ± 0.002 6	0.030 ± 0.002 4	0.118 ± 0.006 5
Veces control	0.46	0.85	1.13	1.30	2.09	1.13	1.47	1.34	0.68	1.87	3.03
MICA 50 mg/Kg	1.734 ± 0.069 5	0.060 ± 0.010 4	0.379 ± 0.037 6	0.007 ± 0.002 5	0.048 ± 0.004 6	0.034 ± 0.005 6	0.139 ± 0.007 6	0.031 ± 0.004 6	0.028 ± 0.004 5	0.023 ± 0.004 5	0.047 ± 0.009 4
Veces control	0.85	1.30	0.97	0.70	1.12	1.10	0.91	0.97	1.12	1.44	1.20
MICA+Ejercicio	1.760 ± 0.203 7	0.229 ± 0.056 4	0.286 ± 0.020 5	0.018 ± 0.003 6	0.231 ± 0.016 4	0.079 ± 0.007 5	0.644 ± 0.043 5	0.037 ± 0.004 6	0.022 ± 0.002 5	0.032 ± 0.004 4	0.076 ± 0.004 3
Veces control	0.94	5.00	0.73	1.80	5.37	2.55	4.24	1.16	0.88	2.00	1.95

GRAFICA nº 8



Concentración en riñón de los intermediarios metabólicos de la gluconeogénesis en ratas ejercitadas dos horas y tratadas previamente con MICA. Los resultados se expresan como múltiplos de los valores controles, siendo ejercicio (○); MICA (□); ejercicio y MICA (●).

#### 3. 2. 4. - Efecto del ejercicio sobre la capacidad de consumo de cuerpos cetónicos por la corteza renal.

Uno de los tejidos que utilizan compuestos cetónicos en mayor escala es la corteza renal (186). Por ello una vez comprobado el claro incremento de cuerpos cetónicos en sangre después de una actividad muscular forzada, resultaba interesante conocer si se alteraba la capacidad de consumo por la corteza renal en estas condiciones.

Para ello se incubaron cortes de corteza renal de peso seco comprendido entre 1 y 2,5 mg tal como se ha descrito en la sección 2. 3. 16. El sustrato añadido al medio de incubación fue acetoacetato 2mM, sustrato de más rápida metabolización que el 3-hidroxi butirato.

Una vez finalizada la incubación se determinó el acetoacetato consumido, así como la cantidad de 3-hidroxi butirato en el medio.

Los resultados se muestran en la tabla nº 12. Puede observarse que no existen diferencias significativas a este respecto entre animales control y animales sometidos a dos horas de ejercicio.

TABLA nº 12

Efecto del ejercicio sobre la capacidad de consumo de cuerpos cetónicos por la corteza renal.

El sustrato utilizado fue acetoacetato a concentración 2 mM. Los animales problema fueron sometidos a dos horas de ejercicio en agua a 22°C. Las medias de los valores hallados están expresados en  $\mu\text{moles} \times \text{hora}^{-1}$  de incubación  $\times \text{gramo}^{-1}$  de tejido seco. El  $\pm$  representa el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

	Nº exp.	Acetoacetato consumido	P	3-hidroxiacetato producido	P
Controles	5	307 ± 26		56 ± 3	
Ejercicio	6	348 ± 35	<0.30	65 ± 4	<0.10

### 3.2.5. - Efecto del ejercicio sobre la capacidad ureogénica hepática

Es conocido que el entrenamiento origina la inducción de las enzimas del ciclo ureogénico, (194), pero no existen datos en la bibliografía en relación al efecto del ejercicio intenso de corta duración sobre la producción de urea por el hígado. Por ello se ha determinado la capacidad ureogénica en ratas, que previamente han sido sometidas a 2 horas de ejercicio en agua a 22°C. Se ha utilizado la técnica de perfusión hepática siendo el sustrato cloruro amónico 10 mM. El sustrato se añadió al medio de perfusión a los 38 minutos de iniciada la misma.

Los resultados obtenidos se han expresado de dos maneras:

a) Producción de urea y consumo de  $\text{NH}_4$  ( $\mu\text{moles}/150 \text{ ml}$ ) respecto al tiempo (gráfica nº 9).

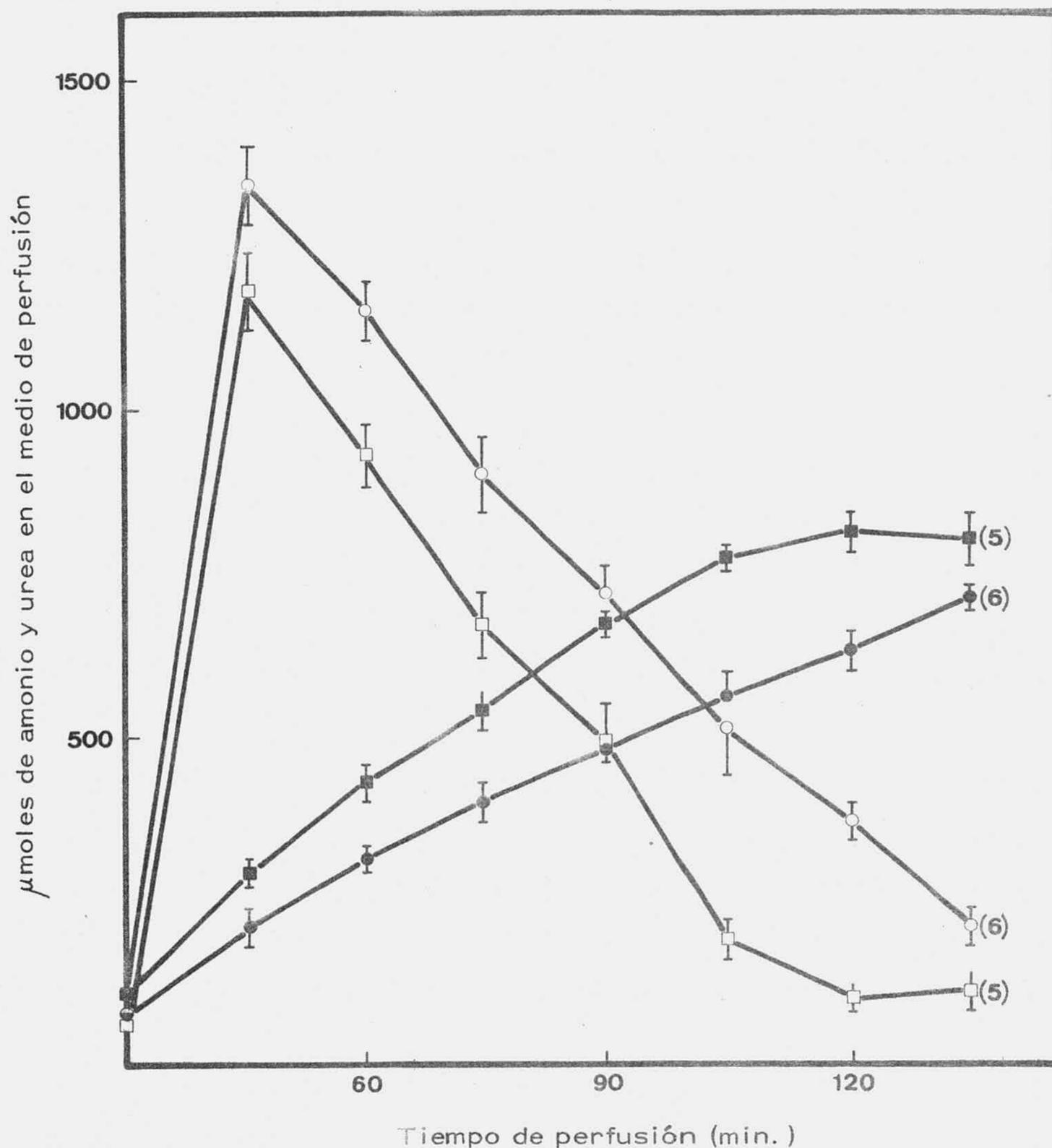
b)  $\mu\text{moles}$  de urea formados o de amonio consumidos por gramo de hígado seco y por minuto de perfusión (tabla nº 13).

TABLA nº 13

Efecto del ejercicio sobre la capacidad ureogénica de hígado perfundido de rata.

Los animales problema fueron sometidos a dos horas de ejercicio en agua a 22°C. El sustrato, cloruro amónico a concentración 10mM, fue añadido a los 38 minutos del comienzo de la perfusión. La velocidad de formación de urea y de consumo de amonio se expresa en  $\mu\text{moles} \times \text{minuto}^{-1}$  de perfusión  $\times \text{gramo}^{-1}$  de hígado seco. Los resultados expuestos son los coeficientes angulares de la recta de regresión  $\pm$  la desviación típica de estos coeficientes.

	AMONIO			UREA	
	Nº exp.	Velocidad de consumo	P	Velocidad de producción	P
Controles	6	$-8,6 \pm 0.7$		$4.1 \pm 0.4$	
Ejercicio	5	$-9.9 \pm 0.7$	<0.90	$4.8 \pm 0.3$	<0.30



Efecto del ejercicio sobre la capacidad ureogénica hepática. Los animales problema fueron sometidos a dos horas de ejercicio en agua a 22°C. Urea encontrada en el medio de perfusión de animales controles (●); de animales tratados (■); amonio encontrado en el medio de perfusión de animales controles (○); de animales tratados (□). Las líneas verticales representan la desviación estándar de la media de los valores hallados en cada punto. El número de experiencias se indica entre paréntesis. Los pesos medios de los hígados secos fueron 1.472 g para los animales controles y 1.601 g para los animales tratados.

### 3.3. - EFECTO DEL ESTRES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA.

Los resultados expresados en la sección 3.1. indican claramente que la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal por el ejercicio se debe a la acidosis láctica que acompaña a esta situación fisiológica. Conviene puntualizar, sin embargo, que la producción de ácido láctico por el músculo no parece depender únicamente de la intensidad del trabajo físico sino que está sujeta a otras variables. En efecto cuando la natación se realiza a 37° en vez de los 22°C habituales, la producción de ácido láctico -asumiendo que está fielmente reflejada por sus valores en sangre- no sobrepasa la concentración de 4.6 mM, siendo en este caso la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal solo levemente superior a la normalidad (189).

