

R.15.404

613.3 (043)

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

INFLUENCIAS NUTRICIONALES SOBRE
LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA
DE CORTEZA RENAL DE RATA

Director
Titular
Ia

E. LETICIA GARCIA SALGUERO

Granada, 27 de mayo de 1986



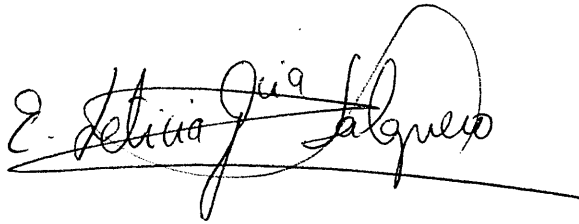
TD-EP

H-5
1
19

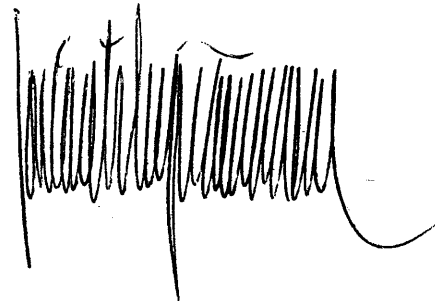
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
23 MAYO 1986
REGISTRO DE ENTRADA
N.º 5149

Tesis presentada para optar al
Grado de Doctor en Farmacia por la
Lda. E. Leticia Garcia Salguero



Director: Dr. D. JOSE ANTONIO LUPIAÑEZ CARA, profesor
titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecu-
lar de la Universidad de Granada



Granada, 27 de mayo de 1986

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º DOCUMENTO 61370/253
N.º COPIA 1581676x

A la hora de presentar este trabajo, no olvidarme de aquellas personas que durante todo tiempo se han ayudado de una u otra forma, y agradezco su ayuda.

Dirección de la Facultad de Medicina
Cátedra de Bioquímica

Los trabajos de investigación que se exponen en la presente memoria "Influencias nutricionales sobre las capacidades gluconeogénica y glucolítica de corteza renal de rata", han sido realizados en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada, bajo la dirección del Prof. Dr. D. José Antonio Lupiáñez Cara. La realización de este trabajo ha sido posible gracias a una Beca del Plan de Formación del Personal Investigador, así como por la subvención del proyecto 1139/81 de la CAICYT.

ayuda en el desarrollo de este trabajo, y a la familia que me ha dado todo el apoyo necesario para poder realizar este trabajo de Medicina.

A las personas que me han ayudado en el desarrollo de este trabajo, y a la familia que me ha dado todo el apoyo necesario para poder realizar este trabajo de Medicina.

Prof. Dr. D. José Antonio Lupiáñez Cara
Cátedra de Bioquímica

AGRADECIMIENTOS

A la hora de presentar este trabajo, no quiero olvidarme de aquellas personas que durante todo este tiempo me han ayudado de una u otra forma, y agradecerles su apoyo e interés.

En primer lugar mi mas sincero agradecimiento al director del trabajo, Prof. D. José Antonio Lupiáñez Cara. Su enorme calidad investigadora ha supuesto en mí un continuo estímulo de superación y una fuente inagotable de conocimientos; ello unido a la extraordinaria calidad humana, su dedicación, interés y a la gran paciencia que ha tenido conmigo, ha hecho posible un ambiente de trabajo realmente grato.

Al Prof. D. Eduardo García Peregrín, director del Departamento durante todo este tiempo.

Al Prof. D. Fermín Sánchez de Medina, que despertó en mí el interés por la Bioquímica, por sus inestimables consejos y por la amabilidad con que siempre me ha considerado, así como a la Prof. Dña. M^a Dolores Suárez.

Asimismo, hago extensivo mi agradecimiento al Prof. D. Alberto Vargas.

A Javier Corpas y Juan Peragón, por su valiosa ayuda en el laboratorio, y a todos mis compañeros con los que he compartido tantas horas, particularmente a Luis Sánchez de Medina.

A mis buenos amigos, de dentro y fuera del Departamento, y de forma especial a Araceli Morales que se prestó a acompañarme en los experimentos realizados durante varias noches.

Y a todo el personal técnico y auxiliar de este Departamento.

Gracias a todos los que me han apoyado y estimulado durante la realización de este trabajo.

A mis padres

ABREVIATURAS

AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ADP	Adenosín difosfato
Asp	Aspartato
ATP	Adenosín trifosfato
CoA	Coenzima A
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTT	Ditiotreitol
E.C.	Comisión Internacional de enzimas
EDTA	Acido etiléndiamino-tetraacético
F6P	Fructosa 6-fosfato
FBP	Fructosa 1,6-bisfosfato
FBPasa	Fructosa 1,6-bisfosfatasa
F2,6-Pasa	Fructosa 2,6-bisfosfatasa
G6P	Glucosa 6-fosfato
G6Pasa	Glucosa 6-fosfatasa
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
3-GAP	Gliceraldehido 3-fosfato
Glu	Glutamato
GK	Glucocuinasa
GOD	Glucosa oxidasa
α GPDH	α -Glicerolfosfato deshidrogenasa
GSH	Glutation reducido
GTP	Guanosín trifosfato
Hepes	Acido N-2-hidroxiethylpiperazín N'-2-etano sulfónico
HK	Hexocuinasa
IDP	Inosín difosfato
ITP	Inosín trifosfato
α -KG	α -cetoglutarato
KHS	Solución salina Krebs-Henseleit

Lac	Lactato
LDH	Lactato deshidrogenasa
MDH	Malato deshidrogenasa
MICA	Acido 5-metoxi-2-indol carboxílico
3-MPA	3-Mercaptopicolínico
NAD	Nicotín adenín dinucleótido
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NADP	Nicotín adenín dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
OAA	Oxalacetato
PC	Piruvato carboxilasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFK	Fosfofructoquinasa
6-PF-2K	Fosfofructo 2-quinasa
2-PG	2-Fosfoglicerato
PHI	Fosfohexosa isomerasa
Pi	Fósforo inorgánico
Pir	Piruvato
PK	Piruvato quinasa
POD	Peroxidasa
TIM	Triosafosfato isomerasa
TrP	Triosas fosfato
Tris	Trihidroximetilaminometano
SEM	Error estándar de la media

GLUCOSA 6-FOSFORO DESHIDROGENASA (G6PD) (EC 1.1.1.49) (G6P dehidrogenasa)

NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado)

GLUCOSA 6-FOSFORO DESHIDROGENASA (G6PD) (EC 1.1.1.49) (G6P dehidrogenasa)

1.1.1.49

ENZIMAS

ALDOLASA: (D-fructose 1,6-bisphosphate D-glyceraldehyde 3-phosphate-lyase, EC 4.1.2.13).

ENOLASA: (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase, EC 4.2.1.11).

FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASA: [GTP/ITP: oxalacetate-carboxylyase (transphosphorylating), EC 4.1.1.32].

FOSFOFRUCTOQUINASA: (ATP-D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase, EC 2.7.1.11).

FOSFOFRUCTO 2-QUINASA: (ATP: D-fructose 6-phosphate 2-phosphotransferase, EC 2.7.1.-).

FOSFOHEXOSA ISOMERASA: (D-glucose 6-phosphate ketol-isomerase, EC 5.3.1.9).

FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA: (D-fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase, EC 3.1.3.11)

FRUCTOSA 2,6-BISFOSFATASA: (D-fructose 2,6-bisphosphate 2-phosphohydrolase, EC 3.1.3.-)

α -GLICEROLFOSFATO DESHIDROGENASA: (sn-glycerol 3-phosphate: NAD⁺ 2-oxidoreductase, EC 1.1.1.8)

GLICEROL QUINASA: (ATP: glycerol 3-phosphotransferase, EC 2.7.1.30)

GLUCOQUINASA: (ATP: D-glucose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.2)

GLUCOSA 6-FOSFATASA: (D-glucose 6-phosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.9)

GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA: (D-glucose 6-phosphate: NADP⁺ 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.49)

GLUCOSA OXIDASA: (β -D-glucose: oxygen oxidoreductase, EC 1.1.3.4)

HEXOQUINASA: (ATP: D-hexose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1.)

LACTATO DESHIDROGENASA: (L-lactate: NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.27)

MALATO DESHIDROGENASA: (L-malate: NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.37)

PEROXIDASA: (Donor: hydrogen-peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7)

PIRUVATO CARBOXILASA: [piruvate: carbon-dioxide ligase (ADP-forming), EC 6.4.1.1]

PIRUVATO QUINASA: (ATP: pyruvate 2-O-phosphotransferase, EC 2.7.1.40)

D-TRIOQUINASA: (ATP: D:glyceraldehyde 3-phosphotransferase EC 2.7.1.28)

TRIOSAFOSFATO ISOMERASA: (D-glyceraldehyde 3-phosphate ketol-isomerase, EC 5.3.1.1)

TRIPTOFANO PIRROLASA: [L-tryptophan: oxygen 2,3-oxidoreductase (decyclizing), EC 1.13.11.11)

1.4.1.- Efecto de diferentes situaciones nutricionales sobre el metabolismo glucídico.....

1.4.1.1.- Ayuno.....

1.4.2.- Metabolismo glucídico en animales alimentados con diferentes dietas.....

1.5.- Relaciones del metabolismo glucídico con otras rutas del metabolismo celular.....

1.5.1.- Relaciones entre el metabolismo glucídico.....

INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCION.....	16
1.- PARTE TEORICA.....	22
1.1.- Gluconeogénesis y glucolisis. Generalidades..	23
1.2.- Regulación de la gluconeogénesis y glucolisis	26
1.2.1.- Regulación alostérica.....	26
1.2.1.1.- Ciclo PC-PEPCK/PK.....	26
1.2.1.2.- Ciclo FBPasa/PFK.....	30
1.2.1.3.- Ciclo G6Pasa/HK-GK.....	36
1.2.2.- Regulación hormonal.....	37
1.2.2.1.- Efecto del glucagon.....	37
1.2.2.2.- Efecto de la insulina.....	42
1.2.2.3.- Efecto de las catecolaminas.....	43
1.2.2.4.- Efecto de los glucocorticoides.....	47
1.2.2.5.- Efecto de otras hormonas sobre la glu coneogénesis y glucolisis.....	50
1.3.- Metabolismo glucídico en riñón.....	51
1.3.1.- Generalidades	51
1.3.2.- Efectos hormonales en el metabolismo glucídico renal.....	53
1.3.3.- Comportamiento renal frente a la incapa- cidad funcional hepática.....	55
1.4.- Efecto de diferentes situaciones nutriciona- les sobre el metabolismo glucídico.....	58
1.4.1.- Ayuno.....	59
1.4.2.- Metabolismo glucídico en animales alimen- tados con diferentes dietas	62
1.5.- Relaciones del metabolismo glucídico con otras rutas del metabolismo celular	64
1.5.1.- Relaciones entre el metabolismo glucídico	

y el metabolismo lipídico.....	64
1.5.2.- Relaciones entre el metabolismo glucídico y el metabolismo proteico.....	66
1.5.3.- Relaciones entre la gluconeogénesis renal y la amoniogénesis.....	68
1.6.- Métodos para el estudio de la gluconeogénesis y glucolisis.....	69
2.- PARTE EXPERIMENTAL.....	77
2.1.- Material.....	78
2.1.1.- Especie ensayada.....	78
2.1.2.- Material utilizado en las diferentes téc- nicas.....	78
2.1.2.1.- Aparatos.....	78
2.1.2.2.- Productos	79
2.2.- Métodos.....	80
2.2.1.- Tratamiento de los animales.....	80
2.2.2.- Composición y elaboración de las dietas..	81
2.2.3.- Preparación y separación de túbulos rena- les.....	82
2.2.4.- Tratamiento de los túbulos renales y cor- teza renal para la determinación de acti- vidades enzimáticas.....	84
2.2.5.- Determinación de actividades enzimáticas.	86
2.2.5.1.- Determinación de la actividad enzimá- tica de la FBPasa	86
2.2.5.2.- Determinación de la actividad enzimá- tica de la PK.....	88
2.2.5.3.- Determinación de la actividad enzimá- tica de la PFK.....	90
2.2.5.4.- Determinación de la actividad enzimá- tica de la PEPCK.....	93
2.2.6.- Determinación de las capacidades gluco- neogénica y glucolítica renales.....	95
2.2.6.1.- Determinación enzimática de glucosa..	95

2.2.6.2.- Determinación enzimática de piruvato.	97
2.2.6.3.- Determinación enzimática de lactato..	99
2.2.7.- Determinación cuantitativa de proteínas..	101
2.2.8.- Tratamiento estadístico de los resultados	103
3.- RESULTADOS.....	105
3.1.- Efecto de diferentes situaciones nutriciona- les sobre las capacidades gluconeogénica y glucolítica de túbulos renales a lo largo del tiempo	106
3.1.1.- Efecto de una dieta alta en carbohidratos sobre las capacidades gluconeogénica y glucolítica de túbulos renales a lo largo del tiempo.....	106
3.1.2.- Efecto de una dieta alta en proteínas sobre las capacidades gluconeogénica y glucolítica de túbulos renales a lo largo del tiempo.....	113
3.1.3.- Efecto del ayuno sobre las capacidades gluconeogénica y glucolítica de túbulos renales a lo largo del tiempo.....	119
3.2.- Efecto de diferentes situaciones nutriciona- les sobre enzimas reguladores del flujo glu- coneogénico y glucolítico.....	127
3.2.1.- Efecto de una dieta alta en carbohidratos sobre las actividades FBPasa, PFK y PK de las fracciones de túbulos renales a lo largo del tiempo.....	127
3.2.2.- Efecto de una dieta alta en proteínas so- bre las actividades FBPasa, PFK y PK de túbulos renales a lo largo del tiempo....	146
3.2.3.- Efecto del ayuno sobre las actividades FBPasa, PFK y PK de túbulos renales a lo largo del tiempo.....	164

3.3.- Comportamiento de las capacidades gluconeogénica y glucolítica, y enzimas reguladores de ambos procesos de corteza renal durante ciclos de alimentación-ayuno y ayuno-alimentación.....	184
3.3.1.- Capacidades gluconeogénica y glucolítica de corteza renal durante ciclos de alimentación-ayuno y ayuno-alimentación....	184
3.3.1.1.- Ciclo alimentación-ayuno.....	184
3.3.1.2.- Ciclo ayuno-alimentación.....	188
3.3.2.- Comportamiento de enzimas gluconeogénicos de corteza renal durante ciclos de alimentación-ayuno y ayuno-alimentación..	193
3.3.2.1.- Ciclo alimentación-ayuno.....	193
3.3.2.2.- Ciclo ayuno-alimentación.....	198
3.3.3.- Comportamiento de enzimas glucolíticos de corteza renal durante ciclos de alimentación-ayuno y ayuno-alimentación.....	202
3.3.3.1.- Ciclo alimentación-ayuno.....	202
3.3.3.2.- Ciclo ayuno-alimentación.....	202
3.3.4.- Comportamiento de la gluconeogénesis y glucolisis, y enzimas relacionados de corteza renal durante ciclos alternativos de alimentación-ayuno-alimentación y ayuno-alimentación-ayuno.....	212
4.- DISCUSION.....	217
4.1.- Comentarios generales.....	218
4.2.- Efecto de diferentes situaciones nutricionales sobre las capacidades gluconeogénica y glucolítica y actividades enzimáticas relacionadas con estos procesos en corteza renal.....	221
4.2.1.- Dieta alta en carbohidratos.....	222
4.2.2.- Dieta alta en proteínas.....	228

4.2.3.- Ayuno.....	235
4.3.- Gluconeogénesis, glucolisis y enzimas relacionados durante ciclos de alimentación-ayuno y ayuno-alimentación.....	239
5.- CONCLUSIONES.....	245
6.- BIBLIOGRAFIA.....	251

INTRODUCC

INTRODUCCION

Generalmente se define a la gluconeogénesis como el proceso metabólico mediante el cual algunos tipos de células son capaces de sintetizar "de novo" glucosa a partir de precursores de naturaleza no glucídica. Entre estos precursores se incluyen al lactato y piruvato, procedentes generalmente del metabolismo glucídico, glicerol, suministrado por el organismo tras la degradación de los triacilglicéridos, y un gran número de aminoácidos procedentes del metabolismo proteico. Aunque todos los aminoácidos naturales, excepto leucina y lisina son potencialmente glucogénicos por sus capacidades de convertirse, durante un metabolismo degradativo, en piruvato, oxalacetato, α -cetoglutarato, succinil-CoA y fumarato, diferentes estudios experimentales indican que solo unos pocos, tales como alanina, serina, prolina, treonina, glutamina, asparagina, glutamato, aspartato y arginina son capaces de producir cantidades significativas de glucosa, dependiendo su utilización del tejido encargado y de la particular situación metabólica en la que se encuentre el organismo.

Aunque el proceso en cuestión es biosintético, la gluconeogénesis conecta el metabolismo de carbohidratos, lipídico y aminoácidos en el animal entero, siendo ésta una característica que llega a ser importante cuando se analizan las diferentes interrelaciones que tienen lugar durante los periodos de ayuno.

En mamíferos, la gluconeogénesis ocurre solo en dos tejidos, el hígado y la corteza renal. Existen algunas evidencias que muestran que el glucógeno mas que la glucosa puede ser sintetizado en el músculo a partir de

lactato, pero esto es probablemente significativo solo cuando la concentración de lactato dentro de las células musculares es muy alta y la concentración de glucógeno muy baja.

La capacidad de síntesis de glucosa es de vital importancia para la supervivencia de los animales. En cualquier momento de la vida del mismo se hace necesario mantener, dentro de unos límites aceptables, los niveles de glucosa sanguínea, a fin de permitir y facilitar el trabajo celular de aquellos tejidos que utilizan la glucosa como combustible metabólico primario. Entre estos tejidos, podemos citar al cerebro, hematies, médula renal, cristalino y córnea del ojo y otros tejidos menos importantes.

El proceso gluconeogénico permite al animal el mantenimiento de los niveles aceptables de glucosa en sangre por bastante tiempo después de que toda la glucosa procedente de la dieta, en forma, generalmente, de sacarosa y diversos polisacáridos, se haya absorbido y utilizado completamente.

La síntesis de glucosa, se trata por tanto, de uno de los procesos metabólicos cuyo funcionamiento exige de un control y coordinación extremadamente estrictos, debido, en primer lugar, a que el sistema multienzimático utilizado por las células corresponde en su mayoría al empleado durante la degradación de la propia glucosa, y por otra parte, porque se trata de un proceso discontinuo debiéndose frenar considerablemente su actividad en aquellas condiciones en las cuales el aporte de glucosa exógena sea alto, o por el contrario, alcanzar altos niveles de actividad cuando aquello no ocurre o sea necesario transformar en glucosa todos aquellos materiales no glucídicos aportados en la dieta.

Por todo ello, el proceso gluconeogénico debe encontrarse sometido a una compleja red de regulación en la que juegan un papel importante, tanto las hormonas, que tradicionalmente se conocen como directoras del mismo, tales como insulina, glucagon, catecolaminas y glucocorticoides fundamentalmente, como el propio suministro de todos aquellos sustratos que iban a ser utilizados para la síntesis de glucosa, y que proceden tanto de la propia acción hormonal como del correspondiente a los macronutrientes que proporcionan las diferentes dietas.

Tanto unos como otros serán en último término responsables de los cambios que se producen en la actividad gluconeogénica durante las diferentes adaptaciones del organismo a situaciones tales como el ayuno, tanto en su fase inicial como prolongada, y el ejercicio, y de los cambios que caracterizan a los periodos perinatal y de lactancia. Siendo también responsables de los que tienen lugar en determinadas condiciones patológicas tales como la diabetes, acidosis aguda y crónica, insuficiencia adrenal y otras relacionadas con este metabolismo.

Tradicionalmente, se ha considerado al tejido hepático como el principal responsable del mantenimiento de los niveles de glucosa sanguíneos, tanto por su papel de almacenador de glucógeno, destinado no para su consumo sino para su distribución como glucosa al resto del organismo, como el ser el tejido encargado de llevar a cabo todos aquellos cambios adaptativos necesarios para suplir la falta de este combustible mediante su síntesis de novo ante todas aquellas situaciones celulares que se han comentado anteriormente.

De la misma manera, y de forma generalizada, se ha considerado a la corteza renal como el tejido capaz de aportar glucosa al organismo entero de una forma

constante y fundamentalmente reducida, salvo en aquellos casos en que se requiera para llevar a cabo el específico metabolismo renal, sin que se aprecien cambios adaptativos aparentemente significativos especialmente en situaciones en las cuales el aporte exógeno de macronutrientes varíe considerablemente. Sin embargo existen varias razones que permiten pensar que esto no es así, y que por tanto la corteza renal juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis glucémica.

En nuestro Departamento, se viene estudiando el proceso gluconeogénico de corteza renal durante bastantes años y se ha puesto de manifiesto que este tejido es capaz de adaptarse a diferentes situaciones de incapacidad hepática, comprobándose como en algunos de estos casos la corteza renal contribuye con un alto porcentaje (hasta el 90%) al mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre, existiendo para ello un auténtico fenómeno de adaptación de este tejido. Asimismo, en otros estudios se ha comprobado como los principales enzimas responsables de esta ruta biosintética son capaces de modular su actividad por medio de mecanismos moleculares semejantes a los que operan en hígado.

Junto a esto, otros autores han demostrado de forma categórica el incremento de la contribución renal a esta homeostasis en diversas situaciones fisiológicas y patológicas, observando que este tejido contribuye con un 50% en casos de ayuno y acidosis metabólica, y cerca de un 60% en el caso de diabetes. Generalmente estos incrementos se atribuyen fundamentalmente a cambios en la actividad o mejor dicho concentración de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

Por todo ello, se ha querido estudiar de forma global y sistemática, los posibles cambios adaptativos

que experimenta el riñón, y concretamente la corteza renal, frente a un grupo de situaciones caracterizadas por el aporte exógeno de diferentes macronutrientes, a fin de comprobar si este tejido es capaz de conectar el metabolismo de los mismos con el proceso gluconeogénico, y si es así, cuales son los principales mecanismos responsables para llevarlo a cabo, siendo éste el principal motivo del trabajo de esta memoria.

Para ello, se presenta un plan de trabajo que ha consistido en administrar durante un periodo de tiempo, perfectamente estudiado y escogido, una serie de dietas de diferente composición, tanto en carbohidratos como proteínas así como el ayuno, a grupos de animales de experimentación y estudiar posteriormente el comportamiento gluconeogénico y glucolítico, así como el de los correspondientes enzimas responsables de los mismos. Además, se han llevado a cabo, y bajo las mismas condiciones, ciclos de ayuno-alimentación. Los resultados de estos trabajos proporcionan un doble objetivo, por una parte, conocer desde un punto de vista teórico de una forma mas profunda las características específicas y puntos reguladores que presenta el proceso gluconeogénico renal, máxime teniendo en cuenta la nula interferencia del metabolismo del glucógeno en este órgano, y por otra parte, reconocer, gracias a los procesos de adaptación metabólica, la importancia que, en esta parcela del metabolismo celular, presenta este tejido, ya que los fenómenos adaptativos constituyen una propiedad significativa de aquellos tejidos que juegan un papel importante desde el punto de vista metabólico.

(11) - GLUCONEOGENESIS Y GLUCOLISIS. GENERALIDADES

La gluconeogénesis es el proceso metabólico mediante el cual es sintetizada la glucosa a partir de precursores no glucídicos, tales como piruvato, lactato (procedientes del metabolismo de carbohidratos), glicerato (procediente de la degradación de ácidos grasos) y otros ácidos glucónicos como el oxalato, malato, fumarato, etc. Este proceso ocurre en un ciclo.

El proceso inverso a la gluconeogénesis, conocido como glucólisis, es el proceso mediante el cual el lactato (lactato y CO_2 en la mitocondria) es oxidado a gliceraldehído 3-P y otros intermediarios.

Mientras que la gluconeogénesis ocurre en las células vivas, la glucólisis

1 - PARTE TEORICA

ocurre en los tejidos vivos y en el laboratorio. El hígado es el principal sitio de gluconeogénesis. Aunque en el hígado el piruvato puede ser convertido al lactato, este proceso es reversible. En otros tejidos, como el músculo y el riñón, la capacidad gluconeogénica es menor que la hepática y su importancia en determinadas circunstancias, que más adelante detallaré, es crucial.

Debido a la importancia de la glucosa como sustrato en la síntesis de macromoléculas, tales como proteínas, glicoproteínas y polisacáridos estructurales, este metabolito constituye el principal combustible metabólico para el cerebro, eritrocitos y médula espinal.

1 - PARTE TEORICA

1.1.- GLUCONEOGENESIS Y GLUCOLISIS. GENERALIDADES

La gluconeogénesis es el proceso metabólico mediante el cual es sintetizada la glucosa a partir de precursores no glucídicos, tales como piruvato, lactato (procedentes del metabolismo de carbohidratos), glicerol (procedente de la degradación de ácidos grasos) y los aminoácidos glucogénicos (como alanina, serina, glicocola, glutamato, glutamina, etc., procedentes del metabolismo proteico).

El proceso inverso a la formación de glucosa, conocido como glucolisis, es su consumo hasta piruvato y lactato (etanol y CO₂ en levaduras) y proporciona energía bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

Mientras que la glucolisis tiene lugar en todas las células vivas, la gluconeogénesis tiene lugar únicamente en dos órganos: hígado y riñón, que trabajan coordinadamente en el mantenimiento de la homeostasis de la glucemia. Aunque es el hígado el que contribuye mayoritariamente al mantenimiento de los niveles de glucosa sanguínea, sobre todo si tenemos en cuenta la diferencia de peso de ambos órganos, la capacidad gluconeogénica del riñón es semejante a la hepática y su importancia en determinadas circunstancias, que más adelante se detallan, es crucial.

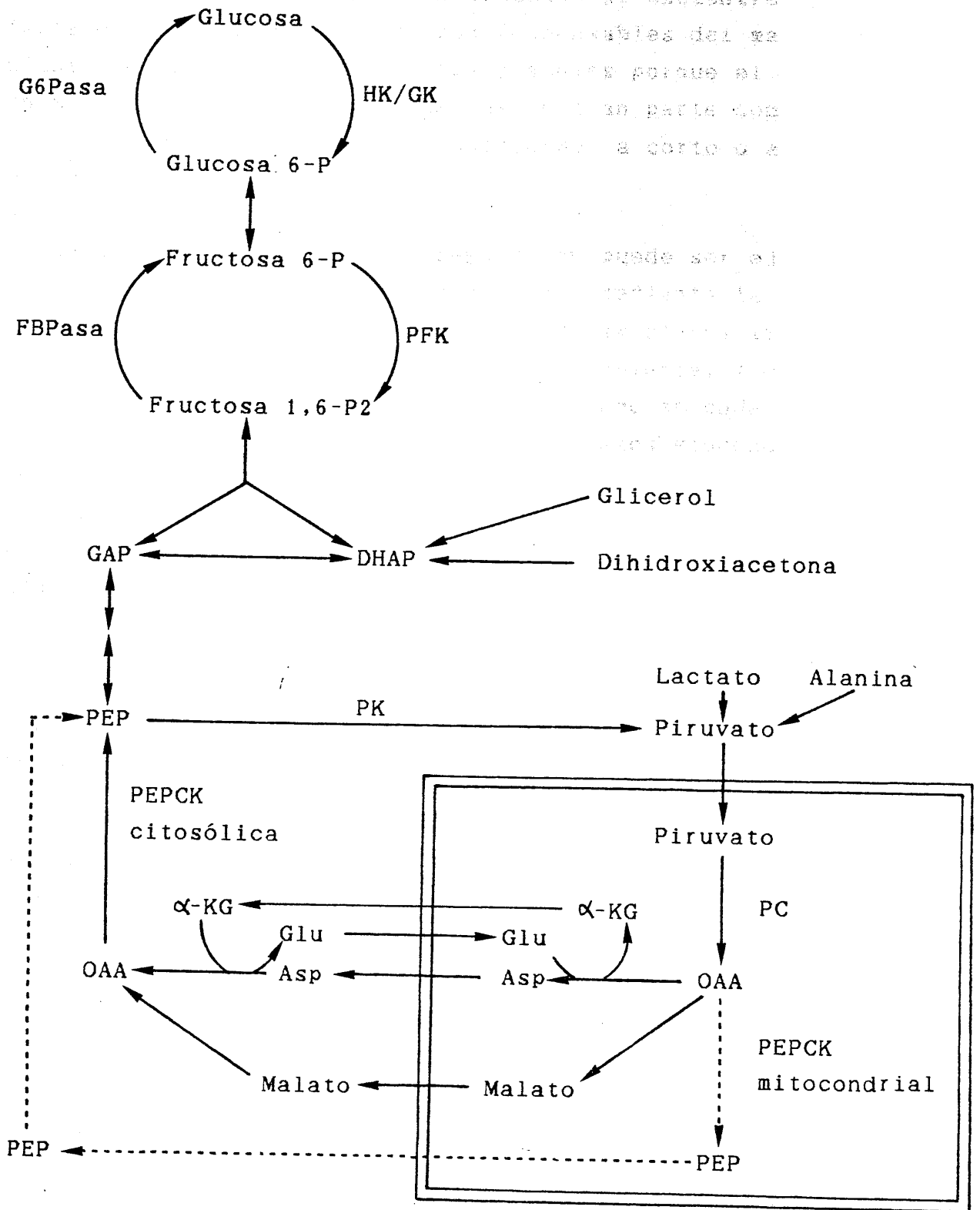
Además de la importancia de la glucosa como precursor en la síntesis de macromoléculas, tales como glucolípidos, glucoproteínas y polisacáridos estructurales, este metabolito constituye el principal combustible metabólico para el cerebro, eritrocitos y médula renal fundamentalmente.

Una de las características mas importantes del flujo gluconeogénico es su capacidad de variación principalmente debida a las diferentes condiciones nutricionales del organismo. Durante las primeras horas de ayuno es el glucógeno hepático el encargado de mantener constantes los niveles de glucemia; su síntesis y degradación están controladas hormonalmente y por la misma concentración de glucosa (Hers, H.G., 1976; Stalmans, W., 1976). Tras estas primeras horas, será la gluconeogénesis quién suministre la glucosa necesaria, fundamentalmente a partir de aminoácidos, pero también a partir de lactato y glicerol. Bajo estas condiciones la glucolisis se encuentra inhibida en hígado y muy disminuida en otros tejidos, pudiendo servir como combustibles ácidos grasos y compuestos cetónicos.

El esquema metabólico de la gluconeogénesis fue elaborado hace algunos años, principalmente en los laboratorios de Lardy (1966) y Scrutton y Utter (1968).

La gluconeogénesis y glucolisis utilizan en su mayor parte el mismo equipo enzimático. Estas enzimas catalizan reacciones reversibles, pero hay tres pasos que son diferentes e irreversibles y son los catalizados por la hexoquinasa-glucoquinasa, fosfofructoquinasa, y piruvato quinasa en la via glucolítica; y por piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa y glucosa 6-fosfatasa en la via gluconeogénica.

Esquema 1



Esquema de la glucólisis y gluconeogénesis. Se indican los enzimas claves de cada ruta.....→ Ruta alternativa que utiliza la PEPCK mitocondrial.

1.2.- REGULACION DE LA GLUCONEOGENESIS Y GLUCOLISIS

Es importante que ambos procesos se encuentren perfectamente regulados, ya que son responsables del mantenimiento de los niveles de glucosa y además porque el sistema multienzimático que utilizan es en gran parte común.

La regulación puede ejercerse a corto o a largo plazo y comprende:

- a) Regulación alostérica
- b) Regulación hormonal. Esta regulación puede ser ejercida bajo dos mecanismos diferentes; uno, mediante la acción directa de las hormonas sobre los enzimas claves implicados en el proceso por modificación covalente; y otro, a través de un mecanismo indirecto, regulando en cada momento el suministro de los diferentes sustratos gluconeogénicos a partir de los tejidos periféricos. Asimismo puede llevarse a cabo de una forma lenta, a largo plazo, gracias a los cambios inducidos en los procesos de síntesis o degradación de enzimas.

1.2.1.- Regulación alostérica

1.2.1.1.-Ciclo Piruvato carboxilasa-Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa/Piruvato quinasa

El primer paso en la ruta gluconeogénica a partir de piruvato está catalizado por un enzima regulador, la piruvato carboxilasa [pyruvate: carbon-dioxide ligase (ADP-forming), EC 6.4.1.1.] de localización mitocondrial.

La actividad piruvato carboxilasa se encuentra activada por un modulador alostérico positivo, el acetil coenzima A (Utter y Scrutton, 1969). Cuando se produce un exceso de acetilCoA mitocondrial superior a las propias necesidades energéticas de la célula, generalmente por un aumento en la degradación de ácidos grasos, se ve favore-

cida la síntesis de glucosa.

Además la actividad de este enzima se encuentra favorecida por un alto valor de la relación ATP/ADP, mientras que se afecta poco por el ayuno, alimentación y diabetes. Esto es debido a la necesidad del enzima no solamente para la gluconeogénesis, que predomina durante el ayuno, sino también para la síntesis de ácidos grasos que opera en animales alimentados (Hers y Hue, 1983).

Los cationes monovalentes y divalentes son esenciales para la actividad del enzima, principalmente K^+ y Mg^{++} (Utter y Scrutton, 1969). El ión magnesio activa el enzima y se ha sugerido que este catión tiene al menos dos mecanismos de acción; por una parte forma un complejo con el ATP para formar ATPMg, y por otro, forma un complejo con el enzima para activar la reacción enzimática (Keech y Barritt, 1967).

Otro factor regulador es la concentración de Ca^{++} ; en varios laboratorios se ha demostrado que un aumento en la concentración de este ión inhibe la actividad piruvato carboxilasa (Kimmich y Rasmussen, 1969; Wimhurst y Manchester, 1970; Foldes y Barritt, 1977). Aunque según Walter (1976) esta inhibición es dependiente de la concentración de sacarosa en el medio de incubación, y que la sacarosa es inhibidora del enzima por sí misma.

El segundo enzima de este ciclo es la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa [GTP/ITP: oxalacetate-carboxylyase (transphosphorylating), EC 4.1.1.32]. Su localización intracelular varía entre las distintas especies; por ejemplo en ratón y rata es casi exclusivamente citosólica, en conejo y paloma es casi totalmente mitocondrial, mientras que en cobaya y en el hombre se distribuye igualmente entre el citosol y la mitocondria.

Siguiendo con el descubrimiento de que la administración de triptófano a ratas causaba una inhibición de la

gluconeogénesis hepática, Lardy y Merryfield (1981) habían subrayado el papel del ión Fe^{++} en la regulación de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Ellos demostraron que en las células, los requerimientos de un ión divalente para la PEPCK eran probablemente realizados por Fe^{++} , acción que requiere una proteína llamada ferroactivador. Este ferroactivador está presente en hígado, riñón y eritrocitos, y su concentración es superior en ratas ayunadas y diabéticas. El efecto del ferroactivador es producido también por el 3-aminopicolinato, un ferroquelante, que puede estimular la actividad PEPCK en presencia de Fe^{++} . Mas recientemente se ha observado que la mitocondria puede liberar Fe^{++} cuando se incubaba en presencia de concentraciones fisiológicas de Ca^{++} (Merryfield y Lardy, 1982). A partir de estas y otras observaciones Lardy y Merryfield propusieron que un cambio en la concentración citosólica de Ca^{++} , que podía estar inducido por agentes α -adrenérgicos, estimulaba la actividad PEPCK a través de la liberación de Fe^{++} de los almacenes mitocondriales. A este respecto la concentración de Fe^{++} , mas que la del ferroactivador era el factor limitante en la activación de la PEPCK.

El significado fisiológico de este mecanismo, sin embargo, tiene que ser considerado con cautela. La falta de correlación entre la presencia del ferroactivador y PEPCK en tejidos, y el hecho de que según Reynolds (1980) el efecto de los ferroquelantes en la PEPCK es proteger el enzima contra la inactivación por Fe^{++} en vez de activarlo, parece no aclarar aún el papel de la proteína ferroactivador en el control de la gluconeogénesis.

La actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa se ha estudiado en presencia de ciertos cationes divalentes, encontrándose que Mn^{++} , Cd^{++} , Zn^{++} y Co^{++} producen un incremento en la actividad (Colombo y Lardy, 1981; Colombo y

col., 1981)

Por lo que respecta a este ciclo en la ruta glucolítica, el enzima implicado es la piruvato quinasa (ATP: pyruvate 2-O-phosphotransferase, EC 2.7.1.40), capaz de transformar irreversiblemente el fosfoenolpiruvato en piruvato. Se trata de un enzima típicamente alostérico que puede ser modulado tanto positiva como negativamente por efectores específicos.

Aunque se ha demostrado que varias hexosas fosforiladas estimulan la actividad piruvato quinasa (Taylor y Bailey, 1967; Koster y Hulsmann, 1970; Van Berkel y col., 1974), solamente la fructosa 1,6-bisfosfato puede aumentar significativamente la actividad piruvato quinasa en presencia de niveles fisiológicos de ADP, fosfoenolpiruvato y ATP (Llorente y col., 1970; Van Berkel y col., 1974). La fructosa 1,6-bisfosfato se une muy estrechamente con el enzima (Blair y Walker, 1984) y además esta unión se encuentra favorecida por el sustrato, fosfoenolpiruvato, y antagonizada por un inhibidor alostérico, la alanina (El-Maghrabi y col., 1982a).

Otro efector alostérico positivo de la piruvato quinasa es el 6-fosfogluconato (Smith y Freedland, 1979; Smith y Freedland, 1981), un intermediario del ciclo de las pentosas fosfato y cuyo papel parece ser de mayor importancia fisiológica en situaciones en las que predomine la lipogénesis en el animal (Smith y Freedland, 1981).

Como inhibidores alostéricos del enzima destacan el ATP, alanina y NADH (Llorente y col., 1970).

La piruvato quinasa como otros enzimas quinasas requiere cationes divalentes para su actividad. El enzima se encuentra activado por Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} y Zn^{++} , en ese orden de mayor a menor efecto activador (Baek y Nowak, 1982).

1.2.1.2.- Ciclo Fructosa 1,6-bisfosfatasa/Fosfofructoquinasa

La fructosa 1,6-bisfosfatasa (D-fructose-1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase, EC 3.1.3.11) juega un papel clave en la regulación de la gluconeogénesis. Un inhibidor alostérico de este enzima es el AMP. La inhibición por AMP es incompetitiva con respecto al sustrato en ausencia de fructosa 2,6-bisfosfato y no competitiva en su presencia (Meek y Nimmo, 1984a), y menos importante a bajas que a altas concentraciones de sustrato (Pilkis y col., 1981a). Se ha señalado también que la fructosa 1,6-bisfosfatasa es inhibida a grandes concentraciones de su sustrato, sin embargo la concentración necesaria para producir esta inhibición es demasiado alta para tener un significado fisiológico (Boiteux y col., 1980).

El enzima tiene un requerimiento absoluto por cationes divalentes, tales como Mg^{++} , Mn^{++} y Co^{++} , para su actividad.

Como efectores positivos del enzima se conocen la histidina (Hers y Hue, 1983) y el citrato (Tejwani, 1983).

A este mismo nivel la glucólisis presenta la fosfofructoquinasa (ATP-D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase, EC 2.7.1.11), prototipo de un enzima multimodulado alostéricamente. Es inhibido por ATP, citrato, y como recientemente se ha descrito, por glicerol 3-fosfato (Claus y col., 1982). Es activado por AMP, fructosa 1,6-bisfosfato, fructosa 6-fosfato, glucosa 1,6-bisfosfato y por 6-fosfogluconato (Sommercorn y Freedland, 1982; Hers y Hue, 1983; Sommercorn y col., 1984).

Una mención especial merece el nuevo efector alostérico señalado recientemente para la fosfofructoquinasa y fructosa 1,6-bisfosfatasa por diferentes grupos de investigadores (Richards y Uyeda, 1980; Van-Schaftingen y Hers,

1980 ; Furuya y Uyeda, 1980 ; Pilkis y col., 1981b; Hue y col., 1981a; Claus y col., 1981 ; Richards y col., 1981 ; El-Maghrabi y col., 1981 ; Van-Schaftingen y Hers, 1981a). Se trata de un azúcar difosfato identificado como fructosa 2,6-bisfosfato, y que aunque primeramente se catalogó como un potente activador de la fosfofructoquinasa, mas tarde se demostró que era también un inhibidor de la fructosa 1,6-bisfosfatasa (Mörikofer-Zwez y col., 1981; Pilkis y col. 1981c; Van-Schaftingen y Hers, 1981b; Francois y col., 1983).

La fructosa 2,6-bisfosfato fue descubierta cuando se estudiaba la regulación hormonal de la actividad fosfofructoquinasa. La primera evidencia se obtuvo por adición de glucagon a hepatocitos, el cual inhibía la actividad de este enzima cuando se medía en extractos crudos de células (Pilkis y col., 1979). Puesto que el efecto fue observado en extractos crudos, no era posible saber si éste era debido a una mecanismo de modulación covalente del enzima o a cambios en los niveles de efectores alostéricos. Algunos autores propusieron la hipótesis de que la actividad enzimática estaría regulada por fosforilación (Kagimoto y Uyeda, 1979 ; Castaño y col., 1979), mientras que otros indicaron que los cambios en la actividad enzimática se debían a variaciones en los niveles de un efector (Claus y col., 1980 ; Van-Schaftingen y col., 1980). Seguidamente numerosos grupos de trabajo informaron acerca de la existencia de un desconocido activador de la fosfofructoquinasa cuyos niveles disminuían drásticamente tras la adición de glucagon (Claus y col., 1980 ; Van-Schaftingen y col., 1980 ; Richards y Uyeda, 1980 ; Claus y col., 1981 ; Hue y col., 1981b).

La primera tentativa de identificación de este activador como fructosa 2,6-bisfosfato fue puesta en marcha por Van-Schaftingen y Hers (1980). La determinación estructural definitiva fue completada, utilizando distintas

técnicas, por Pilkis y col. (1981b) y Uyeda y col. (1981).

La concentración hepática de fructosa 2,6-bisfosfato se encuentra dentro de un rango micromolar y está sujeta tanto a regulación hormonal como nutricional. Los niveles hepáticos de este activador en ratas ayunadas 24 horas disminuyen un 80-90%, mientras que la adición de altas concentraciones de glucosa a hepatocitos de ratas ayunadas iguala estos niveles a los encontrados en hepatocitos de ratas alimentadas (Van-Schaftingen y col., 1980 ; Richards y Uyeda, 1980 ; Claus y col., 1981 ; Hue y col., 1981b; Richards y Uyeda, 1982a ; Pilkis y col., 1983a). La dihidroxiacetona solo restablece parcialmente la concentración normal de este activador (Claus y col., 1982). La realimentación de ratas ayunadas con dietas ricas en carbohidratos incrementa los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato de 2 a 5 veces a los encontrados en hígados de ratas alimentadas ad libitum (Neely y col., 1981).

La concentración de fructosa 2,6-bisfosfato en hepatocitos de ratas alimentadas o de ratas ayunadas incubados con glucosa, disminuye significativamente por la adición de glucagon, cAMP, dibutiril-cAMP, o catecolaminas por un mecanismo β -adrenérgico (Uyeda y col., 1982; Richards y Uyeda, 1980; Claus y col., 1981; Hue y col., 1981b; El-Maghrabi y col., 1982b; Richards y col., 1981). Por su parte la insulina contrarresta los efectos producidos por estos agentes (Richards y Uyeda, 1982a ; Pilkis y col., 1983a).

La fructosa 2,6-bisfosfato ha sido encontrada en todos los tejidos de mamíferos estudiados (Uyeda y col., 1982), encontrándose en mas alta concentración en hígado, cerebro y músculo cardiaco. Así mismo ha sido aislada en Saccharomyces cerevisiae creciendo en glucosa (Lederer y col., 1981; Gancedo y col., 1983), hojas de espinacas (Hers y Van-Schaftingen, 1982) y en otras plan-

tas (Sabularse y Anderson, 1981). Estos estudios demuestran que este azúcar difosfato se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y probablemente juega un importante papel en la regulación de la glucólisis/gluconeogénesis en muchos tipos de células.

La regulación del nivel de fructosa 2,6-bisfosfato está a cargo de las actividades enzimáticas responsables de su síntesis y degradación. Recientemente se ha encontrado que una misma proteína cataliza ambos procesos por un mecanismo de fosforilación-defosforilación que explica la bifuncionalidad de este enzima (Pilkis y col., 1983b). El enzima defosforilado presenta actividad 6-fosfofructo 2-quinasa, mientras que el enzima fosforilado presenta actividad fructosa 2,6-bisfosfatasa. El esquema 2 presenta un modelo simplificado de su regulación.

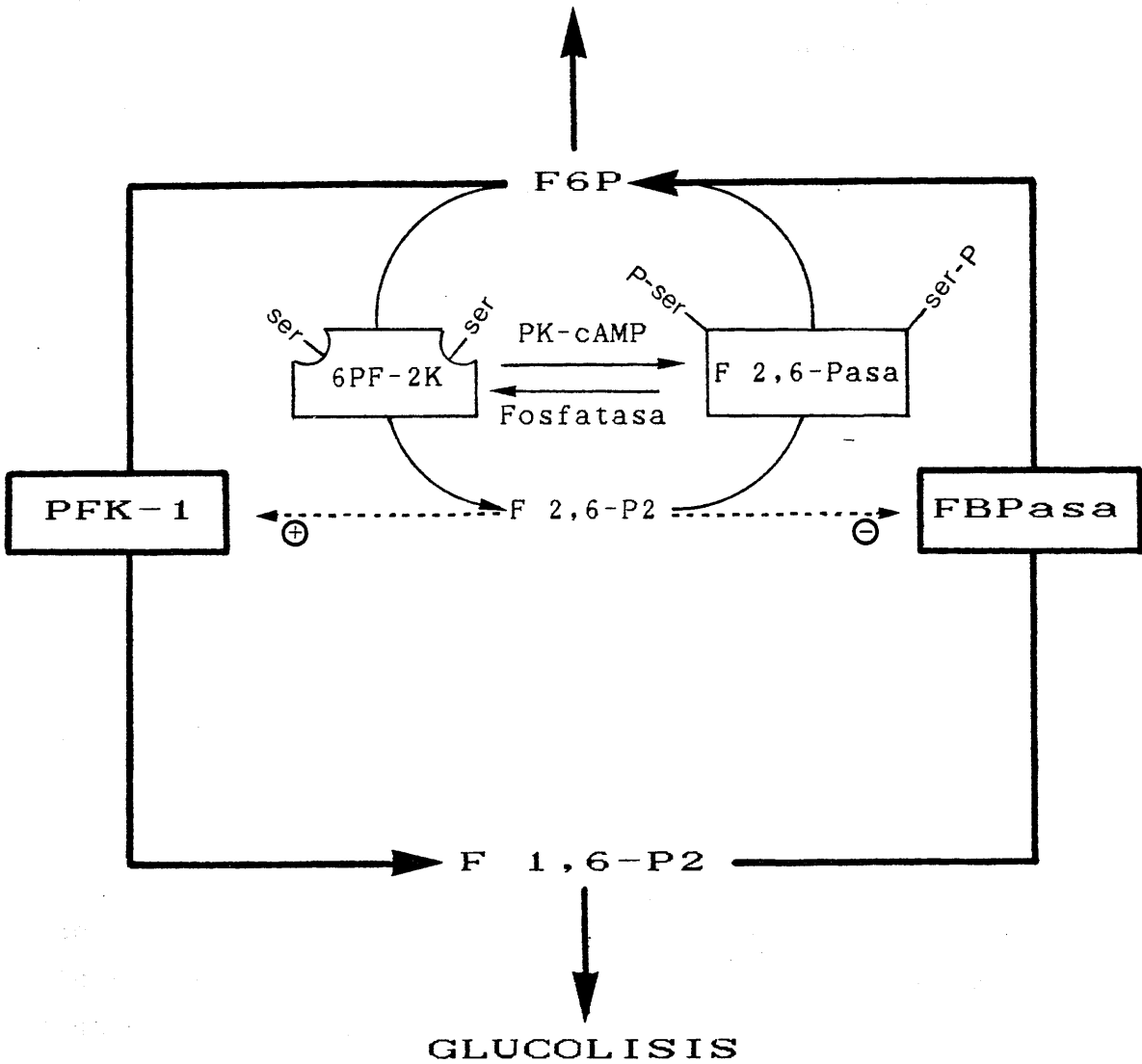
La 6-fosfofructo 2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa es un excelente sustrato para la proteína quinasa dependiente de cAMP, capaz de fosforilar restos de serina. La composición de aminoácidos de la proteína indica que cada una de las dos subunidades contiene 73 residuos de serina, de los cuales solo uno de ellos es accesible a la fosforilación (El-Maghrabi y col., 1982c).

La fosforilación del enzima hace disminuir la actividad quinasa y activa la fosfatasa con un incremento de la afinidad aparente para la fructosa 2,6-bisfosfato. El resultado de la fosforilación es que la actividad fructosa 2,6-bisfosfatasa es predominante cuando el enzima es ensayado a concentraciones subsaturantes de sustrato. La defosforilación del enzima es catalizada por una fosfoproteína fosfatasa (Richards y col., 1982).

La actividad de la 6-fosfofructo 2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa se encuentra regulada hormonalmente. El glucagón disminuye los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato como consecuencia de la fosforilación del enzima a través

Esquema 2

GLUCONEOGENESIS



Esquema de la regulación de la gluconeogénesis y glucólisis por fructosa 2,6-bisfosfato.

de un aumento de la actividad de la proteína quinasa dependiente de cAMP. Al fosforilarse el enzima aumenta la actividad fructosa 2,6-bisfosfatasa (El-Maghrabi y col., 1982c; Furuya y col., 1982 ; Pilkis y col., 1982a; Richards y col., 1982 ; El-Maghrabi y col., 1982d).

La insulina revierte estos efectos bajando los niveles de cAMP, promoviendo la defosforilación del enzima (Pilkis y col., 1983a).

Aunque se señaló una inhibición en la actividad 6-fosfofructo 2-quinasa y activación en la fructosa 2,6-bisfosfatasa por adrenalina, mediante un mecanismo α -adrenérgico (Richards y Uyeda, 1980 ; Richards y Uyeda, 1982b ; Furuya y col., 1982), diferentes autores han demostrado que las catecolaminas no afectan a estos enzimas por un mecanismo α -adrenérgico (Hue y col., 1981b Garrison y Wagner, 1982; Pilkis y col., 1983a).

Corredor y col. (1984) señalan un efecto bifásico de la fructosa 2,6-bisfosfato en la fructosa 1,6-bisfosfatasa hepática, siendo inhibidor a bajas concentraciones de sustrato y activador a altas, aunque este último efecto no tiene mucho significado fisiológico, puesto que no se encuentran esas concentraciones en la célula.

Teniendo en cuenta que la fructosa 2,6-bisfosfato actúa como un potente activador de la fosfofructoquinasa e inhibidor de la fructosa 1,6-bisfosfatasa, podemos concluir que este metabolito juega un importante papel en el control de la glucólisis y gluconeogénesis, y que su regulación se lleva a cabo por modificación covalente de la actividad 6-fosfofructo 2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa, y por diferentes efectores (α -glicerol fosfato, Pi, fructosa 6-fosfato, fosfoenolpiruvato).

1.2.1.3.- Ciclo Glucosa 6-fosfatasa/Hexoquinasa-Glucoquinasa

La glucosa 6-fosfatasa (D-glucose-6-phosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.9), es un enzima que se encuentra ligada al retículo endoplasmático y está presente en hígado, riñón y epitelio intestinal.

La glucoquinasa (ATP: D-glucose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.2) sólo se encuentra en hígado y difiere de la hexoquinasa (ATP: D-hexose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1) por su gran especificidad de sustrato (solo fosforila la glucosa y no otras hexosas); por su alta K_m para la glucosa; porque no se inhibe con el producto glucosa 6-fosfato; porque presentan diferente cinética frente al sustrato y porque se afecta con la dieta y diabetes.

No se conoce otro mecanismo de control de la glucosa 6-fosfatasa que la propia concentración de sustrato. Aunque hay una ligera inhibición por los dos productos de la reacción, glucosa y P_i , este efecto es demasiado pequeño para jugar un papel bajo condiciones fisiológicas.

En cuanto a la glucoquinasa, su control es también esencialmente por concentración de sustrato. La glucoquinasa predomina sobre la hexoquinasa en hígado y actúa cuando la concentración de glucosa en sangre es temporalmente elevada, como suele ocurrir después de la ingestión de una dieta rica en azúcares.

1.2.2.- Regulación hormonal

En la regulación de los procesos gluconeogénico y glucolítico juegan un papel importante hormonas tales como insulina, glucagon, catecolaminas y glucocorticoides. Estas hormonas son las responsables, en parte, de los cambios que se producen en estos procesos durante las diferentes adaptaciones del organismo al ayuno y ejercicio y de los cambios que caracterizan a los periodos neonatal y lactancia, siendo también responsables de los que tienen lugar en determinadas condiciones patológicas, como la diabetes y la insuficiencia adrenal.

La regulación hormonal puede ser ejercida bajo dos mecanismos diferentes. Uno mediante la acción directa de las hormonas sobre los enzimas clave implicados en el proceso; y otro por acción indirecta mediante el efecto sobre el suministro de sustratos gluconeogénicos o bien por síntesis o degradación de enzimas.

1.2.2.1.- Efecto del glucagon

El efecto del glucagon es la estimulación de la gluconeogénesis, con una simultánea inhibición de la glucolisis. El incremento que produce el glucagon en la gluconeogénesis es superior cuando es a partir de hígados de animales ayunados.

El glucagon estimula la gluconeogénesis, no solo a partir de lactato y piruvato, sino también a partir de otros sustratos como glutamato, glutamina, propionato (Chan y Freedland, 1976), fructosa y dihidroxiacetona (Garrison y Haynes, 1973; Yorek y col., 1980), pero no a partir de glicerol (Pilkis y col., 1976) o altas concentraciones de fructosa (5-10 mM).

a) Regulación a nivel de suministro de sustratos gluconeogénicos

Esta hormona tiene poco efecto a nivel de tejidos periféricos. En ausencia de insulina, el glucagon estimula la lipólisis, promoviendo la liberación de glicerol (Gerich y col., 1976).

Disminuye los niveles plasmáticos de ciertos aminoácidos, fundamentalmente alanina (Cherrington y col., 1981), debido a un efecto estimulador de la hormona sobre la captación de este aminoácido por parte del hígado (Steiner y col., 1981). Estos estudios sobre la activación de la captación hepática de los aminoácidos plasmáticos se han hecho con glucagon in vivo (Marliss y col., 1970), en hígado perfundido (Chambers y col., 1968; Mallette y col., 1969) y en hepatocitos aislados, un efecto que fue producido también por dibutiril-cAMP (Lecam y Freichet, 1976).