Parece claro, por tanto, que la producción de ácido láctico - durante la natación está influenciada por el estrés que supone la temperatura de 22°C, muy por debajo de la fisiológica. Las experiencias que se relacionan a continuación tenían como objeto "separar" los efectos de la actividad muscular de la del estrés y estudiar la contribución de cada uno de estos factores a lo que hasta ahora hemos venido denominando "efectos del ejercicio". Se han incluido también los resultados de una serie de experiencias íntimamente relacionadas con todas las que constituyen esta memoria doctoral, relativas al comportamiento de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa en condiciones de estrés no ligadas al ejercicio.

### 3.3.1. - Efecto de la inmersión en agua a 22° C sin ejercicio

Esta experiencia supone en cierto modo lo contrario que la natación en agua a 37°C, que hemos citado con anterioridad. Se trataba con ella de comprobar el efecto del estrés producido por el agua a temperatura por debajo de la fisiológica sin que hubiera más actividad muscular que la desarrollada al tiritar en orden a mantener la temperatura corporal dentro de la normalidad. Se han determinado los valores de ácido láctico en sangre, actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y de la gluconeogénesis renal en ratas mantenidas en agua a 22°C, pero sin cubrirlas, durante quince minutos.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla nº 14.

Como puede observarse, a excepción de la temperatura rectal que desciende drásticamente, no se producen cambios significativos en los valores basales de la capacidad gluconeogénica, de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa de corteza renal, ni de la concentración de lactato y glucosa en sangre.

TABLA nº 14

Efecto de la inmersión en agua a 22°C sin ejercicio sobre la concentración de ácido láctico y glucosa en sangre, la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa y la capacidad gluconeogénica de la corteza renal.

Las concentraciones se expresan en  $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$  de sangre; la actividad enzimática en  $\text{nmoles de sustrato transformado} \times \text{minuto} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína; la capacidad gluconeogénica en  $\mu\text{moles de glucosa producida} \times \text{hora}^{-1}$  de incubación  $\times$  gramo de tejido seco. Los resultados expuestos son medias  $\pm$  el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que la diferencia entre las medias no sea significativa.

	Nº exp.	Controles	Nº exp.	Tratadas 15 min.	P	Nº exp.	Tratadas 2 h.	P
Gluconeogénesis renal	10	128 $\pm$ 6	3	132 $\pm$ 8	<0.90	11	133 $\pm$ 8	<0.50
PEPCK renal	4	34 $\pm$ 2	3	34 $\pm$ 3	<0.90	3	37 $\pm$ 3	<0.50
Glucosa en sangre	4	8.070 $\pm$ 0.318	3	8.122 $\pm$ 0.695	<0.90	3	6.887 $\pm$ 0.237	<0.05
Lactato en sangre	5	3.009 $\pm$ 0.500	3	2.194 $\pm$ 0.998	<0.50	8	2.507 $\pm$ 0.338	<0.50
Temperatura rectal	4	36.7 $\pm$ 0.2	5	30.0 $\pm$ 0.3	<0.001	8	25.7 $\pm$ 0.5	<0.001

### 3.3.2. - Efecto de la temperatura ambiental antes de la realización del ejercicio.

Los resultados que se describen en este apartado corresponden a una serie de animales que estuvieron sometidos de manera fortuita a una temperatura ambiental de 30°C durante varios días. Como se muestra en la tabla nº 15, en estas condiciones los animales presentaban hiperlactacidemia, y al ser sometidos a dos horas de ejercicio no incrementaban la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas renal, sino que dichos valores estaban significativamente más bajos que los controles.

Después de normalizada la temperatura de la habitación entre 14 y 18°C, la concentración de lactato descendió rápidamente hasta valores normales y la actividad enzimática de las ratas ejercitadas se incrementó en la proporción acostumbrada.

TABLA nº 15

Efecto de la temperatura ambiental sobre la concentración sanguínea de ácido láctico y sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de corteza renal en ratas controles y sometidas a dos horas de ejercicio.

El tratamiento se describe en el texto adjunto. La concentración de ácido láctico se expresa en  $\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1}$  de sangre; la actividad enzimática en nmoles de sustrato transformado  $\times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína. Los resultados expuestos son medias  $\pm$  el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que las diferencias entre las medias no sea significativa.

	CONTROLES				EJERCICIO 2h.		
	Nº exp.	Lactato en sangre	P	Actividad enzimática	Nº exp.	Actividad enzimática	P
Temperatura ambiental alta	8	7.133 $\pm$ 0.420		35 $\pm$ 2	4	27 $\pm$ 3	<0.05
Temperatura ambiental baja	4	3.855 $\pm$ 0.390	<0.01	34 $\pm$ 2	10	55 $\pm$ 4	<0.001

### 3.3.3. - Efecto de una situación estresante de corta duración

Los animales fueron sometidos al estrés producido por suspensión en una malla, durante periodos variables de tiempo: 2, 5, 10 y 15 minutos. Después fueron anestesiados para obtener la sangre, por lo que al tiempo descrito del tratamiento hay que sumar los cinco minutos que se esperaba para la extracción de la sangre.

#### 3.3.3.1. - Concentración de lactato en sangre

Como se observa en la tabla nº 16 y gráfica nº 10 los niveles de lactato en sangre aumentan rápidamente tras cinco minutos de tratamiento. Con igual rapidez se recuperan los valores normales. En el punto máximo, a los cinco minutos de tratamiento, el valor alcanzado es casi tres veces el control (tiempo cero).

#### 3.3.3.2. - Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas hepática

La actividad ensayable de la enzima hepática sufre un incremento significativo tan solo con dos minutos de tratamiento, incremento que se mantiene a los cinco y diez minutos (tabla nº 16 y gráfica nº 10).

#### 3.3.3.3. - Actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal

La enzima renal muestra una elevación de su actividad paralela a la de la enzima hepática. Esta elevación es tan rápida que resulta significativa tras dos minutos de tratamiento, alcanzando su valor máximo a los 5 minutos.

Los resultados se muestran en la tabla nº 16 y gráfica nº 10.

#### 3.3.3.4. - Concentración de glucosa en sangre

Como puede observarse en la tabla 16 y gráfica nº 10, no hay variaciones en la glucemia en ningún momento de la experiencia.

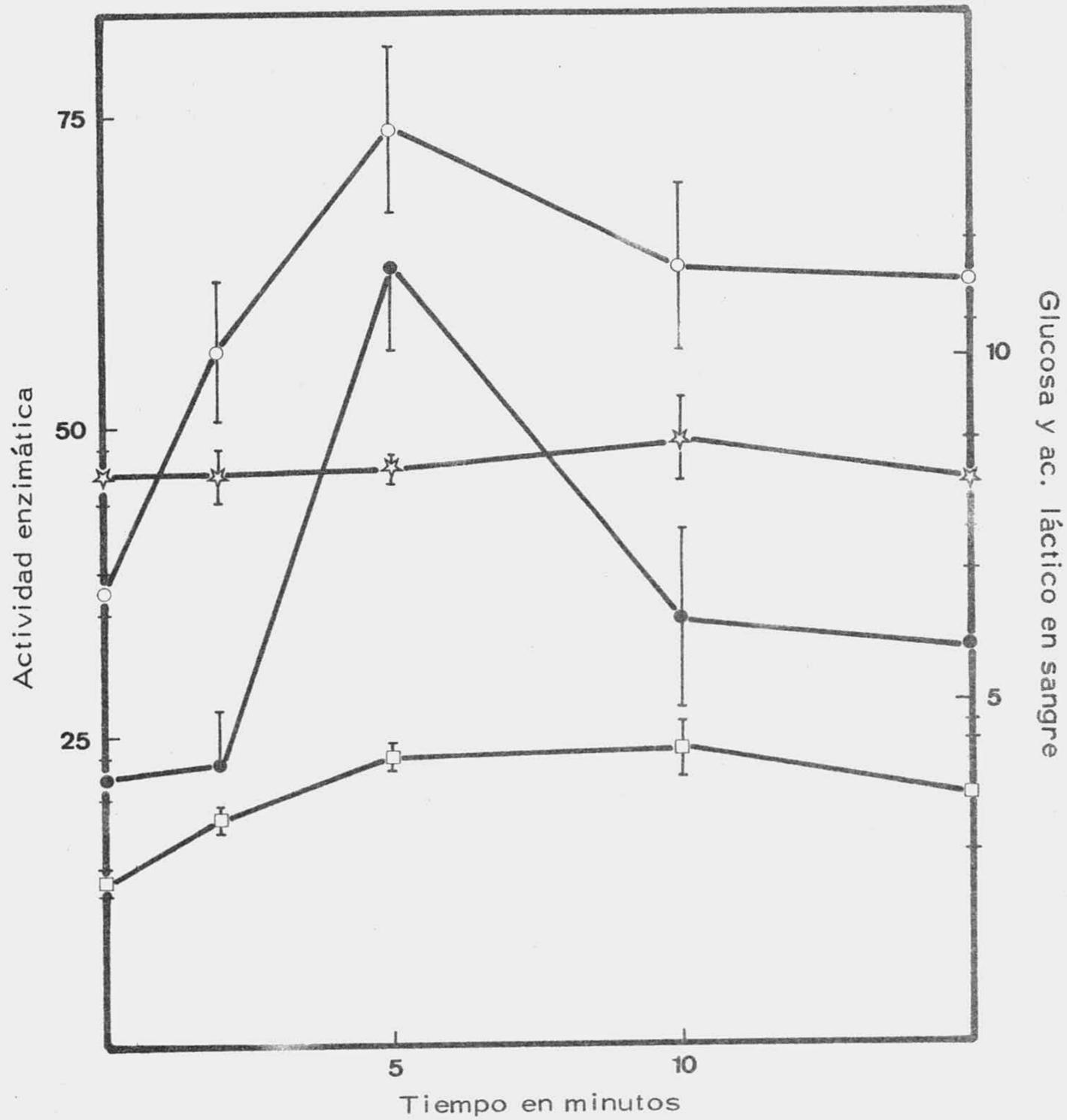
TABLA nº 16

Efecto de una situación estresante de corta duración sobre la concentración sanguínea de ácido láctico y glucosa y la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas hepática y de corteza renal.

El tratamiento se describe en la sección 2.3.1.8. Las concentraciones se expresan en  $\mu\text{moles} \times \text{ml}$  de sangre; la actividad enzimática en  $\text{nmoles de sustrato transformado} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína. Los resultados son medias  $\pm$  el error estándar de la media. P indica la probabilidad de que las diferencias entre las medias no sea significativa.

	PEPCK hepática			PEPCK renal			Glucosa en sangre			Lactato en sangre		
	Nº exp.	Actividad enzimática	P	Nº exp.	Actividad enzimática	P	Nº exp.	Concentración	P	Nº exp.	Concentración	P
0 minutos	4	14 $\pm$ 1		4	36 $\pm$ 1		4	8.353 $\pm$ 0.370		7	3.931 $\pm$ 0.366	
2 minutos	5	18 $\pm$ 1	<0.05	6	59 $\pm$ 6	<0.01	5	8.300 $\pm$ 0.412	<0.90	6	4.145 $\pm$ 0.833	<0.30
5 minutos	4	23 $\pm$ 2	<0.01	6	74 $\pm$ 7	<0.001	7	8.414 $\pm$ 0.220	<0.90	7	11.290 $\pm$ 1.240	<0.001
10 minutos	3	24 $\pm$ 2	<0.01	8	63 $\pm$ 7	<0.01	7	8.788 $\pm$ 0.586	<0.90	6	6.165 $\pm$ 1.310	<0.20
15 minutos	4	20 $\pm$ 4	<0.30	7	62 $\pm$ 3	<0.001	4	8.212 $\pm$ 0.655	<0.90	5	5.839 $\pm$ 1.133	<0.20

GRAFICA nº 10



Efecto de una situación estresante de corta duración sobre la concentración sanguínea de ácido láctico y glucosa sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática y de corteza renal. Los resultados se expresan en la tabla nº 16. Acído láctico ( ● ); glucosa ( ☆ ); fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática ( □ ); fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal ( ○ ). Las líneas verticales representan el error estándar de la media de los valores hallados en cada punto.



IV. - DISCUSSION



#### IV. - DISCUSION

##### 4. 1. - ACIDOSIS LACTICA Y ACTIVIDAD DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA RENAL DURANTE EL EJERCICIO

Los trabajos llevados a cabo anteriormente en el Departamento relativos al efecto del ejercicio sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas renal habían llevado a las siguientes conclusiones y sugerencias, descritas sumariamente:

- a) La fosfoenolpiruvato carboxicinasas renal incrementa su actividad a consecuencia del ejercicio.
- b) Existe un fuerte aumento en la concentración de ácido láctico en sangre a los quince minutos de ejercicio.
- c) El incremento en la actividad enzimática no puede impedirse por tratamiento previo con antibióticos inhibidores de síntesis proteica utilizados a dosis similares a las empleadas en situaciones de acidosis clorhídrica experimental y que en esas circunstancias tampoco son capaces de bloquear la activación de la enzima.
- d) Cuando a las ratas se les administra previamente bicarbonato se impide el aumento en la actividad enzimática.
- e) Todo ello sugería que la activación enzimática durante el ejercicio se debería a la acidosis metabólica -láctica- que acompaña normalmente al ejercicio.

Como punto siguiente de estudio parecía lógico investigar la existencia real de dicha situación de acidosis en nuestras condiciones experimentales, determinando los parámetros sanguíneos característicos de dicha situación.

Los resultados descritos en la primera parte de esta memoria doctoral corroboran los anteriormente obtenidos en este Departamento y constituyen una clara evidencia de la hipótesis inicial del trabajo. Efectivamente, durante el ejercicio realizado en nuestras condiciones experimentales existe una acidosis metabólica manifiesta, con un descenso muy acusado del pH sanguíneo y una pérdida muy fuerte también de bicarbonato en plasma, todo ello referido al minuto quince de iniciado el ejercicio. Es, por tanto, muy razonable atribuir a esta acidosis láctica que acompaña al ejercicio la causa del incremento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal en estas condiciones.

Los resultados que se describen en la sección 3.1.4. tienen a este respecto un gran valor confirmativo que vamos a considerar con cierto detalle, ya que la situación en este punto es algo compleja de describir.

Como acabamos de recordar (apartado "c" de esta sección), el tipo de activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa durante el ejercicio era similar al encontrado en la acidosis metabólica experimental; en ninguno de los dos casos era posible impedir la activación bloqueando la síntesis proteica con antibióticos inhibidores de dicho proceso. No obstante, tal como se ha señalado en la sección 3.1.4., trabajos recientes de Lynedjiand y col. indicaban que era posible evitar la activación de la fos

foenolpiruvato carboxicinasas renal por la acidosis metabólica experimental, aumentando sustancialmente la dosis de inhibidores de la síntesis de proteína (106). Al reexaminar nosotros el comportamiento de la enzima con las correspondientes dosis elevadas de antibiótico hemos encontrado que estas concentraciones de inhibidores bloquean efectivamente dicha activación en ratas sometidas a ejercicio.

Parece evidente que estos últimos resultados constituyen una confirmación adicional de la hipótesis de nuestro trabajo porque indican que se mantiene el paralelismo entre el comportamiento de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas ante la acidosis metabólica y el ejercicio. Es decir:

a) A dosis pequeñas de antibiótico inhibidor ( actinomicina D) no se impide el bloqueo de la activación de la enzima por la acidosis metabólica experimental ni por el ejercicio (aunque esta dosis es capaz de suprimir el efecto inductor de los glucocorticoides).

b) A dosis elevadas del mismo antibiótico se suprime la activación de la enzima por acidosis metabólica y por el ejercicio .

En lo que se refiere a la naturaleza de esta activación, atribuida inicialmente por Alleyne y col. (20) y por Longshaw y col. (187, 188) a una prolongación en la vida media de la enzima o a una conversión de un precursor en una proteína más activa , parece, sin embargo, que debe existir fundamentalmente síntesis de nueva proteína, de acuerdo con Lynedjiand y col. , que han utilizado una metodología más precisa. Por extensión, presumimos que en nuestras condiciones experi

mentales existen también fenómenos inductivos con síntesis "de novo" de la proteína enzimática. Lo que no cabe duda es que la inducción no es del mismo tipo que la que tiene lugar por la administración de corticoides, que resulta mucho más sensible a la inhibición por antibióticos. Ello subraya la especial situación de esta enzima dentro del metabolismo renal, sujeta muy especialmente a una regulación ligada al equilibrio ácido-básico del medio interno, a pesar de su situación dentro de la vía gluconeogénica. La clásica acción gluconeogénica de los glucocorticoides tendría lugar fundamentalmente a través de la inducción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, pero esta situación parece distinta, por lo menos cuantitativamente, de la que tiene lugar por la acidosis metabólica.

El otro dato que confirma la vinculación de la activación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa renal por el ejercicio a la producción de ácido láctico es que esta activación es de un valor semejante cuando el ejercicio se interrumpe después de los primeros quince minutos, cuando se han alcanzado los máximos sanguíneos en la concentración de ácido láctico. Parece claro que los 105 minutos restantes no afectan a la activación enzimática resultando lo mismo que se realice un ejercicio moderado, como ocurre en nuestras condiciones experimentales habituales, ó que los animales guarden un reposo total .

Los datos experimentales que han servido para corroborar la hipótesis inicial de nuestro trabajo ofrecen además la oportunidad de realizar una serie de consideraciones adicionales.

La primera de ellas está relacionada con las concentraciones sanguíneas de cuerpos cetónicos durante las dos horas de ejer-

cicio. Existe un casi perfecto paralelismo entre la evolución de los niveles plasmáticos de acetoacetato y 3 -hidroxibutirato, siendo destacable el descenso inicial en las concentraciones de ambos compuestos, que alcanza un mínimo a los diez minutos, cuando la concentración de ácido láctico es mayor. Posteriormente las concentraciones de cuerpos cetónicos van aumentando mientras se disminuye el nivel de láctico. Parece claro, por tanto, que el descenso en el pH sanguíneo a los quince minutos de ejercicio se debe al incremento en la lactacidemia. En cambio, el bajo pH registrado a las dos horas de ejercicio refleja aparentemente el incremento en los niveles sanguíneos de cuerpos cetónicos.

La evolución en sangre de los niveles de acetoacetato y 3 -hidroxibutirato coincide a grandes rasgos con los datos de Courtice y Douglas (200) y de Johnson y col. ( 201 ) en lo que se refiere a su aumento gradual en sangre tras el fuerte ejercicio inicial de los animales. Ello refleja probablemente el progresivo desfase entre su producción y su consumo. En efecto, los cuerpos cetónicos se originan a nivel hepático a partir de los ácidos grasos liberados por el tejido adiposo. Durante el ejercicio existe una fuerte liberación de ácidos grasos a la sangre y su concentración aumenta en la misma antes que los cuerpos cetónicos (201). Muy probablemente el consumo de estos últimos compuestos irá decreciendo conforme los animales se habitúan al medio extraño y dejan de realizar un ejercicio violento. Ello llevará consecuentemente a su aumento gradual en la sangre. El descenso inicial debe reflejar, de forma coherente con lo anterior, un rápido consumo de los cuerpos cetónicos preexistentes en el plasma, antes de que haya dado tiempo a la producción hepática "de novo".