Otro efecto del glucagon es la estimulación de la entrada de piruvato en la mitocondria, favoreciendo la movilidad del transportador de piruvato en la membrana mitocondrial, mas que un cambio en la afinidad del transportador por el piruvato (Titheradge y Coore, 1976)

Asimismo Kimmig y col. (1983) demuestran una estimulación del consumo de oxígeno por el glucagon en hígado perfundido, añadiendo que esta estimulación está estrechamente relacionada a la inhibición de la glucólisis, debido a un aumento en la fosforilación oxidativa para compensar la disminución extramitocondrial de ATP.

b) Regulación por modificación covalente

La estimulación de la gluconeogénesis e inhibición de la glucólisis producidas por glucagon en hígado, son efectos comparables a los ejercidos por cAMP. Estos efectos

tos parecen estar mediados por una proteína quinasa dependiente de cAMP capaz de fosforilar a enzimas claves de ambos procesos, que a su vez pueden ser defosforilados por una proteína fosfatasa restableciéndose su actividad original.

Hay cuatro enzimas que se ven afectadas por el glucagón, pero solamente dos de ellas modifican sus propiedades cinéticas: piruvato quinasa y fosfofructoquinasa-2/fructosa 2,6-bisfosfatasa son sustratos para la proteína quinasa dependiente de cAMP; mientras que fosfofructoquinasa-1 y fructosa 1,6-bisfosfatasa son moduladas indirectamente por la concentración del efector fructosa 2,6-bisfosfato.

La fosforilación de la piruvato quinasa hepática ha sido demostrada en animales enteros (Riou y col., 1978), cortes de hígado (Ljungström y Ekman, 1977), hepatocitos (Ishibashi y Cottam, 1978a y b; Foster y Blair, 1978), extractos crudos de células (Feliú y col., 1977; Pilkis y col., 1978) y en el enzima purificado (El-Maghrabi y col., 1980; Pilkis y col., 1980).

El mayor efecto cinético producido por la fosforilación en la piruvato quinasa es reducir la afinidad del enzima por el sustrato, fosfoenolpiruvato. El efecto inhibitorio de la fosforilación fue contrarrestado por efectores positivos, como por ejemplo fructosa 1,6-bisfosfato a concentraciones micromolares; por otro lado efectores negativos tales como ATP y alanina pueden inhibir aún más la forma fosforilada del enzima (Ljungström y col., 1976).

El efecto del glucagón sobre la piruvatoquinasa se observa utilizando concentraciones fisiológicas de la hormona (Feliú y col., 1976; Foster y Blair, 1978); y solo en el isoenzima L, no en el M.

Aunque la fosfofructoquinasa-1 puede ser fosforilada por la proteína quinasa dependiente de cAMP, Kagimoto y

Uyeda (1979) observan que esta fosforilación no afecta a la actividad máxima del enzima; únicamente la hace mas sensible a la inhibición por ATP.

La fructosa 1,6-bisfosfatasa de hígado de rata puede ser fosforilada asimismo por la proteína quinasa dependiente de cAMP, aunque no parece estar claro que pueda ser fosforilado este enzima a partir de otras fuentes biológicas. Esto es debido a la presencia en el enzima hepático de rata de una extensión en la porción carboxilo terminal, que es donde se localiza la fosforilación, y que no existe en la estructura de la fructosa bisfosfatasa de otras fuentes (Rittenhouse y col., 1983). Esta fosforilación, sin embargo, solo causa disminución en la K_m del enzima para la fructosa 1,6-bisfosfato, sin alterar sus otras propiedades cinéticas (Meek y Nimmo, 1984b).

La disminución de fructosa 2,6-bisfosfato que se observa tras la adición de glucagon a hepatocitos aislados, es debido a un cambio en las actividades 6-fosfofructo 2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa causado por fosforilación cAMP-dependiente. La fosforilación hace disminuir la actividad quinasa y activa la fosfatasa (Pilkis y col., 1982a; El-Maghrabi y col., 1982c; Richards y col., 1982; El-Maghrabi y col., 1982d). Solo se necesitan pequeños cambios en los niveles de cAMP para afectar a la actividad 6-fosfofructo 2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa, ya que se observan cambios en la actividad enzimática con concentraciones de glucagon que no afectan a la actividad piruvato quinasa ni a la gluconeogénesis (Pilkis y col., 1983a).

Parece ser que la importancia fisiológica de los dos efectos del glucagon, inactivación de piruvato quinasa y disminución de la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato, depende de los sustratos gluconeogénicos utilizados. Con sustratos que entran a nivel de piruvato, la inactiva-

ción de la piruvato quinasa parece ser esencial; mientras que con sustratos que entren a nivel de triosas fosfato, una disminución en la fructosa 2,6-bisfosfato es más importante (Hue y Bartrons, 1984).

c) Regulación por biosíntesis de enzimas

El glucagon y la insulina también tienen efectos a largo plazo sobre los niveles de enzimas hepáticos implicados en las rutas glucolítica y gluconeogénica. Una relación glucagon:insulina elevada en la sangre incrementa la capacidad de síntesis de glucosa por las células que la llevan a cabo y disminuye la de su degradación. Una relación glucagon:insulina baja presenta efectos opuestos. Además de los mecanismos a corto plazo anteriormente discutidos, esto se consigue por inducción y represión de la síntesis de enzimas claves de las rutas mencionadas. Así, cuando la relación glucagon:insulina es alta, se favorece la gluconeogénesis, aumentando la síntesis de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Tilghman y col., 1976; Salavert y Iynedjian, 1982; Iynedjian y col., 1985). Por el contrario, la elevación de los niveles de insulina, lo que indica una relación entre estas hormonas baja, causa un incremento fundamentalmente en la síntesis de glucoquinasa (Weinhouse, 1976), y piruvato quinasa (Miyanaga y col., 1982; Parks y Drake, 1982; Noguchi y col., 1983; Munnich y col., 1984; Noguchi y col., 1985); y disminución en la síntesis de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Cimbala y col., 1982; Andreone y col., 1982). Parece ser que la señal que determina estos efectos es debida al mantenimiento de altos niveles de glucosa sanguínea por entrada de glucosa desde el tracto gastrointestinal.

1.2.2.2.- Efecto de la insulina

La función fisiológica mas importante de la insulina es prevenir la hiperglucemia, cosa que lleva a cabo por dos mecanismos: inhibiendo la liberación de glucosa desde el hígado y estimulando su utilización periférica. De acuerdo con esto, el estímulo mas potente para la secreción de insulina es la elevación de los niveles de glucosa en sangre (Porte y Bagdade, 1970).

a) Regulación a nivel de suministro de sustratos gluconeogénicos

La insulina inhibe la gluconeogénesis por su capacidad de reducir la liberación de aminoácidos a partir del músculo esquelético, gracias a su doble acción sobre el metabolismo proteico, estímulo de la síntesis e inhibición de la degradación proteica (Jefferson y col., 1977).

Por otra parte la acción antilipolítica de la insulina refleja una disminución en la liberación de ácidos grasos y glicerol a partir del tejido adiposo (Blackshear y col., 1974). Estos cambios son en parte debidos a una reducción de los niveles intracelulares de cAMP (Soderling y col., 1973).

Aunque parece que la insulina también reduce la liberación periférica de lactato, este aspecto no está todavía del todo claro (Jefferson y col., 1977).

b) Regulación por modulación covalente

La acción fundamental de la insulina es antagonizar los efectos del glucagon y catecolaminas sobre la gluconeogénesis hepática.

La insulina estimula la glucolisis a muy bajas dosis fisiológicas. Este efecto está en parte atribuido a

la activación que produce de la piruvato quinasa (Probst y Jungermann, 1983; Fleig y col., 1984). Esta estimulación se ejerce de forma rápida y parece estar mediada por una modulación directa que afecta a la afinidad del enzima por el fosfoenolpiruvato.

La inhibición producida por insulina es similar si se utilizan células aisladas (Feliú y col., 1976; Claus y col., 1979 ; Fleig y col., 1984), hígado perfundido (Blair y col., 1976) o animales vivos (Riou y col., 1978).

La insulina asimismo favorece la glucólisis por modificar la concentración de ciertos efectores, como la fructosa 1,6-bisfosfato (Claus y col., 1979) y la fructosa 2,6-bisfosfato. El que la insulina afecta al nivel de fructosa 2,6-bisfosfato ha sido demostrado recientemente (Pilkis y col., 1983a); este efecto es producido al oponerse a la fosforilación cAMP-dependiente de la 6-fosfofructo 2-kinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa.

1.2.2.3.- Efecto de las catecolaminas

Hasta que no se descubrió el papel del glucagon en la homeostasis de la glucosa, la adrenalina era considerada como la hormona hiperglucémica por excelencia. Sin embargo parece claro que los efectos hiperglucémicos de la adrenalina en hígado son importantes sólo en unión a los producidos por glucagon e insulina, y que estos efectos son principalmente aparentes en ciertas situaciones de emergencia (Sokal, 1966; Gerich y col., 1979).

La concentración de adrenalina necesaria para la respuesta hiperglucémica es superior a la concentración encontrada normalmente en condiciones fisiológicas, cosa que no ocurre con el glucagon (Sokal y Sarcione, 1964). Sin embargo la adrenalina tiene un efecto hiperglucémico

mas pronunciado que el glucagon debido a varias razones: (1) la adrenalina inhibe la secreción de insulina (Porte y col., 1966), mientras que el glucagon la estimula (Samols y col., 1965); (2) la adrenalina estimula la glucogenolisis en músculo (Rall y col., 1957), proporcionando así sustrato para la gluconeogénesis en forma de lactato; (3) la adrenalina estimula la secreción de glucagon (Gerich y col., 1973; Iversen, 1973); (4) la adrenalina estimula la secreción de ACTH, la cual incrementa la secreción de glucocorticoides a partir de las células de la zona fasciculada de la corteza adrenal (Grana y Lilla, 1960).

a) Regulación a nivel de suministro de sustratos gluconeogénicos

Las catecolaminas aumentan la liberación de glicerol y lactato, a partir del tejido adiposo y músculo esquelético por su interacción con los receptores β -adrenérgicos. Dicha interacción permite una activación de la adenilato ciclasa, acumulación intracelular de cAMP y por último una activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP.

En el tejido adiposo, la secuencia de reacciones mencionadas permite fosforilar y activar la lipasa, la cual es capaz de transformar los triacilglicéridos en diacilglicéridos y monoacilglicéridos, y posteriormente la hidrólisis de estos conduce a la liberación de glicerol.

En el músculo, y a través del mismo mecanismo, la fosforilasa quinasa es fosforilada y activada, mientras que la forma activa de la glucógeno sintasa es fosforilada e inactivada. En definitiva estos cambios conducen a un aumento en la glucogenolisis a través del doble efecto, disminución de la síntesis de glucógeno y activación de la degradación, lo que permite un incremento del flujo glucolítico con el consecuente aumento en la producción de lac-

tato.

Sorprendentemente las catecolaminas, actuando a través de receptores β -adrenérgicos, inhiben la liberación de alanina y otros aminoácidos en músculo perfundido (Garber y col., 1976). Li y Jefferson (1977) demuestran por otra parte que el agonista β -adrenérgico isoproterenol inhibe el catabolismo proteico y sugieren, además, que éste incrementa la utilización de alanina, lo que explicaría la disminución en la concentración intracelular de algunos aminoácidos.

b) Regulación por modulación covalente

El efecto estimulante de la glucogenolisis y gluconeogénesis causado por las catecolaminas en hígado, no está mediado por receptores β -adrenérgicos a través de cAMP, como se creyó en un principio, sino que está mediado predominantemente por receptores alfa (Tolbert y col., 1973; Tolbert y Fain, 1974; Hutson y col., 1976; Cherrington y col., 1976; Chan y Exton, 1977; Hue y col., 1978; Rizza y col., 1980).

La estimulación α -adrenérgica es dependiente de los iones Ca^{++} , ya que la eliminación de dichos iones del medio impide la estimulación (Whitton y col., 1978; Poggioli y col., 1980). El calcio regula un gran número de procesos metabólicos que están relacionados a su vez con hormonas específicas. El aumento de la gluconeogénesis (Tolbert y col., 1973; Kneer y col., 1979; Yip y Lardy, 1981) y glucogenolisis (Blackmore y col., 1978) producido por agonistas α -adrenérgicos, está asociado a un incremento en el calcio citosólico, principalmente a partir de sus depósitos en la mitocondria y retículo endoplasmático (Blackmore y col., 1979; Babcock y col., 1979)

En una reciente revisión, Reinhart y col. (1984) postulan un mecanismo según el cual la unión de los

agonistas α -adrenérgicos a sus receptores induce la formación de uno o mas "segundos mensajeros". Estos parecen ser los productos de la degradación de ciertos fosfolípidos (principalmente inositol 4,5-bisfosfato e inositol 1,4,5-trisfosfato), los cuales actuando sobre los depósitos de calcio incrementan la concentración citosólica de este ión.

La relación entre la concentración de calcio y el efecto enzimático producido no se conoce en la mayoría de los casos. El mas conocido es la activación de la fosforilasa quinasa, en la glucogenolisis, la cual viene mediada por la unión del calcio a la calmodulina (Walsh y col., 1980).

La adrenalina y los agonistas α -adrenérgicos causan una disminución de la actividad piruvato quinasa en hepatocitos aislados (Felíu y col., 1976; Chan y Exton, 1978), produciendo un incremento en la Km para el fosfoenolpiruvato.

También en hepatocitos aislados y utilizando fructosa como sustrato, la adrenalina estimuló la gluconeogénesis, lo que fué atribuido a inhibición de la fosfofructoquinasa y activación de la fructosa 1,6-bisfosfatasa (Kneer y col., 1974). Paradójicamente, Hue y col. (1981b) encuentran que la fenilefrina y la vasopresina causan una acumulación de fructosa 2,6-bisfosfato en hepatocitos de ratas alimentadas y en presencia de calcio. Este efecto no ocurre en ratas ayunadas, por lo que este incremento es atribuido a una estimulación de la glucogenolisis, acumulación de fructosa 6-fosfato y consecuente de fructosa 2,6-bisfosfato. En ratas ayunadas, en las que no hay glucógeno, no se observa este efecto.

1.2.2.4.- Efecto de los glucocorticoides

La importancia crucial de la corteza adrenal en el mantenimiento del metabolismo glucídico en condiciones normales fue establecido hace mas de 50 años, y sus efectos sobre la gluconeogénesis y síntesis de glucógeno en hígado quedaron reconocidos por los estudios de Long y col. en 1940. Actualmente el mecanismo de los diferentes efectos que producen los glucocorticoides en esta parcela del metabolismo, ha quedado en algunos casos bien establecido pero no en otros.

a) Regulación a nivel de suministro de sustratos gluconeogénicos.

Aunque es el hígado el mayor sitio de acción de los glucocorticoides (Thompson y Lippman, 1974), hay que destacar la importancia de algunos de sus efectos extrahepáticos, estando estos efectos relacionados íntimamente con la respuesta gluconeogénica global del organismo.

La adrenalectomía provoca una reducción en la liberación de aminoácidos a partir del músculo esquelético, mientras que la administración de glucocorticoides en estas circunstancias es capaz de revertir dicha acción. Los glucocorticoides favorecen la liberación de aminoácidos desde el músculo esquelético de varios modos. Parece ser que el mas importante es inhibiendo la síntesis de proteínas (Steele, 1975; Shoji y Pennington, 1977; Tomas y col., 1979) probablemente a nivel de traducción (Rannels y col., 1978).

Además de este efecto sobre la síntesis de proteínas parece ser también esencial el catabolismo proteico. Recientes estudios han demostrado que en el ayuno hay un incremento de la degradación de proteínas en ratas

normales pero no en ratas adrenalectomizadas (Caldwell y col., 1978; Goldberg y col., 1980).

La actividad de la corteza adrenal es esencial para la adaptación durante el ayuno y es requerida para ciertas respuestas hormonales.

También en hepatocitos aislados se ha visto que los glucocorticoides favorecen el transporte de aminoácidos (Lecam y Freychet, 1978).

Los glucocorticoides, asimismo, son capaces de estimular la gluconeogénesis gracias a los efectos que ejercen sobre la acción de las catecolaminas respecto a la liberación de glicerol y lactato a partir de los tejidos adiposo y muscular respectivamente. En los tejidos de ratas adrenalectomizadas se pone de manifiesto una reducción en las respuestas lipolítica y glucogenolítica inducidas por la adrenalina y otras hormonas capaces de actuar a través del cAMP (Steele, 1975). Estos fallos se atribuyen más que a una reducción en la producción del cAMP, a una disminución en la capacidad de respuesta de este nucleótido. Los resultados de Miller y col. (1971) indican que no existen defectos en la activación de la proteína quinasa o fosforilasa quinasa. En este sentido Exton y col. (1972) sugieren que la acción de estos esteroides envolvería el mantenimiento de las concentraciones intracelulares de Ca^{++} y otros iones, permitiendo así una respuesta normal del cAMP.

b) Regulación por modulación covalente o por biosíntesis de enzimas claves

La adrenalectomía en animales alimentados apenas inhibió la gluconeogénesis hepática, aunque sí disminuyó la respuesta al glucagon y catecolaminas. Mientras que en animales ayunados o diabéticos y adrenalectomizados, hubo

una marcada reducción de la gluconeogénesis e igualmente fue mucho menor la estimulación por glucagon y adrenalina (Exton y col., 1972 ; Exton y col., 1973 ; Exton y col., 1976). Estos efectos indirectos producidos por los glucocorticoides de incrementar la estimulación por glucagon y adrenalina, se conocen como efectos "permisivos", término introducido por Ingle en 1952.

El análisis de las concentraciones de intermedarios metabólicos en la gluconeogénesis, mostró que la adrenalectomía resultaba en un aumento de la concentración de piruvato y una disminución de la de fosfoenolpiruvato, mientras que el tratamiento con glucocorticoides normalizaba estas concentraciones (Exton y col., 1973 ; Exton y col., 1976). Por tanto, el principal sitio de acción de estas hormonas era a nivel de la conversión de piruvato en fosfoenolpiruvato.

Los glucocorticoides inducen la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Foster y col., 1966; Gunn y col., 1975), debiéndose esta inducción a un aumento en la síntesis proteica (Barnett y Wicks, 1971; Gunn y col., 1975) mas que a una disminución en su degradación (Gunn y col., 1976); Igualmente se ha puesto de manifiesto la inducción de otro enzima gluconeogénico, la glucosa 6-fosfatasa (Norlie y col., 1965).

Aunque quedó establecido que los glucocorticoides inducían la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, Gunn y col. (1975) demostraron que en animales normales, estas hormonas estimulaban la gluconeogénesis antes de que ocurriera ningún efecto en la síntesis de la PEPCK. Igualmente, en animales adrenalectomizados, el restablecimiento de la gluconeogénesis después del tratamiento con glucocorticoides ocurre antes que el de la PEPCK. En relación con estos resultados, Martin y col. (1984) observaron una activación de la función mitocondrial que sí podía ser importante en

los primeros efectos de los glucocorticoides en la gluconeogénesis. Este aumento en la gluconeogénesis no requiere la inducción de la piruvato carboxilasa y parece estar mediada por alteraciones en las concentraciones de ciertos efectores. El aumento en las concentraciones de acetyl-CoA y ATP en mitocondrias aisladas establecido por Martin y col. (1984) provee el posible mecanismo para la estimulación de la piruvato carboxilasa. Además de esos efectores, el tratamiento con glucocorticoides disminuye la concentración de glutamato, que es un inhibidor de la piruvato carboxilasa, lo que aumenta aún más la actividad de este enzima (Allan y Titheradge, 1984).

Estudios recientes dan también a los glucocorticoides un papel en la inhibición de la piruvato quinasa, cuyo mecanismo se explica por una disminución en la afinidad por el fosfoenolpiruvato (Probst y Jungermann, 1983; Fleig y col., 1984).

1.2.2.5.- Efecto de otras hormonas sobre la gluconeogénesis y glucolisis

Otras hormonas de menor importancia fisiológica a este nivel, como vasopresina y angiotensina II, han sido descritas como capaces de estimular la gluconeogénesis y glucogenolisis en hígado perfundido y hepatocitos aislados (Hems y Whitton, 1973; Garrison y col., 1979).

La somatostatina (factor inhibidor de liberación) presenta a su vez un importante papel en la gluconeogénesis y glucogenolisis por su interacción en la secreción de glucagon e insulina (Oliver y Wagle, 1975; Weir y Weir, 1977; Unger y col., 1978; Gerich y col., 1978).

Recientemente se ha demostrado que la calcitonina, tiene un efecto hiperglucemiante en ratas alimentadas y ayunadas (Yamaguchi y Yamamoto, 1977). Este efecto no está

mediado por hipocalcemia, y es independiente de la liberación de adrenalina (Yamaguchi, 1980) y glucagon (Yamaguchi 1981). La calcitonina también estimula la producción de glucosa en hepatocitos aislados (Yamaguchi y Williamson, 1983). Aunque no se conoce perfectamente el mecanismo de acción de esta hormona, se ha encontrado que la calcitonina aumenta la actividad de la fructosa 1,6-bisfosfatasa y que esta activación está mediada por calcio (Yamaguchi y Momose, 1984).

1.3.- METABOLISMO GLUCIDICO EN RIÑON

1.3.1.- Generalidades

Generalmente es aceptado que la gluconeogénesis tiene lugar tanto en hígado como en riñón, sin embargo teniendo en cuenta que es el hígado el principal encargado de mantener la homeostasis de la glucemia, la mayor parte de los trabajos se han realizado en este órgano. No obstante, Krebs y col. (1963) destacaron ciertas ventajas del estudio de la gluconeogénesis in vitro utilizando el riñón, como son el muy bajo contenido en glucógeno y glucosa del tejido, y su mayor permeabilidad para los intermediarios del ciclo de Krebs.

Aunque la contribución del riñón a la glucemia en condiciones normales sea del 20%, puede llegar a ser del 50% en casos de ayuno prolongado (Owen y col., 1969), lo que dá una gran importancia fisiológica a la gluconeogénesis renal. Kida y col. (1978), utilizaron un método de dilución isotópica para cuantificar la cantidad de glucosa liberada por el riñón in vivo. De este modo, encontraron que la contribución de este órgano a la glucosa sanguínea en ratas normales suponía el 20-25%, coincidiendo con los resultados de Nagai y col. (1975) mediante los cuales la

actividad PEPCK renal era cuatro veces menor que la de hígado. Por otra parte en ratas con diabetes experimental la contribución renal a la glucemia alcanzó hasta el 55%; mientras que tanto en ratas ayunadas 24 horas como en ratas con acidosis metabólica la contribución alcanzó un valor cercano al 50% (Kida y col., 1978).

De acuerdo con estos hechos se puede afirmar que ambos órganos, hígado y riñón, trabajan coordinadamente en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa sanguínea.

Existen numerosos factores, fundamentalmente hormonales y nutricionales, que afectan a la gluconeogénesis renal, como son el ayuno a corto tiempo (Krebs y col., 1963), ayuno prolongado (Owen y col., 1969), esteroides (Roobol y Alleyne, 1973), el AMP-cíclico (Pagliara y Goodman, 1969; Nagata y Rasmussen, 1970a), el ejercicio (Krebs y Yoshida, 1963), la acidosis (Goodman y col., 1966; Kamm y col., 1967; Alleyne, 1970), catecolaminas y α -agonistas (MacDonald y Saggerson, 1977). Sin embargo sobre el hígado no estimulan positivamente la acidosis (Exton, 1972), ni el ayuno prolongado (Owen y col., 1969); en cambio sí lo hace el glucagón, hormona cuyo efecto no está aún claro en riñón, aunque sí se han encontrado receptores de esta hormona a lo largo de la nefrona (Butlen y Morel, 1985).

Los principales precursores de glucosa en el riñón son el L-lactato, glutamina y en menor proporción el glicerol. El lactato procede fundamentalmente de la actividad glucolítica del músculo esquelético, mientras que la glutamina, aunque se creía que era sintetizada por el hígado, procede mayoritariamente del músculo (Marliss y col., 1971).

1.3.2.- Efectos hormonales en el metabolismo glucídico renal

Aunque el AMP-cíclico se ha visto que es capaz de estimular la gluconeogénesis renal (Roobol y Alleyne, 1973), en el caso de la estimulación por glucagon no ha quedado aún claro. Roobol y Alleyne (1973) observan una estimulación de la gluconeogénesis renal por glucagon en cortes de corteza renal de ratas ayunadas, siendo el cAMP el mediador del efecto hormonal. Estos efectos únicamente se ven a bajas concentraciones de Ca^{++} . Sin embargo esta acción hormonal no pudo ser demostrada en riñón perfundido aislado. MacDonald y Saggerson (1977) investigaron el efecto del glucagon en túbulos renales, no encontrando tampoco ningún efecto positivo, sino mas bien una cierta disminución en la producción de glucosa a bajas concentraciones de Ca^{++} . Anteriormente Guder y Rupprecht (1976) usando túbulos renales, encontraron un pequeño aumento en la gluconeogénesis a partir de piruvato después de la adición de glucagon, a bajas concentraciones de Ca^{++} , y un aumento en cAMP producido por la hormona; no obstante cuestionaron la importancia fisiológica de esta observación ya que era necesario una alta concentración de glucagon para producir este efecto.

Tampoco está claro si la insulina presenta una especial actividad sobre la corteza renal. No se sabe hasta que punto el cambio en la actividad PEPCK encontrado en animales con diabetes crónica inducida experimentalmente (Anderson y Stowring, 1973), es debido a la insulina o a otros factores hormonales distintos que se alteren a lo largo del tiempo en el estado de diabetes.

El efecto de la somatostatina en la gluconeogénesis renal fue estudiado en cortes de corteza renal. La adición de la somatostatina estimuló la gluconeogénesis a partir de lactato, piruvato y glutamina. Este efecto está mediado

a través de estímulos alfa-1 y en presencia de iones calcio (Lupiáñez y col., 1979a; Dileepan y col., 1980; Dileepan y Wagle, 1985). Además esta estimulación fué inhibida por insulina (Lupiáñez y col., 1979b).

La gluconeogénesis renal puede ser estimulada por catecolaminas (Friedrichs y Schoner, 1973; Klahr y col., 1973; Kurokawa y Massry, 1973; Roobol y Alleyne, 1973; Guder y Rupprecht, 1975; MacDonald y Saggerson, 1977; Dileepan y col., 1980). Los estudios con agonistas y antagonistas adrenérgicos específicos, han demostrado que este efecto está mediado a través de un adrenoceptor tipo alfa (Guder y Rupprecht, 1975; MacDonald y Saggerson, 1977; Dileepan y col., 1980) y solo ocurre en presencia de iones calcio, lo que implica a estos iones como posibles mensajeros intracelulares de la respuesta, y posiblemente también a los movimientos de Na^+ y/o K^+ (Saggerson y Carpenter, 1979). Dependiendo de la afinidad de los receptores alfa hacia distintos agonistas y antagonistas, se habla de receptores α_1 y α_2 . En el caso de la estimulación de la gluconeogénesis renal por catecolaminas, los receptores selectivos implicados son del tipo α_1 (Saggerson y col., 1980; Kessar y Saggerson, 1980; McPherson y Summers, 1982).

El efecto que los glucocorticoides producen sobre la gluconeogénesis renal y la actividad de enzimas gluconeogénicos (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y glucosa 6-fosfatasa) se conoce desde hace tiempo. Si bien el papel de la inducción de la PEPCK en el incremento de la gluconeogénesis hepática por glucocorticoides era objeto de controversias, en el caso del aumento de la actividad PEPCK renal es un hecho bastante claro (Longshaw y col., 1972; Iynedjian y col., 1975; Feldman, 1977). La inducción por esteroides de la PEPCK renal es inhibida por Actinomicina D a concentraciones relativamente bajas, lo que indica que se trata de una estimulación selectiva de la síntesis

sis de enzima, a nivel transcripcional (Iynedjian y col., 1975; Iynedjian y Hanson, 1977).

Los glucocorticoides además de aumentar la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, tienen el mismo efecto en otro enzima gluconeogénico renal, la glucosa 6-fosfatasa (Longshaw y col., 1972).

1.3.3.- Comportamiento renal frente a la incapacidad funcional hepática

La gluconeogénesis renal adquiere especial importancia en casos en que la capacidad gluconeogénica hepática se encuentre disminuida o inhibida, así como en los casos de hepatectomía parcial. Cuando la capacidad funcional del hígado se encuentra seriamente dañada, la síntesis de glucosa tiene lugar a gran escala en la corteza renal. De esta forma, la degeneración hepática experimental inducida por galactosamina provoca una disminución en la capacidad gluconeogénica hepática, fundamentalmente a nivel de la actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. En estas condiciones la producción de glucosa por el riñón se incrementa, a la vez que se induce la síntesis de PEPCK renal (García-Ruiz y col., 1973).

Un tratamiento mas agudo, como es la intoxicación del hígado por administración de $Cl_4 C$, produce una respuesta similar, aunque en este caso la respuesta de la corteza renal es mas concluyente. En estas condiciones, la capacidad gluconeogénica renal aumenta significativamente a partir de lactato, piruvato y glutamina, pero no a partir de fructosa, como consecuencia de una notable activación de la PEPCK. Este aumento se debe a síntesis de nueva proteína enzimática, porque puede prevenirse tratando a los animales con antibióticos inhibidores de síntesis proteica (Faus y col, 1978).

Tratando de reducir al máximo el daño celular generalizado que tiene lugar en los tratamientos con galactosamina y Cl₄ C, se seleccionó el ácido 5-metoxi-indol-2-carboxílico (MICA) por producir una inhibición mas selectiva de la gluconeogénesis hepática al bloquear la utilización metabólica del piruvato a nivel mitocondrial (Reed y Lardy, 1970). El efecto producido por la administración del MICA es la reducción de la producción de glucosa por el hígado a la mitad, mientras que se ve importantemente incrementada en la corteza renal (Lupiáñez y col., 1976). Los incrementos producidos en ratas alimentadas son mayores que en ayunadas. El aumento en la formación renal de glucosa bajo estas condiciones parece deberse también a un incremento de la síntesis de novo de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Lupiáñez y col., 1976).

Se ha encontrado otro inhibidor aún mas selectivo de la gluconeogénesis hepática. Se trata del triptófano que es capaz de producir en ratas un efecto hipoglucemiante (Gullino y col., 1955; Mirsky y col., 1957; McDaniel y col., 1973; Smith y Pogson, 1977) por inhibición de la gluconeogénesis hepática (McDaniel y col., 1973; Smith y Pogson, 1977; Sánchez-Pozo y col., 1983a). Por lo que respecta al triptófano, el hígado y la corteza renal presentan un comportamiento bien diferenciado. Las células del parénquima hepático son capaces de metabolizar este aminoácido hasta ácido quinolínico, cuya acumulación produciría la inhibición específica de la gluconeogénesis en este tejido (Veneziale y col., 1967). Sin embargo, esta inhibición no ocurre probablemente en la corteza renal al no existir triptófano pirrolasa (E.C. 1.13.11.11) (De Castro y col., 1957) primer enzima de la ruta metabólica que transforma el triptófano en ácido quinolínico.

De acuerdo con estas consideraciones, la administración de triptófano debería producir una inhibición

específica de la gluconeogénesis hepática, sin afectar a dicho proceso en la corteza renal. Siendo esto así, se dispondría de un buen modelo experimental para estudiar el comportamiento de la gluconeogénesis renal tras la inhibición de la hepática. Para comprobar esta hipótesis se determinaron primeramente los niveles celulares de ácido quinolínico en hígado y corteza renal después de la administración de triptófano, observándose aumentos del orden de 100 veces en la concentración de quinolínico en las células hepáticas, mientras que no aparece a nivel de la corteza renal (Sánchez-Pozo y col., 1982; Sánchez-Pozo y col., 1983a). En estas condiciones, se puede afirmar que la contribución de la gluconeogénesis renal a la homeostasis de la glucemia es importante y significativa (Sánchez-Pozo y col., 1983b). Los valores de glucosa sanguínea no se modificaron tras la administración de triptófano, y esto únicamente podía ser explicado por un incremento en la gluconeogénesis renal ya que la hepática estaba inhibida, y el glucógeno estaba agotado pues este efecto se comprobó tanto en ratas alimentadas como ayunadas (Sánchez-Pozo y col., 1983b).

Sea cual sea el método empleado para inhibir la gluconeogénesis hepática, lo importante es confirmar la destacada función de la corteza renal en la regulación de la glucemia cuando la capacidad metabólica del hígado se encuentra muy disminuida.

Asimismo, la hepatectomía parcial incrementa considerablemente la capacidad gluconeogénica renal para compensar la capacidad disminuida del hígado (Brinkmann y col., 1978; Katz y col., 1979a). Las actividades enzimáticas afectadas son fundamentalmente la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, que aumenta alrededor de un 200%, y la glucosa 6-fosfatasa cuya actividad se eleva aunque en menor orden; la glucoquinasa disminuyó sobre un 30%. Se ha

relacionado a los glucocorticoides con este incremento de la gluconeogénesis renal en estas condiciones, observándose una elevación en los niveles de corticosterona alrededor de un 300% después de 12 a 24 horas de llevar a cabo la hepatectomía parcial (Katz y col., 1979a).

1.4.- EFECTO DE DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES SOBRE EL METABOLISMO GLUCIDICO

Uno de los aspectos, desde el punto de vista metabólico, mas importantes para todos los organismos vivos es la adaptación de las diferentes rutas metabólicas que operan en cada tejido al estado nutricional y hormonal que domina en ese momento. El adecuado balance de estas vias metabólicas se consigue por el continuo intercambio de sustratos y productos entre los distintos órganos y tejidos, la actividad de las enzimas que en ellas participan y el supracontrol que sobre ellos ejercen las diferentes hormonas.

El destino de los nutrientes que proceden de la dieta dependerá de la situación metabólica existente; por ejemplo la glucosa se almacenará como glucógeno, se oxidará proporcionando energía o participará en el mantenimiento de la glucosa circulante.

En condiciones de una dieta rica en carbohidratos, se promueve un incremento de las vias de utilización de estos compuestos. Metabólicamente hablando, esto resulta en una mayor disponibilidad de energía, equivalentes reductores y esqueletos de carbono para los procesos biosintéticos celulares. Una vez satisfechos estos requerimientos se observa un aumento en la formación de material de reserva: glucógeno y triglicéridos.

Si es una dieta con exceso en proteínas, éstas se utilizarán como sustrato oxidable previa transformación en

carbohidratos o grasa. Con este fin se inducen enzimas fundamentalmente del metabolismo nitrogenado y del ciclo de la urea.

En cambio una situación de ayuno requiere una capacidad de adaptación que incluye disminución de enzimas digestivas, de los procesos de absorción intestinal, de la transformación, utilización y distribución de nutrientes y la formación de material de reserva. Por el contrario se incrementan la movilización de grasa, su oxidación, la cetogénesis, gluconeogénesis y el catabolismo proteico. Cuando el ayuno persiste por mas tiempo, el organismo se adaptará gradualmente tratando de satisfacer prioritariamente el requerimiento energético de los tejidos, proporcionando sustratos oxidables como glucosa, ácidos grasos y compuestos cetónicos.

Terminado este periodo viene el tiempo de ingesta, en el que se observaría el patrón metabólico opuesto y así observamos que en cada momento celular, la maquinaria metabólica se adapta a la situación por la que atraviesa, de ayuno o de alimentación.

1.4.1.- Ayuno

En las primeras horas de ayuno es importante el contenido de glucógeno hepático que mantendrá constantes los niveles de glucosa sanguínea (Hers, 1976; Goldstein y Curnow, 1978).

Los principales factores responsables de los cambios metabólicos que ocurren durante el ayuno están asociados a un aumento en la concentración de glucagon en plasma y disminución en el nivel de insulina (Cahill y col., 1966; Marliss y col., 1970). El resultado es por una parte activación de la lipólisis en tejido adiposo y liberación de aminoácidos desde el músculo, y por otra parte

son estimuladas la glucogenolisis y gluconeogénesis en hígado, e inhibida la glucolisis.

Cuando se trata de ayuno prolongado, los compuestos cetónicos adquieren importancia como combustible energético igualando o superando a la glucosa como fuente de energía para el cerebro (según el tiempo que se mantenga el ayuno). Asimismo en ayuno prolongado destaca la gluconeogénesis renal, que es acompañada por un incremento en la amoniogénesis, sobre todo a partir del tercer día de ayuno (Owen y col., 1969).

La corteza adrenal es esencial en la adaptación metabólica al ayuno por sus efectos a nivel de tejidos periféricos e hígado y sus efectos permisivos en ciertas respuestas hormonales (Steele, 1975; Exton y col., 1976 ; Caldwell y col., 1978).

El ayuno produce un aumento significativo en la actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa tanto hepática como renal (Hanson y Garber, 1972) que no parece estar mediado por cambios en la concentración de esteroides circulantes, ya que el incremento en la producción de glucosa es similar en animales normales y en adrenalectomizados (Pogson y col., 1976). Y este aumento de actividad está asociado a nueva síntesis de enzima (Beale y col., 1982; Cimbala y col., 1982).

La actividad glucosa 6-fosfatasa incrementa su actividad en ayuno, debido también a que hay una estimulación en la síntesis de enzima (Hers y Hue, 1983), mientras que en estas mismas circunstancias se reprime la síntesis de la hexoquinasa hepática (Pilkis, 1970).

Desde que Krebs y Eggleston (1965) encontraron que la actividad de la piruvato quinasa hepática se incrementaba en ratas alimentadas con una dieta alta en carbohidratos, y disminuía durante el ayuno, se ha sugerido que este enzima juega un papel clave en la regulación del

metabolismo glucídico bajo distintas situaciones nutricionales. Durante el ayuno disminuye la actividad de la piruvato quinasa debido a que la síntesis de este enzima se reduce considerablemente (Kohl y Cottam, 1976; Van Berkel y col., 1976; Van Berkel y col., 1978; Cladaras y Cottam, 1980a y 1980b; Poole y Bloxham, 1982). Kohl y Cottam (1976), encontraron que la disminución de la actividad piruvato quinasa no era tan marcada como la de la cantidad de enzima, y esa falta de correlación entre la cantidad de enzima y actividad indicaba cierto incremento en la actividad específica de la PK en ayuno. Sin embargo, Hopkirk y Bloxham (1979), sí encontraron una actividad específica inferior en ayuno. Recientemente Cimbala y col. (1985), utilizando un método muy sensible para la determinación de piruvato quinasa tipo L, encuentran resultados que concuerdan con los de Kohl y Cottam (1976). Asimismo encuentran un gran incremento en la síntesis de piruvato quinasa en ratas alimentadas con una dieta alta en carbohidratos, que no concuerda con su actividad. Para explicar estos resultados sugieren la existencia de un precursor de la piruvato quinasa que sería el que aumenta su síntesis y que ha sido encontrado hasta ahora únicamente en hígado fetal humano (Marie y col, 1982).

Azzout y Peret (1984a, 1984b) no observan ningún cambio en la actividad piruvato quinasa durante las primeras 20 horas de ayuno, y sí después de las 24 horas; además destacan la importancia de la presencia de fructosa 1,6-bisfosfato en el efecto de fosforilación que produce el glucagon en este enzima.

La cantidad de fructosa 1,6-bisfosfatasa no cambia durante un ayuno de 48 horas (Poole y Bloxham, 1982), mientras que sí disminuye la actividad de la 6-fosfofructo 2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa en más del 50% después de 72h de ayuno (Pilkis y col., 1983b). Igualmente el

nivel de fructosa 2,6-bisfosfato presentó una gran disminución, incluso después de 24h de ayuno (Neely y col., 1981; Pilkis y col., 1982b; Pilkis y col., 1983b), aunque no se afecte la actividad del enzima, debido probablemente a la menor disponibilidad de sustrato por no existir apenas glucógeno en estas circunstancias.

1.4.2.- Metabolismo glucídico en animales alimentados con diferentes dietas

La alimentación con una dieta alta en carbohidratos de animales que previamente habían sido sometidos a ayuno conlleva cambios opuesto a los descritos anteriormente.

Las dietas altas en carbohidratos promueven la glucolisis y lipogénesis, y elevan la relación insulina/glucagon por aumentar los niveles plasmáticos de insulina (Tiedgen y Seitz, 1980; Peret y col., 1981). Ratas alimentadas con este tipo de dietas presentan en hígado altas concentraciones de 6-fosfogluconato y fructosa 2,6-bisfosfato (Sommercorn y Freedland, 1984) que incrementan la glucolisis por activación de la fosfofructoquinasa (Pilkis y col., 1981b; Van Schaftingen y col., 1981; Uyeda y col., 1981; Sommercorn y col., 1984) y piruvato quinasa (Smith y Freedland, 1979; Smith y Freedland, 1981) e inhibición de la fructosa 1,6-bisfosfatasa (Pilkis y col., 1981c; Van Schaftingen y Hers, 1981b). Por el contrario los niveles de 6-fosfogluconato y fructosa 2,6-bisfosfato son bajos en ratas alimentadas con una dieta alta en proteínas (Sommercorn y Freedland, 1984).

La glucolisis se ve además favorecida por las dietas altas en carbohidratos por la inducción en la síntesis de glucoquinasa (Katz y col., 1979b; Spence y Pitot, 1979), y de la piruvato quinasa (Hopkirk y Bloxham,

1979; Cladaras y Cottam, 1980a,1980b; Poole y Bloxham, 1982; Noguchi y col., 1983).

La adaptación a dietas que son altas en proteínas cambia el metabolismo hepático hacia un gran transporte y degradación de aminoácidos, acompañado por una mayor gluconeogénesis (Eisenstein y Strack, 1971; Rémésy y col., 1978; Peret y col., 1981; Rémésy y col., 1983). Igualmente Krebs y col., (1963) vieron que una dieta consistente únicamente en caseína y margarina elevaba la gluconeogénesis renal incluso más que el ayuno. Se elevan asimismo los niveles plasmáticos de glucagon (Eisenstein y Strack, 1971; Eisenstein y col., 1974; Tiedgen y Steitz, 1980; Peret y col., 1981) y según Demigné y col. (1985), también existe un incremento de la insulina en las primeras horas, durante el periodo de máxima absorción de nutrientes.

Azzout y col. (1984), señalan un aumento en la gluconeogénesis a las 5 horas del comienzo de la dieta hasta alcanzar un pico después de 11-24 horas; después prácticamente permanece constante hasta las 48 horas. La glucólisis, expresada como la formación de lactato+piruvato, cambió en dirección opuesta a la gluconeogénesis.

La actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa hepática aumentó mucho el primer día de la dieta y después permaneció constante (Peret y col., 1981). El efecto del aumento de las proteínas en la dieta y de la adición de aminoácidos, investigada tanto in vivo como en hígado perfundido, resultó en un considerable incremento de la actividad PEPCK dentro de las 6 primeras horas. Este aumento fue independiente de la presencia de glucocorticoides y se debió a nueva síntesis de enzima, ya que la cicloheximida bloqueó totalmente este efecto (Seitz y col., 1980).

Sin embargo, la actividad piruvato quinasa no disminuyó hasta el 4º-8º día del inicio de la dieta (Peret

y col., 1981).

1.5.- RELACIONES DEL METABOLISMO GLUCIDICO CON OTRAS RUTAS DEL METABOLISMO CELULAR

1.5.1.- Relaciones entre el metabolismo glucídico y el metabolismo lipídico

El almacén de glucógeno en hígado es bastante limitado e insuficiente para satisfacer las necesidades energéticas de los tejidos periféricos durante un ayuno prolongado. Los ácidos grasos son movilizados a partir del tejido adiposo bajo una serie de condiciones que incluyen ayuno, estrés y ejercicio (Newsholme, 1976). En estas situaciones el aumento de la concentración de ácidos grasos en la sangre, no solamente provee un combustible adicional para los tejidos, sino que reduce la tasa de utilización de la glucosa y así ayuda a mantener constante el nivel de glucosa en sangre.

En el ayuno prolongado (disminución de la relación insulina/glucagon) el incremento de la lipólisis aporta una gran cantidad de ácidos grasos. Hay varios hechos que indican que la oxidación de ácidos grasos reduce la utilización de glucosa. Así, la oxidación de ácidos grasos en preparaciones de corazón perfundido o músculo esquelético de rata, causa una inhibición de la utilización de glucosa (Randle y col., 1964; Rennie y Holloszy, 1977). De la misma forma, una elevación en la concentración de ácidos grasos en el hombre, causa una reducción de la oxidación de glucosa por el corazón y músculo esquelético (Lassers y col., 1971; Hagenfeldt, 1979).

Estudios in vitro han demostrado que la oxidación de ácidos grasos tiene como resultado una disminución en la utilización de glucosa a través de sus efectos sobre el

transporte de glucosa, hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato deshidrogenasa. El aumento de la oxidación de ácidos grasos eleva por una parte los niveles de acetil-CoA que inhiben la piruvato deshidrogenasa, y por otro los de citrato que inhiben la fosfofructoquinasa. De esta forma la concentración de metabolitos intermediarios se ve incrementada, entre ellos la glucosa 6-fosfato que de este modo inhibe a la hexoquinasa.

Durante las primeras fases del ayuno el músculo cambia como combustible energético la glucosa por los ácidos grasos, mientras que el cerebro sigue utilizando glucosa. Si el ayuno continúa, hay un aumento considerable de los compuesto cetónicos en sangre que sirven de sustrato al cerebro y otros tejidos, a la vez que va disminuyendo la utilización de glucosa. El mecanismo de control de la oxidación de glucosa por los compuestos cetónicos es similar al de los ácidos grasos (Ruderman y col., 1974).

Además de reducir la utilización de glucosa, los ácidos grasos son capaces de incrementar su síntesis. La estimulación de la gluconeogénesis por ácidos grasos se ha demostrado in vivo (Williamson, 1967; Friedmann y col., 1967), en hígado perfundido (Kruger y col., 1964; Struck y col., 1966; Ross y col., 1967), en cortes de corteza renal (Krebs y col., 1965).

Utilizando diferentes sustratos gluconeogénicos como alanina, piruvato o lactato, la adición de ácido oleico activa varios sitios de control de la gluconeogénesis, que han sido identificados a nivel de la piruvato carboxilasa y de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Williamson y col., 1968). Los principales mecanismos sugeridos para la acción de los ácidos grasos en la gluconeogénesis son: la producción de ATP, que favorece el proceso; la activación de la piruvato carboxilasa, por un aumento de acetil-CoA, efector positivo del enzima

(Williamson y col., 1968; Ferré y col., 1979); y la provisión de equivalentes de reducción y su transferencia desde la mitocondria al citosol que permite los requerimientos de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Ferré y col., 1979).

Cuando la oxidación de ácidos grasos es inhibida, la gluconeogénesis disminuye; mientras que la posterior adición de oleato restaura el proceso gluconeogénico a sus niveles normales (Ferré y col., 1981). Incluso a altas concentraciones, el oleato es capaz de impedir la inhibición de la gluconeogénesis producida por la propia glucosa (Rognstad, 1984), lo que demuestra claramente que no son los compuestos químicos endógenos o exógenos procedentes de la dieta, quienes se encargan de la regulación de una determinada ruta metabólica, sino que es la carga energética celular quien se encarga en definitiva de llevar o dirigir dicha regulación.

1.5.2.- Relaciones entre el metabolismo glucídico y el metabolismo proteico

Los aminoácidos pueden ser degradados y con ello utilizados para la obtención de energía. Los aminoácidos glucogénicos producen en su degradación piruvato o intermediarios del ciclo de Krebs, que pueden ser transformados en glucosa en el hígado y riñón, mientras que los aminoácidos cetogénicos se transforman en compuestos cetónicos en el hígado.

Después del periodo de absorción, en el que hay un gran aporte de aminoácidos procedentes de la dieta, la utilización de los mismos como fuente de energía se ve incrementada.

Durante las primeras fases del ayuno hay un aumento del flujo de aminoácidos a partir de las reservas de pro-

teínas del músculo. Estos aminoácidos son utilizados para la síntesis de glucosa, de forma que la homeostasis de glucosa pueda ser mantenida. Cuantitativamente el aminoácido mas importante para la síntesis de glucosa en hígado es la alanina, y en riñón la glutamina.

Si el ayuno continua, el cerebro gradualmente cambia la oxidación de glucosa por oxidación de compuestos cetónicos, procedentes de los ácidos grasos. La cantidad de aminoácidos, que se liberan desde el músculo en esta situación, disminuye. El aumento en la concentración de compuestos cetónicos inhibe la degradación de proteínas en el músculo. Si la concentración de compuestos cetónicos se eleva artificialmente en personas normales que han estado varios días en ayuno, la liberación de alanina a partir del músculo disminuye (Sherwin y col., 1975).

La inhibición de la degradación de proteínas reduce la gluconeogénesis, aunque el lactato y glicerol, procedentes del músculo y tejido adiposo respectivamente, siguen produciendo glucosa en la misma proporción. Pero a la vez la glucosa es menos requerida ya que su utilización por el cerebro se ha reducido bastante.

La degradación de los aminoácidos da lugar a un nitrógeno α -amínico que es eliminado en el hígado por medio del ciclo de la urea. La síntesis de urea y la gluconeogénesis están relacionados, porque comparten varios metabolitos y además por su dependencia por el ATP, por el que pueden competir (Krebs y col., 1976). En relación con este aspecto, Wojtczak y col. (1978) no observan inhibición de la síntesis de urea por la gluconeogénesis por su competencia con el ATP, pero sí encuentran, sin embargo, bajo ciertas condiciones que la gluconeogénesis puede ser inhibida por una alta síntesis de urea. Esto ocurre a bajas concentraciones de NH_4Cl , y puede indicar que esta competencia podría ocurrir realmente in vivo.

1.5.3.- Relación entre la gluconeogénesis renal y la amoniogénesis

El riñón responde a la acidosis metabólica con un aumento en la producción de amonio a partir de glutamina. Cuando se vió que la gluconeogénesis renal también aumentaba en respuesta a la acidosis, se propuso una relación entre amoniogénesis y gluconeogénesis (Goodman y col., 1966; Alleyne y Scullard, 1969), lo que impulsó el estudio de la gluconeogénesis en riñón.

La acidosis incrementa la producción de glucosa a partir de glutamina y glutamato, así como de α -cetoglutarato y oxalacetato, pero no a partir de glicerol o fructosa, lo que sugería que el efecto estimulador de la gluconeogénesis era debido a un aumento en la actividad del enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Goodman y col., 1966), lo que fue realmente confirmado mas adelante (Alleyne y Scullard, 1969).

Esta relación entre los dos procesos fue explicada por una disminución de la concentración de α -cetoglutarato y glutamato, resultado de la activación de la PEPCK (Goodman y col., 1966; Kamm y Asher, 1970). Al ser el glutamato un inhibidor de la glutaminasa dependiente de fosfato (enzima clave en el proceso de amoniogénesis), su disminución causaría una activación del enzima y aumentaría por lo tanto la producción de amonio.

Siguiendo esta teoria varios investigadores (DiTullio y col., 1974; Blackshear y col., 1975; Goodman, 1975) utilizaron para este estudio un inhibidor de la PEPCK, el 3-mercaptopicolínico (3-MPA). Bennett y Alleyne (1976) y Ross (1976) demostraron que el 3-MPA inhibía la formación de glucosa y de amonio a partir de glutamina en ratas acidóticas, atribuyendo a la gluconeogénesis el papel regulador de al menos el 50% de la producción de amonio en

ratas acidóticas.

Sin embargo Bogusky y col. (1983), utilizando 3-MPA y un inhibidor de transaminasas concluyen que la gluconeogénesis no es el proceso que regula la formación de NH_3 en el riñón. El papel de la PEPCK no es regular la formación de NH_3 renal, pero puede dirigir el metabolismo de aminoácidos por controlar la concentración de oxalacetato. La concentración de oxalacetato determina si el glutamato es desaminado por la vía de la glutamato deshidrogenasa o transaminado a aspartato y desaminado por la vía del ciclo de los purín nucleótidos. A bajas concentraciones de oxalacetato, como ocurre en acidosis metabólica crónica en rata, la desaminación de glutamato es por la vía de la glutamato deshidrogenasa; a altas concentraciones de oxalacetato, como en las primeras fases de acidosis en la rata, se forma aspartato a partir de glutamato y posteriormente se desamina por vía del ciclo de los nucleótidos derivados de la purina.

1.6.- METODOS PARA EL ESTUDIO DE LA GLUCONEOGENESIS Y GLUCOLISIS

La elección del método empleado en una ciencia experimental es de gran importancia, con el fin de que los resultados obtenidos puedan ser representativos de lo que realmente ocurre en el animal. Las técnicas usadas mas comúnmente en el estudio de la gluconeogénesis/glucolisis incluyen estudios in vivo, con hígado perfundido y con células aisladas, obtenidas normalmente a partir de ratas. Los detalles de los mecanismos moleculares de control se estudian sobre enzimas purificadas, mientras que los estudios cinéticos de diferentes enzimas pueden realizarse en homogenados celulares.

a) Estudios realizados en hígado

El estudio del proceso gluconeogénico/glucolítico in vivo, plantea algunos problemas, porque los niveles de glucosa en sangre, en cualquier momento, es el resultado de un perfecto equilibrio entre su producción y su utilización.

Un ejemplo típico de estos métodos, llevado a cabo por Chiasson y col. (1977), es la infusión de un precursor de la glucosa marcado, tal como la [^{14}C]alanina, en el animal, seguido de la medida de su incorporación y liberación como [^{14}C]glucosa a la sangre.

Una técnica de doble marcaje fue empleada por Dunn y col. (1978) para estudiar la regulación hormonal de la gluconeogénesis, utilizando glucosa marcada en ^{14}C y ^3H y aminoácidos seleccionados, lo que permitió a estos autores sacar conclusiones acerca de los efectos hormonales.

Adam y Haynes (1969) usaron un tipo diferente de experimentos in vivo. El tratamiento del animal fue hecho in vivo, y las medidas efectivas se hicieron en hepatocitos o en partículas subcelulares del hígado.

Otros progresos en este tipo de técnicas han sido los llevados a cabo por Ramberg (1977), Hetenyi (1982), Katz (1982), Brosnan (1982) y Radziuk (1982).

El otro método de estudio utilizado es el hígado perfundido. La mayor ventaja del uso de un órgano aislado como el hígado, es que los efectos son atribuidos directamente a él y no a influencias extrahepáticas que puedan alterar los resultados.

Existen descritas varias técnicas de perfusión cuyas diferencias fundamentales son relativas a si el hígado es extraído del animal y los medios utilizados para su adecuada oxigenación. El suministro de oxígeno se lleva a cabo bien por adición de eritrocitos al medio (Exton y

Park, 1967; Miller, 1973; Lupiañez y col., 1976), o bien por un oxigenador específico (Friedmann y Rasmussen, 1970; Hanson y Bottermann, 1975).

En general el sistema de hígado perfundido ha demostrado ser un método satisfactorio para el estudio del proceso gluconeogénico o glucolítico.

El aislamiento de hepatocitos o de cualquier otro tipo de células, permite un estudio directo del metabolismo y su regulación. Pero tiene como inconveniente el que al contrario que en hígado perfundido, no se mantienen constantes durante toda la incubación las concentraciones de sustratos, hormonas, productos etc.