Conviene destacar que la acidosis láctica característica de los primeros quince minutos de ejercicio lleva aparejada una disminución muy notable del bicarbonato plasmático mientras que la acidosis cetótica que se registra a las dos horas de natación cursa con valores de bicarbonato plasmático normales, lo que debe reflejar evidentemente un trabajo renal muy eficiente en la regeneración tubular de dicho bicarbonato.

Las determinaciones de pH y bicarbonato sanguíneos correspondientes a las ratas tratadas con bicarbonato (tabla nº 2) arrojan valores semejantes que para las ratas tratadas con solución salina cuando las medidas se realizaron a los quince minutos de ejercicio. Ello se explica porque la administración de bicarbonato se hizo inmediatamente antes de iniciar el ejercicio, no habiéndose traducido todavía dicha administración en los correspondientes valores sanguíneos. Debe recordarse que el tratamiento se realizó por vía intragástrica, lo que exige un tiempo probablemente superior a los quince minutos para los fenómenos absortivos. En cambio, a las dos horas de natación se observa que el pH está ya algo corregido -aunque sigue siendo bajo- y la concentración de bicarbonato en plasma es, incluso superior a la normal. El descenso en el pH viene explicado, lógicamente, por el alto valor de  $p\text{CO}_2$  y puede atribuirse razonablemente a las dificultades respiratorias propias de la natación.

Otro de los aspectos que merece señalarse es el relativo a la evolución durante los primeros quince minutos de ejercicio de los valores de lactacidemia y actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal en ratas tratadas o no con bicarbonato, media hora antes de iniciar

el ejercicio. Las ratas tratadas con bicarbonato comienzan el ejercicio, de natación en este caso, con una concentración más alta que la normal de este compuesto en sangre (resultados no incluidos en el texto) y son por lo tanto alcalóticas.

Por lo que se refiere a la lactacidemia, es interesante subrayar que las ratas tratadas con bicarbonato presentan valores de ácido láctico en sangre superiores a las no tratadas, aunque se mantiene un paralelismo perfecto en la evolución de dichos valores. La mayor concentración inicial de ácido láctico sanguíneo en estas ratas alcalóticas coincide con los datos obtenidos en la bibliografía (202, 206). Aunque la explicación de este fenómeno no está clara, puede interpretarse por una aceleración en la glucólisis muscular (207). Debe recordarse a este respecto que la fosfofructocinasa es una enzima muy sensible al pH (208). Los trabajos de Ui en 1966 con células intactas de diafragma de rata han demostrado que al cambiar el pH externo desde 7.4 a 8.0 se estimula el consumo de glucosa y la producción de lactato. Al parecer, el aumento de pH previene la bien conocida inhibición de la fosfofructocinasa por ATP (209).

Por lo que se refiere a la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal, es destacable que los valores iniciales son muy inferiores en las ratas tratadas con bicarbonato, lo que coincide con lo señalado por Kamm y col. para animales alcalóticos (105). Más interesante aún por lo que tiene de hallazgo original es el ligero incremento de la actividad enzimática a los cinco minutos de iniciado el ejercicio, siendo el efecto más significativo en las ratas tratadas con bicarbonato. Dado que los valores de actividad enzimática vuelven a descender a los diez minutos y se estabilizan, no parece lógico atribuir ese incremento a la lactacidemia, que alcanza su máximo cinco minutos más tarde. Parece más bien un efecto

transitorio ligado quizás al estrés que supone la inmersión. Teniendo en cuenta que la tercera parte de esta discusión estará destinada a considerar el efecto del estrés sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas, volveremos allí a recordar este dato experimental. Cabe añadir que la evolución temporal de esta actividad enzimática es extraordinariamente similar a la de la capacidad gluconeogénica renal, lo que corrobora una vez más el decisivo papel de dicha enzima en la regulación de la gluconeogénesis.

#### 4. 2. - OTROS ESTUDIOS METABOLICOS EN EL EJERCICIO

Se ha corroborado el incremento suave que experimenta la glucemia tras dos horas de ejercicio, tiene tal como había sido descrito por García-Ruiz en nuestro Departamento (121). Es curioso resaltar que hay dos máximos, a los quince y sesenta minutos, ambos muy significativos. El máximo de los quince minutos había sido ya señalado por Gould y Rawlinson (210) y por Dawson (151), y debe tener su explicación en la respuesta glucogenolítica hepática al aumento en las concentraciones circulantes de adrenalina (211) y glucagón (212). Por otra parte no hay alteraciones significativas en los niveles de alanina, urea y amonio en sangre durante las dos horas de ejercicio, salvo un ligero aumento de amonio a los cinco minutos, que podría quizás explicarse por la falta de riego sanguíneo del hígado durante los minutos iniciales del ejercicio (213) con la consiguiente merma en la función desintoxicante de este órgano.

No existen ventajas apreciables en el empleo de una ayuno de 12 horas en vez de la administración de ácido nicotínico para estudiar las posibles alteraciones en la capacidad gluconeogénica hepática prom

vidas por el ejercicio, De hecho, la capacidad gluconeogénica a partir de lactato tras doce horas de ayuno es mucho mayor que la que origina el tratamiento con ácido nicotínico (121) y casi tan alta como la correspondiente a un ayuno de 48 horas. Por ello no es de extrañar que el ejercicio no signifique un incremento adicional en dicha capacidad gluconeogénica hepática, ya más que suficiente para realizar la síntesis de una gran cantidad de glucosa.

El perfil de metabolitos de la gluconeogénesis determinados en riñón de ratas sometidas a ejercicio durante dos horas confirma el funcionamiento de esta vía metabólica "in vivo" (121). Sin embargo, cuando las ratas se trataron previamente con ácido 5-metoxi-2-indol carboxílico, para inhibir selectivamente la gluconeogénesis hepática forzando así el papel metabólico del riñón, lo que ocurre en realidad es una potenciación del efecto del inhibidor. Efectivamente, el perfil de estos metabolitos en el riñón es del mismo tipo que el obtenido en el hígado, lugar preferente de su actuación, destacando las altas concentraciones tisulares de piruvato (en contraposición al lactato) y fosfoenolpiruvato. Como se ha indicado en la sección 3.2.3., trabajos realizados anteriormente en el Departamento por Lupiáñez y colaboradores habían señalado una inducción de la gluconeogénesis renal tras la administración de ácido 5-metoxi-2-indol carboxílico, que se comportaba como un inhibidor selectivo de la gluconeogénesis hepática (199). La potenciación del efecto inhibitor de ácido 5-metoxi-2-indol carboxílico a nivel renal por el ejercicio no es fácil de explicar, puesto que dicho compuesto por sí solo no altera sensiblemente el perfil de metabolitos gluconeogénicos. Puede aventurarse sin embargo la hipótesis de que dicha capacidad de inhibición solo se habrá hecho patente en condiciones de un

alto consumo de ácido láctico por el riñón, tal como ocurre probablemente en el ejercicio. En este hipotético caso, tendríamos un argumento adicional para subrayar el importante papel de la corteza renal en el consumo gluconeogénico del ácido láctico que se produce en el ejercicio.

Ni el consumo de compuestos cetónicos por la corteza renal ni la capacidad de formación de urea por el hígado se afectan significativamente por el ejercicio. En lo que se refiere a los compuestos cetónicos, estos resultados coinciden satisfactoriamente con los datos publicados recientemente por Winder y col, que señalan que un programa de entrenamiento de catorce semanas no modifica las actividades de 3-hidroxi-butirato deshidrogenasa, 3-cetoácido-CoA transferasa y tiolasa en la corteza renal de rata, aunque suponen un incremento en el músculo esquelético, lo que explica que los individuos entrenados no desarrollen cetosis tras el ejercicio (214).

#### 4.3. - EFECTO DEL ESTRES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA

Como se ha mencionado anteriormente (sección 3.3.), la producción de ácido láctico por el músculo durante la natación no depende únicamente de la intensidad del esfuerzo físico sino que está influenciada por otras variables, entre las que destaca por su importancia la temperatura. Así, cuando se opera a 22°C (temperatura muy por debajo de la fisiológica), existe una gran producción de ácido láctico tal como ocurre en nuestras condiciones experimentales habituales. En cambio, si el agua está a 37°C, el aumento en los valores de lacticiemia es muy pequeño (189), Muy probablemente por la desaparición del

estrés que supone la baja temperatura del agua. Sin embargo, nuestras experiencias relativas a la inmersión en agua a 22°C sin ejercicio indican que en estas condiciones no existe aumento alguno de ácido láctico en sangre sino incluso una disminución. Es evidente que no es, por lo tanto, el frío el causante de la alta producción de ácido láctico, durante la natación en agua a 22°C, sino que esta sobreproducción debe atribuirse a un complejo cúmulo de factores, entre los que debe actuar -al menos indirectamente - el frío, y que podríamos englobar en el término de "estrés de la natación en agua fría". Es interesante señalar que cuando el agua se encuentra a una temperatura muy por encima de 37°C también se forma una gran cantidad de lactato (215). La alta producción de ácido láctico durante la natación en agua a temperatura por debajo o por encima de la corporal resulta difícil de explicar, pero cabe añadir que está relacionada con la capacidad de natación, de forma que la producción de ácido láctico es inversamente proporcional al tiempo que tardan los animales en quedar exhaustos.

Aunque está descrito por otra parte que el frío induce la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa hepática y renal (sección 1.1.4.1.), debe puntualizarse que en ese caso se trata de condiciones mucho más drásticas y que requieren un mayor tiempo de actuación, circunstancias ambas que no existen en nuestro caso, por lo que la falta de alteraciones en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal en nuestras condiciones es perfectamente normal.

Los resultados descritos en la sección 3.3.2. presentan un gran interés aunque, por su naturaleza fragmentaria (debido precisamente al carácter fortuito que los motivó), no son todavía de fácil explicación. A primera vista existe, una paradoja en relación a los demás

resultados de esta memoria, pues se trata de animales con una lacticidemia elevada pero con una actividad normal de fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que los valores de ácido láctico en sangre eran reflejo de una situación crónica, probablemente de una gran complejidad fisiológica, y sin semejanza con las condiciones de acidosis láctica aguda anteriormente descritas. Resulta claro el interés de volver a realizar estas experiencias de una forma detallada.

Otras experiencias que parecen requerir una atención principalísima en el futuro son las descritas en la sección 3. 3. 3. que se refieren al efecto de una situación estresante de corta duración no ligada al ejercicio. Cabe destacar que se trata de un efecto muy claro sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, tanto en hígado como en riñón, y que no es posterior a la fuerte subida de la lacticidemia. Esta última es muy elevada a los cinco minutos de la experiencia, alcanzando un valor similar al obtenido a los diez minutos del ejercicio, y que desciende mucho más rápidamente que en aquella circunstancia. Dado que la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal es ya claramente patente a los dos minutos, mientras que en este tiempo las diferencias en la lacticidemia no son aun significativas, parece lógico pensar que dicha activación no está relacionada con los valores sanguíneos de ácido láctico. El fenómeno es menos acusado en el caso de la enzima hepática, pero, en cualquier caso, el "pico" correspondiente al ácido láctico se alcanza al tiempo que son ya muy altas ambas actividades enzimáticas. Por otra parte, la rapidez del incremento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa parece excluir a los fenómenos inductivos como explicación de dichos incrementos, que deben atribuirse mejor a la conversión de las enzimas preexistentes en formas de mayor actividad. Estos fenómenos han sido descritos para otras enzimas, existiendo una bibliografía muy amplia

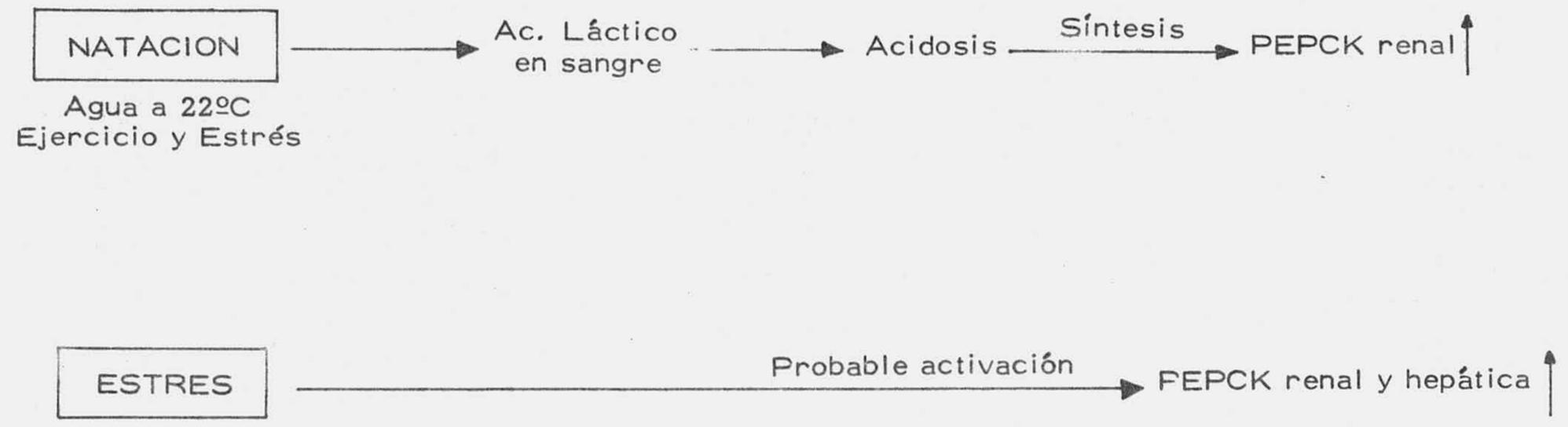
sobre el tema (para una revisión, puede acudirse a la de Rubin y Roseny 216). Incluso ha sido propuesto, como citamos anteriormente, para la fosfoenolpiruvato carboxicinasas renal en situación de acidosis clorhídrica experimental (20, 187, 188), aunque dicha hipótesis ha sido cuestionada a la luz de trabajos más recientes (106). En cualquier caso, se trataría de una acción rápida y transitoria que parece lógico atribuirla a una acción directa del simpático sobre la corteza renal. Acciones nerviosas directas de este tipo han sido descritas para diversas enzimas, entre ellas la glucógeno sintetasa preconizándole un mecanismo que implicaría la formación de AMP cíclico (217).

Con relación a la fosfoenolpiruvato carboxicinasas hepática es bien conocido que resulta inducida por adrenalina y glucagón a través de la formación de AMP cíclico en respuesta a la hipoglucemia (véase la sección 1.1.4.2.). Incluso la propia hipoglucemia puede desencadenar esta inducción por AMP cíclico sin intervención hormonal, tal como se ha demostrado en nuestro Departamento trabajando en hígado perfundido (218). Por otro lado, Nagai y col. han descrito una represión por carba<sub>3</sub>col -agente parasimpaticomimético- sobre la fosfoenolpiruvato carboxicinasas hepática, sugiriendo que los dos sistemas nerviosos autónomos actúan en oposición sobre dicha enzima para generar su conocido ritmo "circadiano" (219). En cambio no hay datos en la bibliografía sobre acciones semejantes de tipo nervioso en relación a la fosfoenolpiruvato carboxicinasas renal. Las catecolaminas actúan sobre el riñón muy probablemente a través de la formación de AMP cíclico (220) e incluso favorecen, "in vitro" la amoniogénesis y gluconeogénesis renal (221).

Sin embargo, no se ha podido demostrar la activación de la

carboxicinasa renal por AMP cíclico (106, 142), explicándose su actuación estimulante de la gluconeogénesis a través de un mecanismo que implicaría un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial para los precursores de oxalacetato (malato y aspartato) con el resultado de una aceleración de la reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxicinasa debida al aumento en las concentraciones de sustrato (142).

Parece prematuro elaborar una hipótesis más o menos detallada sobre la naturaleza, y sobre todo, sobre el posible significado fisiológico de esta activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa por el estrés. Lo que no cabe duda es que se trata de un fenómeno de alto interés y cuyo carácter transitorio —puede recordarse ahora la elevación de esta actividad en los primeros minutos del ejercicio, que podría estar relacionada con el estrés producido por la inmersión— podría explicar quizás algunos de los problemas de interpretación que suscita la activación de esta enzima en diversas circunstancias, a algunas de las cuales ya nos hemos referido. Parecen claras también las diferencias de esta activación por el "estrés sin ejercicio" con la que se origina en el "estrés con ejercicio" que supone la natación. En el siguiente esquema se sintetizan estas diferencias.





V. - CONCLUSIONES



## V. - CONCLUSIONES

1. - A los quince minutos de iniciado el ejercicio (natación en agua a 22°C) existe acidosis metabólica, debida a las altas concentraciones plasmáticas de ácido láctico (acidosis láctica). La acidosis que se registra a las dos horas de ejercicio se debe a los altos niveles sanguíneos de cuerpos cetónicos (cetosis).

2. - A los cinco minutos de iniciado el ejercicio aumenta ligeramente la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de la corteza renal y la capacidad gluconeogénica de dicho tejido a partir de ácido láctico, siendo el efecto más agudo en ratas hechas previamente alcalóticas por administración de bicarbonato. Se sugiere que la causa de estos aumentos es el estrés inicial de la natación.

3. - La activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de la corteza renal que tiene lugar a las dos horas de ejercicio puede impedirse por tratamiento con dosis suficientemente elevadas de antibióticos inhibidores de la síntesis proteica (actinomicina D y cicloheximida) lo que parece indicar que la activación se debe a la síntesis de nueva proteína enzimática.

4. - Esta activación se produce igualmente cuando se interrumpe el ejercicio tras los primeros quince minutos y la medida se realiza a las dos horas, lo que confirma que se debe a la acidosis láctica ya existente.

5. - Se confirma que existe un aumento ligero de la glucemia a los quince minutos de ejercicio. La glucemia correspondiente a los 60 y 120 minutos es también superior a la normal. Salvo un pequeño incremento en la concentración de amoniaco en sangre a los cinco minutos de ejercicio, no existen variaciones significativas en los niveles sanguíneos de amoniaco, urea y alanina durante las dos horas de natación.

6. - El ejercicio potencia aparentemente el poder inhibidor "in vivo" del ácido 5-metoxi-2-indol carboxílico sobre la gluconeogénesis renal, tal como se deduce del perfil de metabolitos intermedios de dicho proceso en el riñón.

7. - El ejercicio no influye sobre la capacidad de consumo de cuerpos cetónicos por la corteza renal ni sobre la capacidad de formación de urea por el hígado.

8. - La inmersión en agua a 22°C sin realización del ejercicio no se traduce en un aumento de las concentraciones sanguíneas de ácido láctico y no influye sobre la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa de la corteza renal, indicando que los altos valores de lactacidemia que aparecen durante la natación en agua a esa temperatura no se deben de forma directa a la misma.

9. - Cuando las ratas se mantienen durante varios días a una temperatura ambiental de 30°C presentan valores basales de lactacidemia muy elevados junto a una actividad normal de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa renal que disminuye por el ejercicio.

10. - Cuando las ratas se someten a una situación estresante de corta duración (manteniéndolas inmovilizadas por suspensión en una malla) los valores de lactacidemia alcanzan un máximo a los cinco minutos, de una magnitud semejante a los que se originan por el ejercicio, y descienden rápidamente a los diez, aunque no se restablecen los valores basales.

11. - En estas condiciones, la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa aumenta significativamente, hasta alcanzar valores aproximadamente dobles de los basales tanto en hígado como en riñón. Estos incrementos son paralelos ó incluso anteriores a los que experimenta la lactacidemia, por lo que no parecen depender de la misma. La rapidez de la respuesta indica que se trata probablemente de un fenómeno no inductivo y de origen nervioso.