Las suspensiones de hepatocitos son obtenidas por dos métodos fundamentales. En uno el hígado es perfundido con colagenasa, y a veces además con hialuronidasa (Berry y Friend, 1969; Seglen, 1972; Wagle y Ingebretsen, 1975); mientras que en el otro el tejido es previamente troceado y a continuación digerido con colagenasa. Carlsen y col. (1981) utilizando ambos métodos demostraron que la viabilidad de las células por ambos métodos es comparable, pero el rendimiento de células es mayor cuando los hepatocitos son obtenidos por perfusión directa.

Actualmente se utilizan otras técnicas que están permitiendo un mejor conocimiento del metabolismo glucídico en hígado. Así Jungermann y col. (1983) usando técnicas histoquímicas y de microdissección, diferenciaron dos tipos de células con comportamiento metabólico distinto: las "células periportales" que contienen alta actividad de enzimas gluconeogénicos y baja actividad de enzimas glucolíticos (Matsumura y col., 1984), y las "células perivenosas" en las que ocurre lo contrario (Matsumura y Thurman, 1984). La insulina activó la glucólisis en ambos tipos de células sin ningún efecto en la gluconeogénesis; el glucagon en cambio estimuló la gluconeogénesis solamente en

"células periportales" e inhibió la glucólisis en los dos tipos de células.

Gracias a esto la ruta indirecta de síntesis de glucógeno mantenida por Newgard y col. (1984) y Katz y McGarry (1984) parece ser posible por la presencia en el hígado de estas dos zonas distintas. Pilkis y col. (1985) han propuesto un esquema según el cual la glucosa exógena sería primeramente utilizada por las "células perivenosas" y convertida en lactato, el cual junto al que proviene de tejidos extrahepáticos sería convertido en glucógeno a través del camino gluconeogénico en las "células periportales". Esto explicaría que la administración de un inhibidor de la PEPCK y de la gluconeogénesis, casi bloqueara por completo la síntesis de glucógeno (Sugden y col., 1983; Newgard y col., 1984).

Al no ser posible todavía separar por los métodos convencionales los dos tipos de células, sobre este tema hay demasiadas controversias y queda sujeto a posteriores estudios que aclaren todo este proceso.

b) Estudios realizados en riñón

El estudio del metabolismo renal in vivo se ve dificultado por la heterogeneidad metabólica de este órgano, aeróbico en la corteza y anaeróbico en la médula (Cohen y col., 1973), y que además tienen los dos lugares simultáneamente. Para mejorar el conocimiento del metabolismo renal se han diseñado técnicas in vitro para estudiar el correspondiente a la corteza excluyendo al de la médula. Así se ha estudiado ampliamente el metabolismo con cortes de corteza renal (Krebs y col., 1963; Henning y col., 1966; Goodman y col., 1966), los cuales muestran considerables ventajas comparados con el órgano aislado perfundido o preparaciones libres de células.

Durante muchos años se han utilizado estos cortes de corteza renal para estudiar el metabolismo de ésta. Sin embargo, tienen ciertas limitaciones debido a la falta de homogeneidad de este tejido. Por esto han sido muy interesantes los intentos de obtener células renales aisladas. Tras los primeros intentos de obtener suspensiones satisfactorias de células renales aisladas, los fragmentos de túbulo renales por tratamiento con colagenasa a partir de la corteza renal, han demostrado ser un modelo útil para estudiar el metabolismo de la corteza renal in vitro (Nagata y Rasmussen, 1970b; Guder y col., 1971).

Aunque este tipo de preparaciones no resulte en células aisladas, proporciona las ventajas normales de éstas sobre los cortes de tejido y el riñón aislado perfundido. En contraste con otros métodos de aislamiento, la preparación de fragmentos de túbulo presenta las siguientes ventajas:

- 1) La vía en la difusión de los sustratos metabólicos hasta las células se encuentra reducida, eliminando, por tanto, problemas tales como el espesor limitante del tejido.
- 2) La cara peritubular de las células es accesible directamente a los solutos transportados.
- 3) Las manipulaciones experimentales con una suspensión de este material son en muchos aspectos más fáciles que con cortes.
- 4) En túbulo aislado se ha demostrado un transporte activo de K^+ , p-aminohipurato y azúcares; la velocidad de estos procesos viene siendo aproximadamente tres veces superior que en cortes. También se han mostrado metabólicamente más activos (Nagata y Rasmussen, 1970b; Guder y col., 1971).

Las preparaciones de túbulo aislado ofrecen la posibilidad de soslayar la heterogeneidad de la corteza

renal solo hasta un cierto punto. Así, al analizar estas preparaciones, se comprueba que en su mayoría consisten en fragmentos de túbulos proximales, sin embargo se presentan también túbulos distales y glomérulos, y por tanto el problema de la heterogeneidad no queda satisfactoriamente resuelto.

El estudio de la gluconeogénesis en riñón entero se ve complicado puesto que parte de la glucosa formada por la corteza puede ser reutilizada por la médula ya que ésta utiliza a la glucosa como el principal sustrato metabólico mientras que la corteza prefiere a los ácidos grasos como fuente de energía.

Los cortes de corteza renal se han mostrado válidos en muchas ocasiones (Lupiañez y col., 1976; Faus y col., 1978; Lupiañez y col., 1979a y 1979b; Hortelano y col., 1981) ya que la velocidad de la gluconeogénesis en ellos excede de la observada in vitro y en riñón perfundido. También las preparaciones de túbulos aislados presentan altas tasas de gluconeogénesis (Guder y Rupprecht, 1976; Gronow y Weiss, 1976; Guder, 1979; Schmidt y col., 1980), pero la presencia de estructuras distales representa una contaminación perniciosa al ser estas porciones tubulares eminentemente glucolíticas (Schmidt y Guder, 1976; Schmidt y col., 1978), en contraposición a las proximales que son gluconeogénicas en su comportamiento metabólico (Schmidt y Guder, 1976; Schmidt y col., 1978) (Figura A).

Por todo ello se han descrito técnicas mas nuevas que desarrollan determinaciones sobre estructuras microdisccionadas, identificadas por inspección microscópica, y estas han permitido el estudio de las características metabólicas de cada segmento de la nefrona. Sin embargo estas técnicas son complejas, y con ellas solo se pueden realizar un número limitado de medidas por cada experimento.

FIGURA A

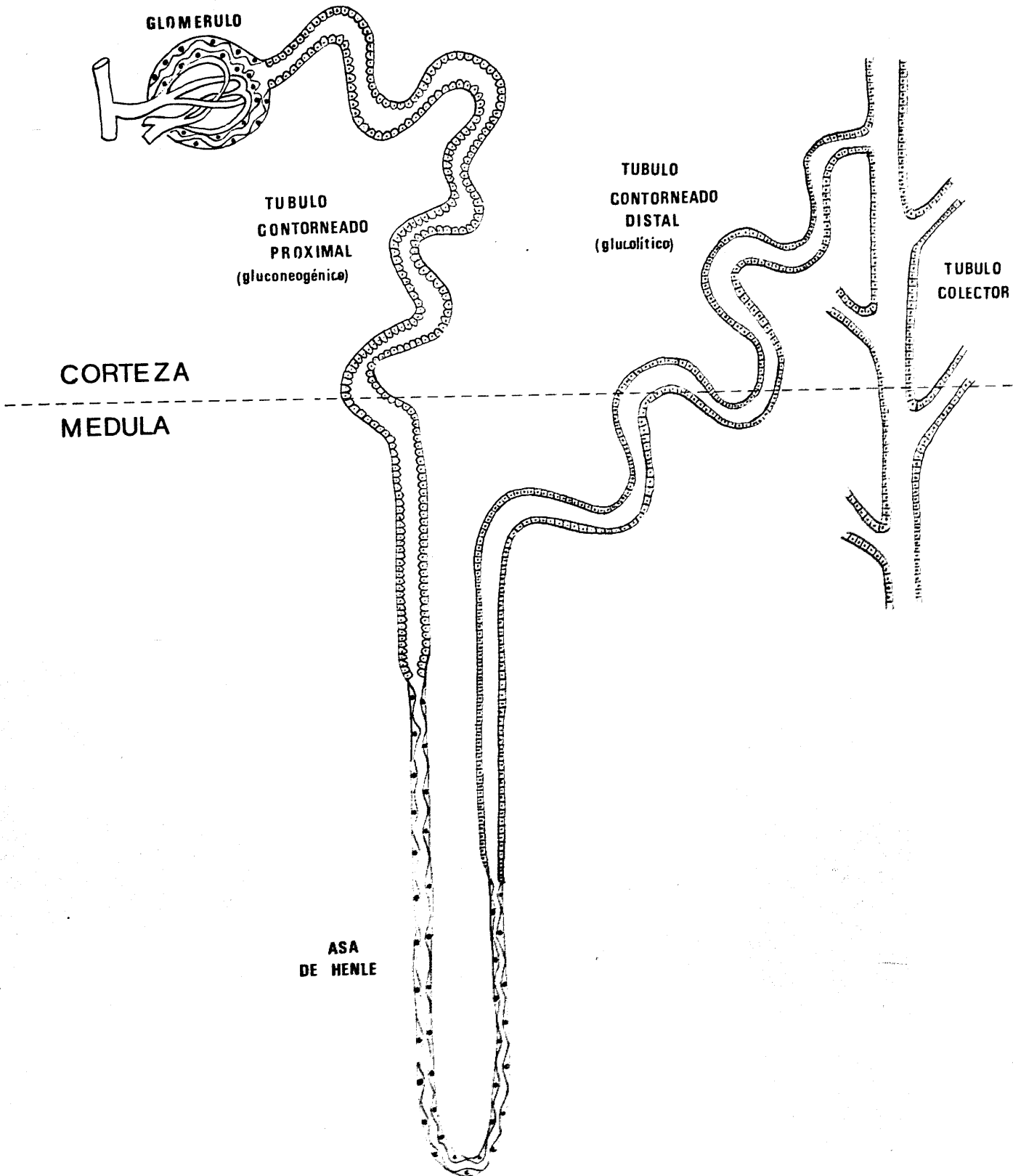


Fig.A.- Localización de las distintas zonas histofisiológicas en un túbulo renal.

El método que utilizamos en nuestro trabajo está basado en la técnica de Vinay y col. (1981), puesto a punto en nuestro departamento recientemente (Martinez-Lopez, 1985). En líneas generales consiste en la dispersión enzimática, con colagenasa, de la corteza en segmentos tubulares y posterior separación de los túbulos proximales, distales y glomérulos en cuatro bandas en un gradiente de Percoll.

Esta separación en fragmentos distales y proximales proporciona además información sobre la distribución enzimática dentro de estas dos estructuras de la corteza renal.

2 - CAPITULO EXPERIMENTAL

2 - PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIAL

2.1.1. Materiales

Se utilizaron los siguientes materiales:

1. Acero inoxidable

2. Aluminio

3. Cobre

4. Latón

5. Níquel

6. Titanio

7. Zinco

2 - PARTE EXPERIMENTAL

2 - PARTE EXPERIMENTAL

2.1.-MATERIAL

2.1.1.-Especie ensayada

Se ha experimentado con ratas de raza Wistar machos, de peso aproximado entre 200 y 250 gramos, alimentadas con dieta estándar (Sandermus D.G.P.A.14685) y libre acceso al agua. Se mantuvieron con luz artificial que se encendía a las 8 horas y se apagaba a las 20 horas, en habitación termostatzada a 22°C.

Los animales fueron suministrados por Biocentre (Barcelona).

2.1.2.-Material utilizado en las diferentes técnicas

2.1.2.1.-Aparatos

Las pesadas se realizaron en balanza Metler H 20T (peso máximo 160g±0,01mg) y balanza Sartorius (peso máximo 160g±1mg).

Para las medidas de pH se utilizó un pHmetro Radiometer Copenhagen, modelo de lectura digital y precisión hasta las milésimas de unidad.

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

La homogenización tisular se realizó con un aparato tipo "Potter" mecánico (MSE) con pistilo de teflón en tubo de vidrio.

Tanto las incubaciones de los túbulos renales , como las de los cortes de corteza renal, se realizaron en aparatos Gallenkamp IH-350, termostatizados y con agitación regulable.

Los gaseos se han realizado con bombonas de carbógeno (95% O₂:5% CO₂).

La adición de sustratos y enzimas se realizó con pipetas Transferpette de la firma Rudolf Brand, GMBH (Alemania) y micropipetas tipo Hamilton.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Beckman modelo TJ-6, de gran precisión a bajas velocidades; y en una centrífuga Beckman J2-21.

Las medidas colorimétricas a 440 y 640 nm se llevaron a cabo en un fotocolorímetro Bausch-Lomb modelo Spectronic 20. Para las medidas espectrofotométricas a 340 nm se utilizó un espectrofotómetro Unicam SP 1.700 con lectura digital, compartimento de cubetas termostatizado y registro gráfico incorporado. Se utilizaron cubetas TSL de 1 cm de espesor.

2.1.2.2.-Productos

En la preparación de tampones, soluciones salinas y demás reactivos generales se han utilizado productos MERCK (Darmstad, Alemania) y Carlo Erba (Italia).

El indicador universal interno procedía de la firma BDH Chem. LTD (Poole, Inglaterra).

Los sustratos, coenzimas y albúmina bovina utilizados pertenecían a la firma SIGMA Chemical Co. (USA).

El Percoll utilizado en la separación en gradiente de densidad procedía de la firma Pharmacia Fine Chemicals (Suecia).

La colagenasa Tipo IV (Lote 34F-6827) obtenida de

Clostridium histolyticum, procedía de la firma SIGMA Chemical Co. (USA).

A la firma Boehringer (Manrheim, Alemania) pertenecían el resto de productos utilizados.

2.2.-METODOS

2.2.1.-Tratamiento de los animales

Los animales se mantenían con una dieta estandar (Sanderms D.G.P.A. 14685) al menos durante dos semanas para su adaptación. La composición de esta dieta se indica a continuación:

Cantidades en gramos

Proteinas	18,08
Grasa	4,24
Carbohidratos	54,50
Celulosa	7,24
Minerales	2,47
Vitaminas	1,25

Tras el periodo de adaptación y siempre a las 8 horas (inicio del ciclo de luz), eran separados en diferentes jaulas 5 ó 6 animales para ser alimentados con los dos tipos de dietas que se han utilizado en este trabajo, o bien eran sometidos a ayuno, en todos los casos con libre acceso al agua.

2.2.2.-Composición y elaboración de las dietas.

Se han empleado dos tipos de dietas, cuya diferencia fundamental es la proporción en carbohidratos y proteínas. La composición de dichas dietas se indica a continuación:

	<u>Dieta alta en Carbohidratos</u>	<u>Dieta alta en Proteínas</u>
Caseína	6g	75g
Grasa	8g	10g
Carbohidratos	80g	5g
Celulosa	1g	1g
C.mineral	4g	4g
C.vitamínico	1g	1g

En ambas dietas la grasa utilizada ha sido aceite de oliva.

El almidón representa un 87% de los carbohidratos, el resto es sacarosa.

La caseína está enriquecida en un 5% con metionina.

Para su elaboración se mezclaron los componentes sólidos pulverizados y al final se adicionó el aceite junto a las vitaminas liposolubles. Por último se tamizó el preparado para conseguir una mezcla homogénea.

La composición del complemento mineral y vitamínico se detalla a continuación:

COMPLEMENTO MINERAL

Cantidades para 100g

NaCl	12,2303g	MnSO ₄	0,1312g
CaHPO ₄	36,6880g	CuSO ₄	0,0178g
KHCO ₃	24,4158g	AlK(SO ₄) ₂	0,0089g
K ₂ HPO ₄	8,0053g	CaCl ₂	0,0089g
MgCO ₃	4,2251g	KI	0,0667g
CaCO ₃	17,1225g	ZnCO ₃	0,0445g
FeSO ₄	1,0341g	NaF	0,0009g

COMPLEMENTO VITAMINICO

Cantidades para 100g

Cianocobalamina	0,10×10 ⁻³ g	Piridoxina	0,07g
Acido fólico	0,02g	Ac.pantoténico	0,16g
Menadiona	0,50×10 ⁻³ g	Biotina	2.00×10 ⁻³ g
Tiamina	0,06g	Sacarosa	c.s.p.100g
Riboflavina	0,06g		

2.2.3.-Preparación y separación de túbulo renales

El método de aislamiento de los diferentes fragmentos tubulares de corteza renal ha sido puesto a punto y descrito por M. Martinez Lopez (1985) en su tesina de licenciatura en nuestro Departamento.

En cada experimento se utilizaron 5 ó 6 ratas (200-250 gramos de peso), las cuales fueron sacrificadas por dislocación cervical.

Los riñones se colocan en un microtomo manual, donde con ayuda de una cuchilla, es extraída toda la corteza renal en finos cortes. Estos cortes son colocados en solución salina Krebs-Henseleit (KHS) pH 7,4 a 4°C.

El tejido es troceado finamente y resuspendido en solución KHS que contiene 1,5 mg/ml de colagenasa y 5 mg/ml de albúmina bovina.

El material utilizado ha sido de plástico o de vidrio previamente siliconado (con una mezcla de Diclorometano-Trimetilclorosilano 100:2) para evitar la adherencia del tejido a las paredes del vidrio.

La disgregación del tejido se realiza en un baño termostatzado a 37°C, con agitación y gaseo con carbógeno durante 30 minutos.

Transcurrido este tiempo se ha producido la digestión del tejido y se detiene la acción de la colagenasa añadiendo KHS a 4°C.

Esta suspensión se filtra a través de una malla de nylon para separar el tejido no disgregado.

La nueva suspensión se centrifuga a 60xg durante 30 segundos, descartando el sobrenadante. Se lava varias veces el precipitado obtenido, centrifugando igualmente a 60xg.

De esta forma obtenemos túbulos renales totales o fracción total.

La separación de las distintas fracciones de los túbulos totales, se realiza en un gradiente de densidad que creamos al utilizar una solución con Percoll al 40% y que contiene una concentración electrolítica final igual a la que posee el KHS. Se resuspende la fracción total de túbulos en esta solución y se centrifuga a 12.200xg durante 30 minutos a 4°C.

Los túbulos totales quedan separados en 4 bandas

(Figura B) que son resuspendidas en KHS y centrifugadas a 80 xg durante 30 segundos para eliminar completamente los restos de Percoll, repitiendo este lavado 3 veces más.

Para el estudio metabólico realizado en este trabajo se eligieron los túbulos contorneados proximales, que quedan en la fracción 4ª tras la separación, y los túbulos contorneados distales, que quedan en la fracción 3ª, por haber sido descritos los primeros como preferentemente gluconeogénicos y los otros como preferentemente glucolíticos.

2.2.4.-Tratamiento de los túbulos renales y corteza renal para la determinación de actividades enzimáticas.

En la determinación de las actividades de los diferentes enzimas, se homogenizan las fracciones tubulares (proximal y distal), o la corteza renal, en tampón Tris-Sacarosa-EDTA-DTT (1mM: 0,25mM: 0,1mM: 1mM) pH 7,6 en un "Potter" de tipo mecánico.

Los extractos obtenidos se centrifugan a 30.000xg durante 30 minutos a 4°C. En el sobrenadante se determinan las actividades enzimáticas como se describe en las secciones correspondientes a cada enzima.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que la fracción 4ª es una preparación casi pura de túbulo proximal.

FIGURA B

2.2.3.1. Determinación de la actividad enzimática de
fructosa 6-fosfatasa

al Sonda 2

La actividad de
fructosa 6-fosfatasa
aparecida en el
siguiente

Fructosa

Fructosa

Fructosa

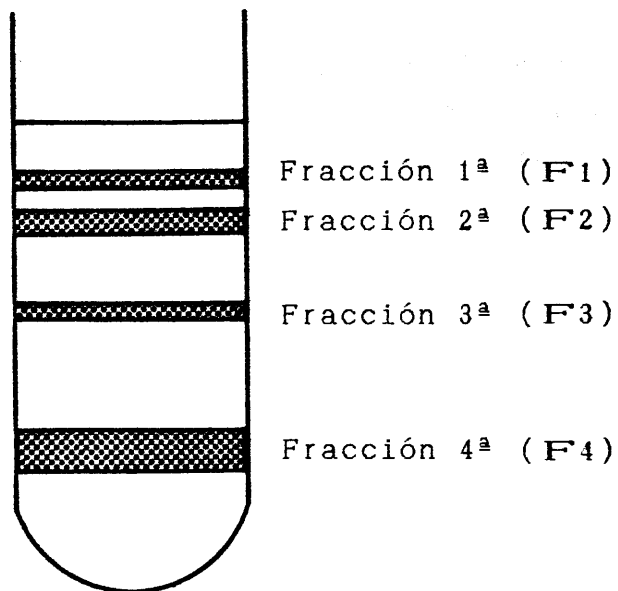


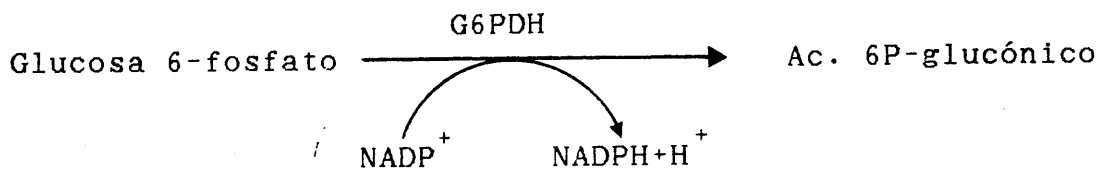
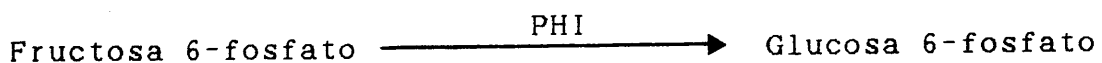
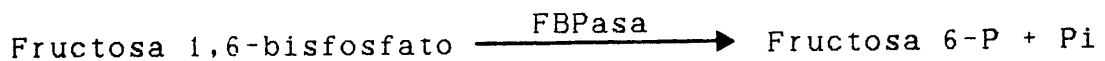
Fig.1.-Separación en gradiente de Percoll. La observación microscópica nos permite identificar cada una de las fracciones aparecidas. La fracción 1ª está compuesta mayoritariamente por glomérulos y por pequeños fragmentos distales. Las fracciones 2ª y 3ª son fundamentalmente de túbulos distales, aunque la 2ª tiene mayor contaminación en glomérulos y pequeños túbulos proximales. Por último la fracción 4ª es una preparación casi pura de túbulos proximales.

2.2.5.-Determinaciones de actividades enzimáticas

2.2.5.1.-Determinación de la actividad enzimática de la fructosa 1,6-bisfosfatasa

a) Fundamento

La determinación de la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa está basada en medir espectrofotométricamente la aparición de NADPH, acoplada al sistema de reacciones siguientes:



Como precursores del sustrato se utilizan concentraciones adecuadas de triosas fosfato de acuerdo con las constantes de equilibrio de las reacciones implicadas y por tanto van proporcionando sustrato en la misma concentración que es transformado.

La aparición de NADPH seguida espectrofotométricamente a 340 nm nos dará cuantitativamente la actividad del enzima.

La medida se realiza a 25°C y a pH 7,2 mantenido con tampón Tris-ClH.

b) Reactivos

Tampón Tris-ClH 66,6 mM pH 7,2
 Solución de MgCl₂ 100 mM
 Solución extemporánea de NADP 10 mM
 Solución de β-mercaptoetanol 200 mM
 Fosfohexosa isomerasa (E.C.5.3.1.9.) comercial
 Glucosa 6P-deshidrogenasa (E.C.1.1.1.49) comercial
 Aldolasa (E.C.4.1.2.13) comercial
 Fructosa 1,6-bisfosfato
 3-Gliceraldehido fosfato
 Dihidroxiacetona fosfato
 Triosafosfato isomerasa (E.C.5.3.1.1) comercial

c) Técnica

Se utilizaron cubetas de 1 ml, preparadas según el siguiente protocolo:

	<u>Volumen cubeta</u>	<u>Concentración cubeta</u>
Tampón Tris-ClH	0,60 ml	40 mM
MgCl ₂	0,05 ml	5 mM
NADP	0,05 ml	0,5 mM
β-mercaptoetanol	0,06 ml	12 mM
PHI	2,80 μl	2 U/ml
G6PDH	2,10 μl	0,3 U/ml
TIM	0,50 μl	5 U/ml
Aldolasa	5,50 μl	0,5 U/ml
Agua dest.	0,06 ml	
TrP	0,02 ml	
FBP	0,10 ml	

Se han utilizado dos concentraciones de sustrato, una subsaturante (0,01 mM para túbulos y 0,0025 mM para corteza renal) y otra saturante (0,1 mM), y para cada una

de ellas la concentración de las triosas fosfato ha sido 100 veces mayor

La reacción se inicia al añadir 0,050 ml del extracto celular a la cubeta.

Se determinaron gráficamente los incrementos de densidad óptica por minuto a 340 nm.

d) Cálculos

La actividad específica FBPasa se expresa en nmoles de F6P producidos por minuto y por miligramo de proteína:

$$\text{nmoles / min / mg} = \frac{\Delta\text{D.O./min} \times V}{10^{-9} \times \epsilon \times d \times v \times P}$$

$\Delta\text{D.O./min}$ = incremento de densidad óptica por minuto

V = Volumen total de la cubeta (ml)

ϵ = Coeficiente de extinción molar del NADPH,
 $6,22 \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{mol}$

d = espesor de la cubeta (1 cm)

v = 0,05 ml de extracto

P = mg de proteína por ml

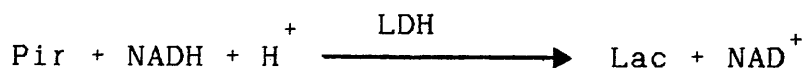
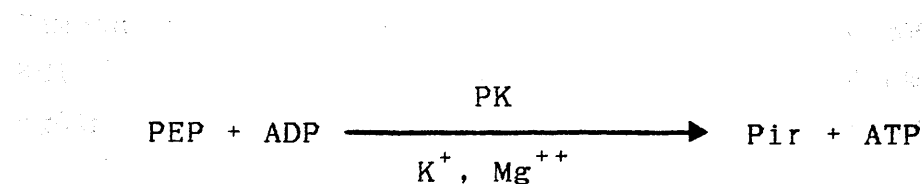
10^{-9} = para pasar a nmoles

2.2.5.2.-Determinación de la actividad enzimática de la piruvato quinasa

a) Fundamento

La actividad de la piruvato quinasa (PK) se determina espectrofotométricamente, siguiendo la disminución de la absorción a 340 nm, correspondiente a la oxidación del NADH en la reacción acoplada con láctico deshidrogenasa.

El método ha sido descrito por Carbonell y col. (1973).



Se utiliza como precursor del sustrato 2-fosfoglicerato que por medio de la enolasa va proporcionando sustrato a la reacción.

La medida se realiza a T^a de 25°C y a pH 7,0.

b) Reactivos

Tampón Imidazol-ClH 77 mM pH 7,0

Solución de KCl 2 M

Solución de MgCl₂ 100 mM

Solución extemporánea de NADH 1,5 mM

Solución extemporánea de ADP 10 mM

L-láctico deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27) comercial

Enolasa (E.C.4.2.1.11) comercial

Fosfoenolpiruvato

2-fosfoglicerato

c) Técnica

Las cubetas se preparan según el siguiente protocolo:

	<u>Volumen cubeta</u>	<u>Concentración cubeta</u>
Tampón	0,45 ml	50 mM
KCl	0,05 ml	100 mM
MgCl ₂	0,05 ml	5 mM
NADH	0,10 ml	0,15 mM
ADP	0,10 ml	1 mM
PEP	0,10 ml	
2-PG	0,10 ml	
LDH	3 μ l	3 U/ml
Enolasa	5 μ l	2 U/ml

Las concentraciones de fosfoenolpiruvato han sido 0,1 y 0,02 mM (subsaturantes para túbulos y corteza renal respectivamente) y 3 mM (saturante); la concentración del precursor 2-PG ha sido en cada caso triple que la del PEP.

La reacción se inicia con la adición de 0,050 ml de extracto a la cubeta.

Los incrementos de densidad óptica por minuto se determinan gráficamente a 340 nm.

d) Cálculos

La actividad piruvato quinasa se expresa en nmoles de piruvato producidos en 1 minuto y por miligramo de proteína.

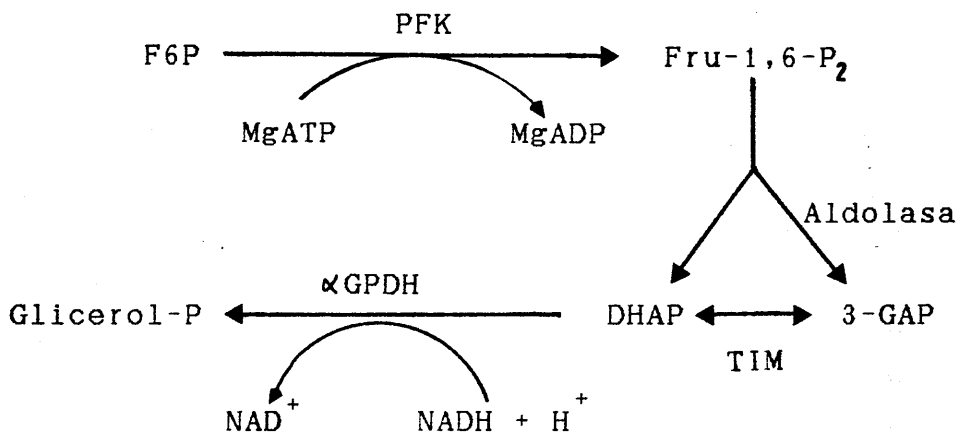
Los cálculos son iguales a los anotados en la sección 2.2.5.1.

2.2.5.3.-Determinación de la actividad enzimática de la fosfofructoquinasa

a) Fundamento

La actividad fosfofructoquinasa se determina espec-

trofotométricamente siguiendo la desaparición de NADH, según el siguiente esquema:



Como precursor del sustrato se utiliza G6P en la relación 3:1 con respecto a la F6P.

b) Reactivos

Tampón Hepes 125 mM pH 7

Solución de KCl 2 M

Solución de MgCl₂ 100 mM

Solución de KH₂PO₄ 100 mM

Solución de NH₄Cl 10 mM

Solución extemporánea de MgATP 15 mM

Solución extemporánea de AMP 1 mM

Fosfohexosaisomerasa (E.C.5.3.1.9) comercial

Aldolasa (E.C.4.1.2.13) comercial

Triosafofato isomerasa (E.C.5.3.1.1) comercial

α -glicerolfosfato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.8)
comercial

Fructosa 6-fosfato

Glucosa 6-fosfato

c) Técnica

Se preparan cubetas de 1 ml según el siguiente protocolo:

	<u>Volumen cubeta</u>	<u>Concentración cubeta</u>
Mg ₂ Cl	0,05 ml	5 mM
KCl	0,05 ml	100 mM
MgATP	0,10 ml	1,5 mM
NADH	0,10 ml	0,15 mM
AMP	0,10 ml	0,1 mM
NH ₄ Cl	0,10 ml	1 mM
KH ₂ PO ₄	0,05 ml	5 mM
Aldolasa	5,5 µl	0,5 U/ml
α-GPDH	1,5 µl	0,5 U/ml
TIM	0,5 µl	5 U/ml
PHI	1,5 µl	1 U/ml
F6P	0,10 ml	
G6P	0,10 ml	

El MgATP, NADH, AMP y ClNH₄ van disueltos en tampón Hepes pH 7, de forma que la concentración de éste en cubeta es de 50 mM.

La reacción se inicia con la adición de 0,250 ml de extracto a la cubeta.

Se determinan gráficamente los incrementos de densidad óptica por minuto a 340 nm.

d) Cálculos

La actividad fosfofructoquinasa se expresa en nmoles de fructosa 1,6-bisfosfato producidos en 1 minuto y por miligramo de proteína.

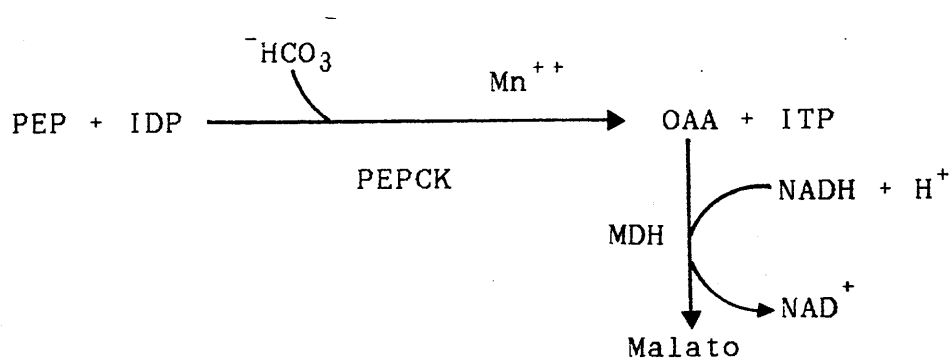
Los cálculos son semejantes a los indicados en la

sección 2.2.5.1., salvo que hay que dividir por 2, debido a que por cada F6P desaparecen 2 NADH.

2.2.5.4.- Determinación de la actividad enzimática de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

a) Fundamento

La carboxilación enzimática del fosfoenolpiruvato se realiza con NaHCO_3 , utilizando IDP como nucleótido coenzimático y Mn^{++} como efector. Para proteger los grupos -SH del enzima se adiciona al medio glutation reducido. El oxalacetato formado se reduce a malato en presencia de NADH y málico deshidrogenasa:



b) Reactivos

Tampón Tris-ClH 0,1 M, pH 7,4

Tampón fosfato sódico 0,01 M, pH 7,5

Solución de MnCl_2 30,3 mM

Solución extemporánea de IDP 30,3 mM

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

Solución de NaHCO_3 0,1 M gaseada con CO_2 momentos antes de preparar las cubetas.

Solución extemporánea de NADH 3,52 mM

Fosfoenolpiruvato

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.

c) Técnica

Se preparan las cubetas según el siguiente protocolo:

	<u>Volumen cubeta</u>	<u>Concentración cubeta</u>
Tampón Tris	1,00 ml	32,150 mM
MnCl ₂	0,10 ml	0,974 mM
IDP	0,15 ml	1,460 mM
GSH	0,20 ml	0,643 mM
NaHCO ₃	0,50 ml	16,080 mM
NADH	0,20 ml	0,226 mM
H ₂ O dest.	0,80 ml	
PEP	0,10 ml	
MDH	10 µl	
Extracto	50 µl	

Las concentraciones utilizadas de PEP han sido 0,0025 mM (subsaturante) y 1 mM (saturante).

Las cubetas preparadas se gasean por espacio de 1 minuto con CO₂ antes de la adición de la málico deshidrogenasa y el extracto.

Se determinan gráficamente los incrementos de densidad óptica por minuto a 340 nm y 30°C.

d) Cálculos

La actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa se expresa en nmoles de OAA producidos por minuto y mg de proteína.

Los cálculos son iguales a los indicados en la sección 2.2.5.1.

2.2.6.- Determinación de las capacidades gluconeogénica y glucolítica renales

El método consiste en la incubación de 120 mg/ml de la suspensión de túbulos renales, tanto con los túbulos proximales como distales, en solución Krebs-Henseleit, pH 7,4 durante 1 hora, agitación y gaseo continuo con gas carbógeno. En el caso de las experiencias con la corteza renal completa, se incubaron cortes de dicho tejido bajo las mismas condiciones experimentales.

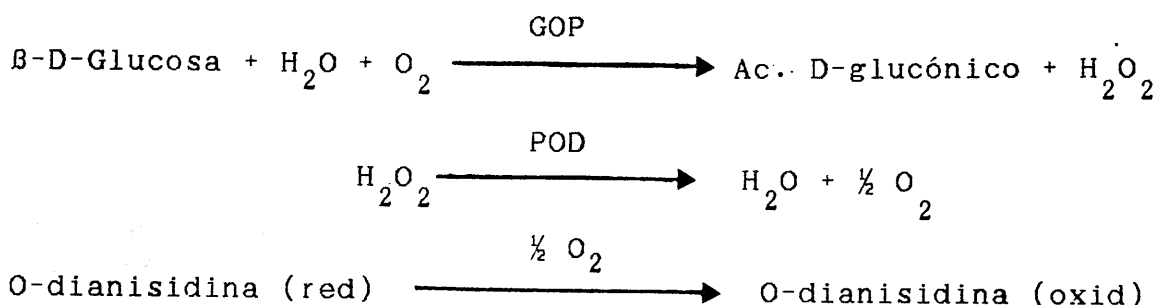
La solución KHS utilizada contiene albúmina bovina en un 1%, y el sustrato ha sido dihidroxiacetona 2 mM en el caso de los túbulos renales. Y piruvato 10 mM y glucosa 2 mM en cortes de la corteza renal.

Transcurrido el tiempo de incubación los líquidos resultantes se desnaturalizan con ClO_4H al 20%, se centrifugan y en el sobrenadante neutralizado se determina glucosa, como medida de la capacidad gluconeogénica, y piruvato y lactato como medida de la capacidad glucolítica.

2.2.6.1.-Determinación enzimática de glucosa

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

La técnica ha sido descrita por Bergmeyer y Bernt (1974). La glucosa oxidasa (GOD), cataliza la oxidación de la glucosa y por la peroxidasa (POD) el H_2O_2 formada se descompone en H_2O y oxígeno atómico que oxida al cromógeno.



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

a) Reactivos

Tampón Fosfato-Tris 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

Peroxidasa (POD) (E.C.1.11.1.7) comercial

La mezcla enzimática se prepara mezclando 9,3 mg de GOD, 3 mg de POD y 0,5 ml de la suspensión de

O-dianisidina en un volumen final de 75 ml con el tampón fosfato-tris.

b) Técnica

Se preparan los siguientes tubos con las cantidades indicadas en ml:

	<u>Blanco</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>	<u>S3</u>	<u>Muestra</u>
S.estándar de glucosa	-	0,50	0,75	1	-
Agua dest.	1	0,50	0,25	-	-
Muestra	-	-	-	-	1
Mezcla enzimática	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Se incuban una hora a 37°C y se determina la D.O. a 440 nm.

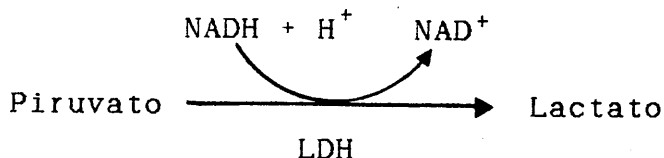
c) Cálculos

Se expresan en μ moles de glucosa/hora de incubación/gramo de tejido seco, teniendo en cuenta los valores de concentración estándar en los tubos S1, S2 y S3 que son 0,10, 0,15 y 0,20 micromoles de glucosa.

2.2.6.2.- Determinación enzimática de Piruvato

La determinación de piruvato se ha realizado según el método de Czok y Lamprecht (1974).

El fundamento es el siguiente:



La oxidación del NADH es proporcional al piruvato presente en la muestra y es medido espectrofotométricamente a 340 nm.

a) Reactivos

Tampón trietanolamina 0,4 M pH 7,6

Solución KCl 2 M

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

L-láctico 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	0,50 ml
KCl	0,20 ml	0,20 ml
NADH	0,05 ml	0,05 ml
Agua dest.	0,75 ml	2,25 ml
Muestra	1,50 ml	—

Se anota el valor de densidad óptica inicial (D.O.i) a 340 nm y a continuación se adicionan 5 μ l de LDH en cada cubeta. Se esperan 15 minutos y se mide la densidad óptica final (D.O.f).

c) Cálculos

Para calcular los nmoles de piruvato en el medio de incubación expresados por mg de tejido seco se utiliza la expresión siguiente:

$$\text{nmoles Piruvato/mg tejido seco} = \frac{\Delta \text{D.O.}}{\epsilon \times 10^{-9}} \times \frac{3}{1,5} \times \frac{Vt}{P}$$

$\Delta \text{D.O.}$ = Incremento de densidad óptica, $\text{D.O.f} - \text{D.O.i}$

3 = Volumen total de la cubeta

1,5 = Volumen de la muestra en cubeta

Vt = Volumen total de la muestra obtenida de la incubación neutralizada.

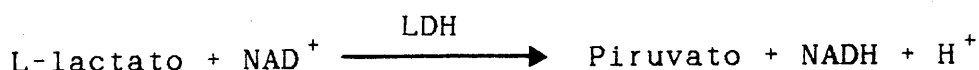
ϵ = Coeficiente de extinción molar del NADH, $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$

10^{-9} = para expresar en nmoles

P = mg de tejido seco

2.2.6.3.- Determinación enzimática de L-lactato

El L-lactato se determina enzimáticamente oxidándolo con NAD mediante el enzima láctico deshidrogenasa (LDH) a pH 9 según ha sido descrito por Gawehn y Bergmeyer (1974).



Se utiliza hidrazina en medio alcalino que retira el piruvato del medio formando la hidrazona correspondien-

te. El NADH formado se mide espectrofotométricamente a 340 nm.

a) Reactivos

Tampón hidrazina-glicocola (0,4 M:0,5 M) pH 9

Solución extemporánea de NAD al 0,5%

L-láctico deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27) comercial

b) Técnica

Las cubetas han sido preparadas según el siguiente protocolo:

	Muestra	Blanco
	—————	—————
Tampón	1,50 ml	1,5 ml
NAD	0,40 ml	0,4 ml
Agua dest.	0,10 ml	0,6 ml
Muestra	0,50 ml	-

Después de anotar la D.O. inicial se adicionan 10 μ l de LDH a cada cubeta; tras esperar 30 minutos se anota la D.O. final. La determinación espectrofotométrica se realiza a 340 nm, anotando el incremento de densidad óptica debido al consumo de lactato paralelo a la formación de NADH.

c) Cálculos

La cantidad de L-lactato existente se expresa en nmoles de L-lactato transformados por mg de tejido seco, siguiendo la expresión indicada en la sección 2.2.6.2.

2.2.7.- Determinación cuantitativa de proteínas

Para esta determinación se siguió el método de Lowry y col. (1951). Se basa en dos reacciones complementarias:

- La del Biuret, característica de grupos $-NH_3$ y que da color violeta
- La del Folin, característica de grupos $-OH$ reductores, y que da color azul.

a) Reactivos

- Biuret

A) CO_3Na_2 al 2% en sosa 0,1 N

B) $SO_4Cu \cdot 5H_2O$ 0,5% en tartrato sódico al 1%

El Biuret se prepara con las soluciones A y B, mezclando 50 ml de A con 1 ml de B. Se prepara extemporáneamente.

- Reactivo de Folin comercial diluido a la mitad con agua
- Solución patrón de proteínas. Se prepara de modo que contenga 500 γ /ml con albúmina bovina en agua destilada.

b) Técnica

Para los tubos problema se hacen diferentes diluciones. Se preparan los siguientes tubos:

	<u>B</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>P₁</u>	<u>P₂</u>
Agua (ml)	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	-	-
Solución patrón (ml)	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	-	-
Dil. 1 problema	-	-	-	-	-	-	1	-
Dil. 2 problema	-	-	-	-	-	-	-	1

siendo B el blanco y P₁ y P₂ los tubos problemas.

Una vez preparados todos los tubos, se añaden 5 ml de Biuret, se esperan 15 minutos y aparece ligera coloración violeta correspondiente a la reacción del Biuret. Pasados los 15 minutos se añaden 0,5 ml de Folin y se dejan 20 minutos. Se desarrolla el color azul propio del reactivo de fenoles. Concluido este tiempo se hace la lectura a 640 nm.

c) Cálculos

Se construye una curva patrón, representando la concentración de proteínas de cada uno de los patrones (50, 100, 150, 200 y 250 γ /ml) frente a su D.O. correspondiente. A partir de la curva patrón e interpolando, se obtiene la concentración de proteínas que hay en cada dilución del problema. Se multiplica la concentración de cada tubo por su dilución y se halla la media aritmética de los dos valores.

Los test de significación utilizados corresponden a la "t" de Student. Cuando es igual el número de datos ambas poblaciones se aplica la fórmula (1); mientras que cuando es diferente se aplica la (2):

2.2.8.- Tratamiento estadístico de los resultados

Los datos que son media de varias experiencias aparecen acompañados del error estándar de la media (SEM).

El valor de la media se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} X_i}{N}$$

donde \bar{X} representa el valor de la media y X_i el de cada uno de los resultados obtenidos.

Para el cálculo del error estándar de la media se aplicó la fórmula:

$$SEM = \frac{\sigma_{N-1}}{N} \quad ; \quad \sigma_{N-1} = \sqrt{\frac{\sum (d_i)^2}{N-1}}$$

siendo N el nº de datos y σ_{N-1} la desviación típica; d_i representa las diferencias de cada valor con respecto a la media, $d_i = X_i - \bar{X}$.

Los test de significación utilizados corresponden a la "t" de Student. Cuando es igual el número de datos de ambas poblaciones se aplica la fórmula (1); mientras que cuando es diferente se aplica la (2):

$$(1) \quad t = \frac{|\bar{X}_a - \bar{X}_b|}{\text{SEMa}^2 + \text{SEMb}^2}$$

$$(2) \quad t = \frac{|\bar{X}_a - \bar{X}_b|}{\sqrt{\text{SEMa}^2 \left(1 + \frac{Na}{Nb} \right) + \text{SEMb}^2 \left(1 + \frac{Nb}{Na} \right)}}$$

$$\left(1 + \frac{Nb-1}{Na-1} \right)$$

3 - RESULTADOS

3 - RESULTADOS

3.1- EFECTO DE DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES SOBRE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO.

Se han estudiado los efectos que ejercen dos dietas de composiciones diferentes y el ayuno, sobre las capacidades gluconeogénica y glucolítica de corteza renal. Este estudio se ha realizado a lo largo de un periodo de tiempo que tiene como último punto las 48 horas.

Para conocer la adaptación metabólica del riñón a estas situaciones, se ha querido hacer un estudio paralelo del metabolismo glucídico tanto en las fracciones distales como proximales de los túbulos renales. Esto es así porque ambas fracciones tubulares presentan un comportamiento metabólico diferente, habiéndose descrito a la fracción distal del túbulo renal como preferentemente glucolítica y la proximal como eminentemente gluconeogénica (Schmidt y Gu-der, 1976; Schmidt y col., 1978).

3.1.1.- Efecto de una dieta alta en carbohidratos sobre las capacidades gluconeogénica y glucolítica de túbulos renales a lo largo del tiempo.

Para la determinación de las capacidades gluconeogénica y glucolítica, se siguió el método descrito en la sección 2.2.6., utilizando como único sustrato dihidroxiacetona a concentración 2 mM. Se eligió este sustrato por encontrarse a mitad de camino de la ruta gluconeogénica/glucolítica y así poder cuantificar el camino metabólico seguido por cada fracción de túbulos renales en cada si-

tuación nutricional del animal.

Se mide glucosa para determinar la capacidad gluconeogénica, y lactato y piruvato de forma que la suma de ambos metabolitos sirve para cuantificar la capacidad glucolítica.

Como puede verse en la tabla 1 y figura 1, la formación de glucosa en la fracción proximal del túbulo renal (F4) va disminuyendo a lo largo del tiempo incluso por debajo de la glucosa producida por la fracción de túbulos distales. En estos últimos no hay diferencias significativas a lo largo de las 48 horas. Sin embargo hay que mencionar que la capacidad gluconeogénica de la fracción distal es bastante elevada, a diferencia de lo encontrado hasta ahora en la bibliografía, que solamente le da importancia como glucolítica. Prácticamente un 50% de la capacidad gluconeogénica total corresponde a esta fracción.

El porcentaje que, con respecto a la capacidad gluconeogénica total, corresponde a cada fracción del túbulo se muestra en la figura 2. Puede observarse que no existe una gran diferencia cuantitativa entre la capacidad gluconeogénica de ambas fracciones de túbulos renales y esta diferencia se va haciendo menor a medida que va disminuyendo dicha capacidad en la fracción proximal del túbulo.

Al contrario de lo que ocurre con la capacidad gluconeogénica, la formación de lactato+piruvato es muy superior en la fracción distal, y va aumentando a lo largo del tiempo con este tipo de dieta. En la fracción proximal únicamente se ve diferencia significativa a las 48 horas (tabla 1, figuras 3 y 4).

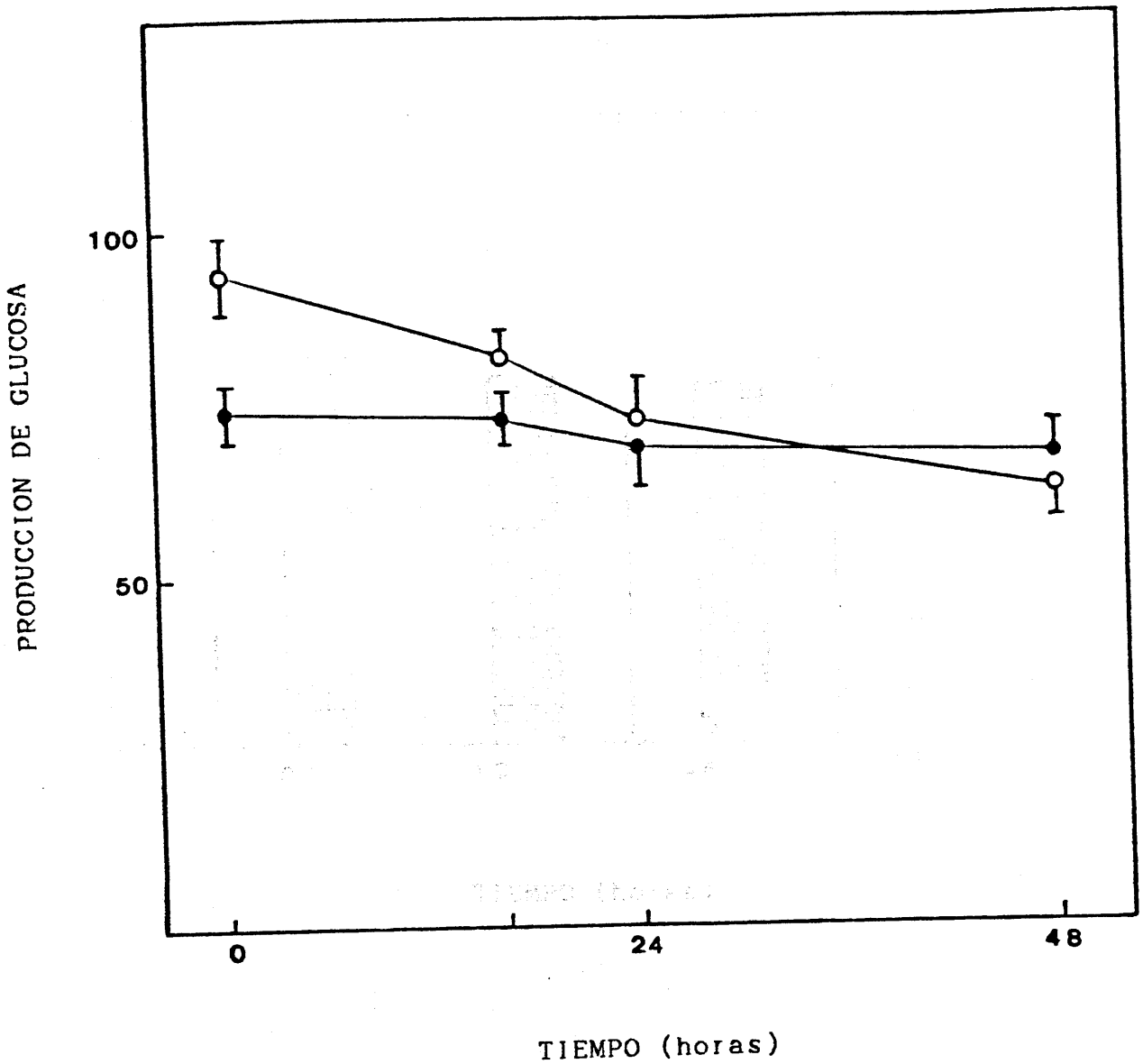
TABLA 1

EFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
F3	74,38±4,45 [*] (9)	73,63±3,82 (3)	69,04±5,53 (6)	67,83±4,74 (6)
Glucosa				
F4	93,92±5,06 (9)	81,99±3,74 (3)	73,25±5,55 ^a (6)	62,88±5,12 ^c (6)
F3	22,71±1,71 ^{***} (8)	29,36±1,08 ^{**} (3)	36,83±3,52 ^{b)***} (7)	50,54±4,67 ^{d)***} (6)
Lac+Pir				
F4	9,43±0,61 (8)	10,36±1,30 (3)	10,44±0,69 (7)	13,64±1,45 ^a (6)

Los resultados de glucosa van expresados en μ moles de glucosa/hora de incubación/gramo de tejido seco. La capacidad glucolítica va expresada como nmoles de lactato +piruvato/hora de incubación/mg de tejido seco. El \pm representa el error estándar de la media. Entre paréntesis se indica el n° de experimentos; en cada experimento se han utilizado 5 ó 6 animales. F3 y F4 representan las fracciones de túbulos distales y proximales respectivamente. El grado de significancia P respecto a los valores de 0 horas se expresa como: a) P<0,02; b) P<0,005; c) P<0,002; d) P<0,0001. El grado significancia de la fracción 3 respecto a la 4 como: *) P<0,02; **) P<0,0005; ***) P<0,00001.