#### CONCLUSION GENERAL

Se demuestra que la activación de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa de la corteza renal por el ejercicio realizado en nuestras condiciones experimentales (natación en agua a 22°C) se debe a la acidosis láctica que acompaña al mismo. Por otra parte se ha puesto de manifiesto una activación de dicha enzima, tanto en hígado como en riñón, en rápida respuesta a una situación de estrés. Aunque la natación en agua fría supone también la existencia de estrés, la activación de la enzima renal en ambas circunstancias parece realizarse por mecanismos diferentes.



VI. - BIBLIOGRAFIA



## VI. - BIBLIOGRAFIA

1. - UTTER, M. F. y KURAHASHI, K., J. Am. Chem. Soc. 75, 758, (1953).
2. - UTTER, M. F., y KURAHASHI, K., J. Biol. Chem. 207, 787, (1954).
3. - UTTER, M. F., Ann. N. Y. Acad. Sci. 72, 451, (1959).
4. - OPIE, L. H. y NEWSHOLME, E. A., Biochem. J. 103, 2391, (1967).
5. - HAHN, P. H. GREEMBERG, R., Experientia 24, 248, (1968).
6. - FELICIONI, R. A., MANNUNCI, A. y ROSSI, C. A. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 41, 166, (1965)
7. - WEISER, M. M., DISSELBACHER, K. J., Biochim. Biophys. Acta - 208/3, 349, (1970)
8. - TCHEN, T. T., y VENNESLAND, B., J. Biol. Chem. 213, 533, (1955)
9. - CANNATA, J. B. y STOPPANI, A. O. M. Anales Asor. Quim. Arg. 52, 99, (1963)
10. - SUZUKI, I, WERKMAN, C. H., Biochim. Biophys. Acta 73, 103, (1963).
11. - AMARASINGHAM; C. R. Fed. Proc. 18, 181, (1959).
12. - NORDLIE, R. C. y LARDY, H. A., J. Biol. Chem. 238, 2259 (1963)
13. - UTTER, M. F., Ann. N. Y. Acad. Sci. 72, 451, (1959).
14. - GEVERS, W. Biochem. J., 103, 141, (1967).
15. - SWIATEK, K. R., CHAO, K. L., CHAO, H. L., CORNBLATH, y TILDON, T., BBA 206, 316 (1970).
16. - HOLTEN, D. D. y NORDLIE, R. C., Biochemistry 4, 723, (1965).
17. - BRECH, W., SHRAGO, E. y WILKEN, D. BBA 201, 145, (1970).
18. - WIELAND, O., EVERTZ-PRUSSE, E. y STUKOWSKI, B. FEBS Letters 2, 26, (1968).
19. - YAMAZAKI, R. K. y UTTER, M. F. Resultados no publicados (I 970)
20. - FLORES, H. y ALLEYNE, G. A. O., Biochem. J. 123, 35, (1971).
21. - ANDERSON, J. W., BBA, 208, 165, (1970).

- 22.- BALLARD, F.J., HANSON, R.W. y LEVEILLE, G.A., J. Biol. Chem. 242, 2746 (1967).
- 23.- CHANG, H.C. y LANE, M.D., J. Biol. Chem. 241, 2413, (1966).
- 24.- FOSTER, D.O., LARDY, H.A., RAY, P. D. y JOHNSTON, J.B., Biochemistry 6, 2120, (1967).
- 25.- BALLARD, F.J. y HANSON, R.W., J. Biol. Chem. 244, 20, 5625 (1969).
- 26.- HOLTEN, D.D. y NORDLIE, R.C., Biochemistry 4, 723, (1965).
- 27.- CHANG, H.C., MARUYAMA, H., MILLER, R.S. y LANE, M.D., J. Biol. Chem. 241, 2421, (1966).
- 28.- MARCO, R. y SOLS, A., Fed. Proc. 30, 1060 (1971).
- 29.- WILLIAMSON, D.H., LUND, P. y KREBS, H.A. Biochem. J. 103, 514, (1967).
- 30.- WILLIAMSON, D.H., VELOSO, E., ELLINGTON, E.V. y KREBS, H.A. Biochem. J. 114, 575, (1969).
- 31.- WILLIAMSON, J.R., SCHOLZ, R. y BROWNING, E.T., J. Biol. Chem. 244, 4617, (1969).
- 32.- GARBER, A.J. y HANSON, R.W. J. Biol. Chem. 246, 589 (1971).
- 33.- BALLARD, F. J., Biochem. J. 120, 809, (1970).
- 34.- WALSH, D.A. y CHEN, L., J. Biochem. Biophys. Comm. 45, 669 (1971).
- 35.- NOCE, P.S. y UTTER, M.F. (1968). Datos no publicados
- 36.- BARNS, R.J. y KEECH, D.B., Biochim. Biophys. Acta 159, 514 (1968).
- 37.- MILLER, R.S., MILDVAN, A.S., CHANG, H., EASTERDAY, R.L. MARUYAMA, H. y LANE, M.D., J. Biol. Chem. 243, 6030 (1968).
- 38.- MILLER, R.S., LANE, A.M., J. Biol. Chem. 243, 6041 (1968).
- 39.- ROSE, I.A. y col, J. Biol. Chem. 244, 6130 (1969).

- 40.- WEBER, G.H., HIRD, N.B., STAMM, N.B. y WAGLE, D.S.,  
Handbook of Physiology, Adipose Tissue. Washington D.E.: Am. Physiol.  
Soc., 1965, Sect. 5 Chapt., 23, p. 225, 237.
- 41.- MEYNHAS, O., BOSHWITZ, C. y RESHEF, L., Biochem. Biophys.  
Acta 250-224, (1971).
- 42.- NOLTE, J., BRDICZKA, D., y PETTE, D., Biochim. Biophys. Acta  
284, 497, (1972).
- 43.- CHENG, S.C. y CHENG, R.H.C., Arch. Bioch. Biophys. 151, 501,  
(1972).
- 44.- DIAMANT, Y.Z. y SAFRIR, E., Biochim. Biophys. Acta 279, 3,  
(1972).
- 45.- GEVERS, W., y KREBS, H.A., Biochem. J., 98, 720, (1966).
- 46.- SÖLING, H.D., WILLMS, B., FRIEDRICH, D., y KLEINEKE, J.,  
Eur. J. Biochem., 4, 372, (1968).
- 47.- WILLIAMSON, D.H., MAYOR, F. y VELOSO, D., en "Regulation  
of gluconeogenesis" (G. T. Verlag Stuttgart) 92 (1971).
- 48.- VENEZIALE, C.M., WALTER, P., KNEER, N. y LARDY, H.A.,  
Biochemistry 6, 2129, (1967).
- 49.- SHRAGO, E. y LARDY, H.A., J. Biol. Chem., 241, 663, (1966).
- 50.- WALTER, P., PAETKAN, V. y LARDY, H.A., J. Biol. Chem., 241,  
2523, (1966).
- 51.- WILLIAMSON, J.R., BROWNING, E.T. y OLSON, M.S. Adv. Enz.  
Reg., 6, 67, (1968).
- 52.- ANDERSON, H.H., NIKLAS, W.J., BLANK, B., REFINO, C.  
WILLIAMSON, J.R., en "Regulation of gluconeogenesis", (G. T.  
Verlag. Stuttgart, 1971) p. 293.
- 53.- BERRY, M.N. y KUN, E., Eur. J. Biochem., 27, 395, (1972).
- 54.- ROBINSON, B.H., FEBS Letters, 14, 309, (1971).
- 55.- ROBINSON, B.H., FEBS, Letters, 16, 267, (1971).
- 56.- PHILIPPIDIS, H., y BALLARD, F.J., Biochem. J., 120, 385, (1970)
- 57.- GARBER, A.J., y BALLARD, F.J., J. Biol. Chem., 245, 2229 (1970)

- 58.- HELDT, H. W., en "Regulation of metabolic Processes in Mitochondria", Editado por J.M. TAGER, S. PAPA, E. QUAGLIARIELLA y E.C. SLATER, New York. Elsevier, (1956), p. 51.
- 59.- RAY, P.D., FOSTER, D.O., y LARDY, H.A., J.Biol.Chem. 241, 3904, (1966).
- 60.- IZZO, J.L. y GLASSER, S.R., Endocrinology, 68, 189, (1961).
- 61.- YOUNG, J.W., SHRAGO, E. y LARDY, H.A., Biochemistry, 3, 1687, (1964).
- 62.- FOSTER, D.O., RAY, P.D., y LARDY, H.A., Biochemistry, 5, 555. (1966).
- 63.- PASSERON, S., JIMENEZ DE ASUA, L. y CARMINATTI, H. Biochem. Biophys. Res. Commun., 27, 33, (1967).
- 64.- DIPIETRO, D.L., SHARMA, C. y WEINHONSE, S., Biochemistry, 1, 455, (1962).
- 65.- SNOKE, R.E., JOHNSTON, J.B. y LARDY, H.A., Eur.J.Biochem. 24, 342, (1971).
- 66.- KACEW, S., SINGHAL, R.L. y LING, G.M., Can.J.Biochem., 50, 225, (1972).
- 67.- MADAPPALY, M.M., MACKIRER, C.R. y MEHLMAN, M.A., Life Sci, 11, 77 (1972).
- 68.- GARTHOFF, L.H., FRIEND, B.A., TOBIN, R.B. y MEHLMAN, M.A., Life Sci, 11, 677, (1972).
- 69.- MEHLMAN, M.A., TOBIN, R.B. y JOHNSTON, J.B., J.Nut., 100, 1341, (1970).
- 70.- BERRY, L.J., SMYTHE, D.S. y COLWELL, L.S., J.Bacteriol, 96, 1191, (1968).
- 71.- RIPPE, D.F. y BERRY, L.J., Infection and Immunity, 6, 97, (1972).
- 72.- WEBER, G. y LEA, M.A., Adv. Enz.Reg., 4, 115, (1966).
- 73.- WEBER, G., HENRY, M.C., WAGLE, S.R. y WAGLE, D.S., Adv. Enz.Reg., 2, 325, (1964).
- 74.- NAGAI, K., SUDA, M., YOKOYAMA, M. y NAKAGAWA, H., Biochem. Biophys. Res. Conm., 43, 1340, (1971).
- 75.- NADAGAWA, H. y NAGAI, K., J.Biochem., 69, 923, (1971).