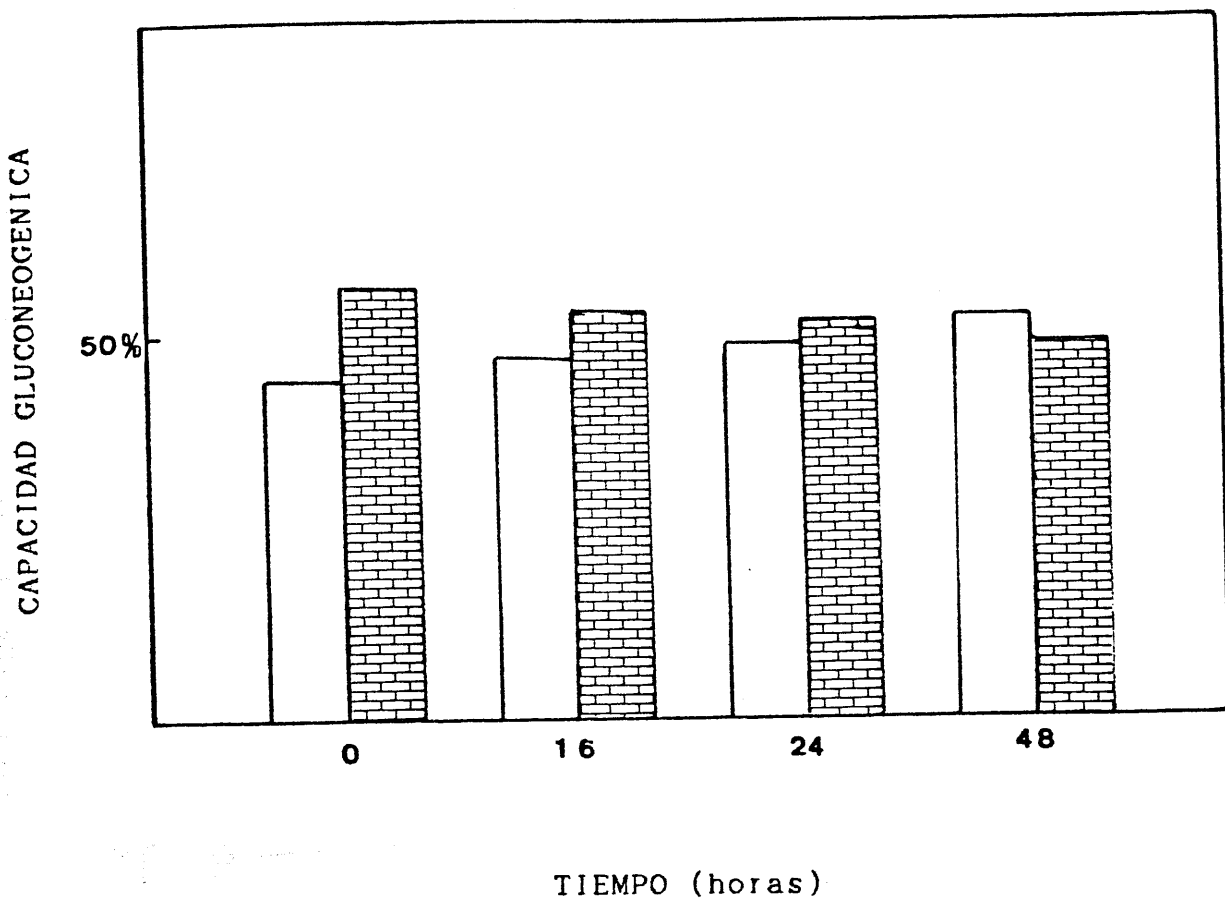
FIGURA 1



EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA PRODUCCION DE GLUCOSA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los resultados se expresan en μmoles de glucosa/hora de incubación/gramo de tejido seco. Las barras verticales representan el error estándar de la media.

(●) Glucosa formada por la fracción de túbulos distales.
(○) Glucosa formada por la fracción de túbulos proximales.

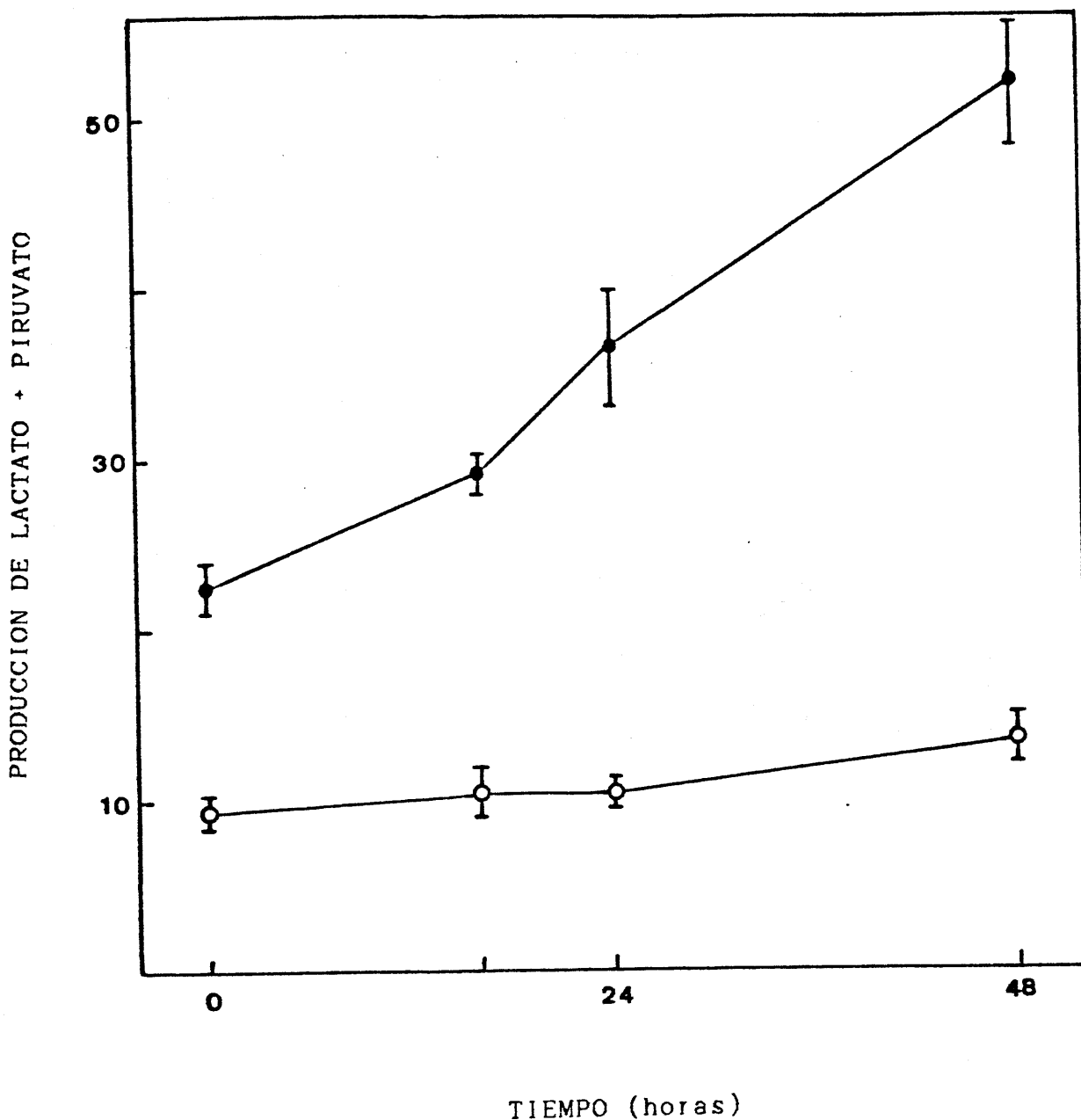
FIGURA 2



EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los datos correspondientes a cada fracción del túbulo renal se representan como porcentajes de la capacidad gluconeogénica total.

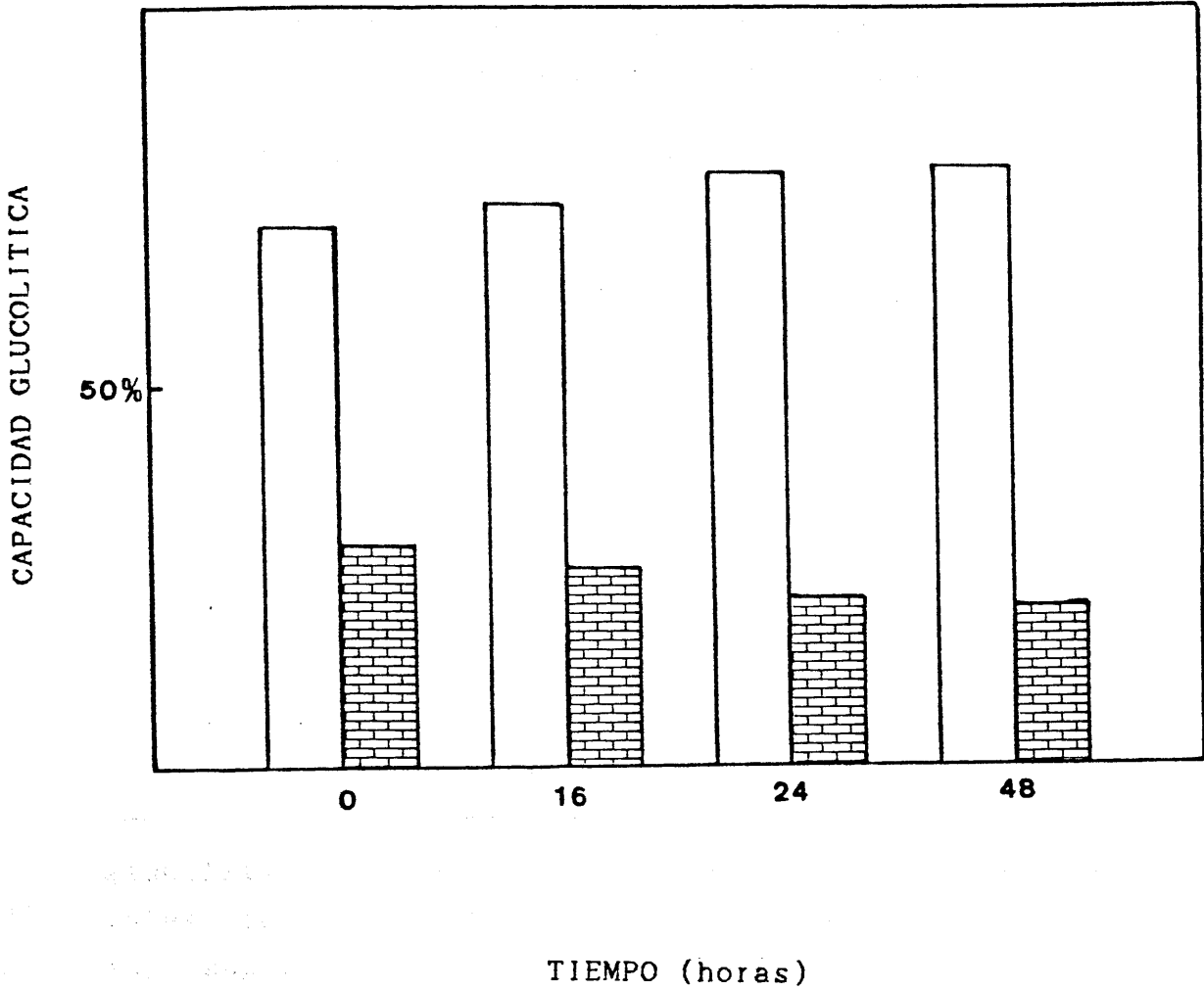
□ Fracción de tubulos distales. ▒ Fracción de tubulos proximales.

FIGURA 3



EFEECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA PRODUCCION DE LACTATO + PIRUVATO DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los resultados se expresan en nmoles de lactato+piruvato /hora de incubación/mg de tejido seco. Las barras verticales representan el error estándar de la media. (●) Fracción de túbulos distales. (○) Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 4



EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA CAPACIDAD GLUCOLITICA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los datos correspondientes a cada fracción del túbulo renal se representan como porcentajes de la capacidad glucolítica total. □ Fracción de túbulos distales. ■ Fracción de túbulos proximales.

3.1.2.- Efecto de una dieta alta en proteínas sobre las capacidades gluconeogénica y glucolítica de túbulos renales a lo largo del tiempo.

Cuando se les suministra a las ratas una dieta con elevada proporción en proteínas y baja en carbohidratos, la formación de glucosa en la fracción proximal de túbulos renales, se va incrementando a lo largo del tiempo (tabla 2, figuras 5 y 6). Mientras que en la fracción distal de dichos túbulos no se observan diferencias a lo largo de todo el tiempo experimental. Este comportamiento específico en ambas fracciones hace que al final de la experiencia (48 horas), la diferencia en la formación de glucosa por parte de la fracción proximal respecto a la distal sea del 100% cuando se compara con el punto 0 horas (Fig. 6).

Por lo que respecta a la capacidad glucolítica, no se observan cambios en la formación de lactato+piruvato a lo largo de las 48 horas y en ninguna de las fracciones de túbulos renales, únicamente destacar que el porcentaje glucolítico correspondiente a la fracción de túbulos distales con respecto a la capacidad glucolítica total, es muy superior al que corresponde a la fracción de túbulos proximales (tabla 2, figuras 7 y 8).

representa el error estándar de la media y entre paréntesis se indica el nº de experimentos. en esta experimentación se han utilizado 5 ó 6 animales. P₃ y P₄ corresponde respectivamente a las fracciones de túbulos distales proximales. El grado de significancia P respecto a los va

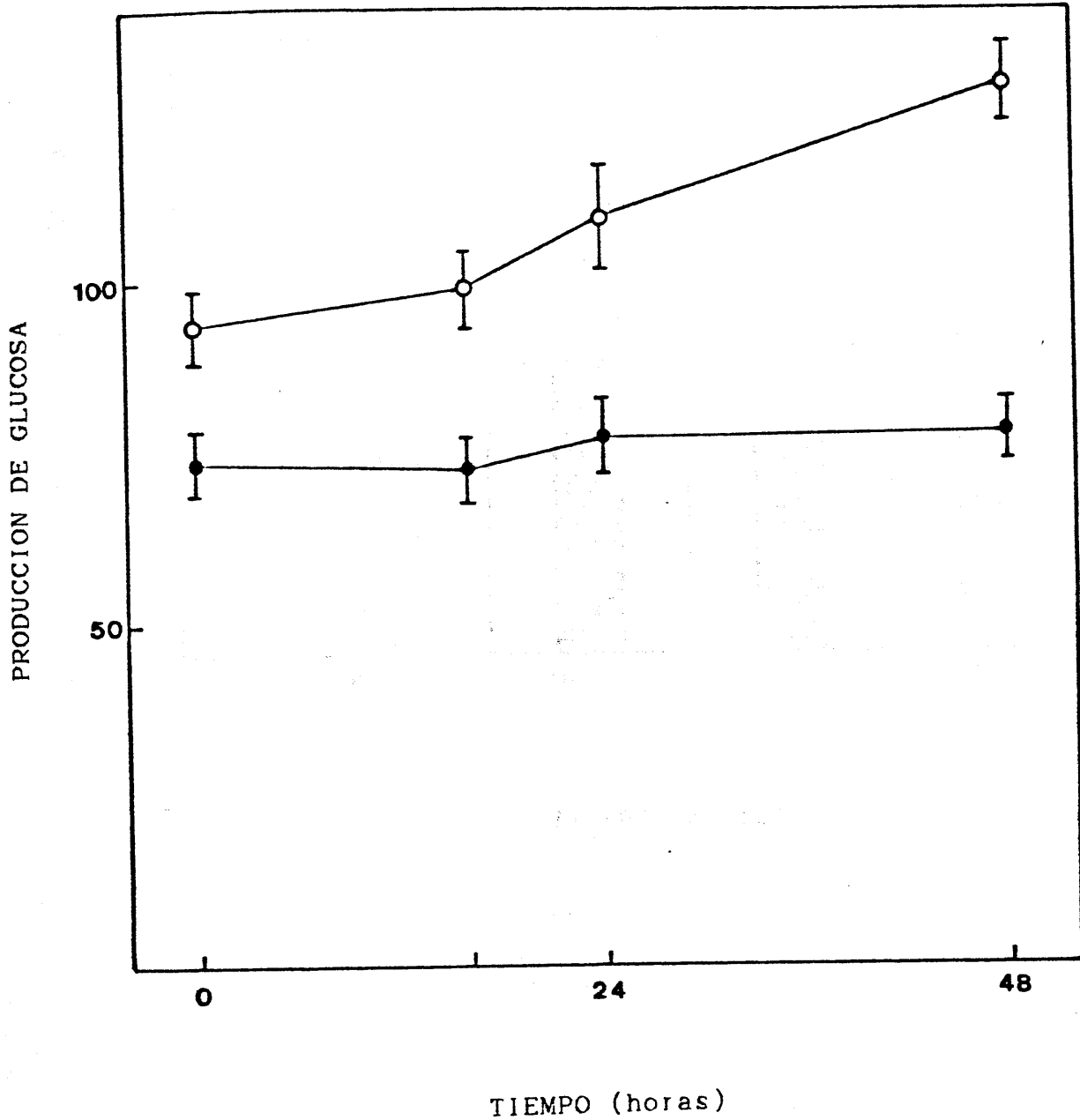
TABLA 2

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
F3	74,38±4,45 [*] (9)	73,24±4,48 [*] (3)	77,60±5,31 ^{**} (7)	78,31±4,82 ^{***} (8)
Glucosa				
F4	93,92±5,06 (9)	99,16±5,49 (3)	109,51±7,09 (7)	128,93±5,86 ^a (7)
F3	22,71±1,71 ^{***} (8)	19,00±1,93 [*] (3)	21,20±1,94 ^{**} (7)	22,04±1,20 ^{***} (6)
Lac+Pir				
F4	9,43±0,61 (8)	9,92±1,26 (3)	9,35±1,04 (7)	10,57±0,95 (5)

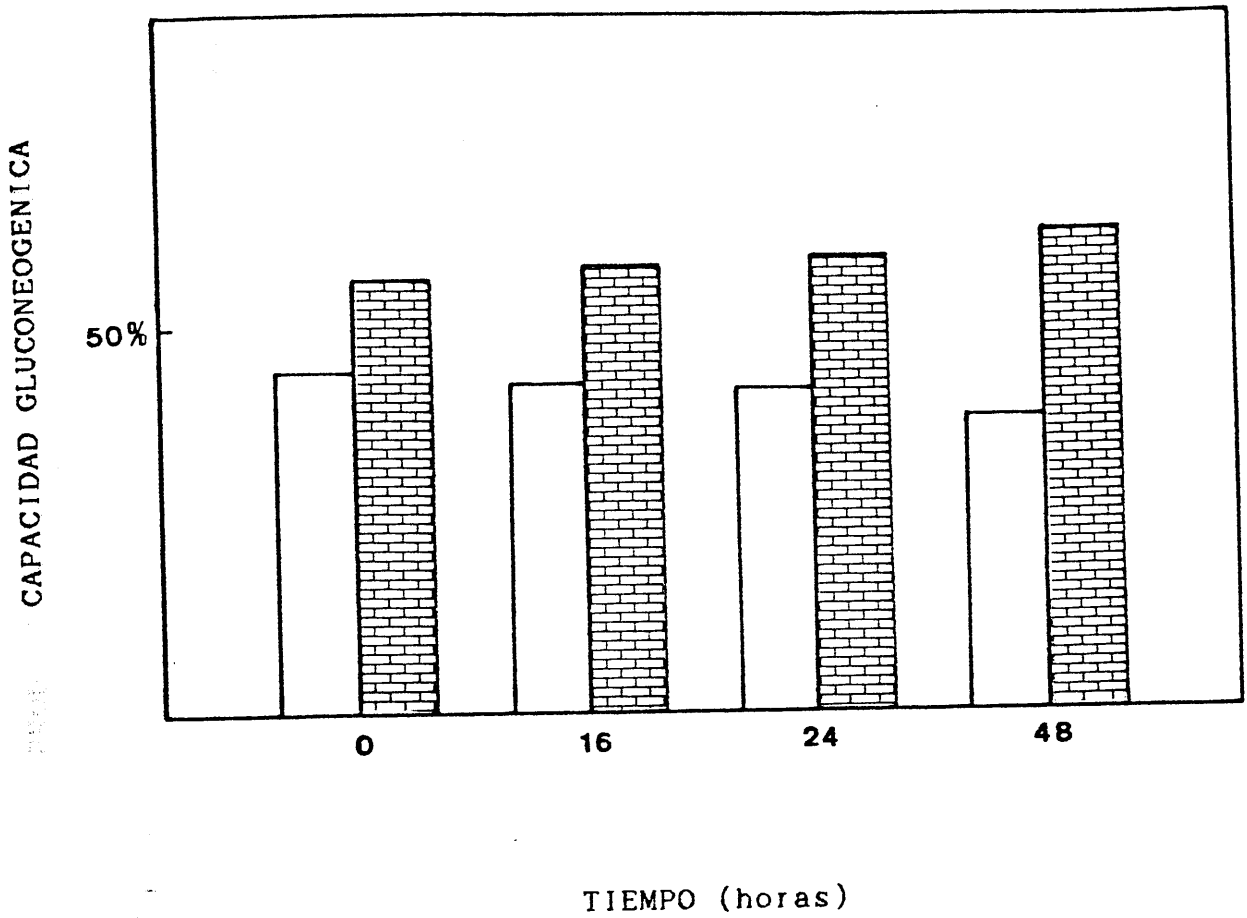
Los resultados de glucosa van expresados en μ moles de glucosa/hora de incubación/gramo de tejido seco. La capacidad glucolítica se expresa como nmoles de lactato+piruvato /hora de incubación/mg de tejido seco. El \pm representa el error estándar de la media y entre paréntesis se indica el n^o de experimentos; en cada experimento se han utilizado 5 ó 6 animales. F3 y F4 corresponden respectivamente a las fracciones de túbulo distales y proximales. El grado de significancia P respecto a los valores de 0 horas se expresa como: a) P<0,001. Y de los valores de la fracción 3 respecto a la fracción 4 como: *) P<0,05; **) P<0,005; ***) P<0,0001.

FIGURA 5



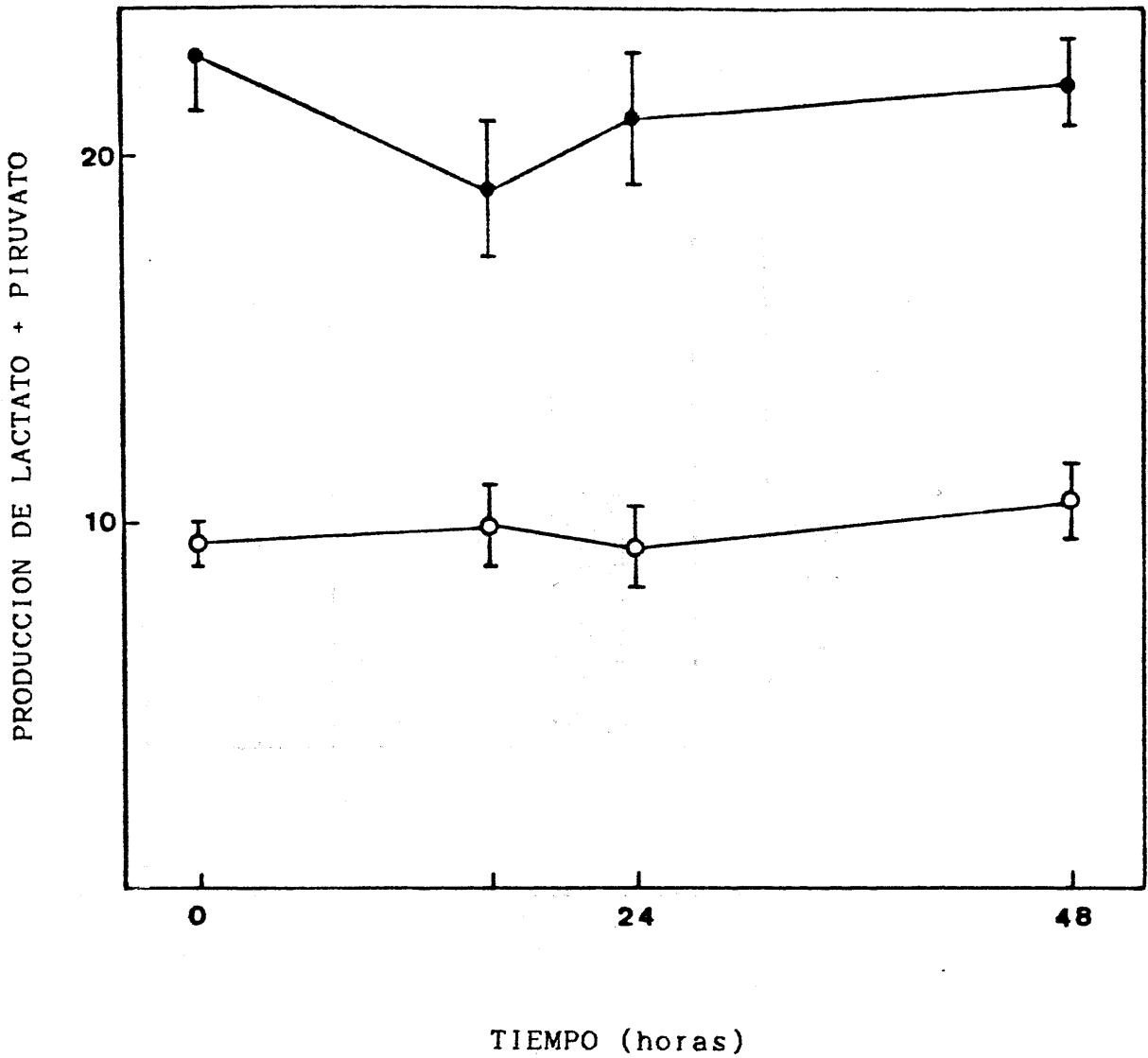
EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA PRODUCCION DE GLUCOSA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los resultados se expresan en μ moles de glucosa/hora de incubación/gramo de tejido seco. Las barras verticales representan el error estándar de la media. (•) Fracción de túbulos distales. (○) Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 6



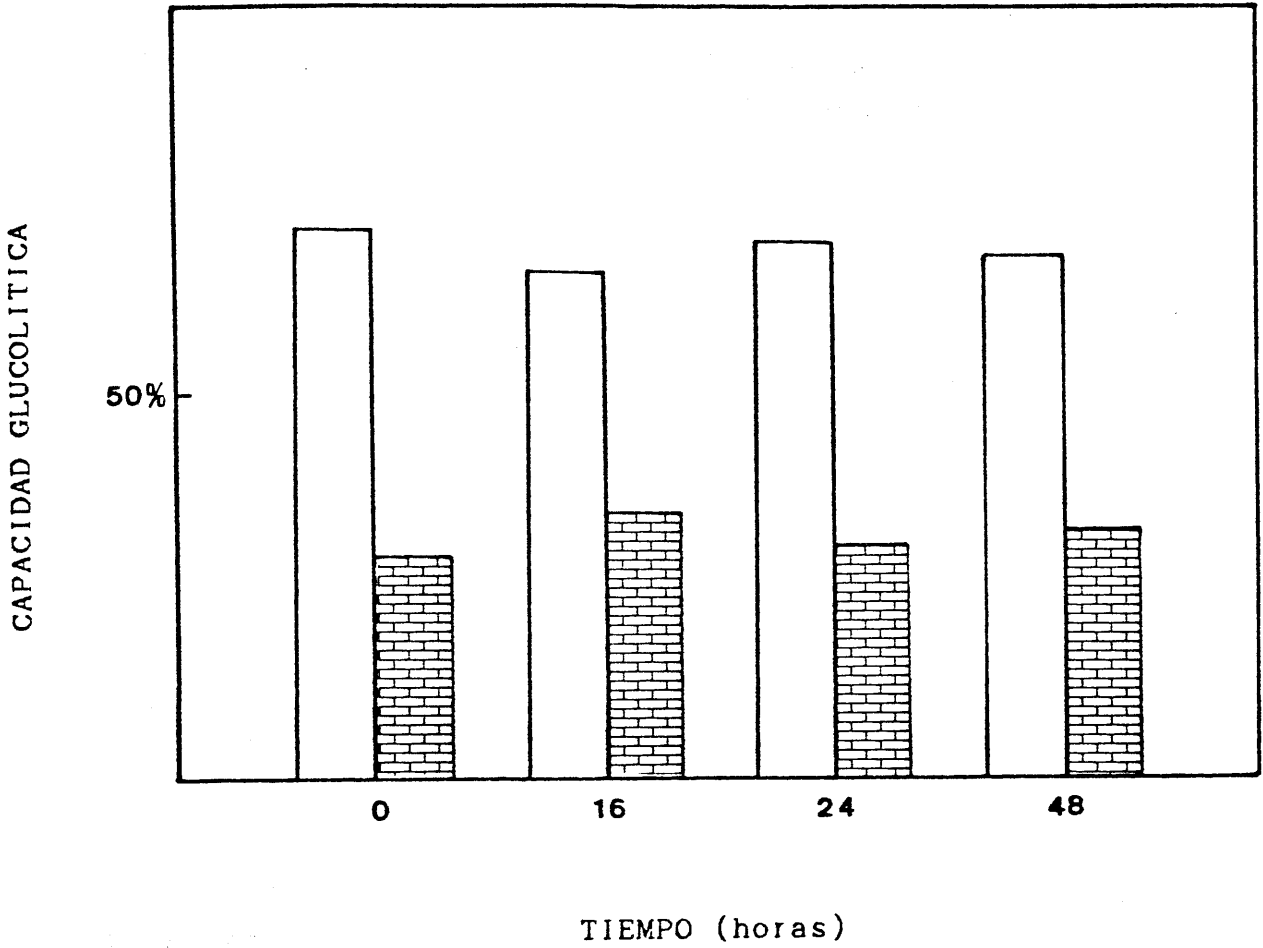
EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los datos correspondientes a cada fracción del túbulo renal se representan como porcentajes de la capacidad gluconeogénica total. □ Fracción de túbulos distales. ▒ Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 7



EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA PRODUCCION DE LACTATO + PIRUVATO DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los resultados se expresan en nmoles de lactato+ piruvato /hora de incubación/mg de tejido seco. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (●) Fracción de túbulos distales. (○) Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 8



EFEECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA CAPACIDAD GLUCOLITICA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los datos correspondientes a cada fracción del túbulo renal se representan como porcentajes de la capacidad glucolítica total. □ Fracción de túbulos distales. ▒ Fracción de túbulos proximales.

3.1.3.- Efecto del ayuno sobre las capacidades gluconeogénica y glucolítica de túbulos renales a lo largo del tiempo.

El aumento en la formación de glucosa que tiene lugar a nivel de la fracción proximal de los túbulos renales durante el ayuno, es muy superior a la que se presentaba con una dieta alta en proteínas, sobre todo a las 48 horas. Esto es debido a que en esta situación la gluconeogénesis renal adquiere especial importancia en el mantenimiento de la homeostasis de la glucemia (tabla 3, figura 9). La diferencia entre los porcentajes que corresponden a cada fracción del túbulo renal, se hace muy significativa a las 48 horas, siendo ésta del orden del 250% respecto a la diferencia encontrada a las 0 horas (figura 10).

Asimismo la capacidad glucolítica se va reduciendo en la fracción de túbulos distales, de forma que a las 48 horas es inferior a la que presenta la fracción de túbulos proximales (tabla 3, figuras 11 y 12).

Puesto que es en la fracción de túbulos proximales donde se observan las principales variaciones en la formación de glucosa bajo las tres situaciones nutricionales estudiadas, se han representado dichos cambios en la figura 13. Las mayores diferencias ocurren en las dos situaciones mas extremas, como son el ayuno y la dieta alta en carbohidratos.

Igualmente, en la figura 14 se representa la formación de lactato+piruvato por parte de la fracción de túbulos distales en estas mismas circunstancias. En este caso, la dieta rica en carbohidratos es la que proporciona los niveles glucolíticos mas altos, mientras que el ayuno origina los mas bajos.

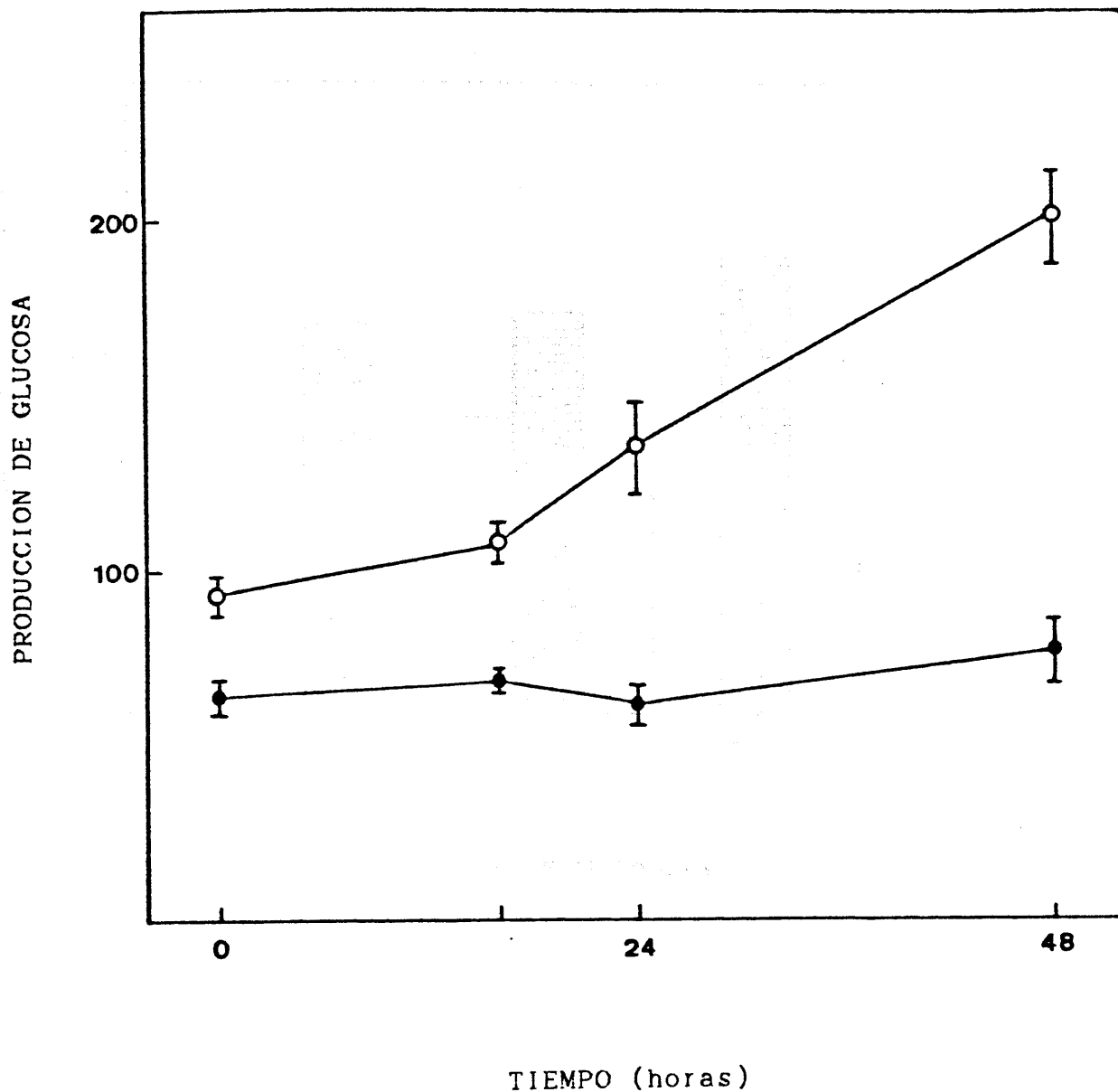
TABLA 3

EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO.

	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
F3	74,38±4,45 [*] (9)	79,65±3,08 ^{**} (3)	71,62±4,82 ^{***} (7)	87,02±8,30 ^{***} (8)
Glucosa				
F4	93,92±5,06 (9)	107,97±5,18 (3)	135,27±12,04 ^b (7)	201,25±12,96 ^d (8)
F3	22,71±1,71 ^{***} (8)	15,86±1,50 ^{a)*} (4)	9,97±1,04 ^c (6)	7,97±0,78 ^d (6)
Lac+Pir				
F4	9,43±0,61 (8)	9,94±1,20 (4)	8,86±0,93 (6)	9,00±0,93 (6)

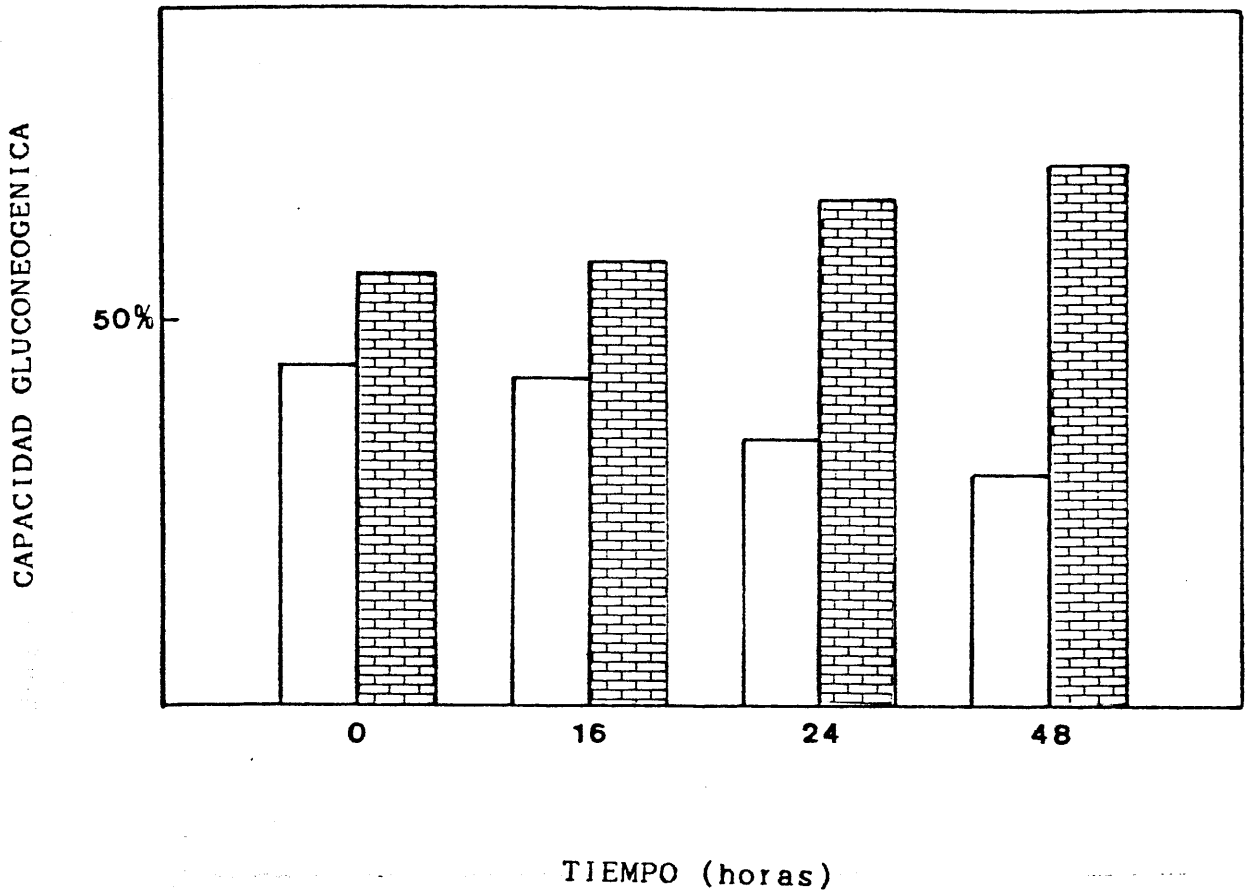
Los resultados de glucosa van expresados en μ moles de glucosa/hora de incubación/gramo de tejido seco. La capacidad glucolítica se expresa como nmoles de lactato+piruvato /hora de incubación/mg de tejido seco. El \pm representa el error estándar de la media. Entre paréntesis se indica el n° de experimentos; en cada experimento se han utilizado 5 ó 6 animales. F3 y F4 corresponden a las fracciones de túbulos distales y proximales respectivamente. El grado de significancia P respecto a los valores de 0 horas se expresa como: a) P<0,05; b) P<0,005; c) P<0,0005 d) P<0,0001. Y de los valores de la fracción 3 respecto a la fracción 4 como: *) P<0,05; **) P<0,01; ***) P<0,0005.

FIGURA 9



EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA PRODUCCION DE GLUCOSA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los resultados se expresan en μ moles de glucosa /hora de incubación/gramo de tejido seco. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (●) Fracción de túbulo distales. (○) Fracción de túbulo proximales.

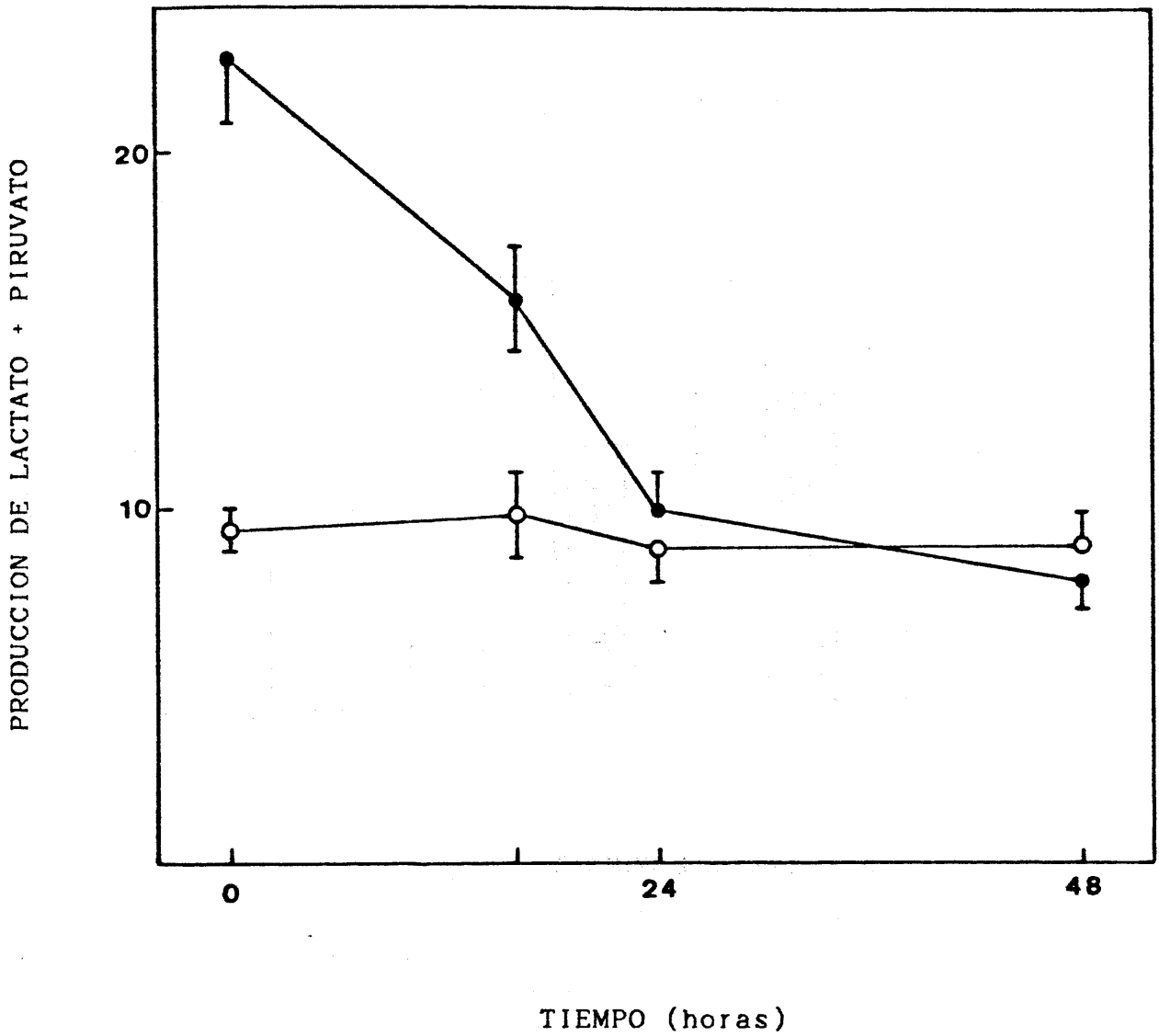
FIGURA 10



EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los datos correspondientes a cada fracción del túbulo renal se representan como porcentajes de la capacidad gluconeogénica total.

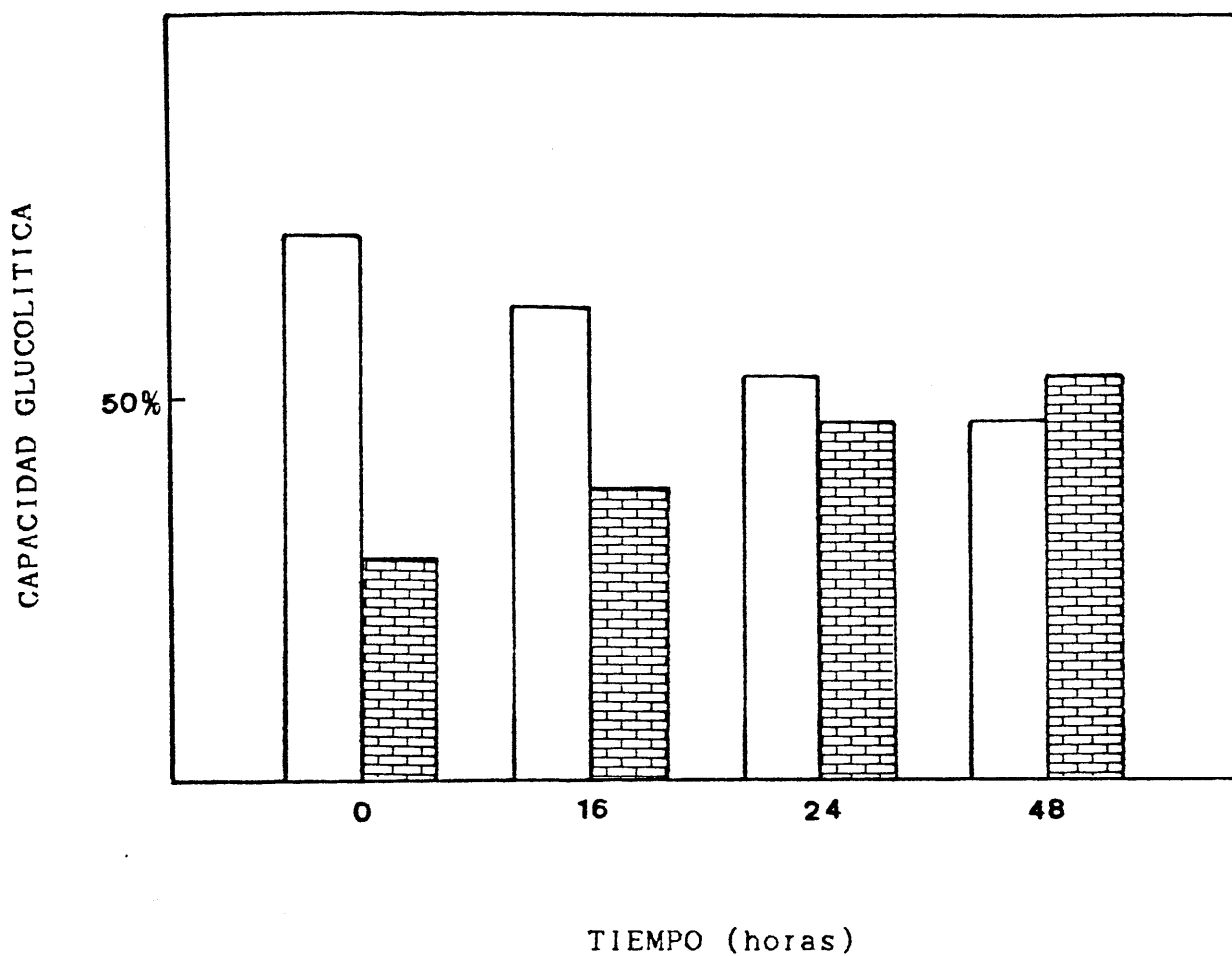
□ Fracción de túbulos distales. ▒ Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 11



EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA PRODUCCION DE LACTATO + PIRUVATO DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los resultados se expresan en nmoles de lactato+piruvato /hora de incubación/mg de tejido seco. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (●) Fracción de túbulos distales. (○) Fracción de túbulos proximales.

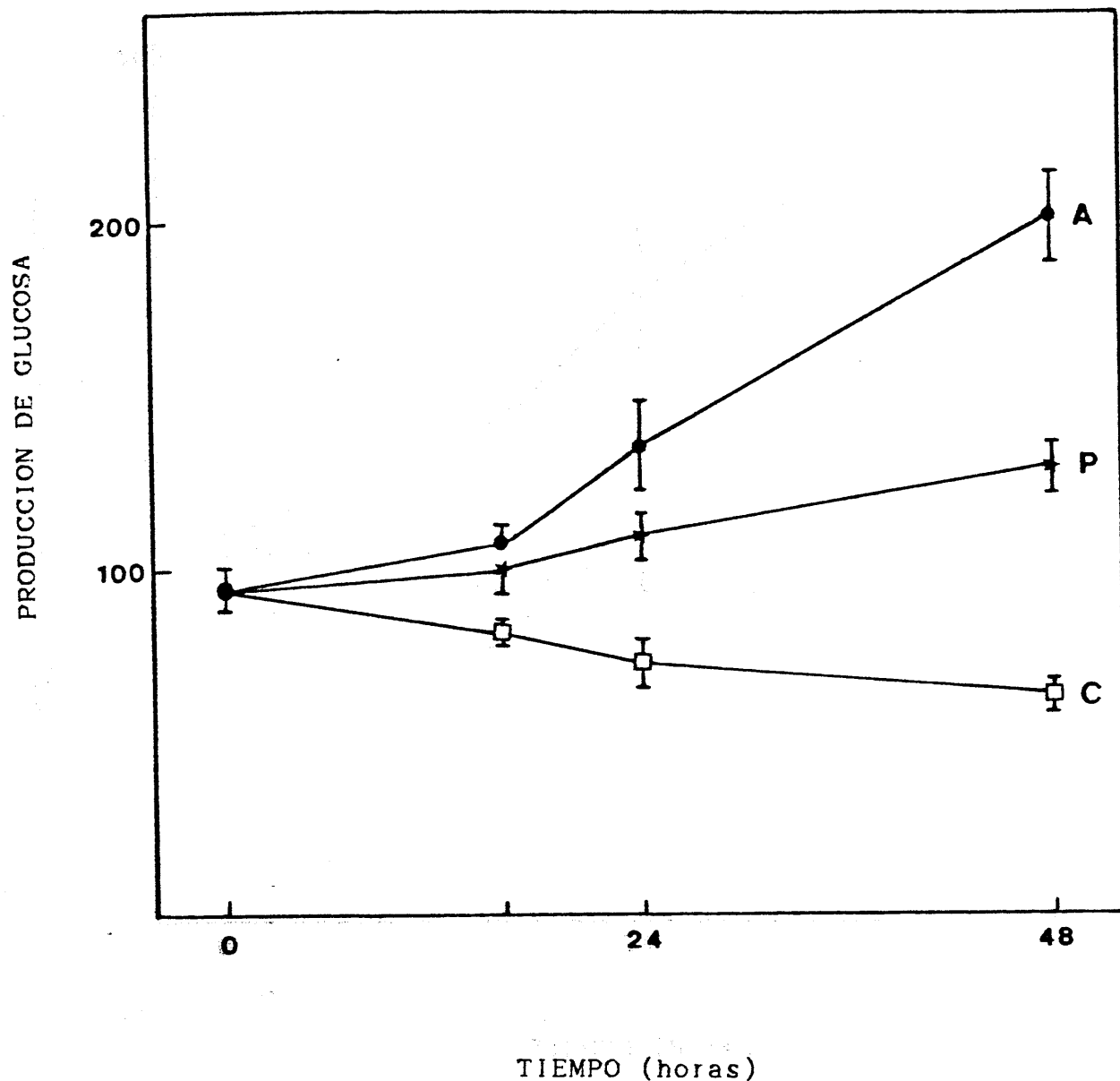
FIGURA 12



EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA CAPACIDAD GLUCOLITICA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los datos correspondientes a cada fracción del túbulo renal se representan como porcentajes de la capacidad glucolítica total.

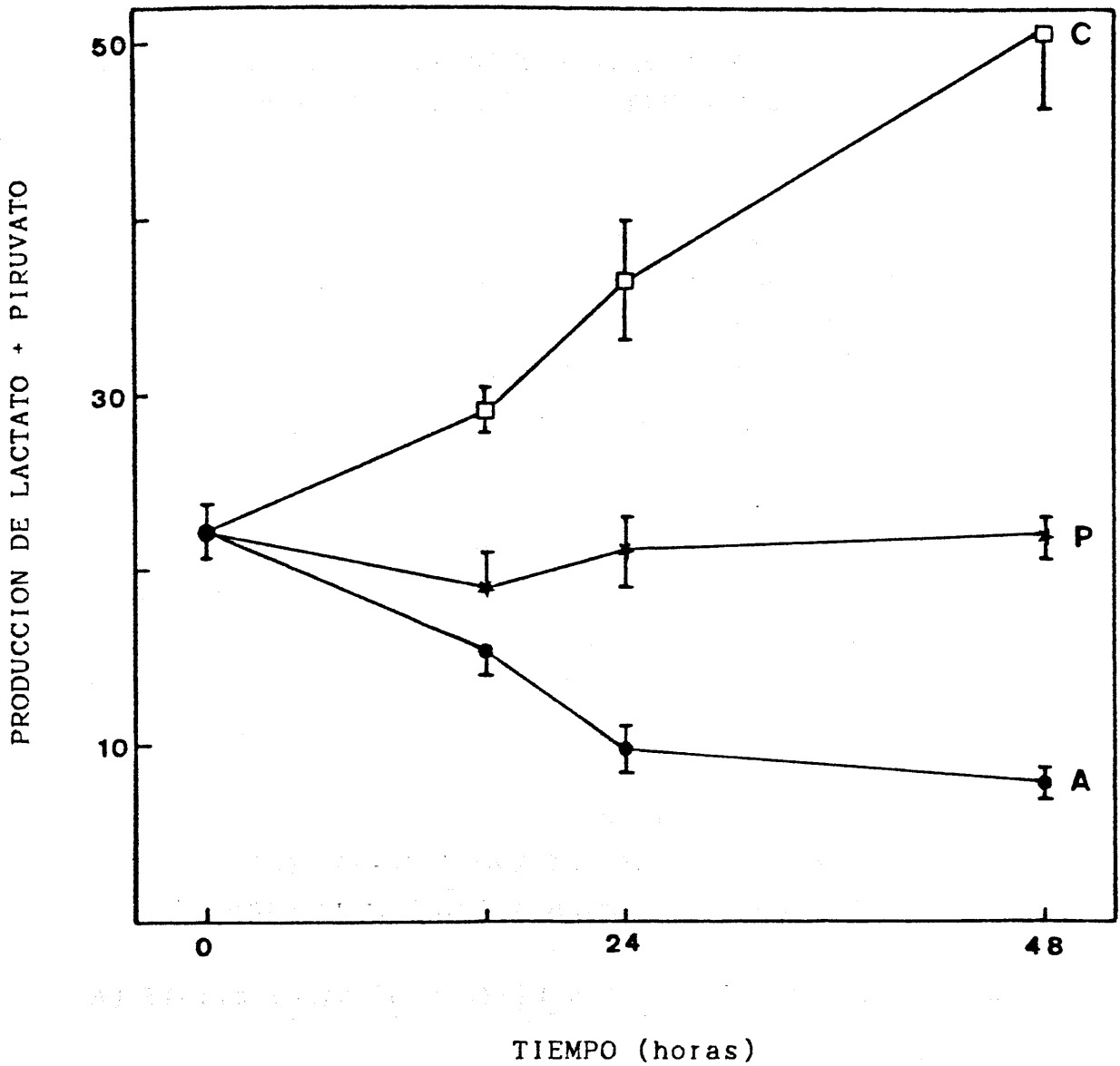
□ Fracción de túbulos distales. ▒ Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 13



EFFECTO DE DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES SOBRE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA DE LA FRACCION DE TUBULOS PROXIMALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los resultados se expresan en μ moles de glucosa /hora de incubación/gramo de tejido seco. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (C): dieta alta en carbohidratos; (P): dieta alta en proteínas; (A): ayuno.