- 76.- NAGAI, K. y NAKAGAWA, H., J. Biochem. 71, 125, (1972).
- 77.- SHRAGO, E., LARDY, H.A., NORDLIE, R.C. y FOSTER, D.O. J. Biol. Chem., 238, 3188, (1963).
- 78.- USATENCO, M.S. Biochemical Medicine 3, 298, (1970).
- 79.- NORDLIE, R.C., VARRICHIO, F.E. y HOLTEN, D.P. Biochim. Biophys. Acta 97, 21, (1965).
- 80.- DIESTERHAFT, M.E., SHRAGO, E. y SALLACH, H.J., Biochem. Med. 5, 297, (1971).
- 81.- BALLARD, F.J., Biochim. Biophys. Acta 242, 470, (1971).
- 82.- BALLARD, F.J. y HANSON, R.W., Biochem. J. 104, 866, (1967).
- 83.- YEUNG, D. y OLIVER, I.T., J. Biochem. 108, 325, (1968).
- 84.- WICKS, W.K., J. Biochem. Chem. 244, 3941, (1969).
- 85.- WICKS, W.D., J. Biol. Chem. 246, 217, (1971).
- 86.- YEUNG, D., y OLIVER, E.T., Biochemistry 7, 3231, (1968).
- 87.- WICKS, W.D., KENNEY, F.T., y LEE, K.L., J. Biol. Chem. 244, 6008, (1969).
- 88.- SHRAGO, E., YONNG, J.W. y LARDY, H.A., Science 158, 1572 (1967).
- 89.- HOPGOOD, M.F., BALLARD, F.J., RESHEF, L. y HANSON, R.W. Biochem. J. 134, 445, (1973).
- 90.- TILGHMAN, S.M., HANSON, R.W., RESHEF, L., HOPGOOD, M.F. y BALLARD, F.J. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1304 (1974).
- 91.- HUTTNER, W.B., KRONE, W., SEITZ, H.J. y TARNOWSKI, W. Biochem. J. 142, 691, (1974).
- 92.- KRONE, W., HUTTNER, W.B., SEITZ, H.J. y TARNOWSKI, W. FEBS Letters 46, 158, (1974).
- 93.- BARNETT, C.A. y WICKS, W.D. J. Biol. Chem. 246, 7201, (1971).

94. - WICKS, W.D., BARNETT, C.A. y McKIBBIN, J.B., Fed.Proc. Fed. Am. Soc. Wxp. Biol. 33, 1105 (1974).
95. - RESHEF, L., BALLARD, F.J. y HANSON, R.W., J. Biol. Chem. 244, 5577, (1969).
96. - RAY, P.D., FOSTER, D.O. y LARDY, H.A., J. Biol. Chem., 239, 3396 (1964).
97. - RESHEF, L., HANSON, R. y BALLARD, F.J., J. Biol. Chem. 245, 5979, (1970).
98. - EXTON, J.H., HAPER, S.C., TUCKER, A.L., FLAGG, J.L., y PARK, C.R., J. Biol. Chem., 246, 6166, (1973).
99. - GUNN, J.M., HANSON, R.W., MEYNHAS, O., RESHEF, L., y BALLARD, F.J., Biochem. J. 150, 195, (1975).
100. - HENNING, H.V., STUMPT, B., OHLY, B. y SEVBERT, W., Biochem. Z, 344, 274-288, (1966).
101. - GOODMAN, A.D., FUISZ, R.W. y CAHILL, G.F. jr. J. Clin. Invest. 45, 612-619, (1966).
102. - ALLEYNE, G.A.O. y SCULLARD, G.H., J. Clin. Invest. 48, 364-370, (1969).
103. - ALLEYNE, G. A. O., Nature, 217, 847, (1968)
104. - KAMM, D.E. y CAHILL, G.F. jr. Am. J. Physiol. 216, 1207-1212 (1969).
105. - KAMM, D.E., STROPE, G.L. y KUCHMY, B.L., Metabolism. 23, 1073-1709, (1974).
106. - IYNEDJIAN, P.B., BALLARD, F.J., y HANSON, R.W., J. Biol. Chem. 250, 5596-5603, (1975).
107. - OLIVA, PH.B.; The American Journal of Medicine, 48, 209-225 (1970).
108. - COHEN, R.D. y WOODS, H.F. en "Clinical and Biochemical Aspects of Lactic Acidosis", Blackwell Scientific publication, Oxford y London (1976).

109. - MARGARIA, R.; en "Exercise in Altitude" Excerpta Medica. Foundation, New York (1967).
110. - DANIEL, S.S. y JAMES, L.S.; Ann. N.Y. Acad. Sci., 119, 1147 (1965).
111. - DICKER, S.E. y SHIRLEY, D.G., J. Physiol., 212, 235, (1971).
112. - BALLARD, F.J., Biochem. J., 124, 265, (1971).
113. - KREBS, H.A., en "Essays in Biochemistry", vol. 8, pg. 1 (1972).
114. - WOODS, H.F., y KREBS, H.A., Biochem. J. 125, 129 (1971).
115. - SCRUTTON, M.C. y UTTER, M.F., Ann. Rev. Biochem. 37, 249, (1968).
116. - EXTON, J.H.; Metabolism., 21, 945, (1972).
117. - HANSON, R.W. y GARBER, A.J.; Amer. J. Clin. Nutr. 25, 1010, (1972).
118. - HANSON, R.W. y GARBER, A.J., RESHEF, L. y BALLARD, F. J., Amer. J. Clin. Nutr.; 26, 55, (1973).
119. - NEWSHOLME, E.A. y START, C., En Regulation in Metabolism" 247, John Wiley El Sous, London, (1975).
120. - SANCHEZ-URRUTIA; L., Tesis Doctoral. Universidad de Granada
121. - GARCIA-RUIZ, J.P., Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
122. - KREBS, H.A.; Adv. Enzyme Regul., 10, 397, (1972).
123. - HEMS, R., ROSS, B.D. y BERRY, M.N. y KREBS, H.A., Biochem. J., 101, 284, (1966).
124. - EXTON, J.H. y PARK, C.R., J. Biol. Chem., 244, 1424, (1967).
125. - BERRY, M.N., Proc. Roy. Soc. Med., 100, 1260, (1967).
126. - SCRUTTON, M.C. y UTTER, M.F., Amer. J. Med., 32, 831, (1967).
127. - SÖLING, H.D., WILLIMS, B., KLEIMENE, J. y GEHLHOFF, M. Europ. J. Biochem., 16, 289, (1970).

128. - KLEINEKE, J. y SÖLING, H. D., en "Regulation of Glucoseogenesis", Gerog. Thieme Stuttgart, 20, (1971).
129. - SCRUTTON, M. C. y WHITTE, M. D., Biochem. Med. 9, 271, (1974).
130. - NISHITSUTSUJI-UWO J. M., ROSS B. D. y KREBS H. A. Biochem. J., 103, 852, (1967)
131. - OWEN, O. E., FELIG, P., MORGAN, A. P., WAHREN, J. y CAHILL, G. F., J. Clin. Invest., 48, 574, (1969).
132. - YUDKIN, J. y COHEN, R. D., Clin. Sci. Mol. Med., 48, 121, (1975).
133. - SANCHEZ-MEDINA, F., SANCHEZ-URRUTIA, L., MEDINA, J. M. y MAYOR, F., FEBS Letters, 19, 128, (1971).
134. - BOWMAN, R. H., J. Biol. Chem., 245, 1604, (1970).
135. - ALLEYNE, G. A. O., J. Clin. Invest. 49, 943-951 (1970)
136. - ORLOFF, J. y BURG, M., Ann. Rev. Physiol., 33, 83, (1971).
137. - GOODMAN, A. D., en "Nitrogen Metabolism and the Environment" (editado por Campbell, J. W. y Goldstein, L.), 297, Academic Press, London y New York, (1972).
138. - KUROKAWA, N. y RAMUSSEN, H., Biochim. Biophys. Acta 313, 13, (1973).
139. - KUROKAWA, K., OHNO, T. y RASMUSSEN, H., Biochim. Biophys. Acta, 313, 32, (1973).
140. - KUROKAWA, K., y RASMUSSEN, H., Biochim. Biophys. Acta 313, 42, (1973).
141. - KUROKAWA, K. y RASMUSSEN, H. Biochim. Biophys. Acta 313, 59, (1973).
142. - ALLEYNE, G. A. O., y ROOBOL, A., The Medical Clinics of North America, 59, 781, (1975).
143. - HUCKABEE, W. E., J. Clin. Invest., 37, 244, (1958).

144. - GOLDSMITH, G. A., Amer. J. Med. Sci., 215, 182, (1968).
145. - OLSON, R. E., Ann. Intern. Med., 59, 960, (1963).
146. - ALPERT, N. R., Ann. N. Y. Acad. Sci., 119, 995, (1965).
147. - KREBS, H. A. y VEECH, R. L., en "Mitochondria Structure and Function" (L. Ernster y Z. Drahota eds.) p. 101, Academic Press, New York.
148. - GOLLNICK, P. D., Amer. J. Physiol., 213, 734-738, (1967).
149. - GOLLNICK, P. D., y HEARN, G. R., Amer. J. Physiol., 201, 694-696, (1961).
150. - GOLLNICK, P. D., STRUCK, P. J. y BOGYO; T. P., J. Appl. Physiol. 22, 623-627, (1967).
151. - DAWSON, C. A. y HORVATH, S. M., Medicine and Science Sport 2, 2, (1970).
152. - JERVELL, O., Acta Med. Scand. Suppl. 24, (1929).
153. - BANG, O, Scand. Arch. Physiol., 74, (1936).
154. - DAVIES, C. T. M., KNIBBS, A. V. y MUSGROVE, J. Int. Z. Angew. Physiol., 28, 155, (1970).
155. - ROWELL, L. B., en "Muscle metabolism. During. Exercise" (B. Pernow y B. Saltin eds) p. 127. Plenum, New York, (1971).
156. - KNUTTGE; H. G., en "Muscle metabolism During Exercise". (B. Pernow y B. Saltin eds). Plenum, New York, (1971).
157. - KREBS, H., Proc. Roy. Soc. Ser. B., 159, 545, (1964).
158. - KREBS, H. A. y YOSHIDA, T., Biochem. Z. 383, 241, (1963).
159. - SANCHEZ-MEDINA, F., SANCHEZ-URRUTIA, L., MEDINA, J. M. y MAYOR, F., FEBS Letters, 26, 25, (1972).
160. - ROWELL, L. B., BRENGELMAN, G. L., BLACKMON, J. R. TWISS, R. D. y KUSUMI, F. J. Appl. Physiol., 24, 475, (1968).
161. - ROWELL, L. B., KARNING, K. K., EVANS, I. I., KENNEDY, Th. O. WARD, J., BLACMON, J. R. y KUSUMI, F. J. Appl. Physiol. 21, 1773, (1966).