FIGURA 14



EFFECTO DE DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES SOBRE LA CAPACIDAD GLUCOLITICA DE LA FRACCION DE TUBULOS DISTALES A LO LARGO DEL TIEMPO. Los resultados se expresan en nmoles de lactato-piruvato /hora de incubación/mg de tejido seco. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (C): dieta alta en carbohidratos; (P): dieta alta en proteínas; (A): ayuno.

3.2.- EFECTO DE DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES SOBRE ENZIMAS REGULADORES DEL FLUJO GLUCONEOGENICO Y GLUCOLITICO

Los enzimas del metabolismo glucídico que se han analizado paralelamente a las capacidades gluconeogénica y glucolítica, han sido : la Fructosa 1,6-bisfosfatasa (D-fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase, E.C.3.1.3.11); Fosfofructoquinasa (ATP-D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase, E.C.2.7.1.11); y Piruvato quinasa (ATP: pyruvate 2-O-phosphotransferase, E.C.2.7.1.40).

Cada uno de estos enzimas se ha medido a dos concentraciones de sustrato, una subsaturante, que ha sido estimada después de realizar la cinética del enzima, y otra saturante, considerada como la correspondiente a la velocidad máxima.

3.2.1.- Efecto de una dieta alta en carbohidratos sobre las actividades FBPasa, PFK y PK de las fracciones de túbulos renales a lo largo del tiempo.

A) Efecto sobre la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa

La actividad de un enzima gluconeogénico, fructosa 1,6-bisfosfatasa, presenta a velocidad subsaturante de sustrato (0,01 mM) en la fracción de túbulos proximales de corteza renal, una inhibición significativa a lo largo del tiempo por acción de una dieta alta en carbohidratos, mientras que no se observan cambios a velocidad máxima, correspondiente a una concentración de fructosa 1,6-bisfosfato de 0,1 mM (tabla 4).

En la figura 15 se han representado únicamente las actividades a velocidad subsaturante, puesto que como se ha mencionado anteriormente no se observaron cambios a velocidad máxima durante toda la experiencia (48 horas).

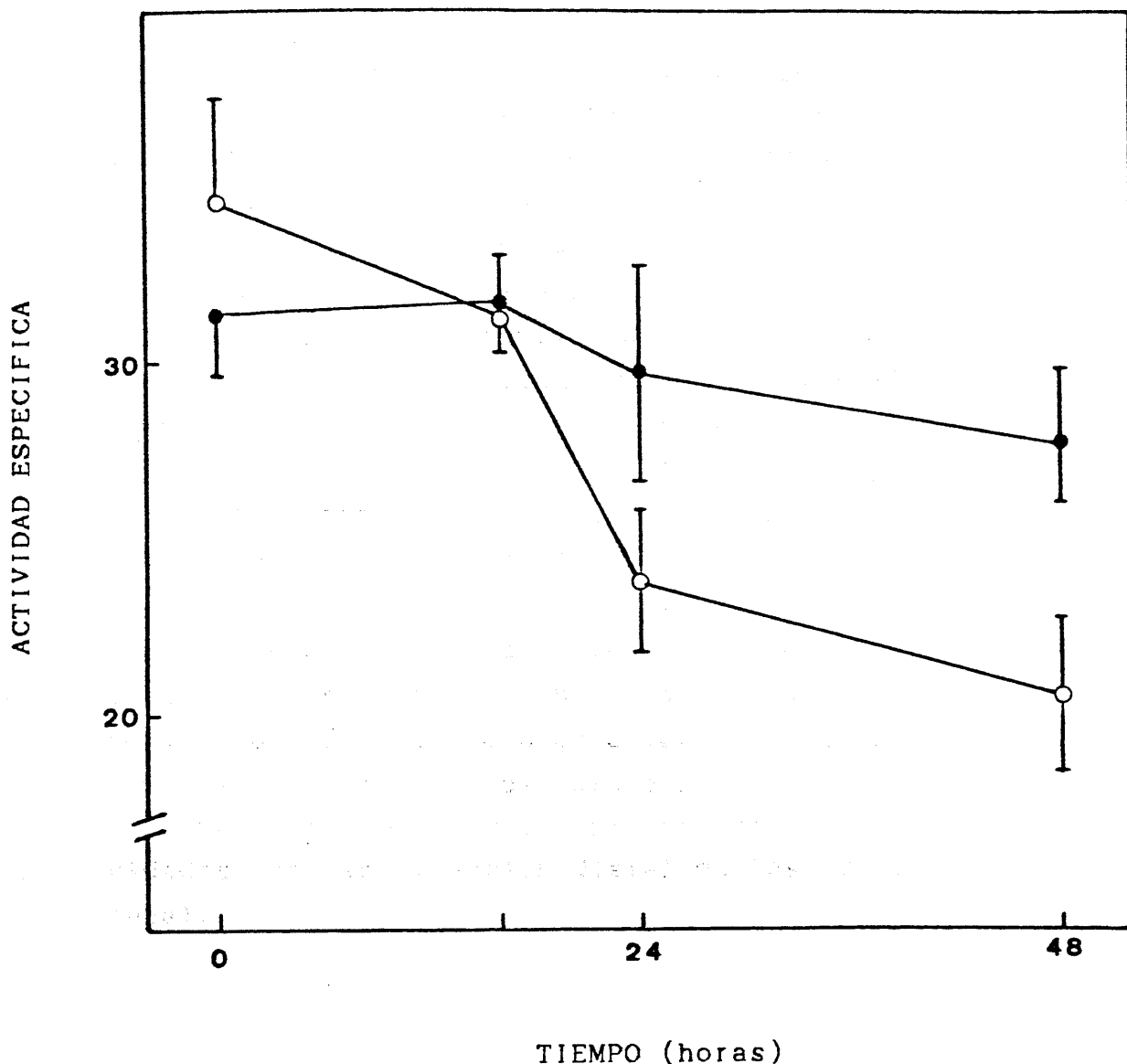
TABLA 4

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
Vss	31,44±1,75 (9)	31,77±1,23 (3)	29,74±3,00 (6)	27,78±1,97 (6) *
F3				
Vmax	140,65±10,80 (10) **	132,62±11,23 (3) *	137,28±7,30 (8)	134,81±7,10 (6)
Vss	34,56±2,97 (9)	31,41±1,13 (3)	23,81±2,07 ^a (6)	20,31±2,30 ^b (7)
F4				
Vmax	177,07±9,81 (10)	176,99±4,77 (3)	162,58±11,64 (6)	159,44±10,61 (6)

La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. El ± representa el error estándar de la media y el nº de observaciones se indica entre paréntesis. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0,01 mM) y saturante (0,1 mM) de sustrato (velocidad máxima). F3 y F4 representan a las fracciones de túbulo distales y proximales respectivamente. El grado de significancia P respecto a los valores de 0 horas se representa como: a) P<0,02 y b) P<0,005. Y de la fracción 3 respecto a la fracción 4 como: *) P<0,05; **) P<0,02.

FIGURA 15

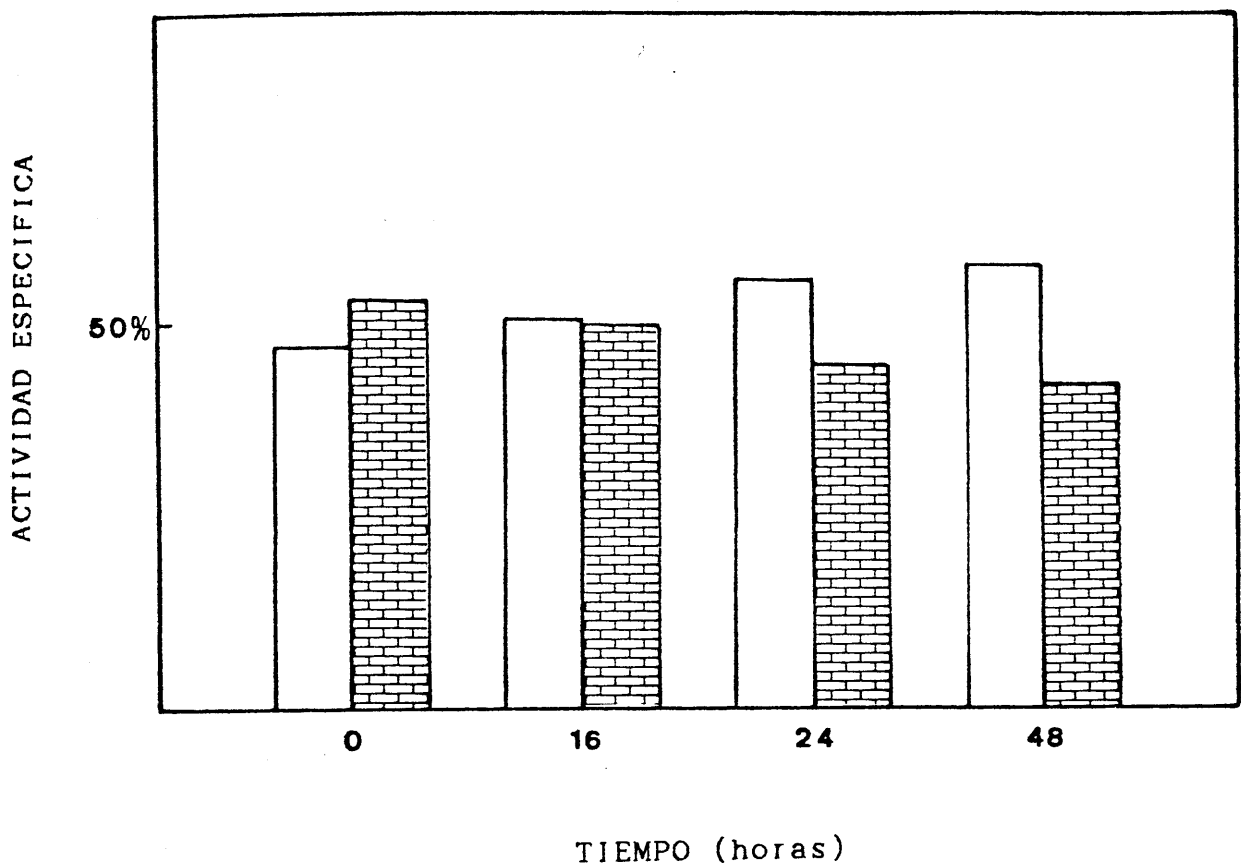


EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Las barras verticales indican el error estándar de la media. Los valores representados corresponden a la velocidad subsaturante. (●) Fracción de túbulos distales; (○) Fracción de túbulos proximales.

La fracción de túbulos distales presenta también una gran actividad fructosa bisfosfatasa, al igual de lo que ocurría con la capacidad gluconeogénica. En la figura 16 se representan los porcentajes de cada una de las fracciones de túbulos con respecto a la actividad total. Se puede observar que a lo largo del tiempo disminuye la actividad de este enzima en la fracción proximal hasta alcanzar una diferencia respecto a la fracción distal y al principio de la experiencia (0 horas), del orden del 350%.

Como puede verse en la tabla 5 y figura 17, la relación entre las velocidades subsaturante y máxima $[(V_{0,01}/V_{max}) \times 100]$ en la fracción de túbulos proximales va disminuyendo a lo largo del tiempo. Esto nos indica que dicho cambio tiene lugar principalmente a velocidad subsaturante y por lo tanto no se debe a un cambio en la concentración de enzima, debido a variaciones en el proceso de síntesis/degradación de proteínas. Por otra parte, no se observan cambios significativos en la relación de velocidades en la fracción distal de los túbulos de corteza renal.

FIGURA 16

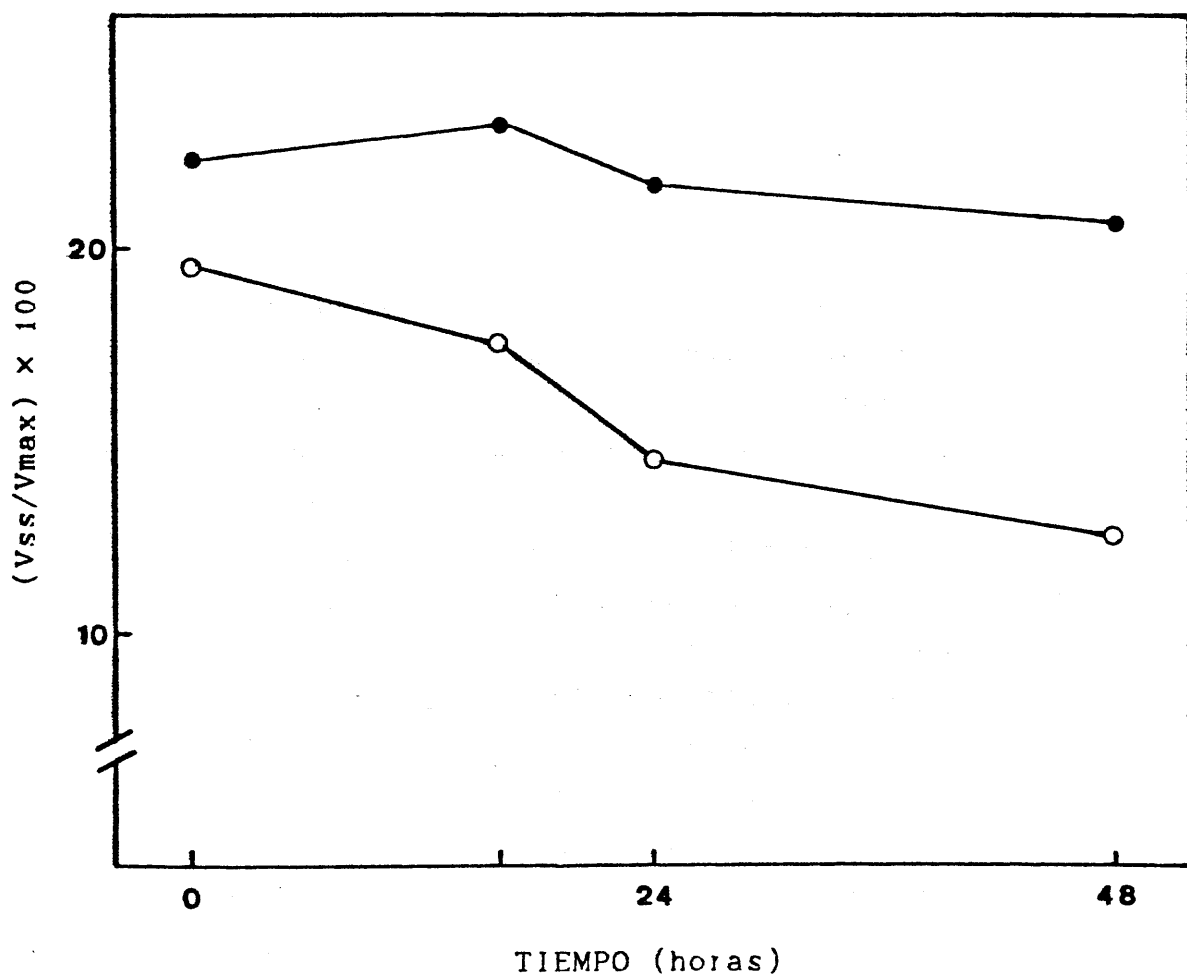


EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. El valor correspondiente a cada fracción del túbulo renal se representa como porcentaje de la actividad enzimática total a velocidad subsaturante. □ Fracción de túbulos distales. ▨ Fracción de túbulos proximales.

TABLA 5 y FIGURA 17

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO.

$(V_{\text{subsaturante}}/V_{\text{máxima}}) \times 100$				
	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
F3	22,35	23,25	21,66	20,61
F4	19,52	17,75	14,64	12,74



F3 y F4 representan a las fracciones de túbulos distales y proximales, que en la figura quedan marcados como (●) y (○).

B) Efecto sobre la actividad fosfofructoquinasa

La fosfofructoquinasa es sin lugar a dudas el enzima más importante en la regulación del proceso glucolítico (Uyeda, 1979; Goldhammer y Paradies, 1979; Van Schaftingen y col., 1981; Boiteux y Hess, 1981; Melendez-Hevia y col., 1983). Su actividad aumenta de forma muy significativa con una dieta rica en carbohidratos (tabla 6 y figura 18). El cambio tiene lugar a nivel de velocidad subsaturante (0,2 mM) y es del orden del 60% respecto al valor inicial, y solo en la fracción de túbulos distales que, como se sabe, son eminentemente glucolíticos. En ninguna de las fracciones se observan cambios en la velocidad a concentración saturante de glucosa 6-fosfato (3 mM), correspondiente a la velocidad máxima.

La diferencia de actividad entre los dos tipos de fracciones tubulares se ve claramente reflejada en la figura 18, donde se puede observar que aunque no hay excesiva diferencia a las 0 horas, ésta se hace muy marcada a las 48 horas, alcanzando un valor cercano al 100% al ir aumentando a lo largo del tiempo la actividad sólo en la fracción distal y permaneciendo constante la misma en la fracción proximal.

La figura 19 muestra el porcentaje de actividad fosfofructoquinasa a concentración subsaturante correspondiente a cada fracción del túbulo renal (proximal y distal), y en relación a la actividad total. Debido al diferente comportamiento de ambas fracciones respecto a la regulación de dicha actividad, a las 48 horas la diferencia encontrada entre ambas respecto al punto inicial fue aproximadamente del orden del 100% al pasar la diferencia de ser del 15% al 32%.

La relación entre las velocidades subsaturante y máxima confirma nuestros resultados, pues a lo largo del

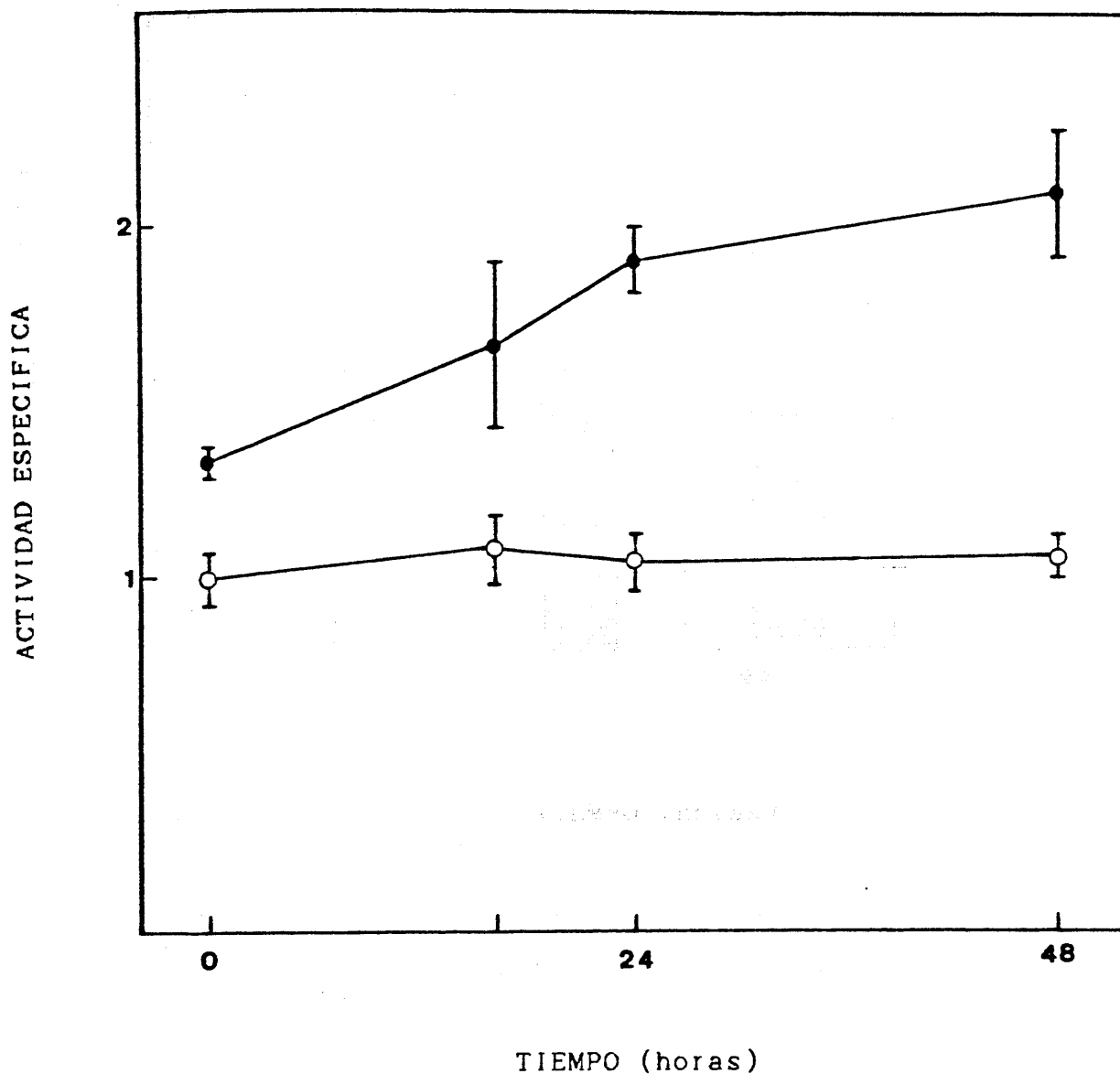
TABLA 6

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
	*	a	b)**	b)**
Vss	1,33±0,03 (9)	1,67±0,24 (3)	1,90±0,08 (7)	2,10±0,18 (6)
F3				
Vmax	16,46±0,73* (9)	16,24±0,99 (3)	15,47±0,70 (7)	15,71±0,96 (6)
Vss	1,00±0,07 (9)	1,09±0,09 (3)	1,05±0,07 (7)	1,07±0,05 (6)
F4				
Vmax	13,07±0,68 (9)	13,34±1,08 (3)	13,09±0,86 (7)	13,51±0,72 (6)

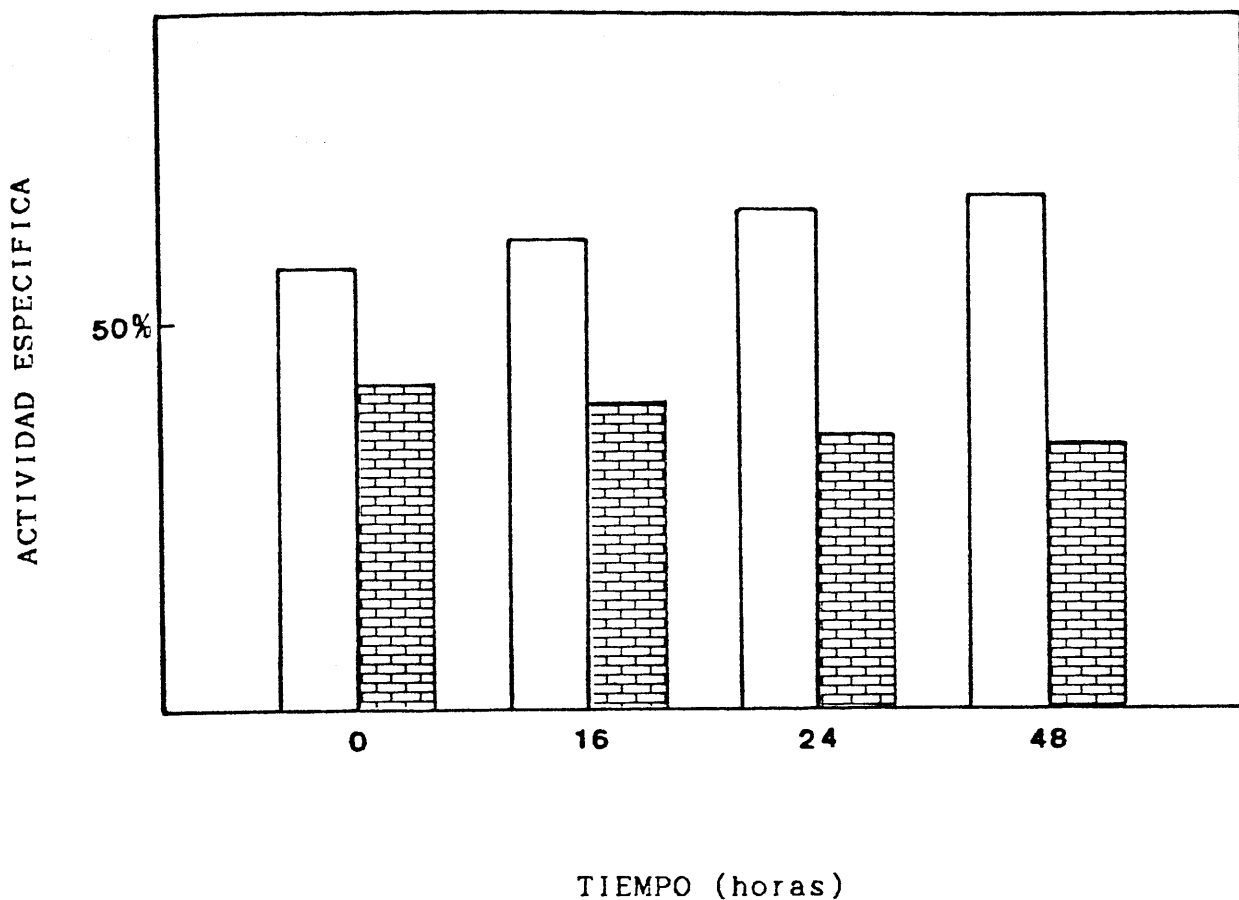
La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. El ± representa el error estándar de la media. Entre paréntesis se indica el nº de experimentos; en cada experimento se han utilizado 5 ó 6 animales. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0,2 mM) y saturante (3 mM) de sustrato (velocidad máxima). F3 y F4 representan las fracciones de túbulos distales y proximales. El grado de significancia P respecto a los valores de 0 horas se representa como: a) P<0,05; b) P<0,0002. Y de los valores de la fracción 3 respecto a la fracción 4 como: *) P<0,005; **) P<0,0005.

FIGURA 18



EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Las barras verticales indican el error estándar de la media. Los valores representados corresponden a la velocidad subsaturante. (●) Fracción de túbulo distales. (○) Fracción de túbulo proximales.

FIGURA 19



EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. El valor correspondiente a cada fracción del túbulo renal se representa como porcentaje de la actividad enzimática total a velocidad subsaturante. □ Fracción de túbulos distales. ▨ Fracción de túbulos proximales

tiempo se ve su aumento en la fracción de túbulo distales (tabla 7 y figura 20), lo que está de acuerdo con una enorme capacidad de modulación de la fosfofructoquinasa existente en dicha fracción tubular, descartando un cambio en la síntesis proteica.

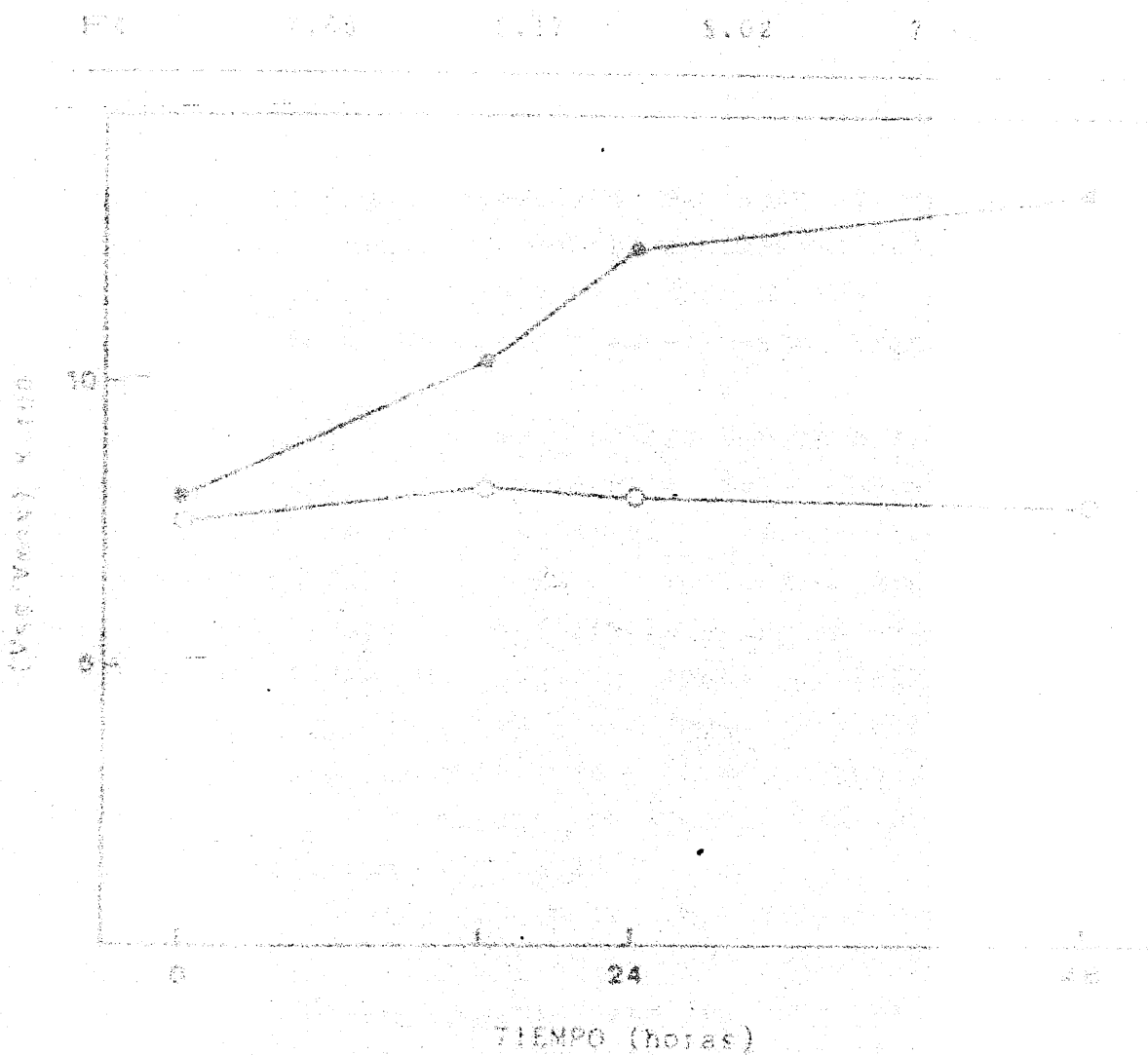
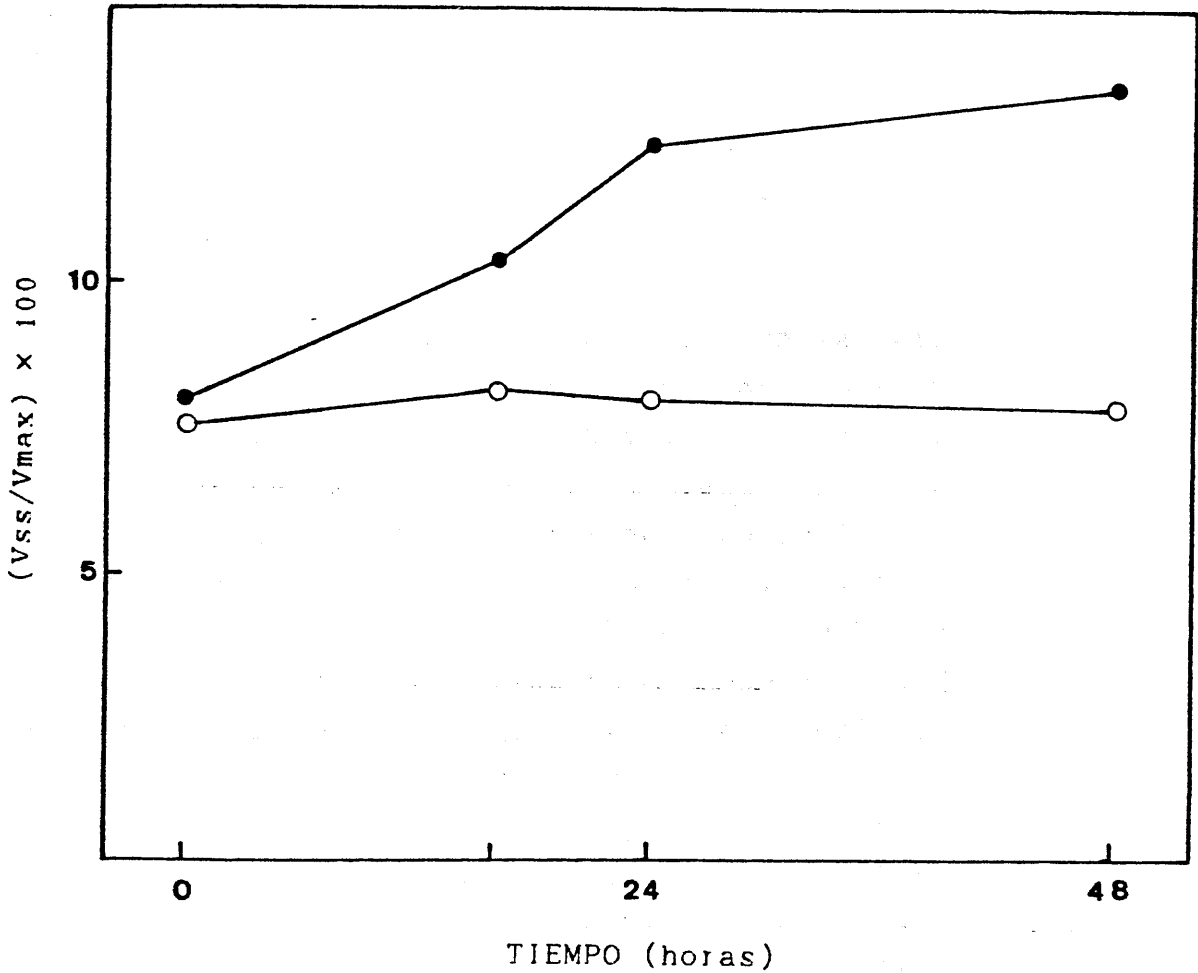


TABLA 7 y FIGURA 20

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO.

(Vsubsaturante/Vsaturante) × 100				
	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
F3	8,08	10,28	12,28	13,27
F4	7,65	8,17	8,02	7,92



F3 y F4 corresponden a las fracciones de túbulos distales y proximales, que en la gráfica figuran como (●) y (○) respectivamente.

C) Efecto sobre la actividad piruvato quinasa

El comportamiento de la piruvato quinasa, enzima clave del proceso glucolítico, frente a una dieta rica en carbohidratos, es semejante al de la fosfofructoquinasa estudiado anteriormente.

Cuando se analiza la única situación en donde existe un cambio en la actividad piruvato quinasa (velocidad a concentración subsaturante, 0,06 mM de fosfoenolpiruvato, en la porción distal del túbulo renal), se observa un aumento de dicha actividad a lo largo del tiempo respecto al valor inicial. Este aumento llega a ser del orden del 80%. El resto de las situaciones estudiadas, velocidad saturante de sustrato en la porción distal del túbulo y ambas medidas de velocidad en la porción proximal, no presenta diferencias significativas a lo largo de dicho periodo experimental (tabla 8, figura 21).

Al igual de lo que ocurría con la actividad fosfofructoquinasa, la contribución de ambas porciones del túbulo renal, distal y proximal, al flujo glucolítico por parte de la piruvato quinasa, varía divergentemente a lo largo del tiempo. La diferencia entre la contribución de ambas porciones del túbulo renal al final del tiempo experimental (48 horas) presenta un aumento del orden del 100%. Este porcentaje se obtiene de una diferencia al inicio de la experiencia (0 horas) del 24% al 44% al final de la misma (figura 22).

La relación entre las velocidades subsaturante y máxima de este enzima va aumentando a lo largo del tiempo en la fracción de túbulos distales, mientras, como era de esperar, no varía en la porción proximal (tabla 9, figura

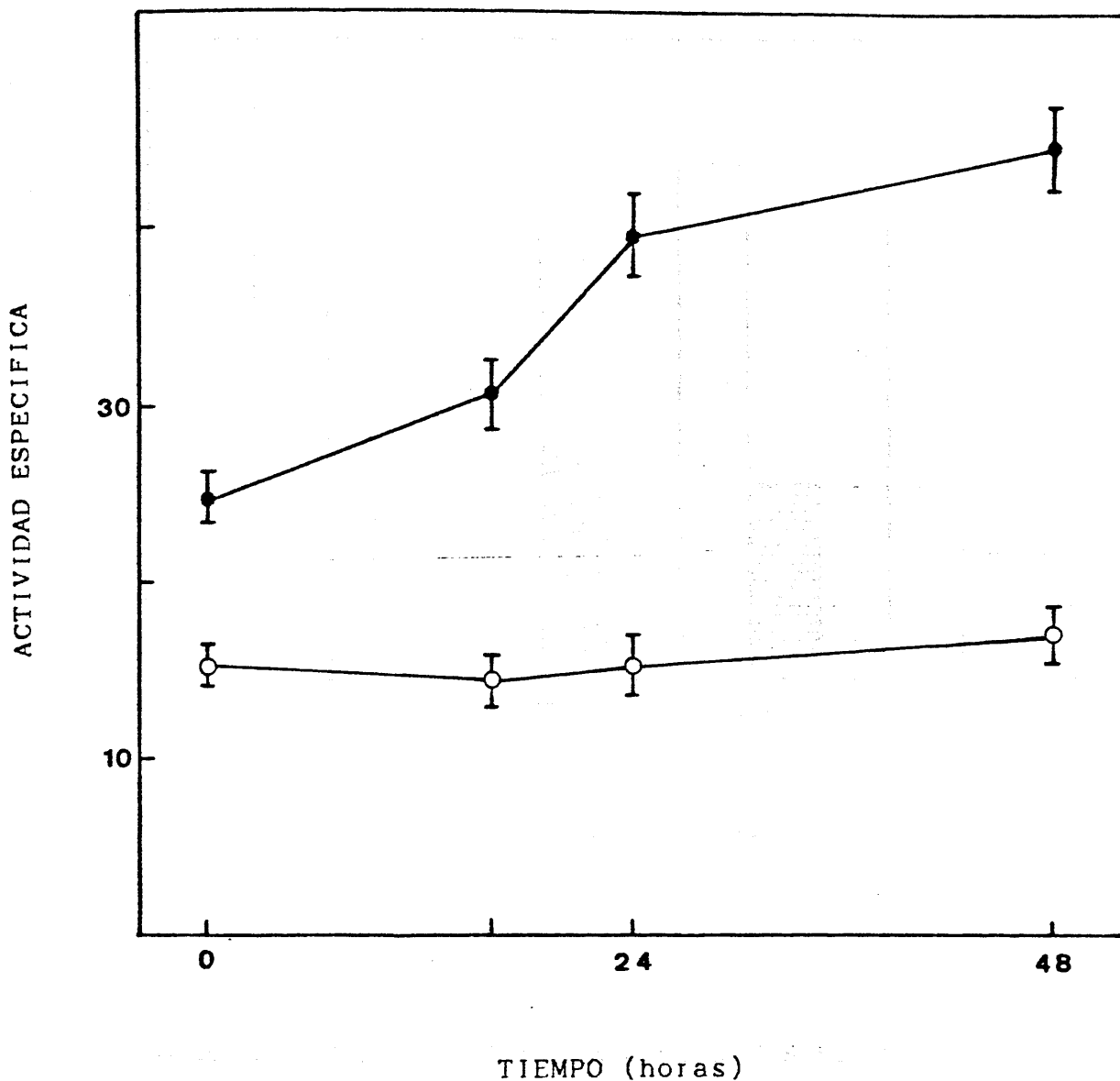
TABLA 8

EFEECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
Vss	24,83±1,24 ^{**} (11)	30,81±1,78 ^{a)*} (3)	39,83±2,51 ^{b)**} (6)	44,68±2,33 ^{b)**} (6)
F3				
Vmax	178,24±6,48 ^{**} (11)	192,86±4,59 [*] (3)	178,63±6,35 ^{**} (8)	186,33±8,28 ^{**} (8)
Vss	15,23±0,82 (11)	14,98±1,36 (3)	15,38±1,63 (6)	17,30±1,40 (6)
F4				
Vmax	110,55±5,69 (11)	119,04±3,16 (3)	109,27±7,67 (8)	108,15±4,39 (8)

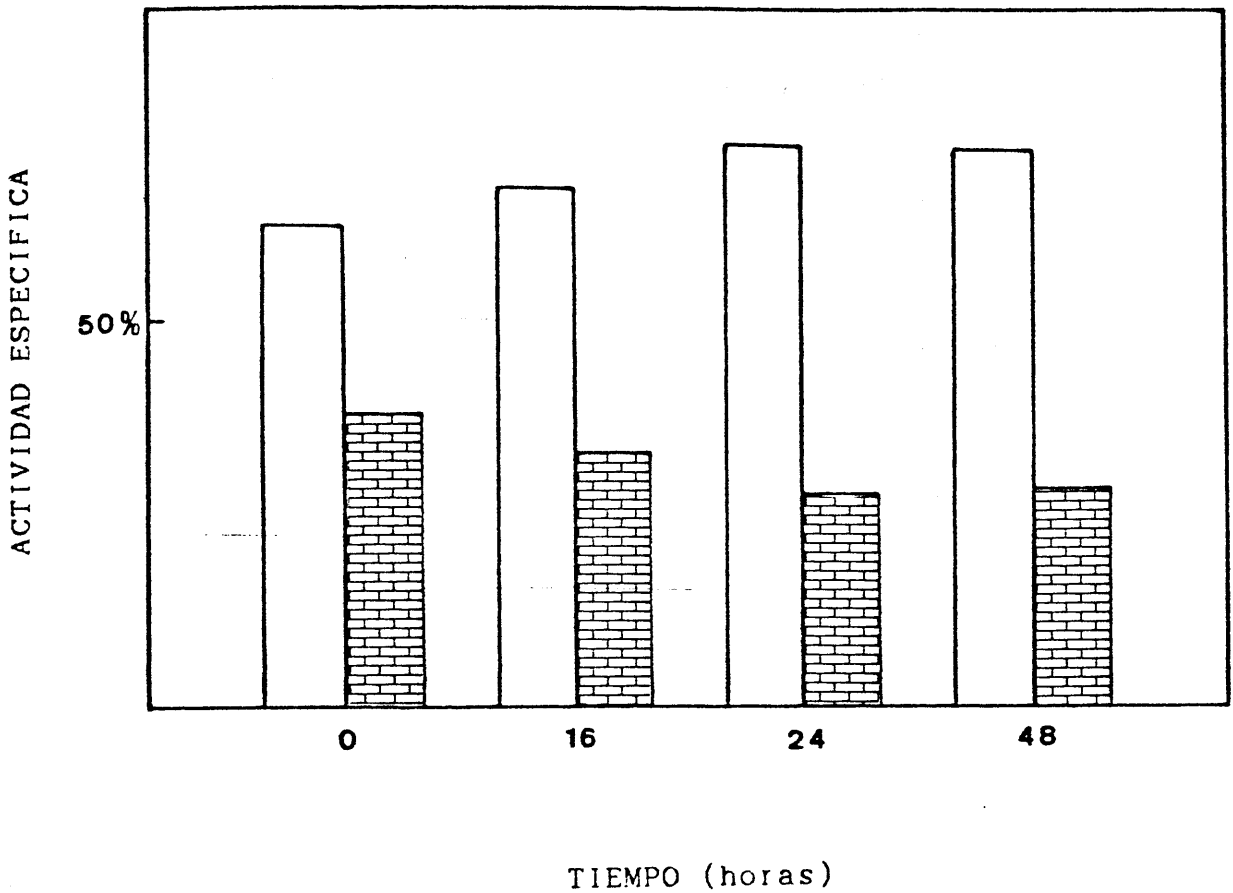
La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. El ± representa el error estándar de la media y el n° de observaciones se indica entre paréntesis. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0,06 mM) y saturante (3 mM) de sustrato (velocidad máxima). F3 y F4 representan a las fracciones de túbulo distales y proximales respectivamente. El grado de significancia P respecto a los valores de 0 horas se indica como : a) P<0,05; b) P<0,0001. Y de los valores de la fracción 3 frente a la 4 como : *) P<0,005; **)P<0,00001.

FIGURA 21



EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Los valores representados corresponden a la velocidad subsaturante. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (●) Fracción de túbulos distales. (○) Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 22

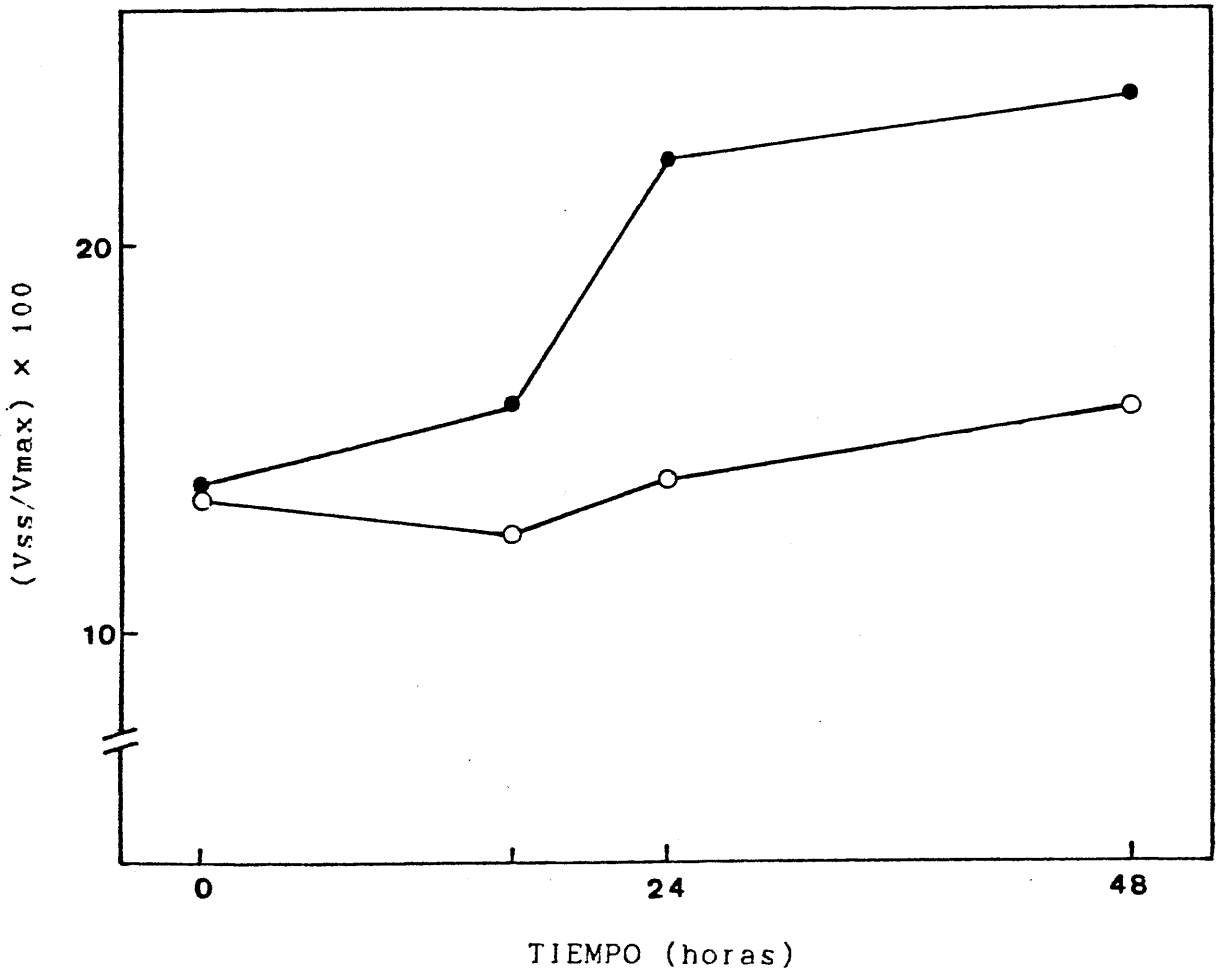


EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. El valor correspondiente a cada fracción del túbulo renal se representa como porcentaje de la actividad enzimática total a velocidad subsaturante. □ Fracción de túbulos distales. ▨ Fracción de túbulos proximales.

TABLA 9 y FIGURA 23

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

	$(V_{\text{subsaturante}}/V_{\text{máxima}}) \times 100$			
	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
F3	13,93	15,97	22,29	23,98
F4	13,77	12,58	14,07	15,99



F3 y F4 corresponden a las fracciones de túbulos distales y proximales, que en la figura se marcan como (●) y (○) respectivamente.

23). El comportamiento en este caso es semejante al encontrado y analizado por la actividad fosfofructoquinasa.

En la tabla 10 se reflejan los efectos de esta dieta alta en carbohidratos sobre todos los parámetros estudiados, indicando el porcentaje de activación o inhibición, según el caso. Tanto la formación de glucosa como la actividad del enzima gluconeogénico ensayado, fructosa 1,6-bisfosfatasa, presentan una inhibición aproximadamente del mismo orden. La glucolisis, por el contrario, se ve activada fuertemente coincidiendo prácticamente los valores de incremento en la capacidad glucolítica (99,7%) con la suma de las actividades de los dos enzimas claves del proceso, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa, (36,1+54,8), lo que demuestra un fuerte paralelismo entre el comportamiento metabólico y las actividades enzimáticas claves de dichos procesos.

TABLA 10

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS SOBRE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA, Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LA FRACCION TOTAL DEL TUBULO RENAL (F3+F4)

Dieta carbohidratos			
	0 horas	48 horas	%
Glucosa	168,30	130,71	-22,5
FBPasa	66,00	48,09	-27,1
Lac+Pir	32,14	64,18	+99,7
PFK	2,33	3,17	+36,1
PK	40,06	61,98	+54,8

Las capacidades gluconeogénica (glucosa) y glucolítica (lactato+piruvato) se calculan mediante la suma de los valores correspondientes obtenidos en ambas porciones del túbulo renal. Las actividades enzimáticas totales se han calculado tomando como base las velocidades subsaturantes en ambas fracciones tubulares.

Se indican los porcentajes de activación (+) o de inhibición (-) con respecto a las 0 horas.

3.2.2.- Efecto de una dieta alta en proteínas sobre las actividades fructosa 1,6-bisfosfatasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa de túbulo renales a lo largo del tiempo.

A) Efecto sobre la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa

La dieta alta en proteínas dió lugar a un aumento en la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa presente en la porción proximal del túbulo renal. Dicho incremento en la actividad enzimática tuvo lugar exclusivamente a nivel de la velocidad subsaturante de sustrato (fructosa 1,6-bisfosfato 0,01 mM) y fue del orden del 30%. Mientras que no se observaron cambios ni a concentración saturante de sustrato (0,1 mM), tomada como velocidad máxima, en la fracción proximal, ni a ambas concentraciones de sustrato en la fracción distal del túbulo renal (tabla 11 y figura 24). Estos resultados, cualitativamente son semejantes y evolucionaron paralelamente a los encontrados para la formación de glucosa bajo las mismas condiciones nutricionales. Atendiendo a los valores encontrados a velocidad máxima en ambas fracciones del túbulo renal, se puede afirmar que la concentración de fructosa 1,6-bisfosfatasa fue significativamente mayor en la porción proximal en un valor aproximado al 30% (tabla 11).

La figura 25 representa los porcentajes de actividad a concentración subsaturante de sustrato correspondientes a cada fracción tubular respecto a la actividad total (suma de ambas actividades). Se puede observar como el porcentaje de participación a la actividad enzimática total en la porción proximal del túbulo, va aumentando a lo largo del tiempo hasta alcanzar una diferencia del orden del 100% como consecuencia del aumento progresivo de esta actividad sin cambios en la correspondiente a la porción

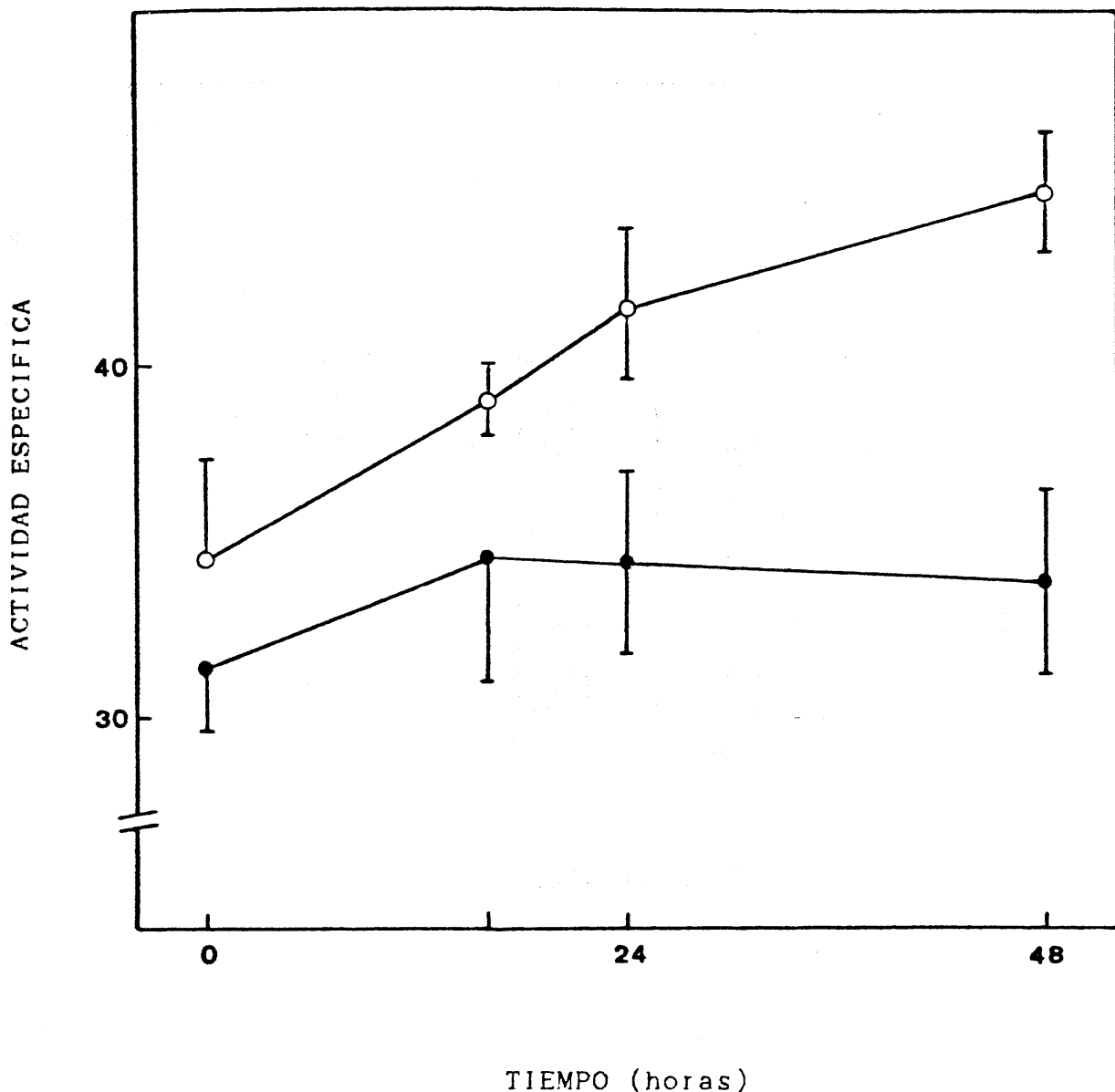
TABLA 11

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
Vss	31,44±1,75 (9)	34,70±3,79 (3)	34,40±2,67* (7)	33,90±2,56** (6)
F3				
Vmax	140,65±10,80* (10)	135,86±4,86* (3)	139,10±9,81* (7)	132,99±10,03* (7)
Vss	34,56±2,97 (9)	39,02±0,81 (3)	41,63±2,00 (8)	44,94±1,61 ^a (6)
F4				
Vmax	177,07±9,18 (10)	177,64±13,54 (3)	176,07±10,40 (8)	177,33±13,28 (7)

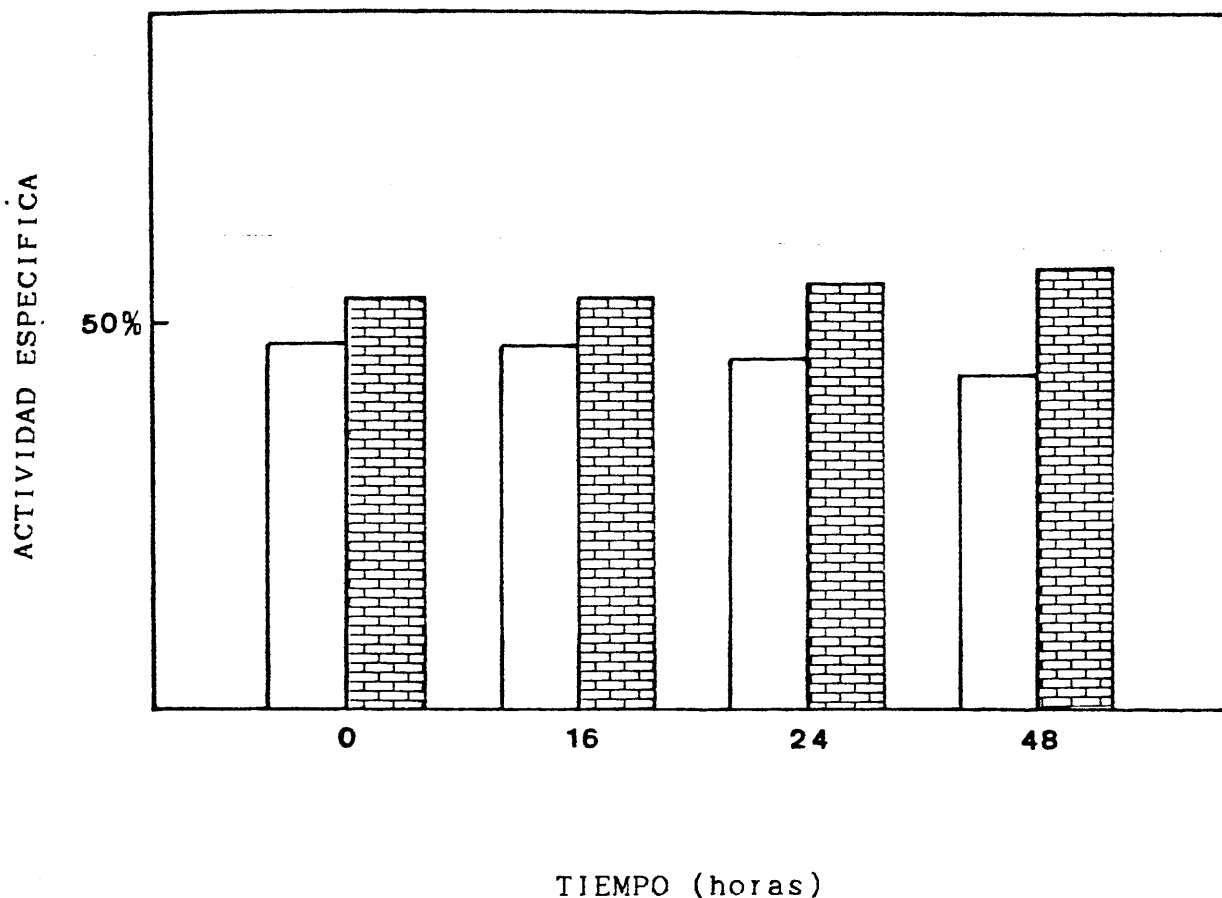
La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. El ± representa el error estándar de la media. Entre paréntesis se indica el número de experimentos; en cada experimento se han utilizado los riñones de 5 ó 6 animales. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0,01 mM) y saturante (0,1 mM) de sustrato. F3 y F4 representan las fracciones de túbulo distales y proximales respectivamente. El grado de significancia P respecto a los valores de 0 horas se expresa como : a) P<0,02. Y de los valores de la fracción 3 respecto a los de la fracción 4 como: *) P<0,05; **) P<0,00001.

FIGURA 24



EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína/ Los valores representados corresponden a la velocidad subsaturante. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (●)Fracción de túbulos distales. (○) Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 25



EFEECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1.6-BISFOSFATASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. El valor correspondiente a cada fracción del túbulo renal se representa como porcentaje de la actividad enzimática total a velocidad subsaturante. □ Fracción de túbulo distales. ▤ Fracción de túbulo proximales.

distal.

Finalmente, la tabla 12 y figura 26 representan los valores correspondientes a la relación entre la velocidad subsaturante respecto a la velocidad máxima, $(V_{ss}/V_{max}) \times 100$, parámetro cinético que aporta un dato importante acerca del tipo de mecanismo de control que opera en los cambios adaptativos que sufre la actividad enzimática. Se puede observar que mientras dicha relación no cambia a lo largo del tiempo en la fracción distal, sí lo hace y de forma progresiva en la porción proximal del túbulo renal alcanzándose una diferencia del orden del 30%.

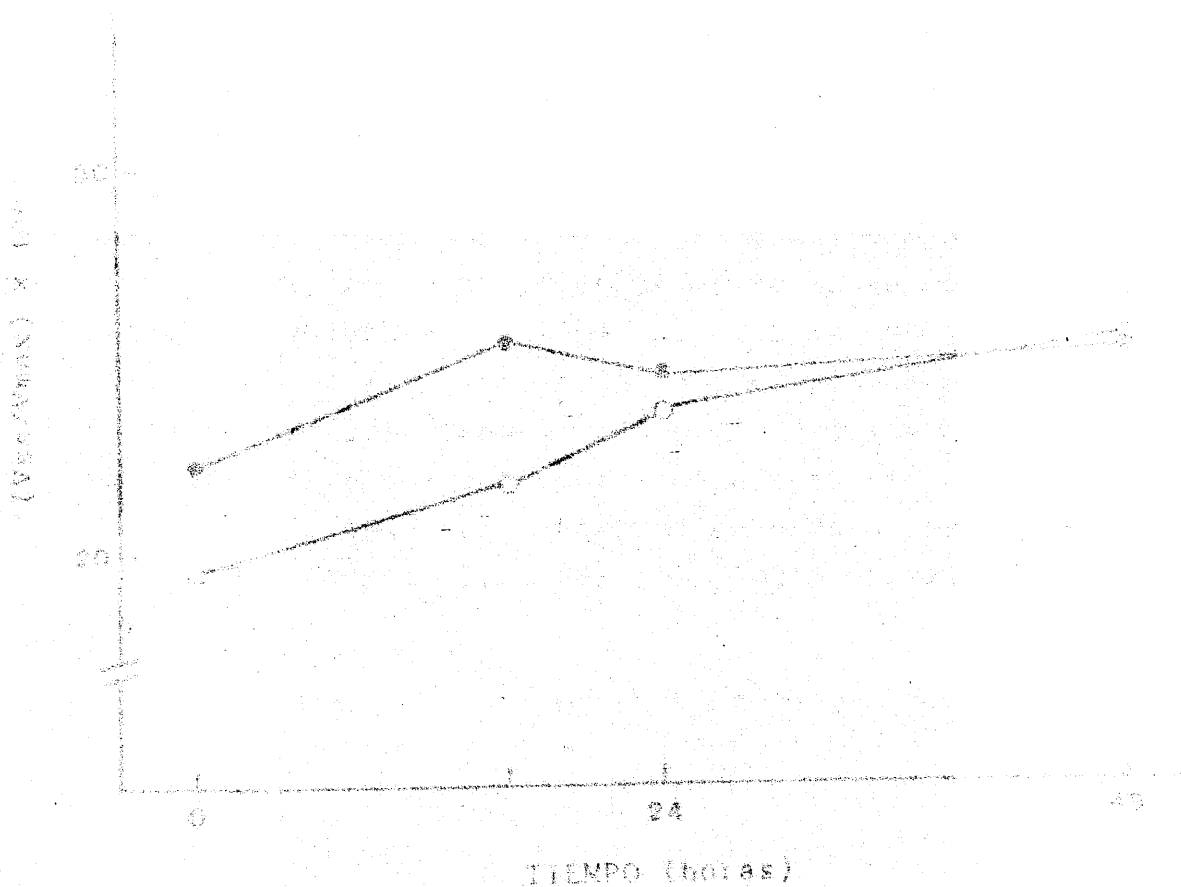
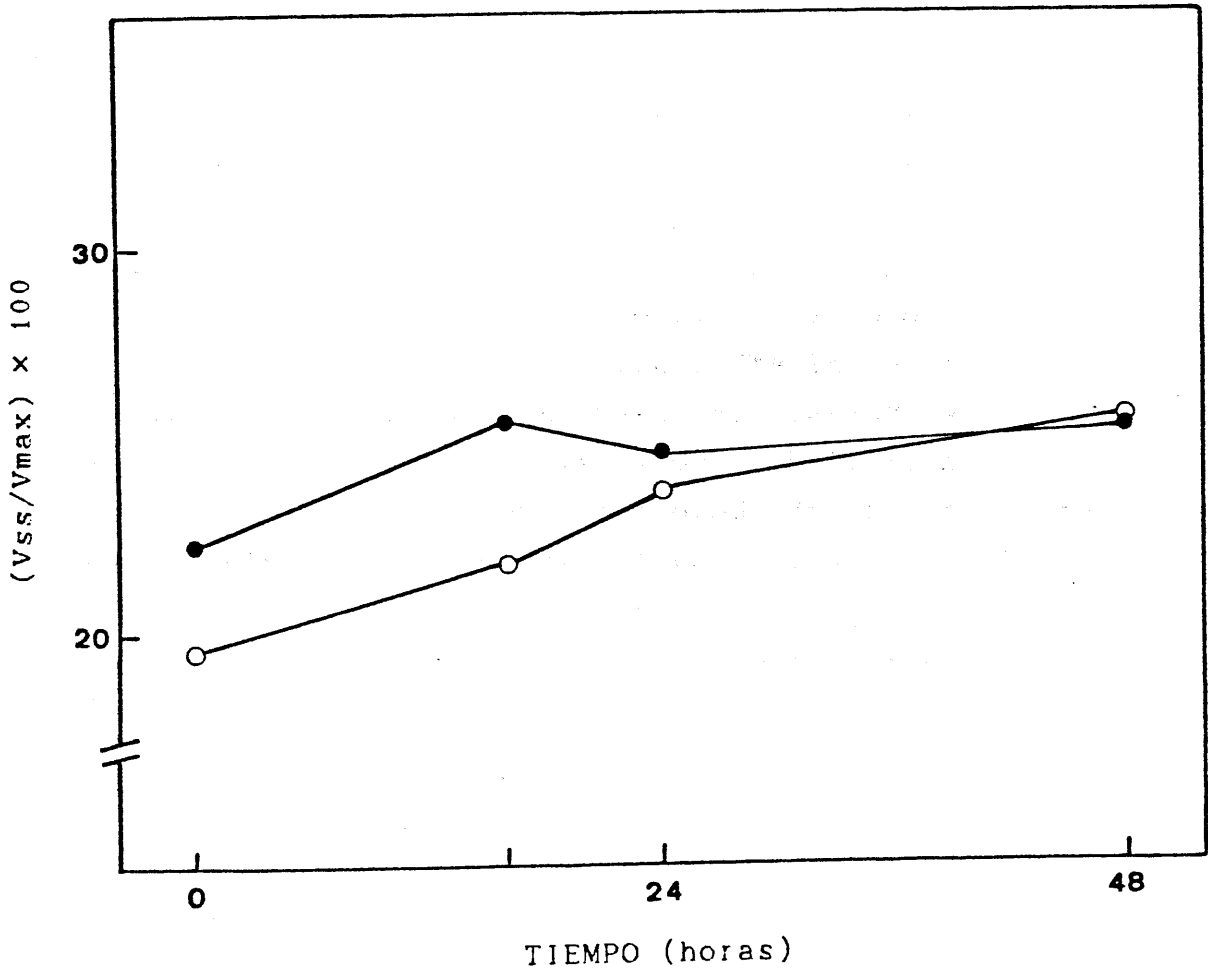


TABLA 12 y FIGURA 26

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

(Vsubsaturante/Vmáxima) × 100				
	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
F3	22,35	25,54	24,73	25,30
F4	19,52	21,96	23,64	25,34



F3 y F4 corresponden a las fracciones de túbulos distales y proximales respectivamente, en la gráfica figuran como (●) y (○).

B) Efecto sobre la actividad fosfofructoquinasa

Una dieta alta en proteínas produce sobre la actividad fosfofructoquinasa cambios similares a los producidos por una dieta alta en carbohidratos. Existe un aumento de la actividad PFK a concentración subsaturante de sustrato (glucosa 6-fosfato 0,2 mM) y a nivel de la fracción de túbulos distales. Este aumento llega a ser significativo incluso a las 16 horas del comienzo de la dieta, alcanzándose un incremento del orden del 60% al final del experimento, 48 horas (tabla 13 y figura 27).

En la figura 28, donde se representan los porcentajes correspondientes a cada fracción del túbulo renal con respecto a la actividad total, siempre calculados a partir de las velocidades obtenidas a concentración subsaturante, se puede observar que si bien a las 0 horas la diferencia entre ambos porcentajes es pequeña, de un 14%, al final del experimento (48 horas) esta diferencia se hace de un 35%, lo que supone un aumento final del orden del 150%.

Asimismo, la relación entre la velocidad subsaturante y velocidad máxima se va elevando a lo largo del tiempo en la fracción distal del túbulo renal, llegándose a alcanzar un incremento del orden del 50% a las 48 horas de someter a los animales a una dieta rica en proteínas. Por otra parte, no se observan cambios en esta relación a nivel del segmento proximal del túbulo distal (tabla 14 y figura 29).

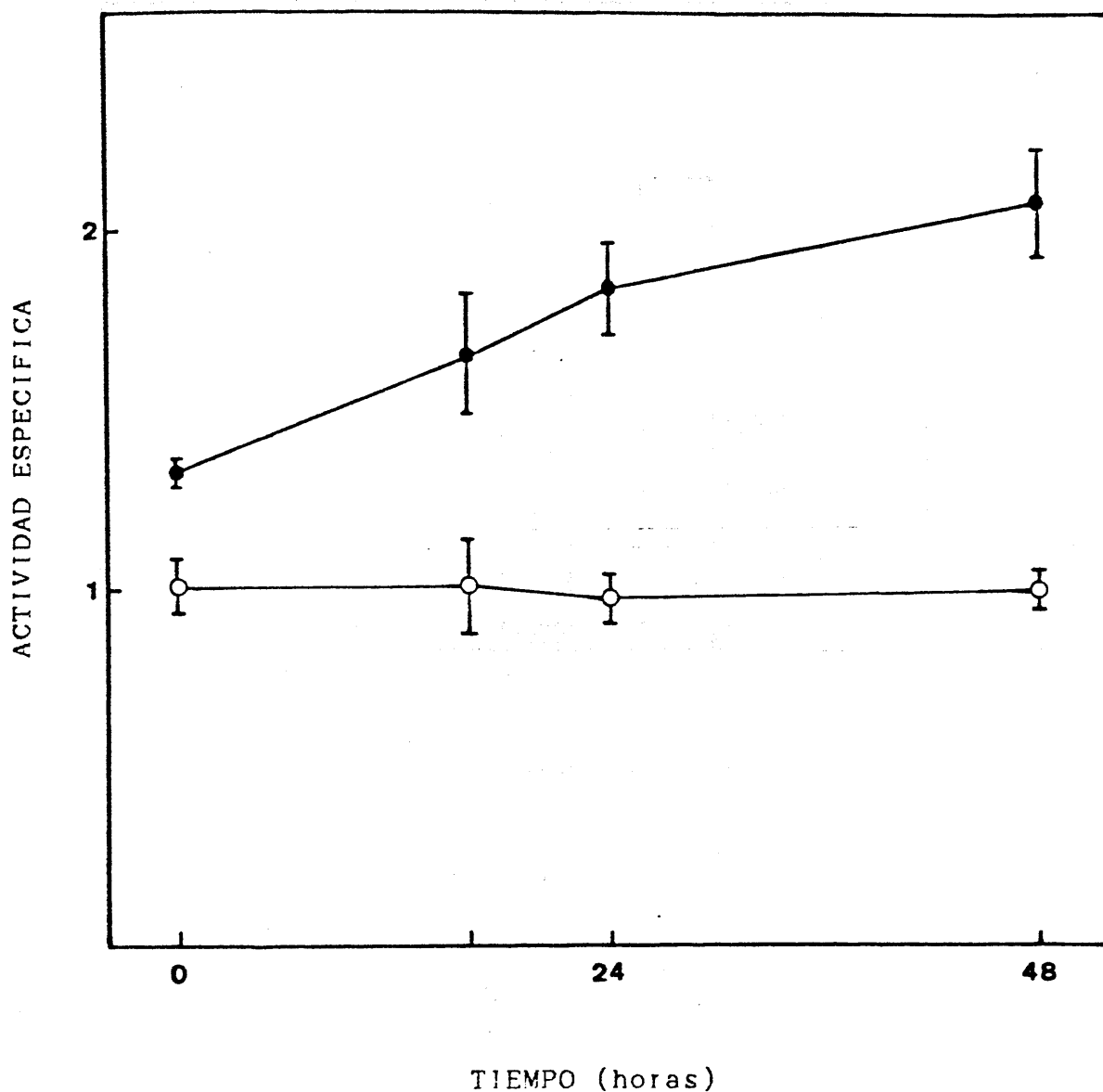
TABLA 13

EFECTO DE UNA DIETA RICA EN PROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO.

	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
	**	a)*	b)***	c)***
Vss	1,33±0,03 (9)	1,64±0,16 (3)	1,83±0,12 (8)	2,07±0,14 (7)
F3				
	*		*	**
Vmax	16,46±0,73 (9)	17,55±1,19 (3)	16,73±0,85 (8)	16,93±0,81 (7)
Vss	1,00±0,07 (9)	1,01±0,13 (3)	0,97±0,06 (8)	0,99±0,05 (7)
F4				
Vmax	13,07±0,68 (9)	14,67±1,01 (3)	13,57±0,84 (8)	12,63±0,43 (7)

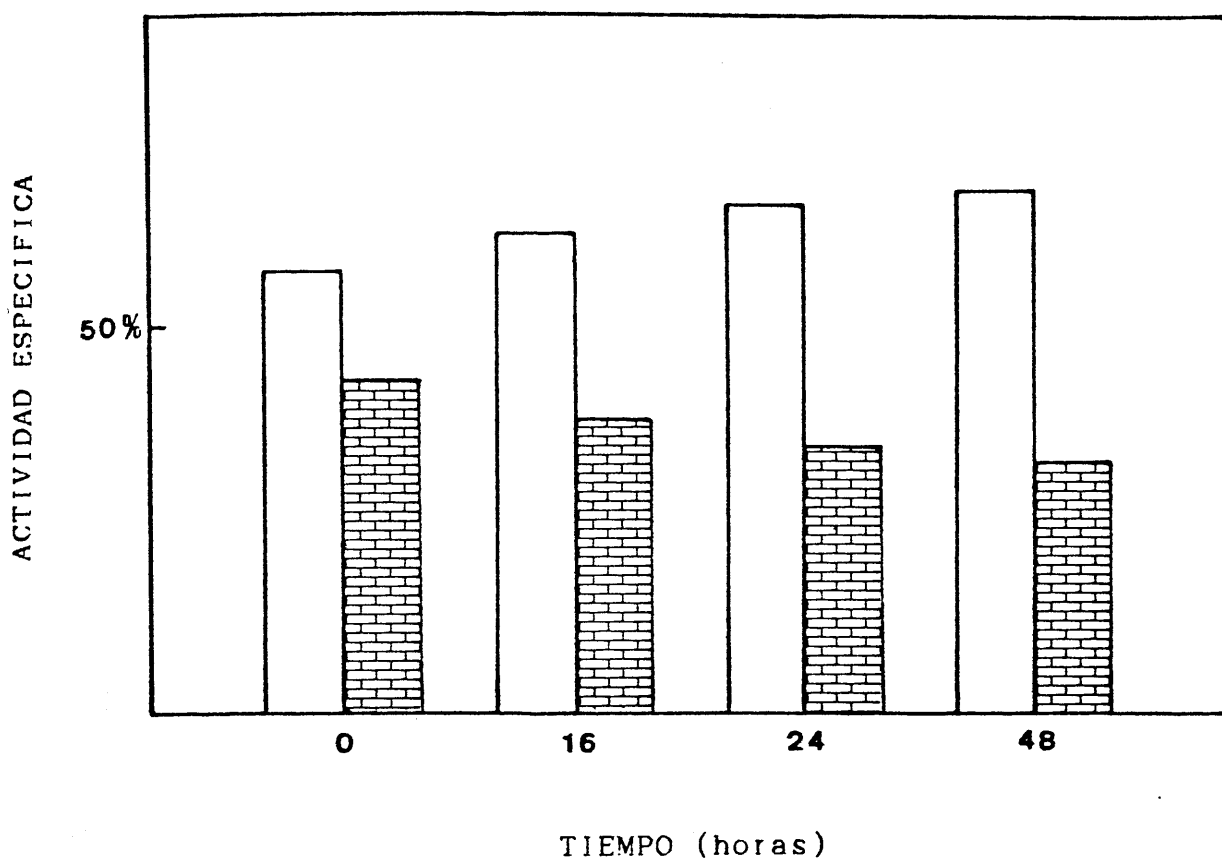
La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. El ± representa el error estándar de la media y entre paréntesis se indica el nº de experimentos. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0,2 mM) y saturante (3 mM) de sustrato. F3 y F4 representan a las fracciones de túbulos distales y proximales respectivamente. El grado de significancia P con respecto a los valores a las 0 horas se indica como: a) P<0,02; b) P<0,001; c) P<0,0001. Y de los valores de la fracción 3 con respecto a la 4 como: *) P<0,05; **) P<0,001; ***) P<0,00001.

FIGURA 27



EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Se representan los valores correspondientes a la velocidad subsaturante. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (●) Fracción de túbulos distales. (○) Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 28

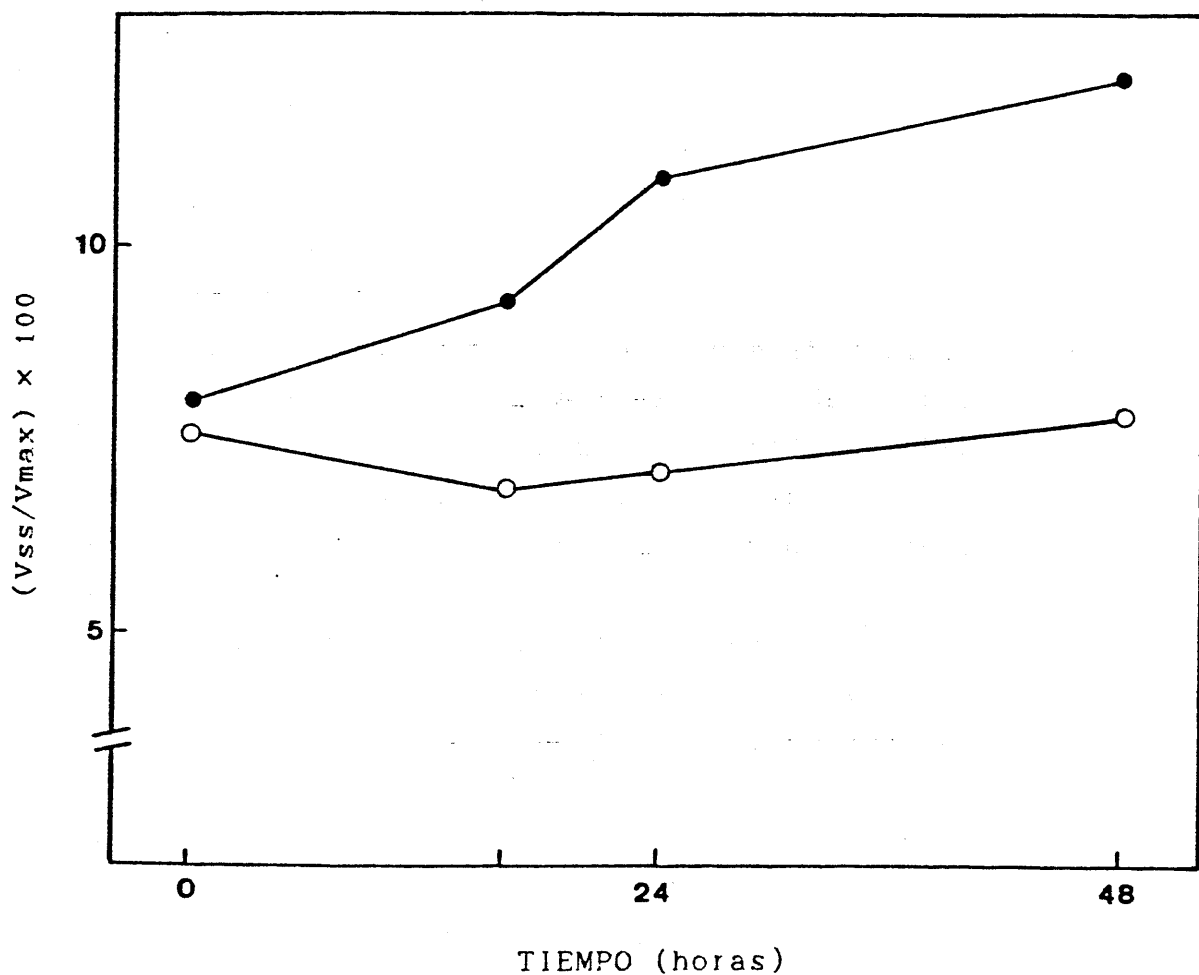


EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. El valor correspondiente a cada fracción del túbulo renal se representa como porcentaje de la actividad enzimática total a velocidad subsaturante. □ Fracción de túbulos distales. ▨ Fracción de túbulos proximales.

TABLA 14 y FIGURA 29

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

$(V_{\text{subsaturante}}/V_{\text{máxima}}) \times 100$				
	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
F3	8,08	9,34	10,94	12,22
F4	7,65	6,88	7,15	7,84



F3 y F4 corresponden a las fracciones de túbulos distales y proximales respectivamente, que en la figura quedan marcadas como (●) y (○).

C) Efecto de una dieta rica en proteínas sobre la piruvato quinasa

La actividad piruvato quinasa de corteza renal presenta un comportamiento semejante al de la fosfofructoquinasa en el mismo tejido, tras someter a los animales a una dieta alta en proteínas durante un periodo experimental de 48 horas. Sin embargo, estos efectos, se diferencian en aspectos cualitativos y cuantitativos. Cuando se analiza el comportamiento de la actividad de este enzima en la porción distal del túbulo renal, se observa que tanto la velocidad del enzima a concentración subsaturante de sustrato (fosfoenolpiruvato 0,06 mM), como la velocidad máxima, obtenida a concentración saturante de fosfoenolpiruvato (3 mM), aumenta significativamente al final del periodo experimental. En condiciones subsaturantes de sustrato el incremento llega a ser del 80%, mientras que a velocidad máxima la actividad aumenta en un 35%. Por otra parte, no se manifiestan cambios en la actividad del enzima en el segmento proximal del túbulo (tabla 15 y figura 30).

Analizando las actividades del enzima en ambas fracciones del túbulo renal (F3 + F4), se observa que a lo largo de la experiencia el contenido de piruvato quinasa en la porción proximal es del orden de un 40-50% menor que en la distal (tabla 15).

Los cambios que tienen lugar en la actividad piruvato quinasa a nivel de ambas porciones del túbulo renal, explican un incremento en la participación de la zona distal frente a la proximal y respecto a la actividad total de este enzima en la corteza renal (figura 31). Como se puede observar este incremento alcanza, al final del periodo experimental, un valor del 100%.

Los valores correspondientes a la relación entre la velocidad a concentraciones celulares de sustrato y velo-

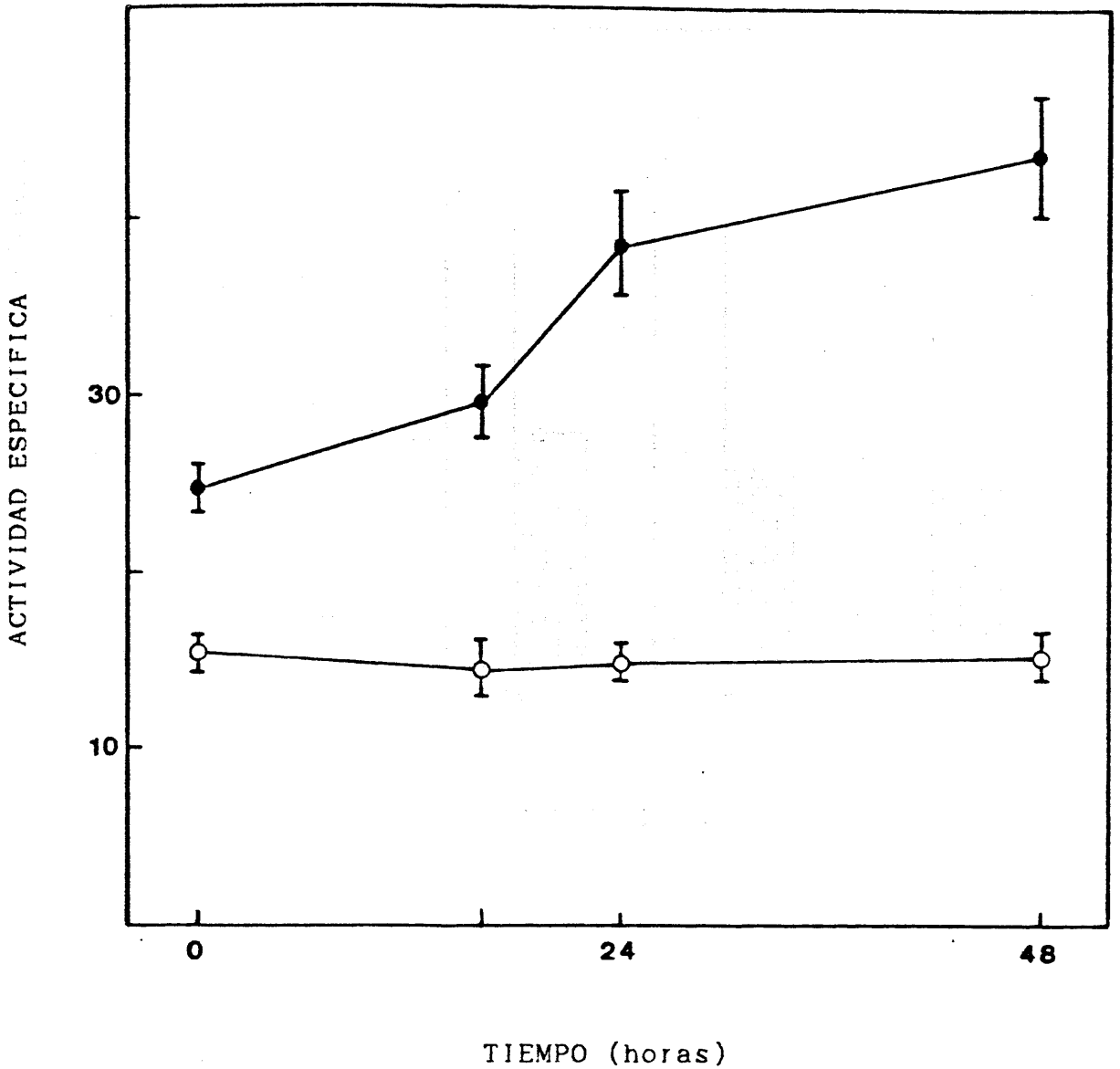
TABLA 15

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO.

	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
	**	*	b)**	c)**
Vss	24,83±1,24 (11)	29,44±2,12 (3)	38,44±2,61 (7)	43,87±3,37 (8)
F3				
	**	*	*	a)**
Vmax	178,24±6,48 (11)	186,00±7,87 (3)	199,89±17,09 (7)	237,84±16,62 (8)
Vss	15,23±0,82 (11)	14,50±1,44 (3)	14,97±0,81 (7)	15,09±1,09 (8)
F4				
Vmax	110,55±5,69 (11)	117,30±1,38 (3)	110,04±6,91 (7)	108,27±5,82 (8)

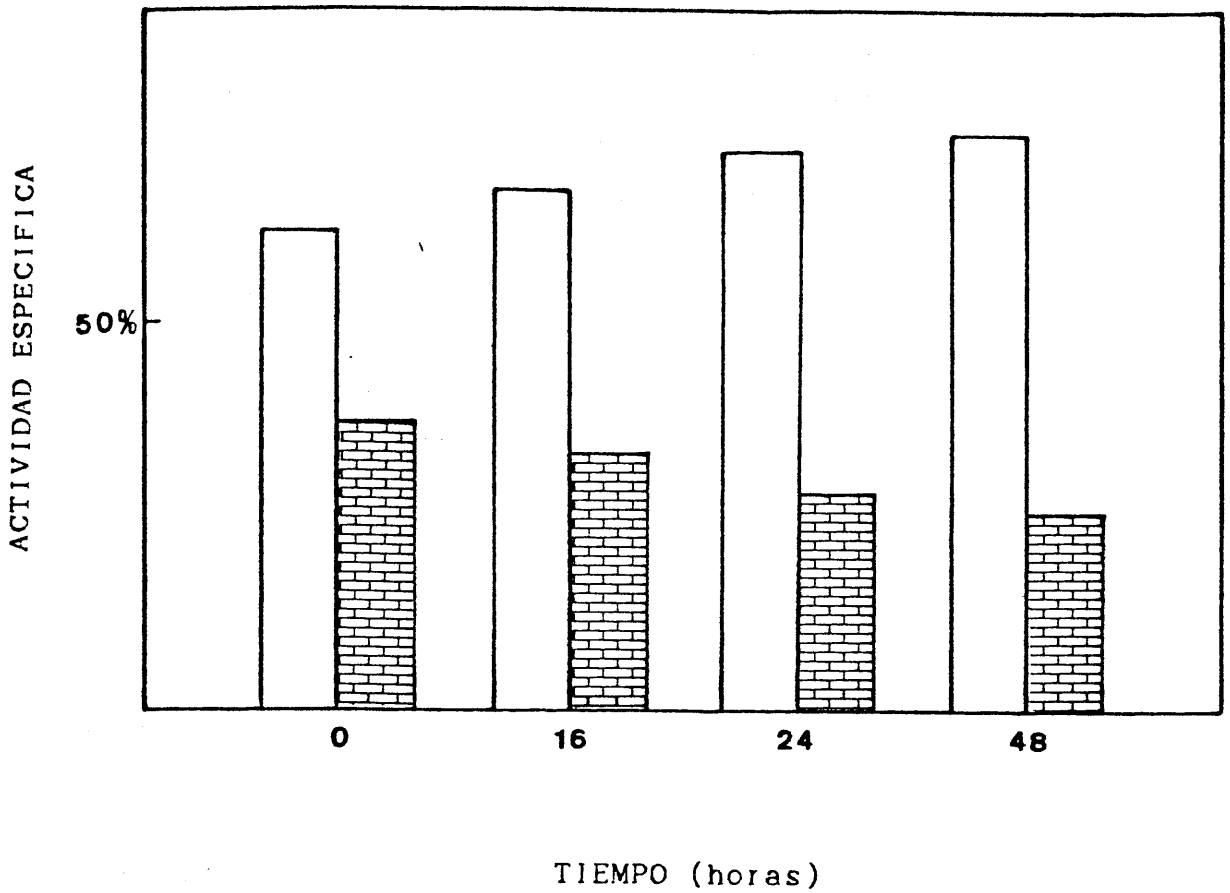
La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. El ± representa el error estándar de la media y entre paréntesis se indica el número de experimentos realizados. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0.06) y saturante (3 mM) de sustrato. F3 y F4 representan las fracciones de túbulo distales y proximales. El grado de significancia P con respecto a los valores de 0 horas se expresa como: a) P<0,002; b) P<0,0005; c) P<0,00001. Y de los valores de la fracción 3 con respecto a la fracción 4 como: *) P<0,005; **) P<0,0001.

FIGURA 30



EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Los valores representados corresponden a la velocidad subsaturante. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (●) Fracción de túbulos distales. (○) Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 31



EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. El valor correspondiente a cada fracción del túbulo renal se representa como porcentaje de la actividad enzimática total a velocidad subsaturante. □ Fracción de túbulo distales. ▤ Fracción de túbulo proximales.

cidad máxima se representan en la tabla 16 y figura 32. Como se puede observar, no existen cambios de estos valores en la porción proximal, debido, en este caso, a que ambas velocidades no varían durante todo el periodo experimental.

Por otra parte, la relación entre las velocidades en la fracción distal del túbulo evoluciona a lo largo del tiempo con un doble comportamiento. Durante las primeras 24 horas esta relación aumenta aproximadamente en un 40%, aumento que persiste hasta el final de la experiencia, 48h. Al principio, el incremento se debe a un aumento a velocidad subsaturante sin cambios a velocidad máxima, mientras que en las segundas 24 horas la relación se mantiene al aumentar en el mismo grado (15%) tanto la velocidad a concentraciones celulares de PEP como a velocidad máxima.

Finalmente, en la tabla 17 se muestra el efecto global de esta dieta sobre los diferentes aspectos estudiados del metabolismo glucídico en riñón, gluconeogénesis y glucolisis, junto con los enzimas implicados en ambas rutas. Los valores se expresan como actividad total (suma de ambos fragmentos del túbulo renal) de todos los parámetros analizados, expresándose los cambios que tienen lugar a las 48 horas como porcentajes de activación o inhibición.

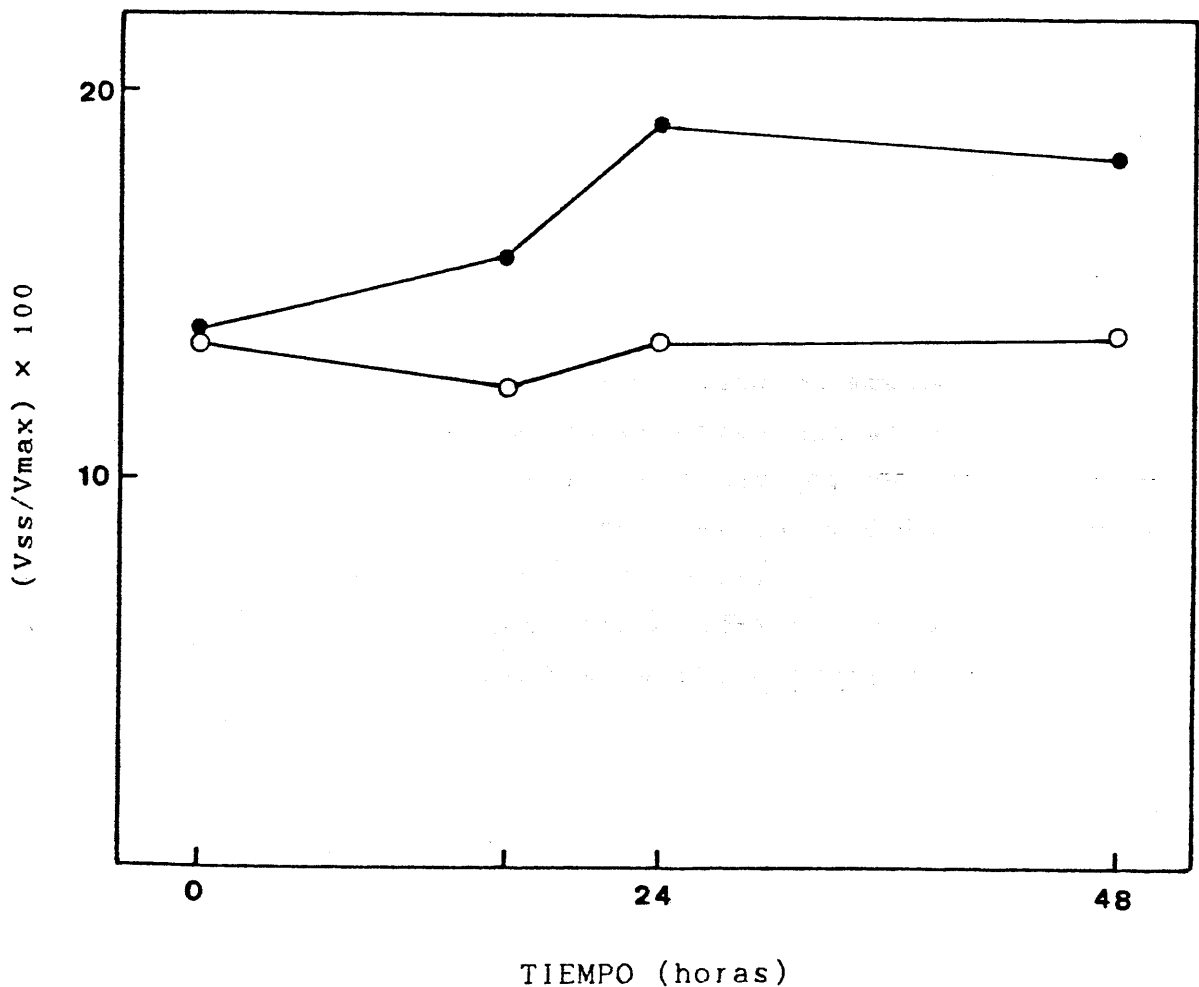
En el caso de la gluconeogénesis, se observa la existencia de un paralelismo entre el proceso gluconeogénico y la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa, y que se hace más acusado si se consideran por separado los cambios producidos en cada una de las fracciones del túbulo renal (resultados no mostrados).

Por lo que respecta a la glucolisis, el comportamiento es completamente diferente. A lo largo del tiempo no se modifican significativamente los valores de

TABLA 16 y FIGURA 32

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

	$(V_{\text{subsaturante}}/V_{\text{saturante}}) \times 100$			
	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
F3	13.93	15.83	19.23	18.44
F4	13.77	12.36	13.60	13.94



F3 y F4 corresponden a las fracciones de túbulos distales y proximales respectivamente, que en la figura quedan marcados como (●) y (○).

TABLA 17

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS SOBRE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA, Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LA FRACCION TOTAL DEL TUBULO RENAL (F3+F4)

Dieta proteínas			
	0 horas	48 horas	%
Glucosa	168,30	207,24	+23,2
FBPasa	66,00	78,84	+19,5
Lac+Pir	32,14	32,61	+1,5
PFK	2,33	3,06	+31,3
PK	40,06	58,96	+47,2

Las capacidades gluconeogénica (glucosa) y glucolítica (lactato+piruvato) se calculan mediante la suma de los valores correspondientes obtenidos en ambas porciones del túbulo renal. Las actividades enzimáticas totales se han calculado tomando como base las velocidades subsaturantes en ambas fracciones tubulares.

Se indican los porcentajes de activación (+) o de inhibición (-) con respecto a las 0 horas.

glucolisis, medidos como la suma de lactato y piruvato producidos, mientras que aparecen cambios muy significativos en la actividad total de los dos enzimas glucolíticos ensayados, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa, con diferencias al final de las 48 horas del orden del 30 y 50% respectivamente.

3.2.3.- Efecto del ayuno sobre las actividades FBPasa, PFK y PK de túbulos renales a lo largo del tiempo.

A) Efecto sobre la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa

Como vimos en el apartado 3.1.3., el ayuno producía un gran aumento en la formación de glucosa sobre todo a las 48 horas. Sobre la fructosa 1,6-bisfosfatasa también el ayuno produce un incremento muy significativo en su actividad, alrededor del 55%. Este efecto tiene lugar a nivel de la fracción de túbulos proximales y solo ocurre a velocidad subsaturante, no observándose ningún cambio en la fracción distal, ni a velocidad máxima en ambas fracciones (tabla 18, figuras 33 y 34).

La relación entre las velocidades subsaturante y máxima, que se muestra en la tabla 19 y figura 35, también se ve incrementada en la porción proximal del túbulo renal alcanzándose un valor del 52%, sin que se produzcan cambios en la fracción de túbulos distales.

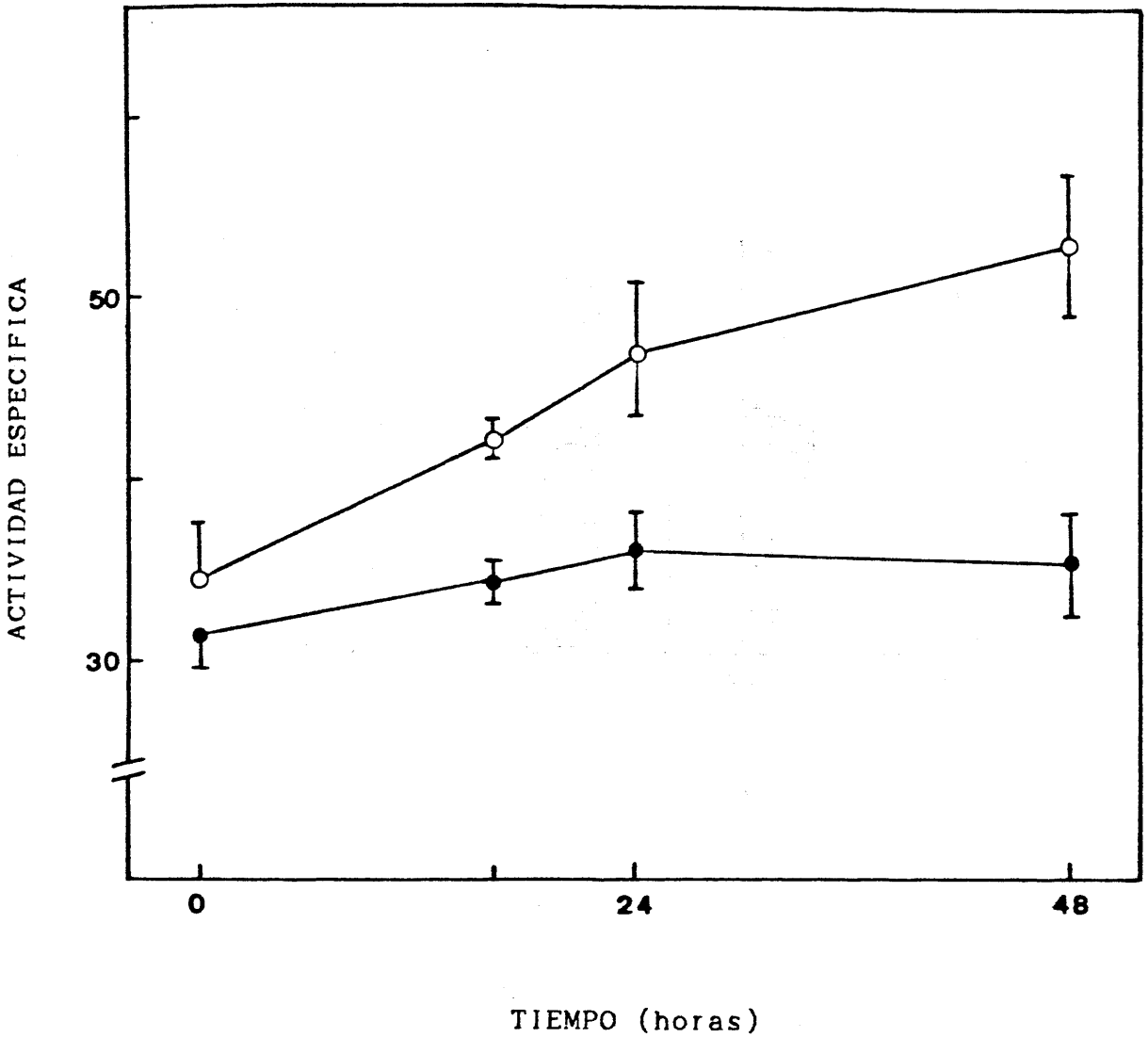
TABLA 18

EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
Vss	31,44±1,75 (9)	34,40±1,01 (4) **	36,30±1,84 (8) *	35,54±2,76 (8) **
F3				
Vmax	140,65±10,80 (10) *	138,32±8,73 (4) *	146,31±4,61 (6) *	144,14±13,52 (6)
Vss	34,56±2,97 (9)	42,33±1,13 (4)	47,04±3,68 (6) a	53,09±3,85 (6) b
F4				
Vmax	177,07±9,18 (10)	171,13±9,24 (4)	175,13±9,80 (8)	179,30±12,42 (8)

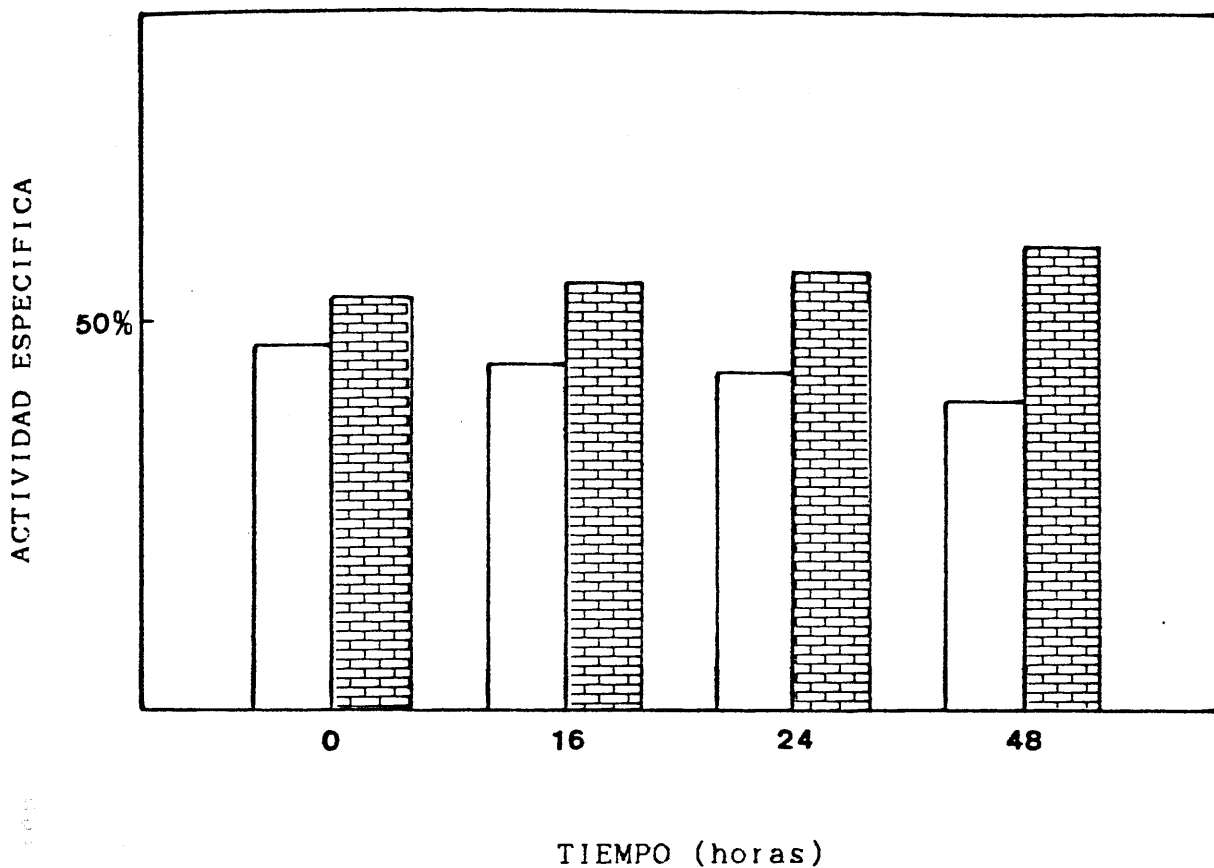
La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. El ± representa el error estándar de la media. El nº de experimentos realizados se indica entre paréntesis. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0,01 mM) y saturante (0,1 mM) de sustrato. F3 y F4 representan las fracciones de los túbulos distales y proximales. El grado de significancia frente a los valores de 0 horas se expresa como: a) P<0,05; b) P<0,005. Y de los valores de la fracción 3 con respecto a la fracción 4: *) P<0,05; **) P<0,005.