162. - BARCROFT, H. y COBBOLD, A.F., *J. Physiol.*, 132, 372, (1956).
163. - GREENE, N.M., *J. Lab. Clin. Med.*, 58, 682, (1961).
164. - BEARN, A.G., BILLING, B. y SHERLOCK, S., *J. Physiol.*, 115, 430, (1951).
165. - ELLIS, S., *Pharmacol. Rev.*, 8, 485, (1956).
166. - ANTONIO ORIOLA, P., "Determinación de fosfoenolpiruvato carboxicinasa en tejido hepático de rata". Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia, Granada, (1970).
167. - WOLLENBERGER, A., RISTAN, O. y SCHFFA, P., *Arch. ges Physiol.*, 270, 399, (1967).
168. - WILLIAMSON, D.H., LUND, P. y KREBS, H.A., *Biochem. J.*, 103, 514, (1967).
169. - KLOTZSCH, H. y BERGEMEYER, H.U., "Methods of Enzymatic Analysis" (Academic Press, New York, London), 1156, (1965)
170. - BUCHER, T., "Methods of Enzymatic Analysis" (Academic Press, New York, London), 246, (1965).
171. - BERGEMEYER, H.U., "Methods of Enzymatic Analysis" (Academic Press, New York, London), 229, (1965).
172. - HORHORST, H.J., "Methods of Enzymatic Analysis" (Academic Press, New York, London), 328, (1965).
173. - WAHLEFELD, A.E., "Methods of Enzymatic Analysis" (Academic Press, New York, London), 1.604, (1974).
174. - GAWEHN, K., y BERGEMEYER, H.U., "Methods of Enzymatic Analysis", (Academic Press, New York, London), 1.492, (1974).
175. - MILLER, L.L., BLIS, C.G., WATSON, M.L. y BALE, W.F., *J. Exp. Med.*, 94, 431, (1951).
176. - SCHIMASSEX, H., *Biochem. J.*, 336, 460, (1963).

- 177.- HEMS, R., ROSS, B.D., BERRY, M.M. y KREBS, H. A.,  
Biochem. J., 101, 284, (1966).
- 178.- MEDINA-JIMENEZ, J.M., "Efecto de la Fenetil biguanida (Fenformina) sobre la gluconeogénesis en hígado perfundido de rata"  
Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Granada, (1972).
- 179.- KREBS, H. y HENSELEIT, K., Hoppe-Seyl., 2, 210, 33  
(1932).
- 180.- KREBS, H.A., BENNET, D.A.H., GASQUET, P., GASCOINE,  
F. y YOSHIDA, T., Biochem., 86, 22, (1963).
- 181.- GARCIA-RUIZ, J.P., Tesina de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Granada, (1972).
- 182.- BERGEMEYER, H.U., "Methods of Enzymatic Analisis" (Academic Press, New York, London), 123, (1965).
- 183.- WILLIAMSON, D.H., y MELLANBY, J., en "Methods of Enzymatic Analisis", (Academic Press, New York, London), 1.837 (1974)
- 184.- WILLIAMSON, D.H., en "Methods of Enzymatic Analisis", (Academic Press, New York, London), 1.679, (1974).
- 185.- KUN, K.E., y KEARNEY, E.B., "Methods of Enzymatic Analisis" (Academic Press, New York, London), 1.803, (1974).
- 186.- KREBS, H.A., WILLIAMSON, D.H., BATES, M.W., PAGE, M.A. y NAWKINS, R.A., Adv. Enz. Reg. 9, 387, (1971).
- 187.- LONG SHAW, I.D. y POGSON, C.I., J.Clin. Invest., 51, 2277, (1972).
- 188.- LONGSHAW, I.D., ALLEYNE, G.A.O. y POGSON, C.I., J.Clin. Invest., 51, 2284, (1972).
- 189.- SANCHEZ-URRUTIA, L., GARCIA-RUIZ, J.P., SANCHEZ-MEDINA F., y MAYOR, F., Biochem. Med., 14, 355, (1975).
- 190.- GOLBERG, I.H. RABINOWITZ, M. y REICH, E., Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A., 48, 2094, (1962).
- 191.- ENNIS, H.L. y LUBIN, M., Science, 146, 1474, (1964).

- 192.- FELIG, P. y WAHREN, J., J.Clin. Invest., 50, 2703, (1971).
- 193.- PEGEL, V.A., KSENTS, S.M, y SHCHERBAKOV, Yu. V., Fiziol. Zh. SSSR inr.I.M. Sechenova, 54, 1102 (1968).
- 194.- BARNER, R.H., LABADAN, B.A., SIYAMOGEN, B., y GRADFIELD, I R.B., Amer.J.Physiol. 207, 1242, (1964).
- 195.- CARLSON, L.A. y NYE, E.R., Acta med. Scand., 179, 453, (1966)
- 196.- AMMON, H.P.T. y ESTLER, C.J., Liga Sci, 6, 641, (1967).
- 197.- HANSON, R.L., RAY, P.D., WALTER, P. y LARDY, H.A., J.Biol.Chem., 244, 4351, (1969).
- 198.- REED, J. y LARDY, H.A., J.Biol.Chem., 245, 5297 (1970).
- 199.- LUPIAÑEZ, J.A., FAUS, M.J., MUÑOZ-CLARES, R. y SANCHEZ-MEDINA, F., FEBS Letters, 61, 277 (1976).
- 200.- COURTICE, F.C. y DOUGLAS, C.G., Proc.Roy. Soc. B. 119, 381, (1936).
- 201.- JOHNSON, R.H., WALTON, J.L., KREBS, H.A. y WILLIAMSON, D.H., Lancet II, 452, (1969).
- 202.- COOK, L.C., HURST, R.H., J.Physiol., 79, 443, (1933).
- 203.- MACLEOD, J.J.R., HOOVER, D.H., Amer.J.Physiol., 42, 460, (1917).
- 204.- HALDI, J., Amer.J.Physiol., 106 (1933).
- 205.- TOBIN, R.B., Amer.J.Physiol., 207, 601, (1964).
- 206.- EGGLETON, M.G., EVANS, C.L., J.Physiol., 70, 261 (1930).
- 207.- GEVERS, W., DOWLE, E., Clin. Sci. 25, 343, (1963),
- 208.- TRIVEDI, B. y DANFORTH, W.H., J.Biol. Chem., 241, 4110 (1966)
- 209.- UI, M., Bioch. Biophys. Acta, 124 310, (1966).
- 210.- TORSTI, P.; VAPAATALO, H.I. y NEUVONEN, P., Ann.Med. Exp.Liol.Fenn., 46, 53-56, (1968).
- 211.- GOLLNICK, P.D., SOULE, R.G., TAYLOR, A.W., WILLIAMS, C. y TANUZZO, C.D., Amer.J.Physiol., 219, 729, (1970).

- 212.- BOFTGER, I., SCHLEIN, E.M., FALOONA, G.R., KNOCHEL; J.P., y UNGER, R.H, J. of Clin. Endocrinol. and Metabol. 35, 117, (1972).
- 213.- ROWELL, L.B., BLACKMON, J.R. y BRUCE, R.A., J. Clin. Invest., 43, 1677, (1969).
- 214.- WINDER, W.W., BALDWIN, K.M. y HOLLOSZY, J.O., Eur. J. Biochem., 47, 461, (1974).
- 215.- YANG, T.L. y LISSAK, K., Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 17, 63, (1960).
- 216.- RUBIN, C.S. y ROSEN, O.M., Eur. Rev. Biochem., 44, 831, (1975).
- 217.- SHIMAZU, T., Biochim. Biophys. Acta, 252, 28, (1971).
- 218.- MORENO, F.J., SANCHEZ-URRUTIA, L., MEDINA, J.M., SANCHEZ-MEDINA, F. y MAYOR, F., Biochem. J., 150, 51 (1975).
- 219.- NAGAI, K., SUDA, M. y NAKAGAWA, H., J. Biochem., 74, 863, (1973).
- 220.- BECK, N.P., REED, IS.W., MURDAUGH, H.V., y DAVIS, B.B., J. Clin. Invest., 51, 939-944, (1972).
- 221.- KLAHR, S., NAWAR, T. y SCHOOLVERTH, A.C., Biochim. Biophys. Acta, 304, 161-168, (1973).

01080056



Biblioteca Universitaria de Granada



DILIGENCIA:

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

- D. Federico Mayor Zaragoza
- D. Enrique Montoya Gomez
- D. José Ant. Lozano Teruel
- D. Fermín Sanchez de Medina Contreras
- D. Eduardo Barrio Peregrin

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don  
Rosario A. Muñoz Clares

se acordó por unanimidad otorgar la calificación de  
Sobresaliente "cum laude"

y para que conste, se libró cédula firmada por  
componentes del Tribunal, la presente diligencia.

Granada, a 27 de Septiembre de 1976

El Secretario,

El Presidente,