FIGURA 33



EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados /minuto/mg de proteína. Los valores representados corresponden a la velocidad subsaturante. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (●) Fracción de túbulos distales. (O) Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 34

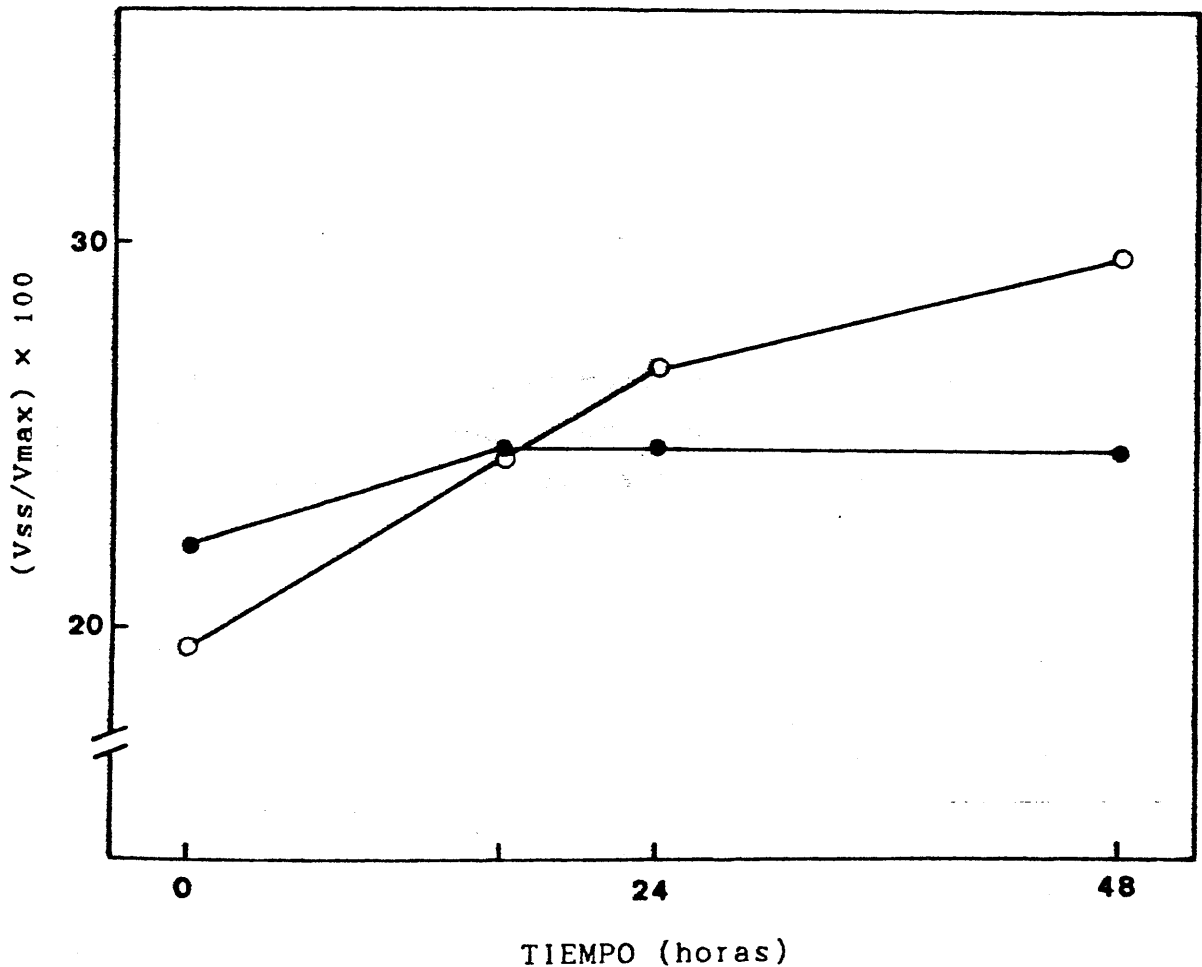


EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. El valor correspondiente a cada fracción del túbulo renal se representa como porcentaje de la actividad enzimática total a velocidad subsaturante. □ Fracción de túbulos distales. ▨ Fracción de túbulos proximales.

TABLA 19 y FIGURA 35

EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO.

(Vsubsaturante/Vmáxima) × 100				
	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
F3	22,35	24,86	24,81	24,65
F4	19,52	24,73	26,86	29,61



F3 y F4 corresponden a las fracciones de túbulos distales y proximales respectivamente, que en la figura se marcan como (●) y (○).

C) Efecto del ayuno sobre la actividad fosfofructoquinasa

El ayuno provoca una disminución de la actividad fosfofructoquinasa a nivel de la fracción de túbulos distales, alcanzando incluso su actividad valores inferiores a la que presenta la fracción de túbulos proximales. Por otra parte no existen cambios significativos en la velocidad máxima, ni tampoco en ambas actividades a nivel de la fracción proximal (tabla 20 y figura 36).

En la figura 37, se observa como el porcentaje de actividad correspondiente a la fracción distal con respecto a la actividad total, pasa de ser del 15%, superior en los segmentos distales, hasta descender a las 48 horas a valores inferiores, del orden de un 10%, a los correspondientes a la fracción proximal del túbulo renal.

Por último, la relación entre las velocidades subsaturante y máxima va disminuyendo, igualmente, en esta porción tubular a lo largo del tiempo (tabla 21 y figura 38), mientras que no se modifican los valores correspondientes a la F4 (segmentos proximales del túbulo renal). La disminución en la F3 llega a ser del 31%.

C) Efecto del ayuno sobre la actividad piruvato quinasa

A diferencia de los efectos producidos por el ayuno sobre las actividades fructosa 1,6-bisfosfatasa y fosfofructoquinasa, esta situación nutricional no parece afectar la actividad del enzima piruvato quinasa de corteza renal a ninguno de los niveles estudiados.

Efectivamente, no se encontraron cambios en dicha actividad enzimática, a lo largo del periodo experimental,

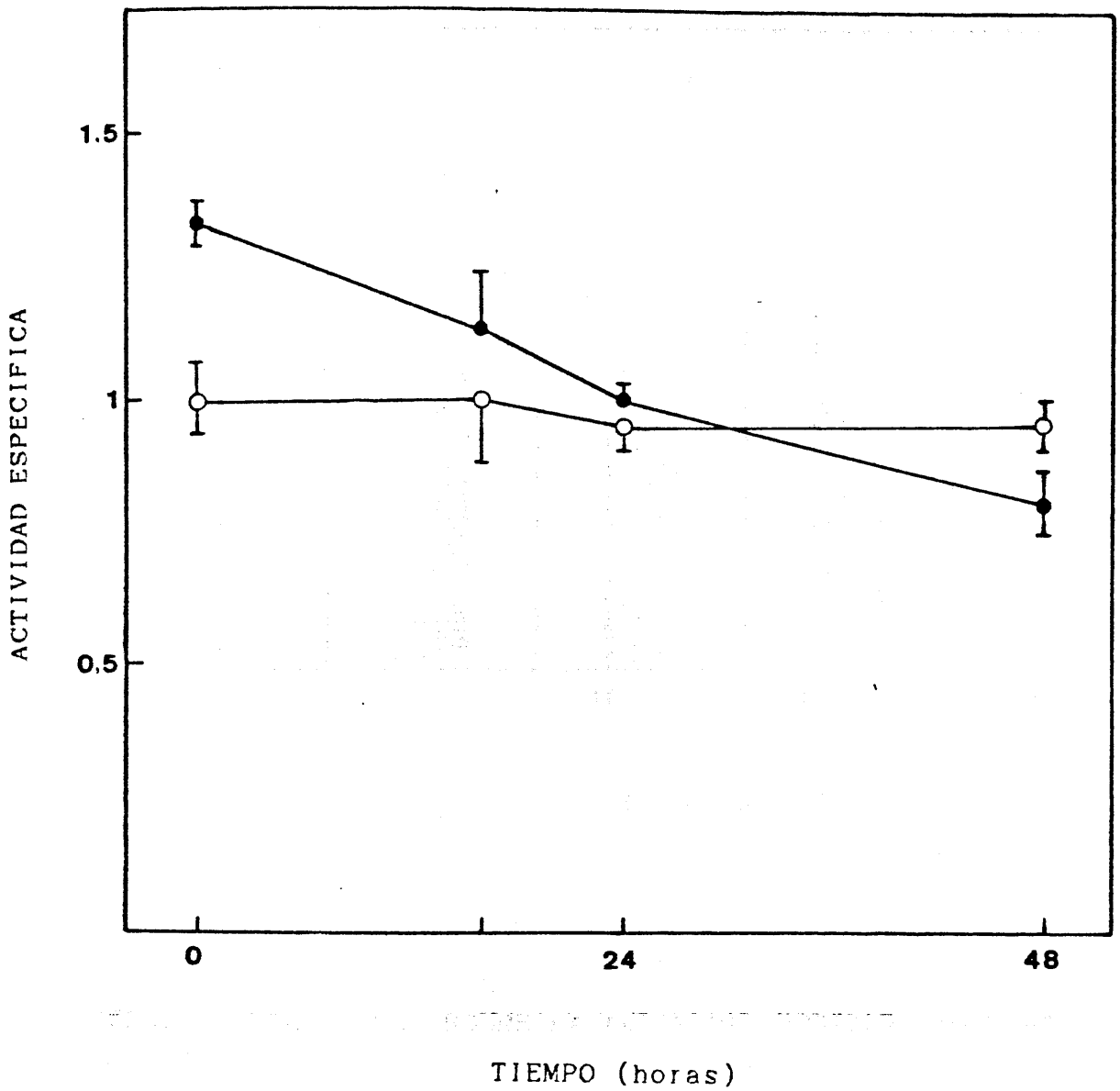
TABLA 20

EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
Vss	1,33±0,03 [*] (9)	1,13±0,10 ^a (4)	1,02±0,02 ^b (7)	0,81±0,06 ^b (7)
F3				
Vmax	16,46±0,73 [*] (9)	16,66±1,66 (4)	15,68±0,80 (7)	14,62±0,49 (7)
Vss	1,00±0,07 (9)	1,01±0,12 (4)	0,96±0,04 (7)	0,96±0,04 (8)
F4				
Vmax	13,07±0,68 (9)	13,45±0,99 (4)	13,35±0,99 (7)	13,28±0,91 (8)

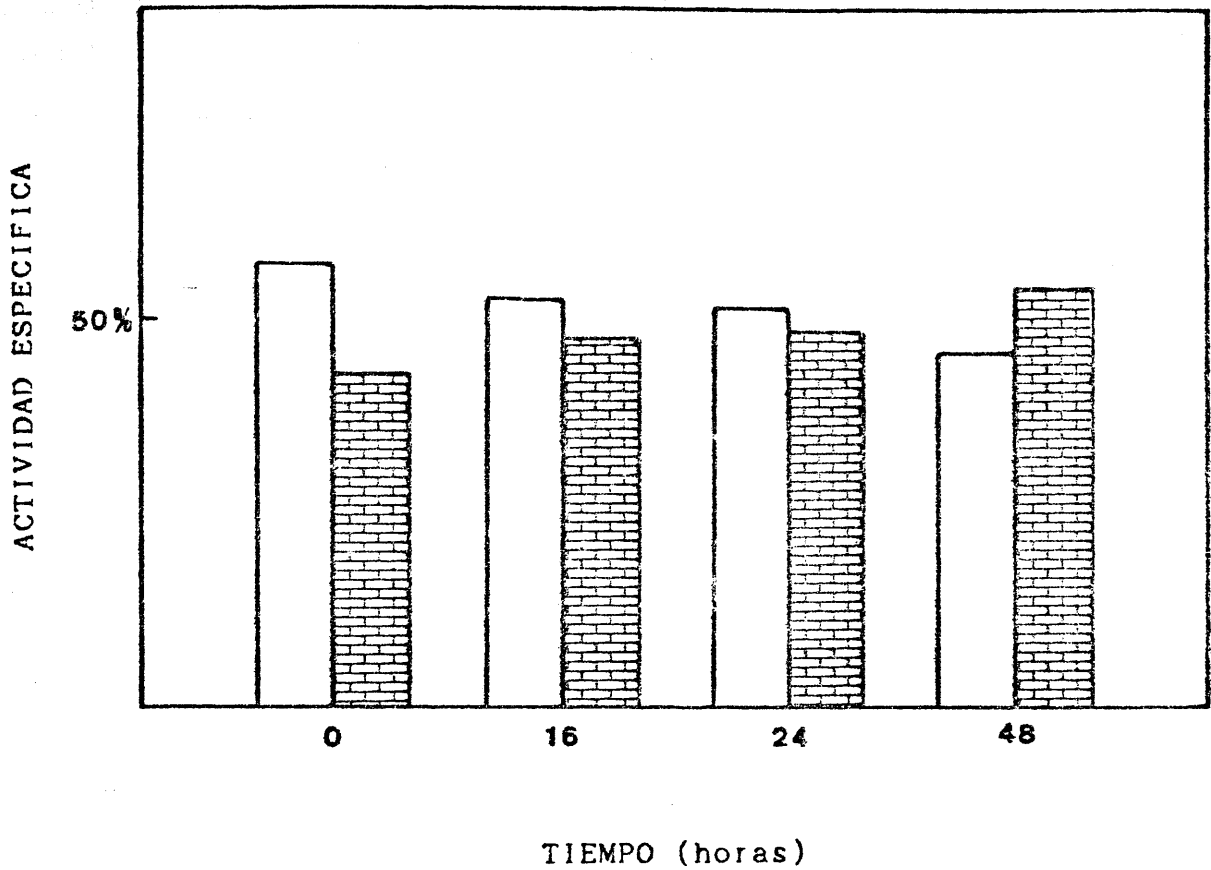
La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. El ± representa el error estándar de la media y entre paréntesis se indica el n° de experimentos. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0,2 mM) y saturante (3 mM) de sustrato. F3 y F4 representan las fracciones de túbulos distales y proximales. El grado de significancia P respecto a los valores de 0 horas se expresa como: a) P<0,05 y b) P<0,0001. Y de los valores de la fracción 3 con respecto a la 4 como: *) P<0,005.

FIGURA 36



EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Se representan los valores correspondientes a la velocidad subsaturante. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (●) Fracción de túbulos distales. (○) Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 37



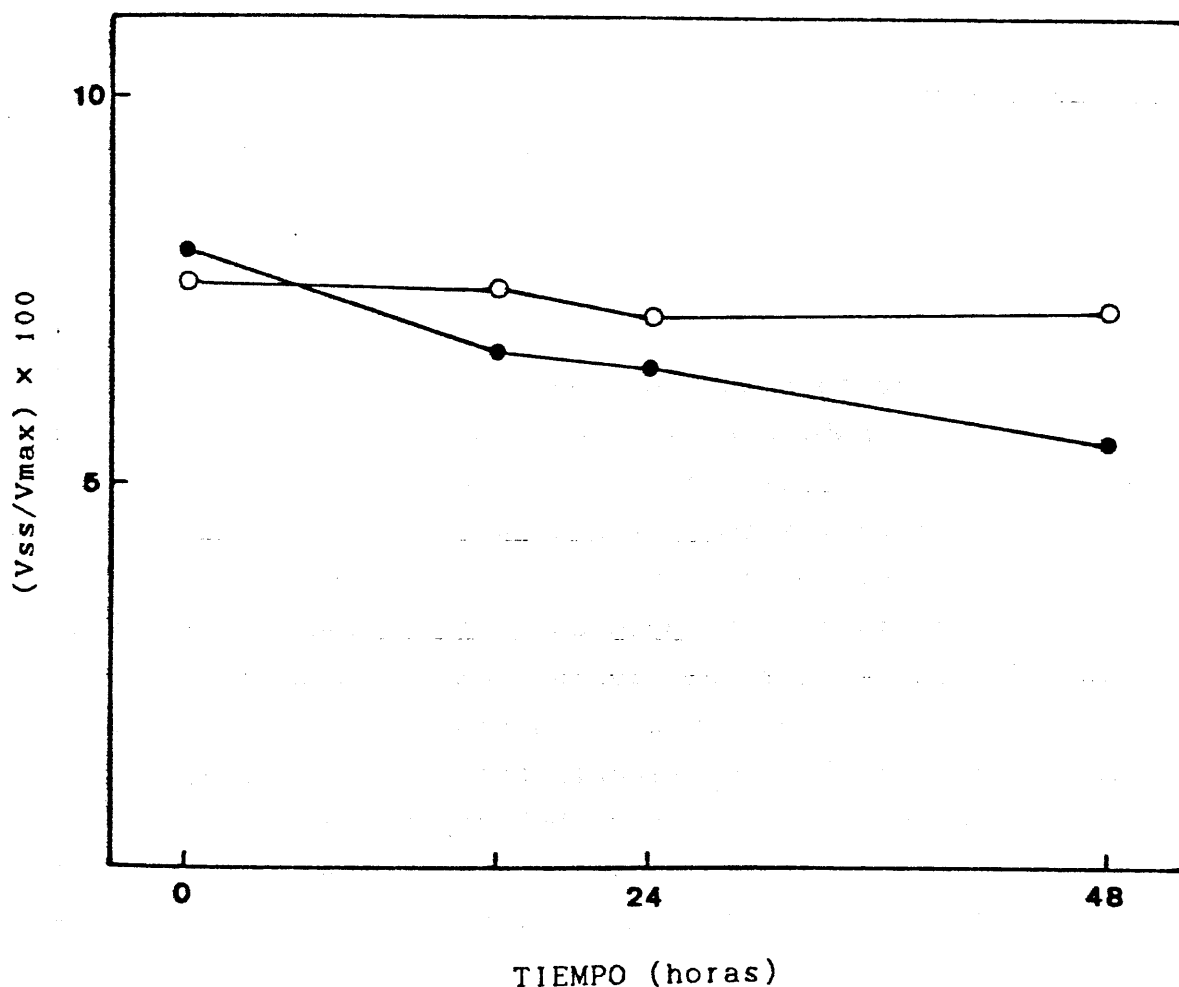
EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. El valor correspondiente a cada fracción del túbulo renal se representa como porcentaje de la actividad enzimática total a velocidad subsaturante .

□ Fracción de túbulos distales. ▨ Fracción de túbulos proximales.

TABLA 21 y FIGURA 38

EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

	$(V_{\text{subsaturante}}/V_{\text{saturante}}) \times 100$			
	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
F3	8,08	6,78	6,50	5,54
F4	7,65	7,51	7,19	7,23



F3 y F4 corresponden a las fracciones de túbulos distales y proximales; en la figura se marcan como (●) y (○).

en ninguna de las condiciones ensayadas (tabla 22 y figura 39). Solamente mencionar la diferencia significativa existente entre la concentración de este enzima en las fracciones del túbulo renal estudiadas (proximal y distal) de acuerdo con las diferencias en su actividad a ambas concentraciones de sustrato utilizadas (0,06 mM y 3mM). A lo largo del tiempo, esta diferencia fue del orden del 40% menor en la porción proximal del túbulo.

Debido a este comportamiento tampoco aparecen cambios en la participación de ambas porciones del túbulo a la actividad total del enzima piruvato quinasa (figura 40), manteniendose una diferencia del 20% a lo largo de las 48 horas. Asimismo, la relación entre las velocidades subsaturante y máxima de la piruvato quinasa en las fracciones 3 y 4 del túbulo renal no variaron a lo largo del tiempo, presentando valores semejantes en ambas fracciones (tabla 23 y figura 41), aunque cuantitativamente su actividad sea diferente de forma significativa.

En la tabla 24 se muestran los efectos que presenta el ayuno a las 48 horas sobre la capacidad gluconeogénica y glucolítica, así como sobre los enzimas de ambos procesos, indicandose los porcentajes de activación e inhibición referidos a las 0 horas. Podemos destacar la activación producida en la gluconeogénesis, tanto en la formación de glucosa como en el enzima gluconeogénico, la fructosa 1,6-bisfosfatasa. A la vez existe una inhibición en uno de los dos enzimas glucolíticos, la fosfofructoquinasa, y en la capacidad glucolítica medida como la formación de lactato+piruvato; en cambio no existe ninguna modificación en el otro enzima, la piruvato quinasa.

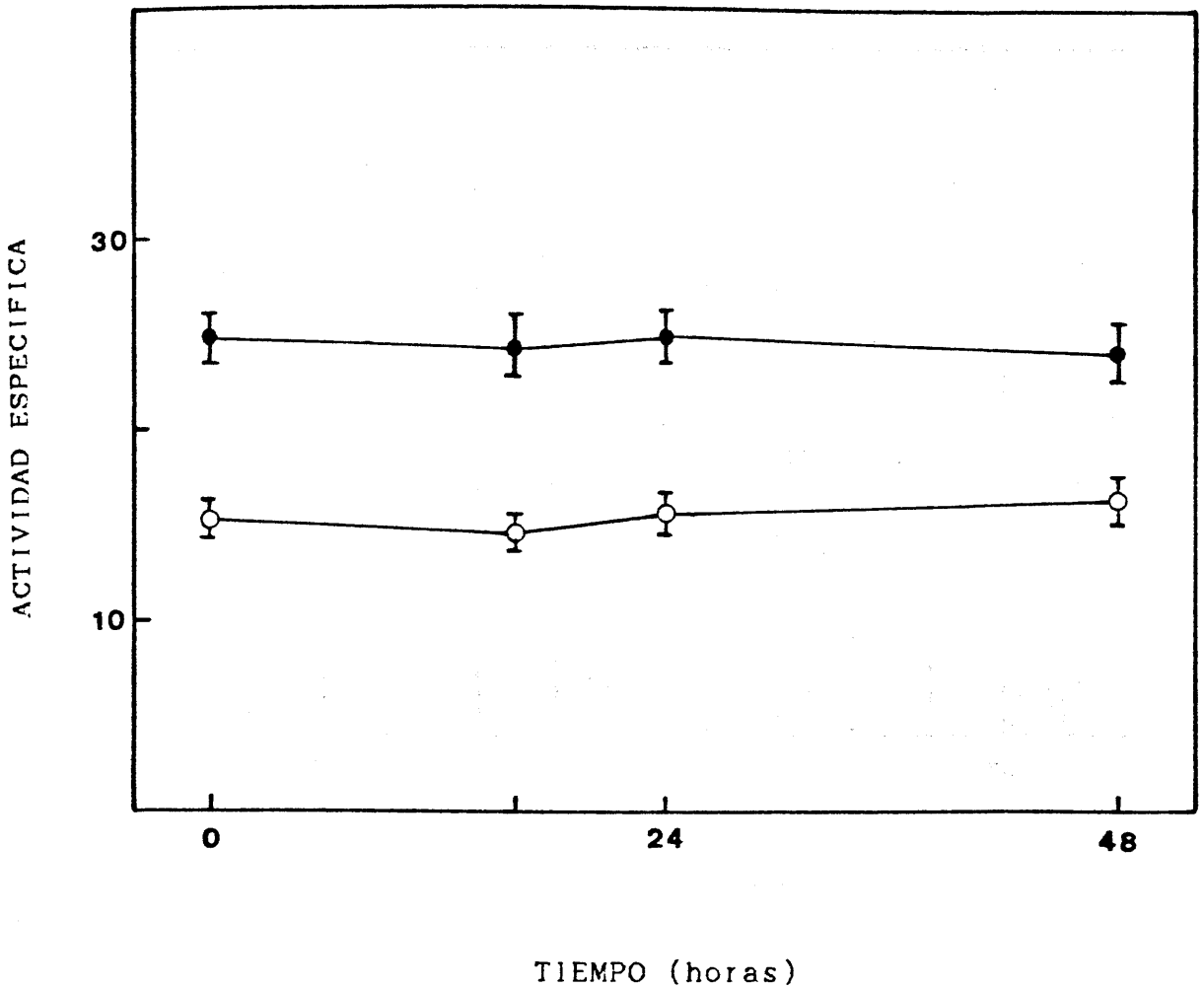
TABLA 22

EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO

	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
Vss	24,83±1,24 ^{***} (11)	24,22±1,38 ^{**} (4)	24,90±1,19 ^{**} (7)	24,18±1,56 ^{**} (8)
F3				
Vmax	178,24±6,48 ^{***} (11)	167,38±19,72 [*] (4)	174,26±6,06 ^{***} (8)	160,34±8,37 ^{**} (7)
Vss	15,23±0,82 (11)	14,61±0,49 (4)	14,82±1,37 (7)	15,43±1,05 (8)
F4				
Vmax	110,55±5,69 (11)	111,88±7,18 (4)	112,41±6,32 (8)	108,92±4,23 (7)

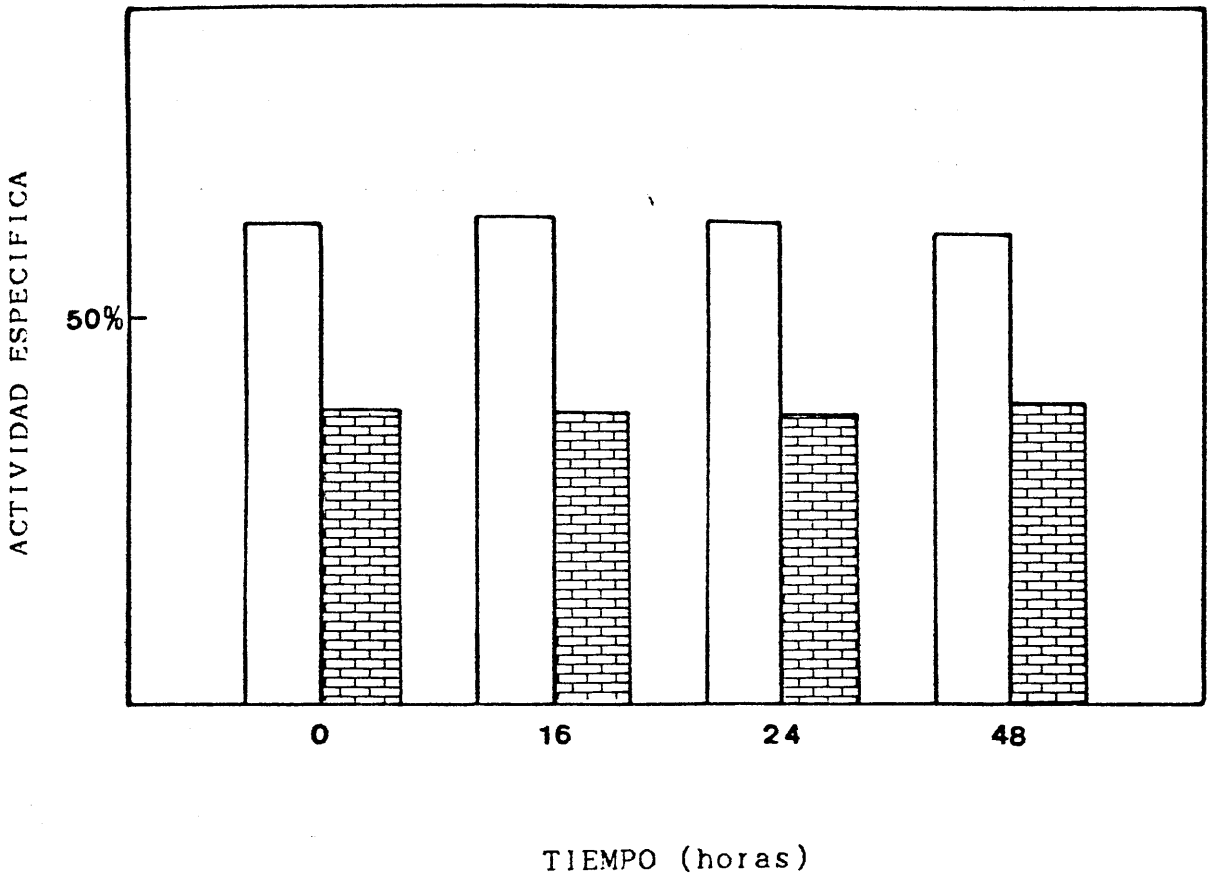
La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. El ± representa el error estándar de la media y entre paréntesis se indica el n° de experimentos. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0,06 mM) y saturante (3 mM) de sustrato. F3 y F4 representan las fracciones de túbulo distales y proximales. El grado de significancia P de los valores de la fracción 3 con respecto a la fracción 4 se expresa como: *) P<0,05; **) P<0,001; ***) P<0,0001.

FIGURA 39



EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Se representan los valores correspondientes a la velocidad subsaturante. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (●) Fracción de túbulos distales. (○) Fracción de túbulos proximales.

FIGURA 40



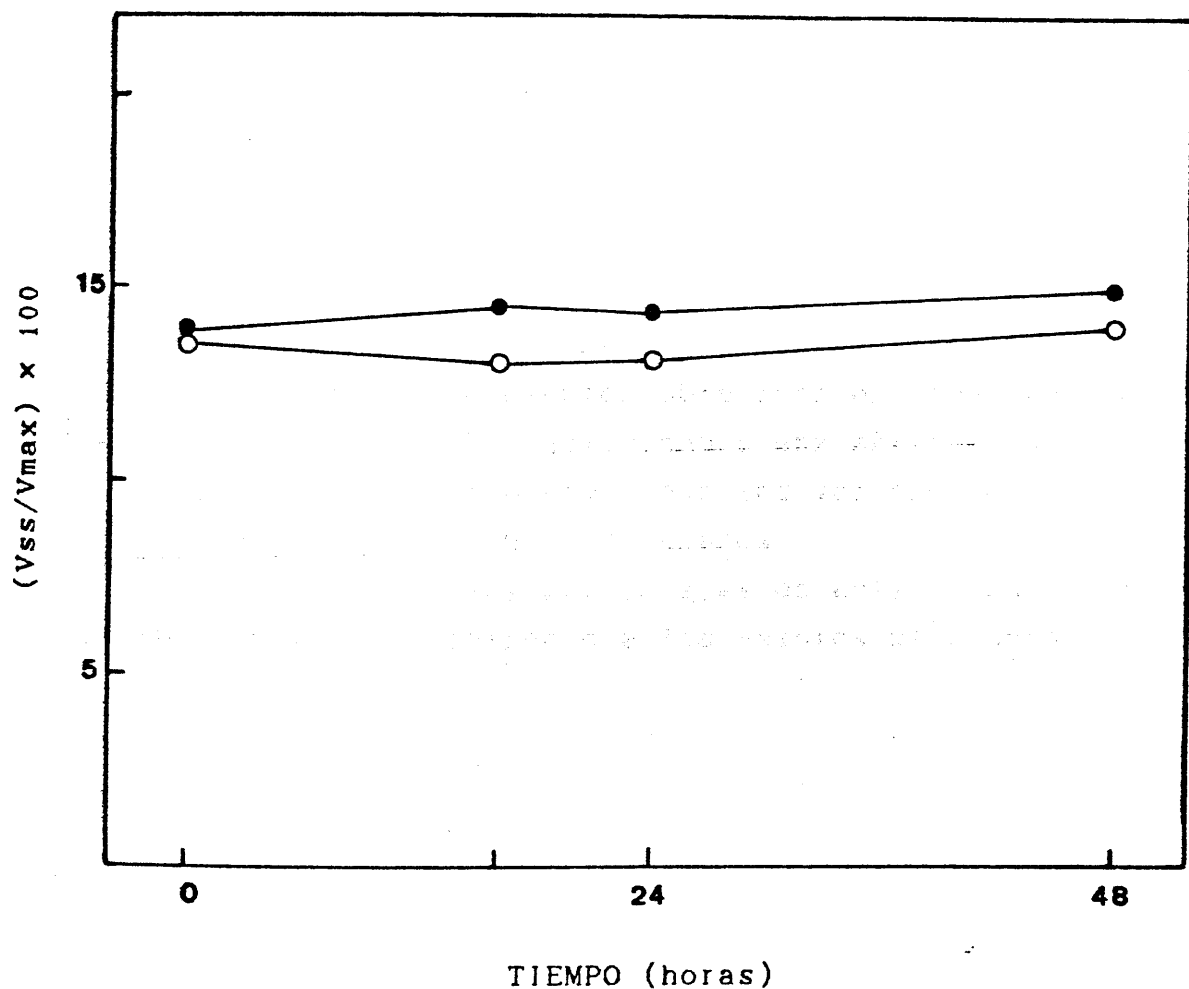
EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO. El valor correspondiente a cada fracción del túbulo renal se representa como porcentaje de la actividad enzimática total a velocidad subsaturante.

□ Fracción de túbulos distales. ▨ Fracción de túbulos proximales.

TABLA 23 y FIGURA 41

EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE TUBULOS RENALES A LO LARGO DEL TIEMPO.

	$(V_{\text{subsaturante}}/V_{\text{máxima}}) \times 100$			
	0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
F3	13,93	14,47	14,29	15,08
F4	13,77	13,06	13,18	14,16



F3 y F4 corresponden a las fracciones de túbulos distales y proximales, que en la figura quedan marcados como (●) y (○) respectivamente.

TABLA 24

EFFECTO DEL AYUNO SOBRE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA, Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN LA FRACCION TOTAL DEL TUBULO RENAL (F3+F4)

	Ayuno		
	0 horas	48 horas	%
Glucosa	168,30	288,27	+71,3
FBPasa	66,00	88,63	+34,3
Lac+Pir	32,14	16,97	-47,2
PFK	2,33	1,77	-24,1
PK	40,06	39,61	-1,1

Las capacidades gluconeogénica (glucosa) y glucolítica (lactato+piruvato) se calculan mediante la suma de los valores correspondientes obtenidos en ambas porciones del túbulo renal. Las actividades enzimáticas totales se han calculado tomando como base las velocidades subsaturantes en ambas fracciones tubulares.

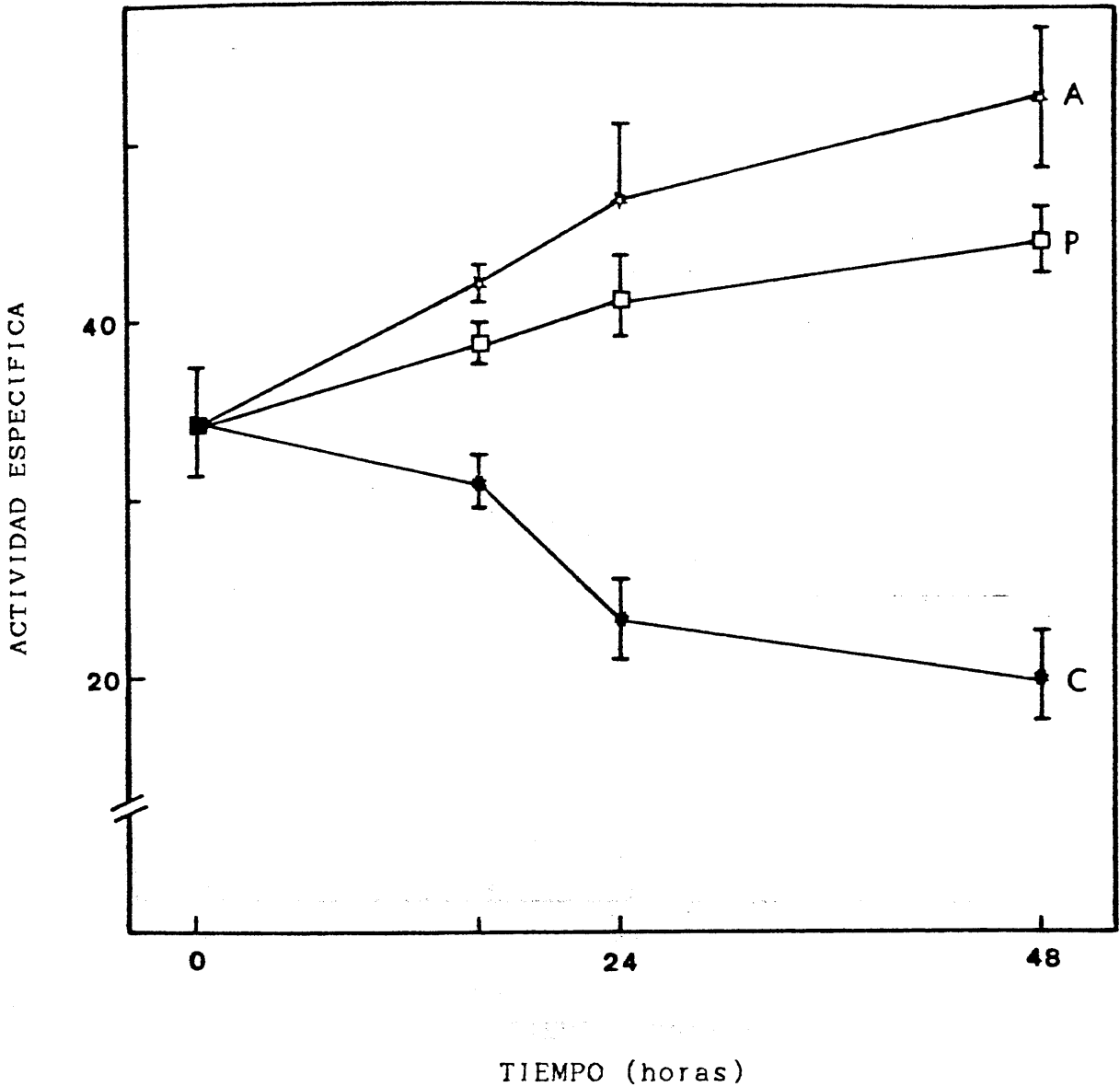
Se indican los porcentajes de activación (+) y de inhibición (-) con respecto a los valores de 0 horas.

Como se puede observar a lo largo de la exposición de estos resultados, la porción proximal del túbulo renal es la zona de este tejido que responde, mediante cambios profundos y rápidos, en su capacidad gluconeogénica a través de modulaciones significativas en la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa, a diferentes situaciones nutricionales. Por ello, se ha querido resumir los efectos del ayuno y dietas ricas en carbohidratos y proteínas sobre la actividad de este enzima en la figura 42.

Como puede verse, la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa a concentraciones subsaturantes de sustrato, presenta un aumento, cualitativamente diferente, frente al ayuno y a la dieta rica en proteínas. Por el contrario dicha actividad sufre, como cabía esperar, una fuerte disminución frente a la dieta rica en carbohidratos. Es necesario mencionar que bajo ninguna de estas condiciones nutricionales, y durante este periodo experimental (48h), la velocidad máxima de este enzima no varía de forma significativa.

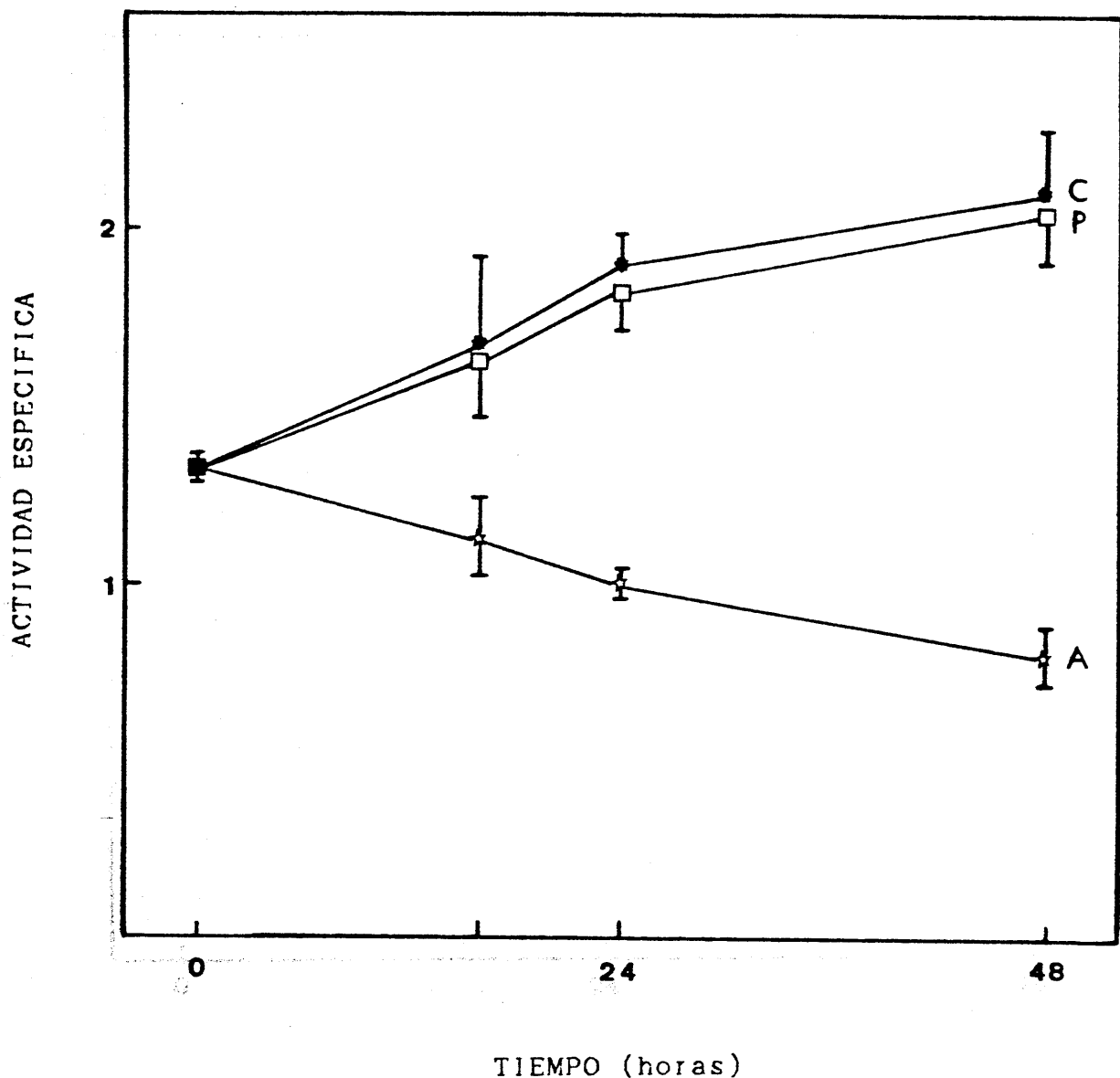
Por otra parte, y por las mismas razones expuestas anteriormente, la porción distal del túbulo renal responde con cambios en su capacidad glucolítica a los diferentes estados nutricionales. Las figuras 43 y 44 muestran los efectos de éstos sobre las actividades fosfofructoquinasa y piruvato quinasa respectivamente. Como se puede observar en ambas gráficas, las actividades, a concentraciones celulares de sustrato, de ambos enzimas glucolíticos responden de forma semejante frente a una dieta alta en carbohidratos y proteínas, incrementándose a lo largo del tiempo. Sin embargo, su comportamiento frente al ayuno es cualitativamente diferente. Mientras que, como era de esperar, la actividad fosfofructoquinasa disminuye durante el ayuno, esta situación nutricional no afecta a la actividad piruvato quinasa.

FIGURA 42



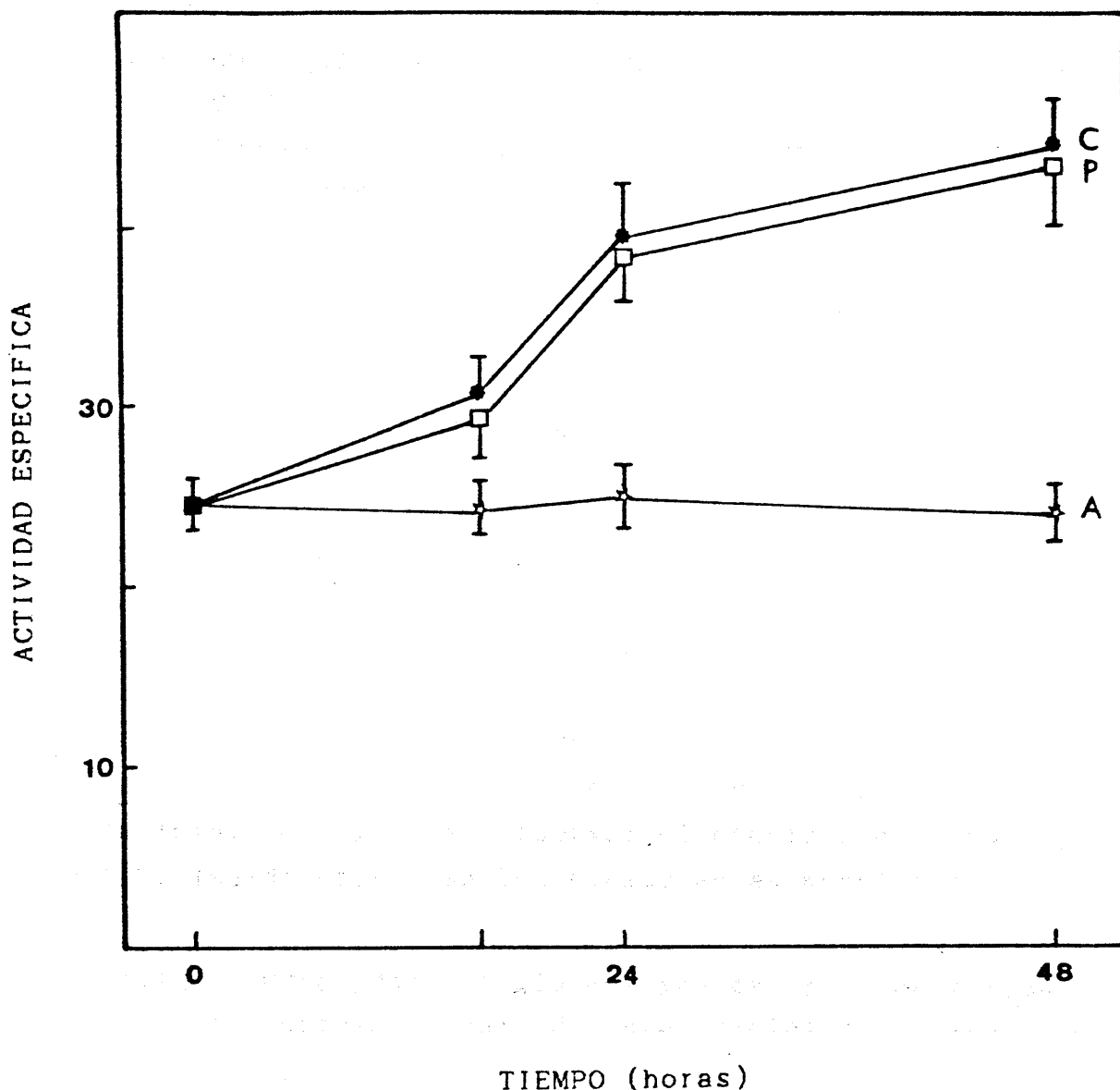
EFFECTO DE DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE LA FRACCION PROXIMAL DEL TUBULO RENAL A LO LARGO DEL TIEMPO. La actividad enzimática, ensayada a concentración subsaturante de fructosa 1,6-bisfosfato (0,01 mM), se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (C): Dieta alta en carbohidratos. (P): Dieta alta en proteínas. (A): Ayuno.

FIGURA 43



EFFECTO DE DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE LA FRACCION DISTAL DEL TUBULO RENAL A LO LARGO DEL TIEMPO. La actividad enzimática, ensayada a concentración subsaturante de fructosa 6-fosfato (0,2 mM), se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (C): Dieta alta en carbohidratos. (P): Dieta alta en proteínas. (A): Ayuno.

FIGURA 44



EFFECTO DE DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA DE LA FRACCION DISTAL DEL TUBULO RENAL A LO LARGO DEL TIEMPO. La actividad enzimática, ensayada a concentración subsaturante de fosfoenolpiruvato (0,06 mM), se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Las barras verticales indican el error estándar de la media. (C): Dieta alta en carbohidratos. (P): Dieta alta en proteínas. (A): Ayuno.

3.3.- COMPORTAMIENTO DE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA, Y ENZIMAS REGULADORES DE AMBOS PROCESOS DE CORTEZA RENAL DURANTE CICLOS DE ALIMENTACION-AYUNO Y AYUNO-ALIMENTACION

Una vez realizado el estudio de los procesos gluconeogénico y glucolítico a nivel de las diferentes fracciones tubulares, y puestos de manifiesto los principales cambios que tienen lugar tras el tratamiento de diferentes situaciones nutricionales, se eligieron la dieta alta en carbohidratos y el ayuno para estudiar el comportamiento de ambos procesos durante ciclos alternativos de alimentación y ayuno, por ser estos estados fisiológicos los que presentan entre sí mayores diferencias.

Para estos análisis, no se han utilizado las diferentes fracciones del túbulo renal, sino que se ha preferido hacer el estudio a nivel de la corteza renal completa, a fin de observar el efecto global que sobre dicho tejido presentan los ciclos antes mencionados.

3.3.1.- Capacidades gluconeogénica y glucolítica de corteza renal durante ciclos de alimentación-ayuno y ayuno-alimentación

3.3.1.1. Ciclo alimentación-ayuno

Para la determinación de las capacidades gluconeogénica y glucolítica se siguió el método anteriormente descrito (sección 2.2.6), utilizando dos sustratos diferentes: piruvato 10 mM para medir la formación de glucosa, y glucosa 2 mM para medir la formación de lactato y piruvato. Los cortes realizados de la corteza renal presentaron un peso seco que osciló entre 2-4 mg.

El ciclo alimentación-ayuno consistió en suministrar a los animales durante 4 días (96 horas) una dieta alta en carbohidratos. Al cabo de este tiempo, se sometió a un grupo de animales a 24 horas de ayuno y a otro a 48 horas de ayuno. Finalmente, se estudiaron los diferentes parámetros a las 0 horas, a las 96h de la dieta rica en carbohidratos, y a las 24 y 48h de ayuno.

Los resultados obtenidos a lo largo de esta situación fisiológica se representan en la tabla 25 y figura 45. Como se puede observar, la dieta rica en carbohidratos inhibió significativamente la capacidad gluconeogénica de corteza renal a lo largo de las 96 horas. Los valores de síntesis de glucosa en este tejido alcanzan de nuevo los niveles originales después de 48 horas de ayuno, siendo el incremento a las 24 horas (172%) diez veces mayor que el que tiene lugar en las segundas 24 horas (17%).

Cuando se analiza la capacidad glucolítica (tabla 25 y figura 45 panel inferior) se puede apreciar un comportamiento claramente inverso. La formación de piruvato y lactato aumenta significativamente durante el primer periodo de 96h (alimentación), para descender por debajo de los valores originales a las 48h. Igualmente, durante el primer periodo de ayuno (24 horas) tiene lugar la máxima capacidad de inhibición (61%) frente al 16% obtenido en el segundo periodo.

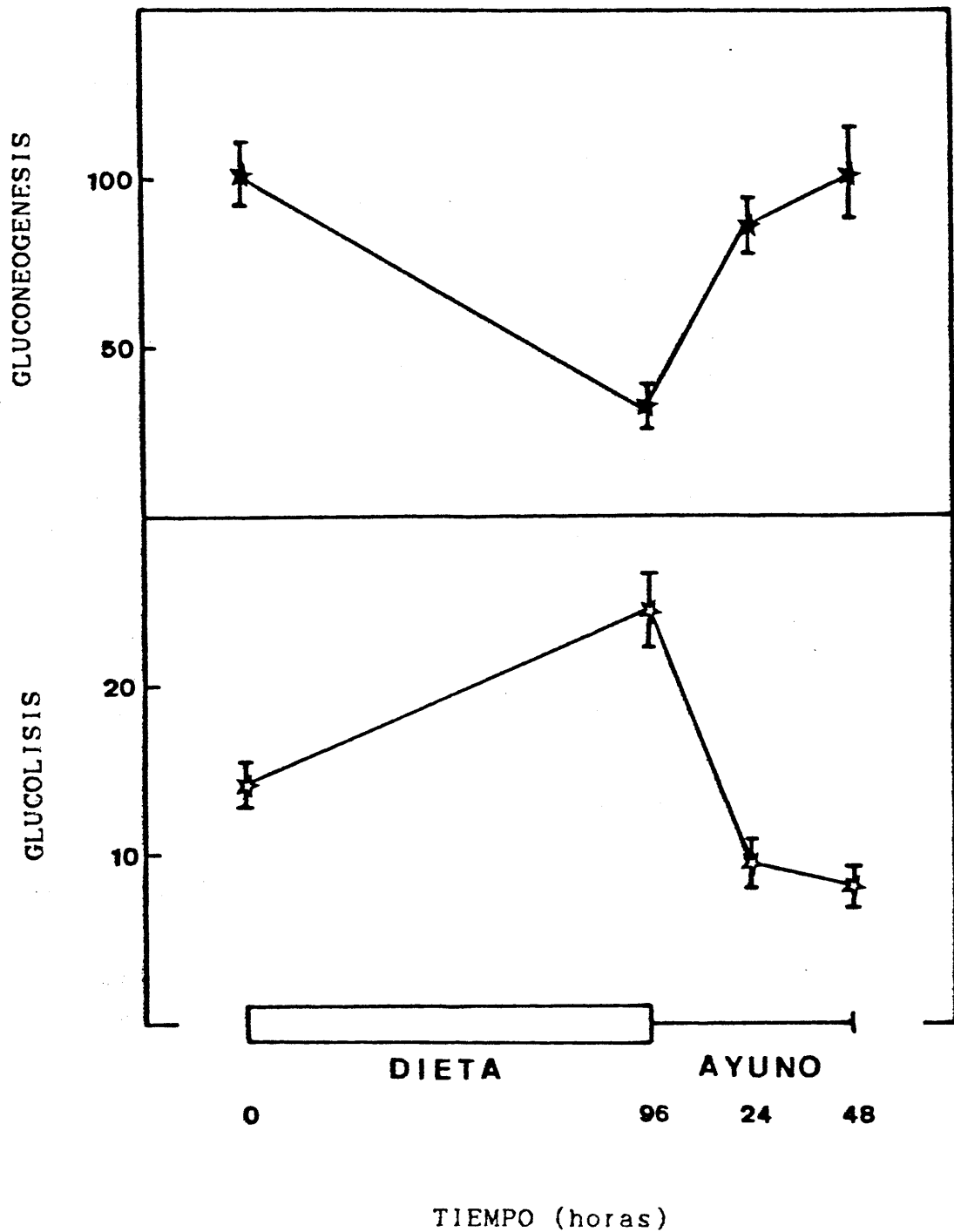
TABLA 25

COMPORTAMIENTO DE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE ALIMENTACION-AYUNO.

	0 horas	96h Dieta CH	+24h Ayuno	+48h Ayuno
Glucosa	103,36±9,52 (5)	32,32±2,16 ^{**} (5)	87,83±7,73 ^{**} (6)	102,89±12,66 (5)
Lac+Pir	14,25±1,08 (5)	24,84±2,12 [*] (5)	9,81±1,20 ^{**} (5)	8,28±1,15 (5)

La capacidad gluconeogénica va expresada en μ moles de glucosa/hora de incubación/gramo de tejido seco. La capacidad glucolítica se expresa en nmoles de lactato+piruvato/hora de incubación/mg de tejido seco. El \pm representa el error estándar de la media y entre paréntesis se indica el n° de experimentos. En cada experimento se han utilizado los riñones de 2 a 4 animales. Los valores indicados en esta tabla corresponden a las 0 horas; 96h con una dieta alta en carbohidratos; 96h con dieta alta en carbohidratos + 24h de ayuno; y 96h con esa misma dieta + 48h de ayuno. El grado de significancia P de cada valor con respecto al anterior se expresa como: *) P<0,005; **) P<0,001.

FIGURA 45



EVOLUCION DE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE ALIMENTACION-AYUNO. La capacidad gluconeogénica se expresa como μ moles de glucosa/hora de incubación/gramo de tejido seco. La capacidad glucolítica se expresa como nmoles de lactato+piruvato/hora de incubación/mg de tejido seco. Las barras verticales indican el error estándar de la media. El periodo de alimentación corresponde al de una dieta rica en carbohidratos.

3.3.1.2.- Ciclo ayuno-alimentación

Experimentalmente, el ciclo ayuno-alimentación consistió en mantener, a un amplio número de animales, en ayuno durante 96 horas y a continuación a un grupo se les suministró una dieta alta en carbohidratos durante 24 horas y a otro durante 48h.

La tabla 26 y figura 46 muestran los resultados obtenidos a lo largo de este ciclo. Como cabía esperar, la formación de glucosa en corteza renal se incrementó significativamente en los animales sometidos a 96h de ayuno. Posteriormente, y tras administrar la dieta rica en carbohidratos, estos valores descendieron por debajo de los correspondientes a las 0h. El mayor porcentaje de inhibición tiene lugar durante las primeras 24h (45%) frente al 24% obtenido durante el segundo periodo de alimentación.

Por otra parte, la formación de lactato y piruvato en estas condiciones, presenta cambios claramente inversos. Durante el periodo de ayuno disminuye significativamente la capacidad glucolítica, para verse incrementada posteriormente durante el periodo de alimentación. Conviene destacar también que, aunque en menor grado que en los casos anteriores, durante las primeras 24h de alimentación el incremento en la síntesis de lactato y piruvato fué mayor (60%) que durante el segundo periodo (30%).

Por último, las figuras 47 y 48 muestran los porcentajes respecto a las 0h de las capacidades gluconeogénica (figura 47) y glucolítica (figura 48) considerando todos los puntos ensayados en ambos ciclos.

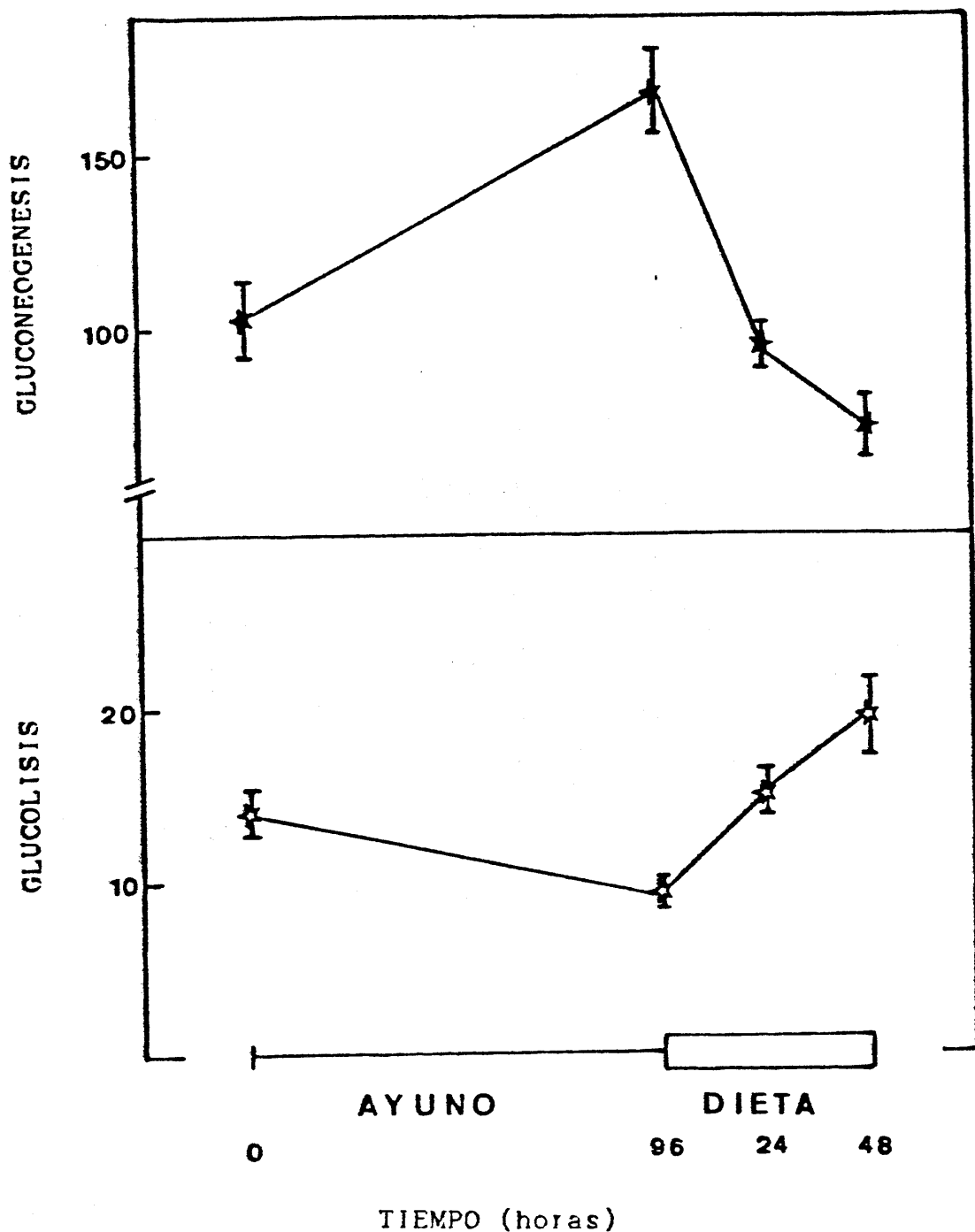
TABLA 26

COMPORTAMIENTO DE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE AYUNO-ALIMENTACION

	0 horas	96h Ayuno	+24h Dieta CH	+48h Dieta CH
Glucosa	103,36±9,52 (5)	169,57±12,13 (6) **	94,34±5,23 (5) **	71,33±8,14 (5) *
Lac+Pir	14,25±1,08 (5)	9,37±0,61 (5) **	15,08±1,02 (6) **	19,77±2,11 (5)

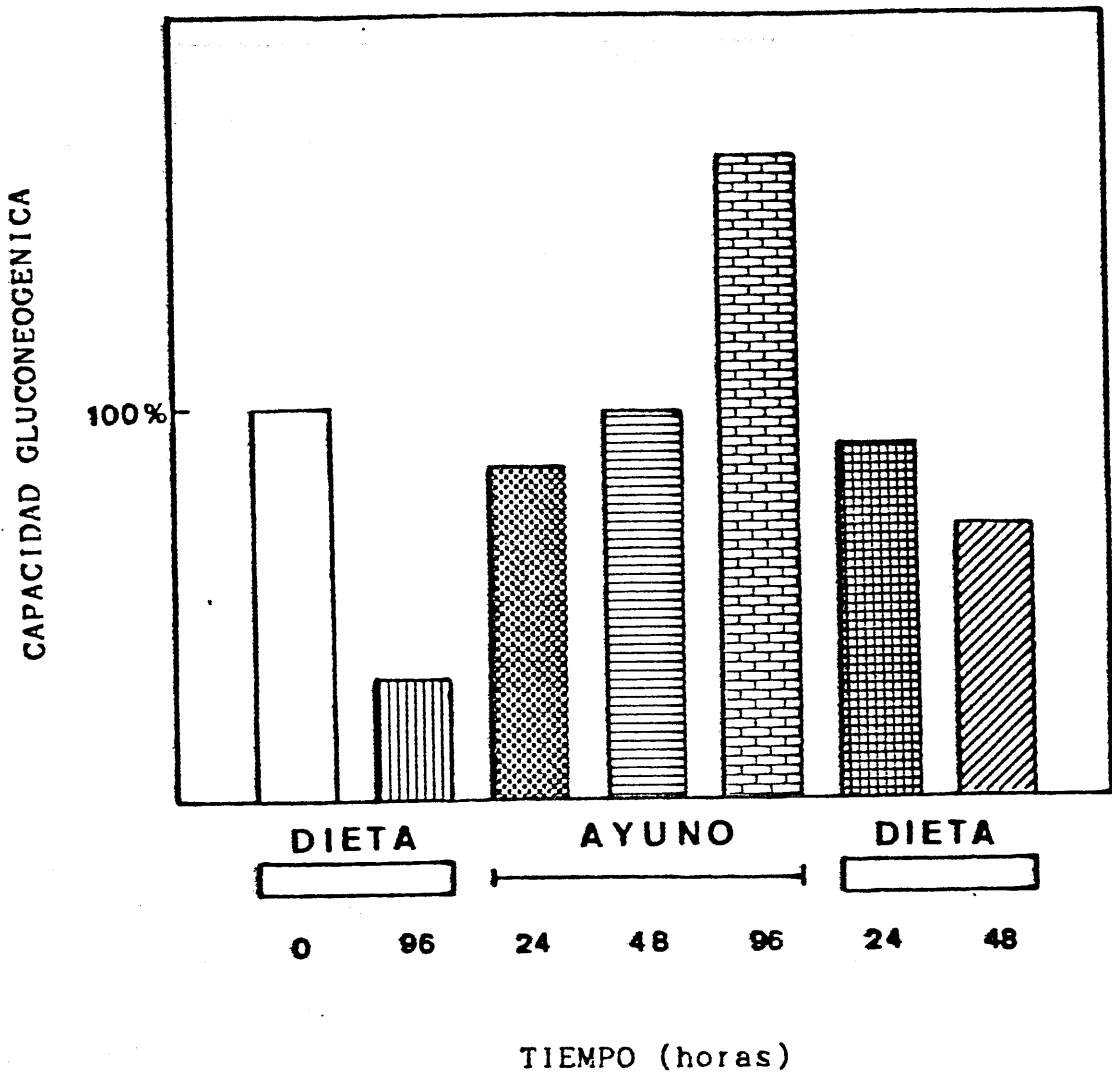
La capacidad gluconeogénica va expresada en μ moles de glucosa/hora de incubación/gramo de tejido seco. La capacidad glucolítica se expresa como nmoles de lactato+piruvato /hora de incubación/mg de tejido seco. El \pm representa el error estándar de la media. Entre paréntesis se indica el n° de experimentos. Los valores de esta tabla corresponden a los obtenidos a las 0 horas; 96h de ayuno; 96h de ayuno + 24h con dieta alta en carbohidratos; y 96h de ayuno + 48h con esa misma dieta. El grado de significancia de cada valor con respecto al anterior se expresa como: *) $P < 0,05$; **) $P < 0,005$.

FIGURA 16



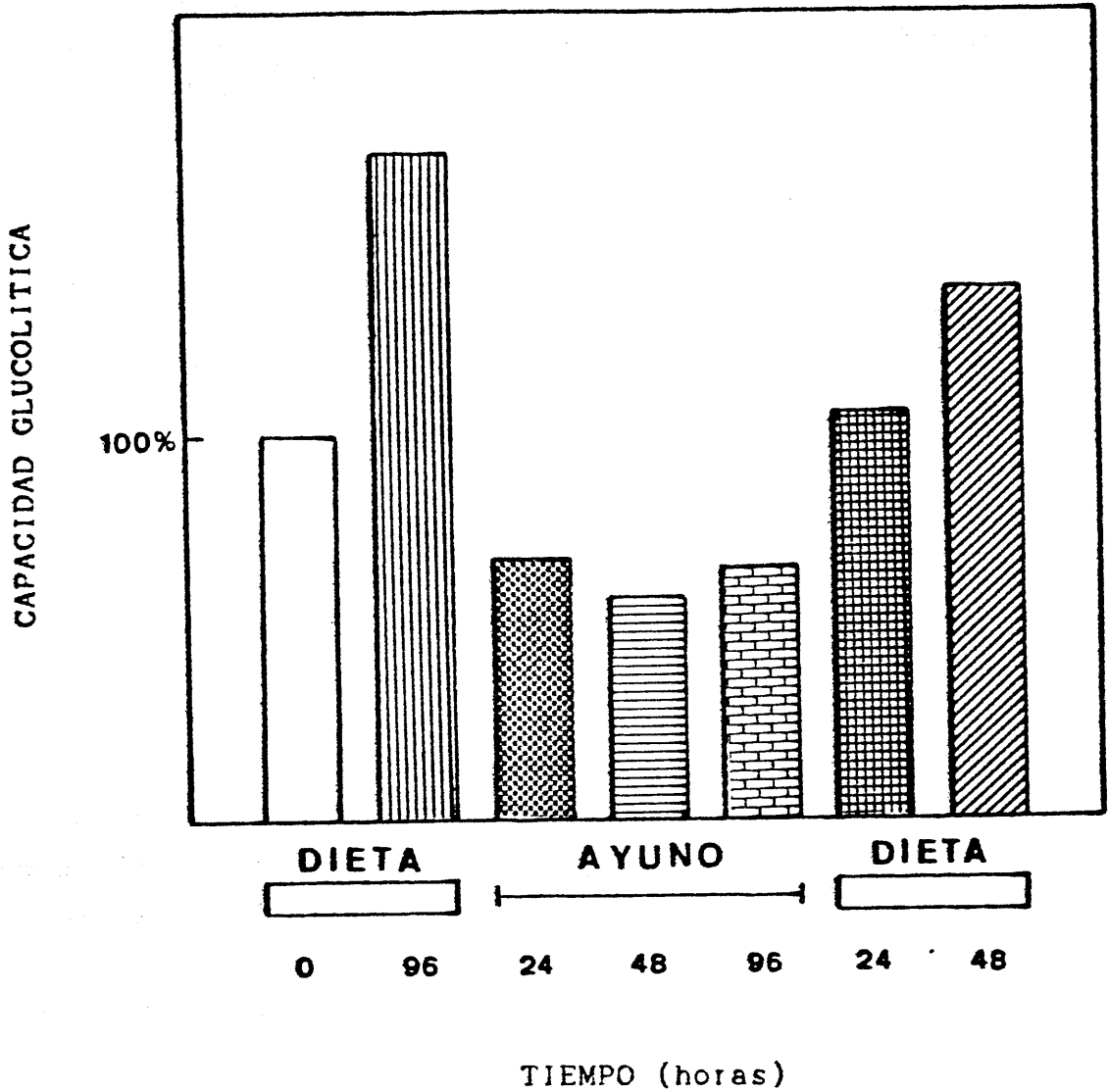
EVOLUCION DE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE AYUNO-ALIMENTACION. La capacidad gluconeogénica se expresa como μ moles de glucosa/hora de incubación/gramo de tejido seco. La capacidad glucolítica se expresa como nmoles de lactato-piruvato/hora de incubación/mg de tejido seco. Las barras verticales indican el error estándar de la media. El periodo de alimentación corresponde al de una dieta rica en carbohidratos.

FIGURA 47



COMPORTAMIENTO DE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE ALIMENTACION-AYUNO-ALIMENTACION. Se representan los porcentajes referidos a los valores de 0 horas.

FIGURA 48



COMPORTAMIENTO DE LA CAPACIDAD GLUCOLITICA DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE ALIMENTACION-AYUNO-ALIMENTACION. Se representan los porcentajes referidos a los valores de 0 horas.

3.3.2.- Comportamiento de enzimas gluconeogénicos de corteza renal durante ciclos de alimentación-ayuno y ayuno-alimentación

3.3.2.1.- Ciclo alimentación-ayuno

Además de seguir el comportamiento de las capacidades gluconeogénica y glucolítica de la corteza renal, midiendo la formación de glucosa y lactato+piruvato, durante estas situaciones nutricionales, se han estudiado los posibles cambios que tienen lugar en las actividades de los principales enzimas de estos procesos a nivel de dos de los ciclos que intervienen en su regulación y que están constituidos por la FBPasa-PFK y PEPCK-PK.

Con el fin de ensayar la actividad de cada uno de los enzimas a concentraciones subsaturante y saturante de sustrato, bajo nuestras condiciones experimentales, se llevó a cabo el estudio cinético de todos los enzimas en un amplio rango de concentraciones de los sustratos implicados (resultados no mostrados).

En la tabla 27, se muestran los resultados obtenidos durante un ciclo de alimentación (dieta rica en carbohidratos)-ayuno con los dos enzimas gluconeogénicos. Por lo que respecta a la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa se pueden observar cambios solo a velocidad subsaturante de sustrato (0,0025 mM), efecto que también se puede comprobar en la figura 49 donde solo se representan estos valores. A concentraciones de sustrato correspondientes a velocidad máxima (0,1 mM) no se obtuvieron cambios significativos.

De forma paralela a lo que ocurría en la formación de glucosa, la corteza renal reduce la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa en animales a los que primeramente se les ha suministrado una dieta alta en carbohidratos durante

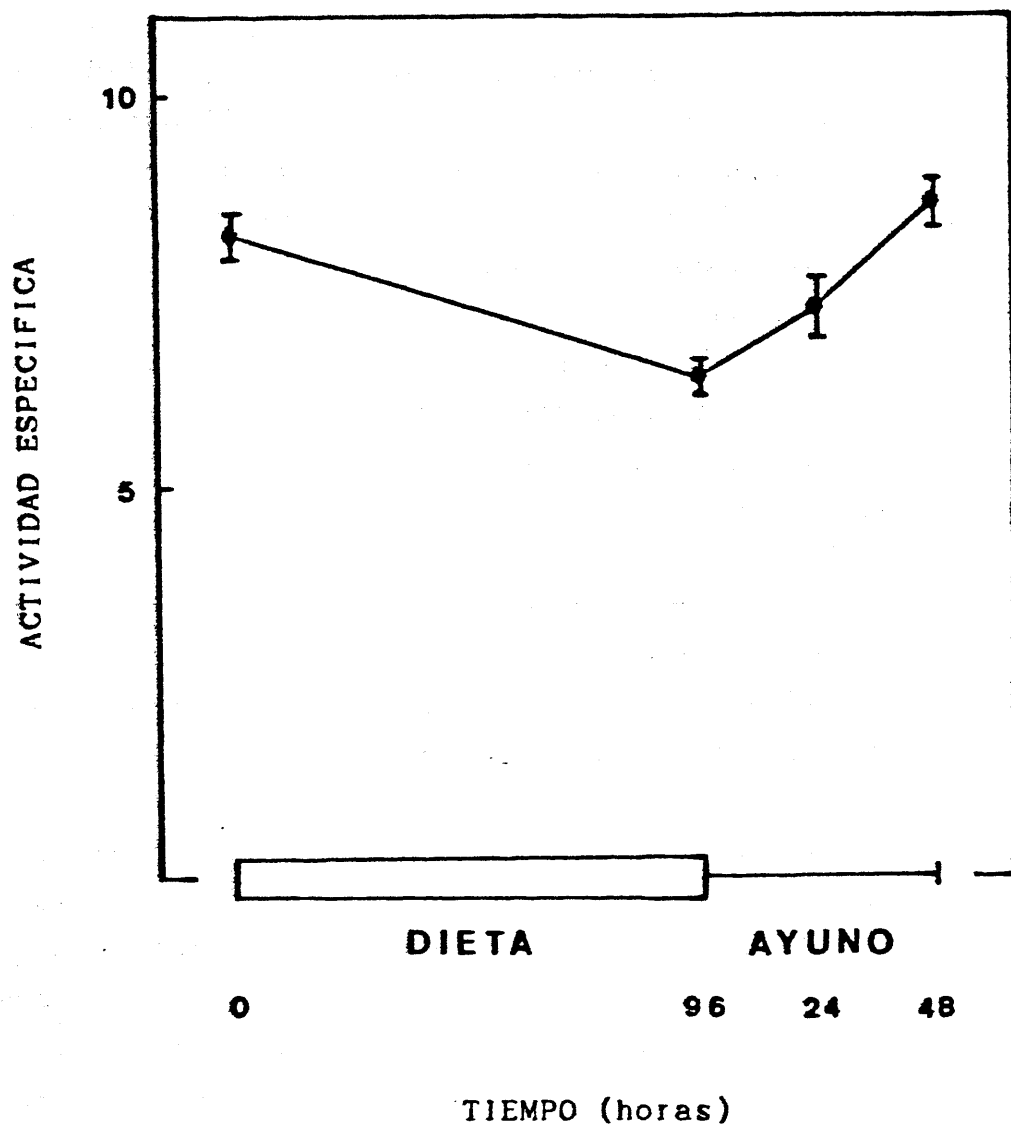
TABLA 27

ACTIVIDADES DE ENZIMAS GLUCONEOGENICOS DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE ALIMENTACION-AYUNO

	0 horas	96h Dieta CH	+24h Ayuno	+48h Ayuno
Vss	8,21±0,24 (4)	6,43±0,16 ^{***} (5)	7,27±0,31 [*] (5)	8,66±0,23 [*] (4)
FBPasa				
Vmax	91,57±9,76 (6)	88,46±4,15 (5)	91,66±6,27 (5)	81,01±2,68 (4)
Vss	5,29±0,24 (5)	3,85±0,20 ^{**} (5)	7,24±0,58 ^{**} (6)	9,56±0,52 [*] (3)
PEPCK				
Vmax	21,35±1,41 (5)	14,03±1,59 [*] (5)	35,29±2,31 ^{***} (6)	51,66±1,96 ^{**} (3)

La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0,0025 mM) y saturante (0,1 mM para la FBPasa y 1 mM para la PEPCK) de sustrato. El ± representa el error estándar de la media. Entre paréntesis se indica el nº de experimentos realizados. Los valores de esta tabla corresponden a las 0 horas; 96h con una dieta alta en carbohidratos; 96h con esa dieta + 24h de ayuno; 96h con la misma dieta + 48h de ayuno. El grado de significancia P de cada valor con respecto al anterior se expresa como: a) P<0,05; b) P<0,005; c) P<0,0005.

FIGURA 49



EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE ALIMENTACION-AYUNO. La actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa correspondiente a los valores de velocidad subsaturante (0,01 mM), se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Las barras verticales indican el error estándar de la media. El periodo de alimentación corresponde al de una dieta rica en carbohidratos.

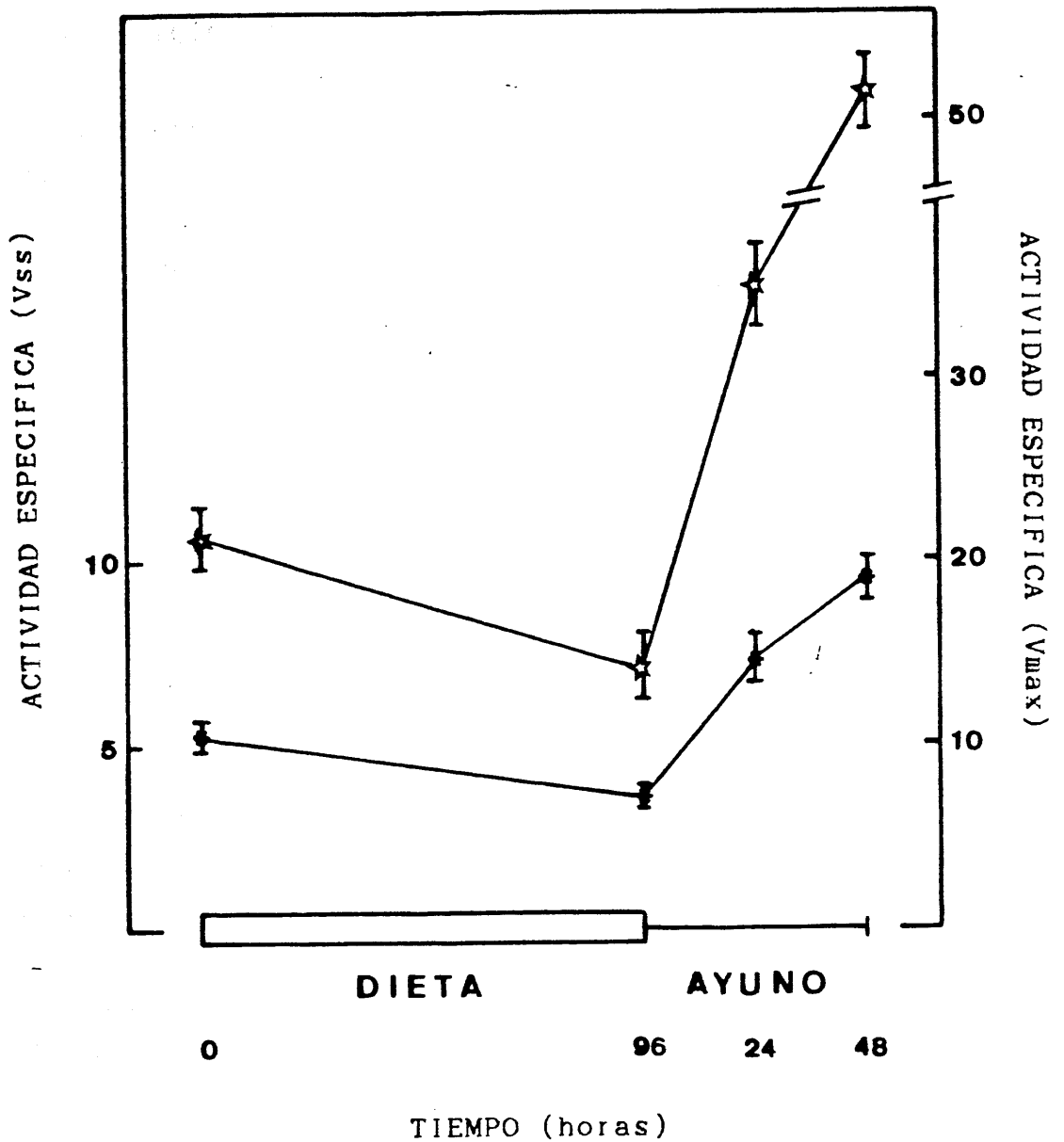
96 horas. Esta actividad se ve incrementada posteriormente si a continuación a estos animales se les somete a un periodo de ayuno de 24 ó 48 horas, alcanzándose valores próximos a los correspondientes al inicio del ciclo (0h).

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, además de los cambios que tienen lugar a nivel de la actividad a concentración subsaturante de sustrato (tabla 27), presenta variaciones considerables a velocidad máxima, siendo este comportamiento característico de un enzima inducible. En la figura 50, se representan los valores correspondientes a la actividad PEPCK a ambas concentraciones de sustrato (0,0025mM y 1 mM). Los cambios que ocurren en la actividad PEPCK son paralelos a los ya comentados de la FBPasa, a excepción de los que ocurren en la velocidad máxima. Como se puede comprobar, éstos son prácticamente proporcionales a los de la velocidad a concentración subsaturante.

Tomando como ejemplo los cambios producidos a velocidad máxima, el porcentaje de inhibición a las 96h de dieta con respecto a las 0h es alrededor de un 35%; mientras el incremento en la actividad producido por el ayuno representa un 150% a las 24h y un 270% a las 48h, con respecto al punto de las 96h con dieta. Asimismo, se puede observar claramente que el incremento de actividad PEPCK en las primeras 24h de ayuno (150%) es superior al obtenido durante el segundo periodo que solamente alcanza un 50%.

Esta diferente capacidad de adaptación también tiene lugar cuando se analiza la velocidad a concentración subsaturante, siendo 3 veces mayor el incremento durante las primeras 24h de ayuno (90% frente a un 30% obtenido en el segundo periodo).

FIGURA 50



EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASA DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE ALIMENTACION-AYUNO. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Se representan los valores correspondientes a la velocidad subsaturante, Vss (*), y velocidad máxima, Vmax (☆). Las barras verticales indican el error estándar de la media. El periodo de alimentación corresponde al de una dieta rica en carbohidratos.

3.3.2.2.- Ciclo ayuno-alimentación

Durante el ciclo ayuno-alimentación el comportamiento de los enzimas gluconeogénicos es inverso al mostrado anteriormente pero con respuestas semejantes ante las dos situaciones nutricionales que caracterizan a estos ciclos.

La actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa de corteza renal aumenta significativamente a concentraciones celulares de fructosa 1,6-bisfosfato a lo largo de las 96 horas de ayuno, para descender posteriormente cuando los animales son tratados con una dieta alta en carbohidratos. A velocidad máxima, no se observan cambios en la actividad de este enzima durante todo el tiempo experimental (tabla 28 y figura 51).

Frente a la situación de ayuno, el enzima parece responder de manera rápida ya que el descenso en la actividad enzimática, durante el primer periodo de ayuno, alcanza un valor del orden del 45%, mientras que en las segundas 24 horas este valor solo es del 23% (figura 51). La actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa desciende, al final de la experiencia, por debajo de la encontrada al inicio del ciclo en un 40%.

Por otra parte, la actividad PEPCK de corteza renal presenta variaciones a las dos concentraciones de sustrato utilizadas. Los resultados de este enzima se muestran en la tabla 28 y figura 52. Al igual de lo que ocurría con el ciclo anterior, las variaciones de ambas actividades son prácticamente proporcionales a lo largo de todo el periodo experimental.

Tanto la actividad PEPCK a concentraciones subsaturantes como saturantes de sustrato responden con mayor capacidad adaptativa durante las primeras 24h de alimentación. En ambos casos este valor es del orden de 3 veces mayor que en el segundo periodo.

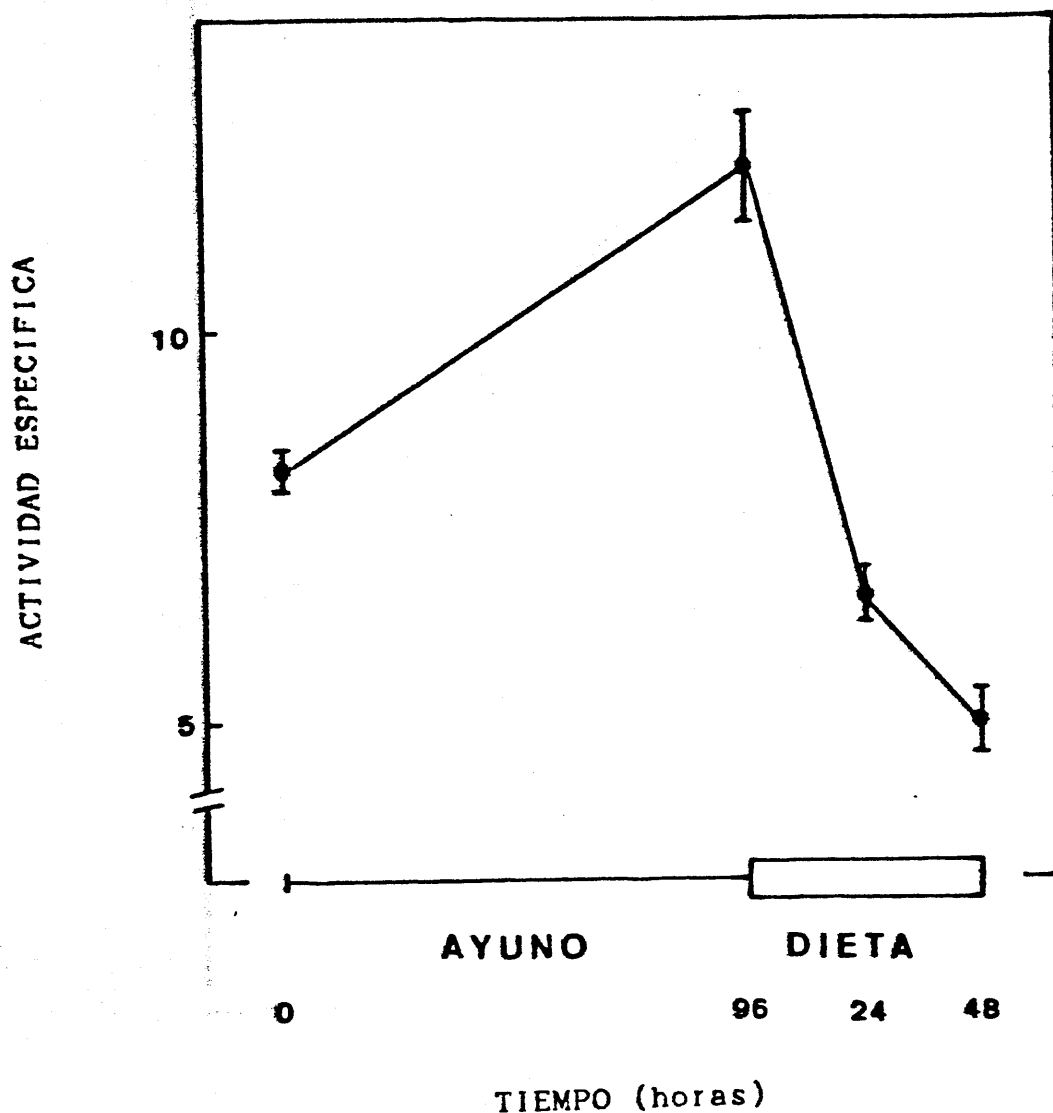
TABLA 28

ACTIVIDADES DE ENZIMAS GLUCONEOGENICOS DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE AYUNO-ALIMENTACION

	0 horas	96h Ayuno	+24h Dieta CH	+48h Dieta CH
Vss	8,21±0,24 (4)	12,10±0,72* (9)	6,61±0,30*** (7)	5,04±0,29** (5)
FBPasa				
Vmax	91,57±9,76 (6)	86,79±2,91 (8)	89,62±8,36 (5)	79,39±4,47 (5)
Vss	5,29±0,24 (5)	10,65±1,12** (3)	5,59±0,44* (5)	4,42±0,42 (3)
PEPCK				
Vmax	21,35±1,41 (5)	57,08±1,02*** (4)	20,68±1,00*** (5)	16,88±1,03* (4)

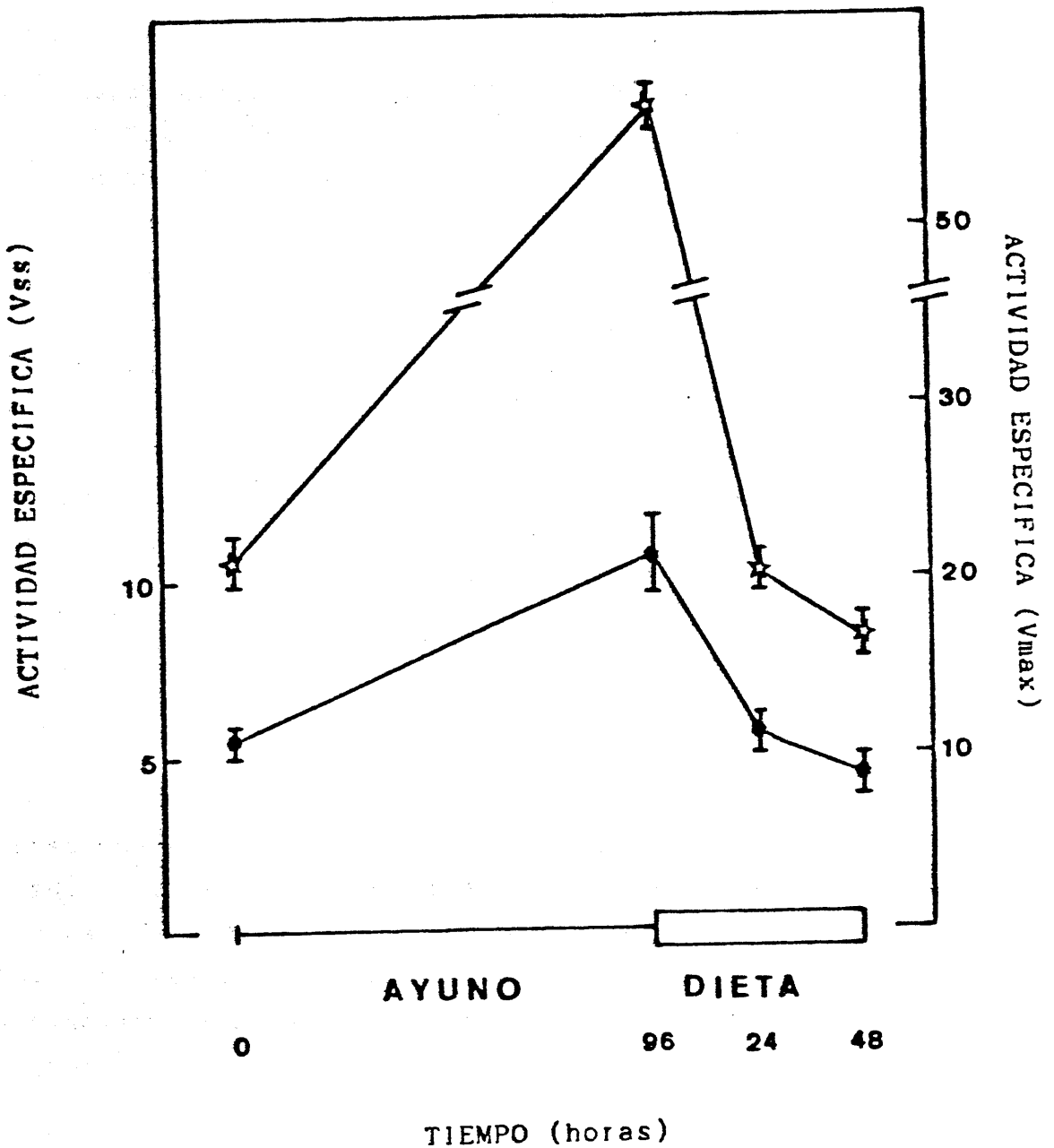
La actividad enzimática se expresa como nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0,0025 mM) y saturante (0,1 mM en la FBPasa y 1 mM en la PEPCK) de sustrato. El ± representa el error estándar de la media. Entre paréntesis se indica el nº de experimentos. Los valores de esta tabla corresponden a los obtenidos a las 0 horas; 96h de ayuno; 96h de ayuno + 24h con dieta alta en carbohidratos; 96h de ayuno + 48h con esa misma dieta. El grado de significancia P de cada valor con respecto al anterior se expresa como: *) P<0,05; **) P<0,001; ***) P<0,0001

FIGURA 51



EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE AYUNO-ALIMENTACION. La actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa, correspondiente a los valores de velocidad subsaturante, se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Las barras verticales indican el error estándar de la media. El periodo de alimentación corresponde al de una dieta rica en carbohidratos.

FIGURA 52



EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASA DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE AYUNO-ALIMENTACION. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Se representan los valores correspondientes a la velocidad subsaturante, V_{ss} (●), y velocidad máxima, V_{max} (☆). Las barras verticales indican el error estándar de la media. El periodo de alimentación corresponde al de una dieta rica en carbohidratos.

3.3.3.- Comportamiento de enzimas glucolíticos de corteza renal durante ciclos de alimentación-ayuno y ayuno-alimentación

3.3.3.1.- Ciclo alimentación-ayuno

Una dieta alta en carbohidratos suministrada durante 96 horas, provoca cambios similares en la actividad de los dos enzimas glucolíticos estudiados, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa de corteza renal. Estos cambios solo tienen lugar a concentración subsaturante de sustrato (0,25 mM en la PFK y 0,02 mM en la PK), y consisten en un incremento significativo de la actividad de ambos enzimas.

El ayuno, a que son sometidos los animales tras la alimentación con la dieta, hace disminuir ambas actividades enzimáticas. En el caso de la PFK el valor de actividad desciende por debajo del encontrado a las 0 horas, mientras que en el caso de la PK, el ayuno no logró reducir su actividad a concentración subsaturante de sustrato por debajo de los valores obtenidos al principio del ciclo. La velocidad máxima de ambos enzimas no varió significativamente a lo largo de la experiencia. Los resultados se muestran en la tabla 29 y figura 53.

3.3.3.2.- Ciclo ayuno-alimentación

Los cambios en las actividades fosfofructoquinasa y piruvato quinasa de corteza renal durante un ciclo de ayuno-alimentación se muestran en la tabla 30 y figura 54.

La actividad PFK a concentraciones celulares de sustrato disminuye significativamente durante las 96 horas

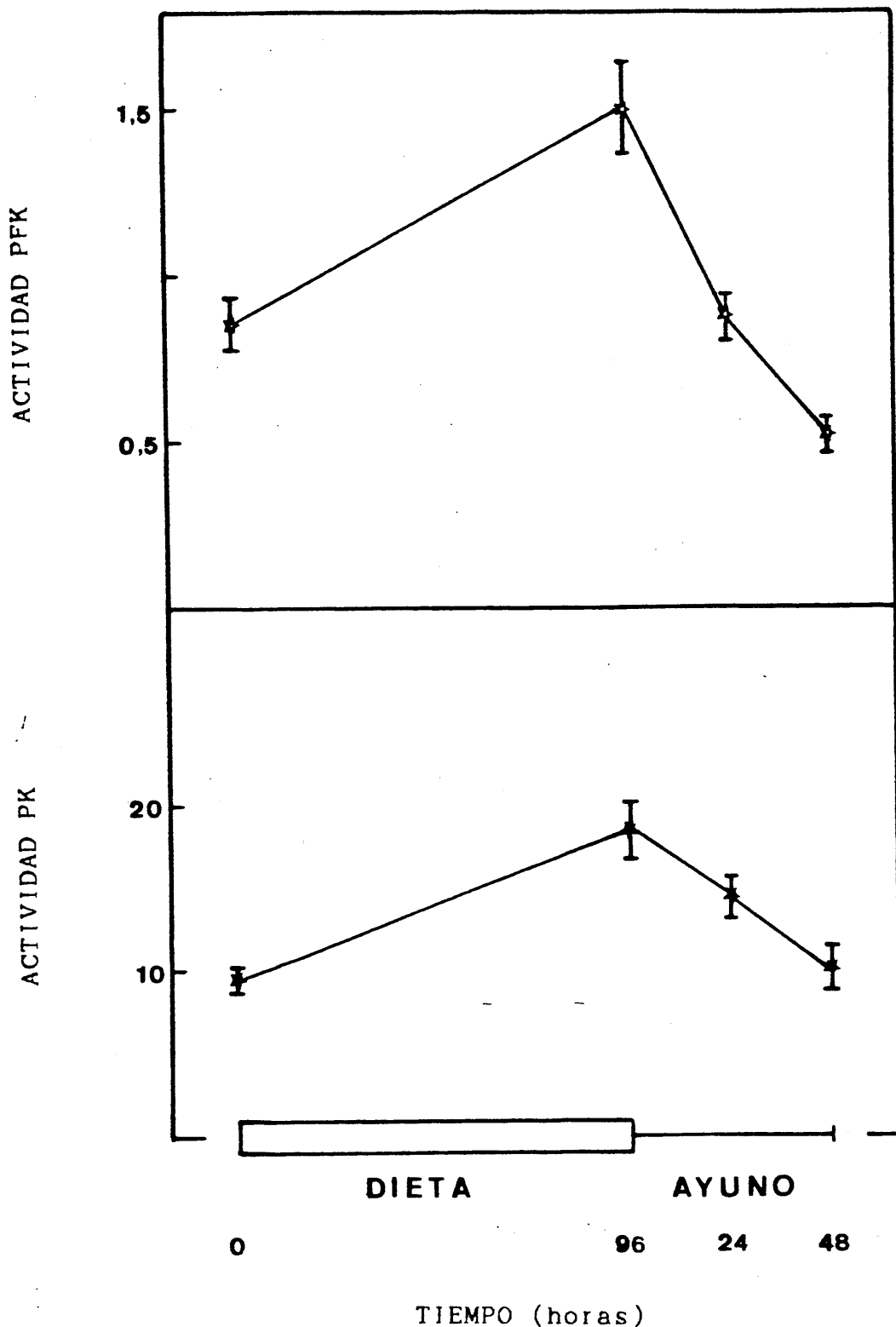
TABLA 29

ACTIVIDADES DE ENZIMAS GLUCOLITICOS DE CORTEZA RENAL
DURANTE UN CICLO DE ALIMENTACION-AYUNO

	0 horas	96h Dieta CH	+24h Ayuno	+48h Ayuno
Vss	0,854±0,075 (6)	1,508±0,140 (4) ***	0,891±0,063 (4) **	0,516±0,041 (4) ***
PFK				
Vmax	13,46±1,26 (6)	10,84±0,81 (4)	10,67±0,40 (4)	10,70±1,28 (5)
Vss	9,68±0,53 (4)	18,47±1,68 (6) ***	14,85±1,07 (4)	10,17±1,00 (4) *
PK				
Vmax	137,46±5,50 (4)	126,62±6,37 (6)	122,63±7,70 (6)	141,76±6,04 (4)

La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0,25 mM en la PFK y 0,02 mM en la PK) y concentración saturante (3 mM) de sustrato. El ± representa el error estándar de la media. Entre paréntesis se indica el nº de experimentos realizados. Los valores de esta tabla corresponden a las 0 horas; 96h con dieta alta en carbohidratos; 96h con esa dieta + 24h de ayuno; 96h con dieta + 48h de ayuno. El grado de significancia P de cada valor con respecto al anterior se expresa como: *) P<0,02; **) P<0,01; ***) P<0,005.

FIGURA 53



EVOLUCION DE LAS ACTIVIDADES FOSFOFRUCTOQUINASA Y PI-RUVATO QUINASA DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE ALIMENTACION-AYUNO. Las actividades enzimáticas, correspondientes a los valores de velocidad subsaturante, se expresan en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Las barras verticales indican el error estándar de la media. El periodo de alimentación corresponde al de una dieta rica en carbohidratos.

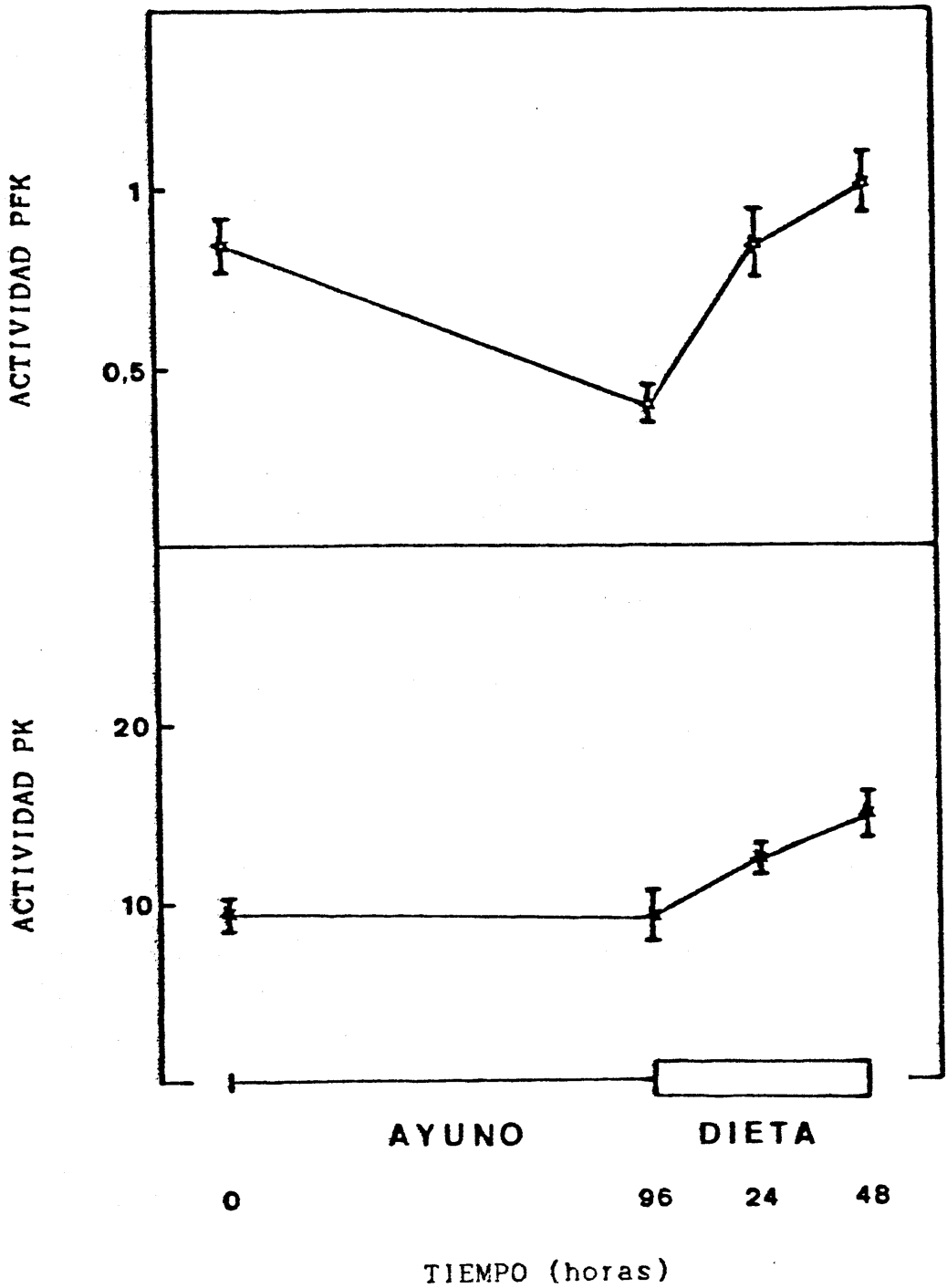
TABLA 30

ACTIVIDADES DE ENZIMAS GLUCOLITICOS DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE AYUNO-ALIMENTACION

	0 horas	96h Ayuno	+24h Dieta CH	+48h Dieta CH
Vss	0,854±0,075 (6)	0,406±0,035 (5)	0,858±0,092 (4)	1,16±0,074 (5)
		***	**	*
PFK				
Vmax	13,46±1,26 (6)	10,41±0,05 (5)	9,98±0,69 (4)	10,85±1,21 (5)
Vss	9,68±0,53 (4)	9,43±1,21 (8)	12,48±0,33 (4)	14,67±0,96 (4)
PK				
Vmax	137,46±5,50 (4)	124,23±5,65 (8)	124,69±9,39 (6)	134,41±11,09 (4)

La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Vss y Vmax corresponden a las actividades específicas a concentración subsaturante (0,25 mM en la PFK y 0,02 mM en la PK) y a concentración saturante (3 mM) de sustrato. El ± representa el error estándar de la media y entre paréntesis se indica el n° de experimentos. Los valores de esta tabla corresponden a las 0 horas; 96h de ayuno; 96h de ayuno + 24h con dieta alta en carbohidratos; y 96h de ayuno + 48h con esa misma dieta. El grado de significancia P de cada valor con respecto al anterior se expresa como: *) P<0,05; **) P<0,005; ***) P<0,001.

FIGURA 54



EVOLUCION DE LAS ACTIVIDADES FOSFOFRUCTOQUINASA Y PIRUVATO QUINASA DE CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE AYUNO-ALIMENTACION. Las actividades enzimáticas, correspondientes a los valores de velocidad subsaturante, se expresan en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Las barras verticales indican el error estándar de la media. El periodo de alimentación corresponde al de una dieta rica en carbohidratos.

de ayuno para elevarse posteriormente con la dieta rica en carbohidratos. El incremento, durante esta parte del ciclo, fué del orden del 110% durante las primeras 24 horas y solo del 35% en el segundo periodo. La velocidad máxima no sufrió cambios a lo largo del periodo experimental.

El comportamiento de la piruvato quinasa fué cualitativamente diferente. Durante las 96 horas de ayuno no se obtuvieron cambios en la actividad del enzima a concentraciones subsaturantes de fosfoenolpiruvato, confirmando los resultados expuestos anteriormente con los túbulos renales. Mientras que cuando los animales fueron sometidos a alimentación, su actividad se incrementó significativamente. En este caso, el incremento observado durante las primeras 24 horas fué el doble del obtenido en el segundo periodo de alimentación.

Como resumen final de esta experiencia, se han establecido los porcentajes de activación o de inhibición, de todos los parámetros bioquímicos estudiados, referidos al inicio de cada una de las situaciones nutricionales, consideradas estas como el momento de 0 horas y el de 96 horas de ayuno o de dieta rica en carbohidratos, a partir del cual se cambia a la situación contraria.

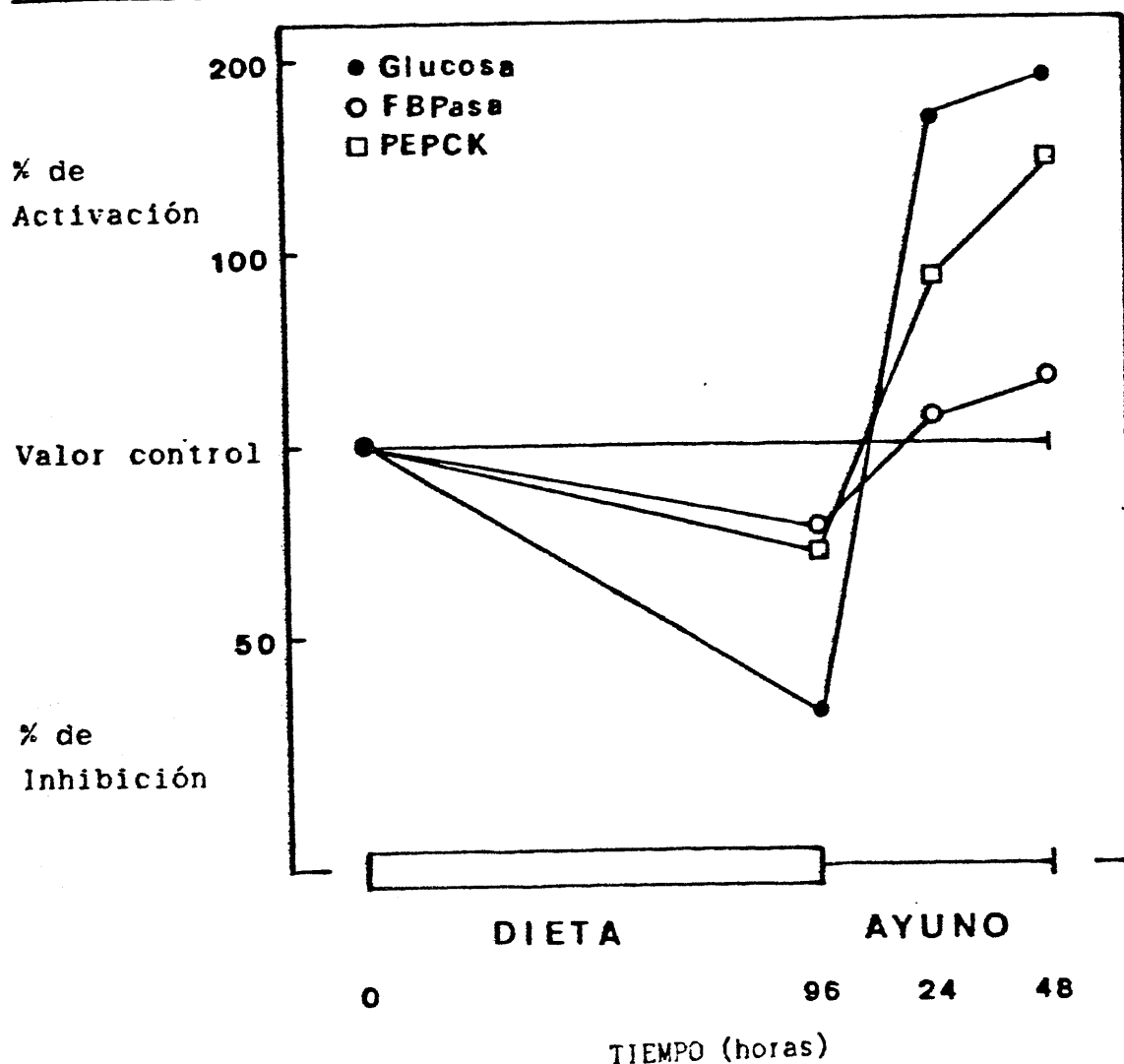
Tanto en el ciclo alimentación-ayuno como ayuno-alimentación, los cambios observados en la formación de glucosa y en los dos enzimas gluconeogénicos, FB_Pasa y PEPCK, son semejantes y paralelos. Estos resultados se resumen en la tabla 31, figura 55 y tabla 33, figura 57.

Igual ocurre con la formación de lactato+piruvato y los enzimas glucolíticos, PFK y PK. Únicamente destacar el hecho de que la PK no se afecta por el ayuno a las 96 horas (tabla 32, figura 56 y tabla 34, figura 58).

TABLA 31 y FIGURA 55

EVOLUCION DE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA Y ENZIMAS RELACIONADOS EN CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE ALIMENTACION-AYUNO.

	DIETA		AYUNO	
	0 horas	96 horas	+24 horas	+48 horas
Glucosa	100%	-70%	+172%	+218%
FBPasa	100%	-22%	+13%	+35%
PEPCK	100%	-28%	+88%	+149%

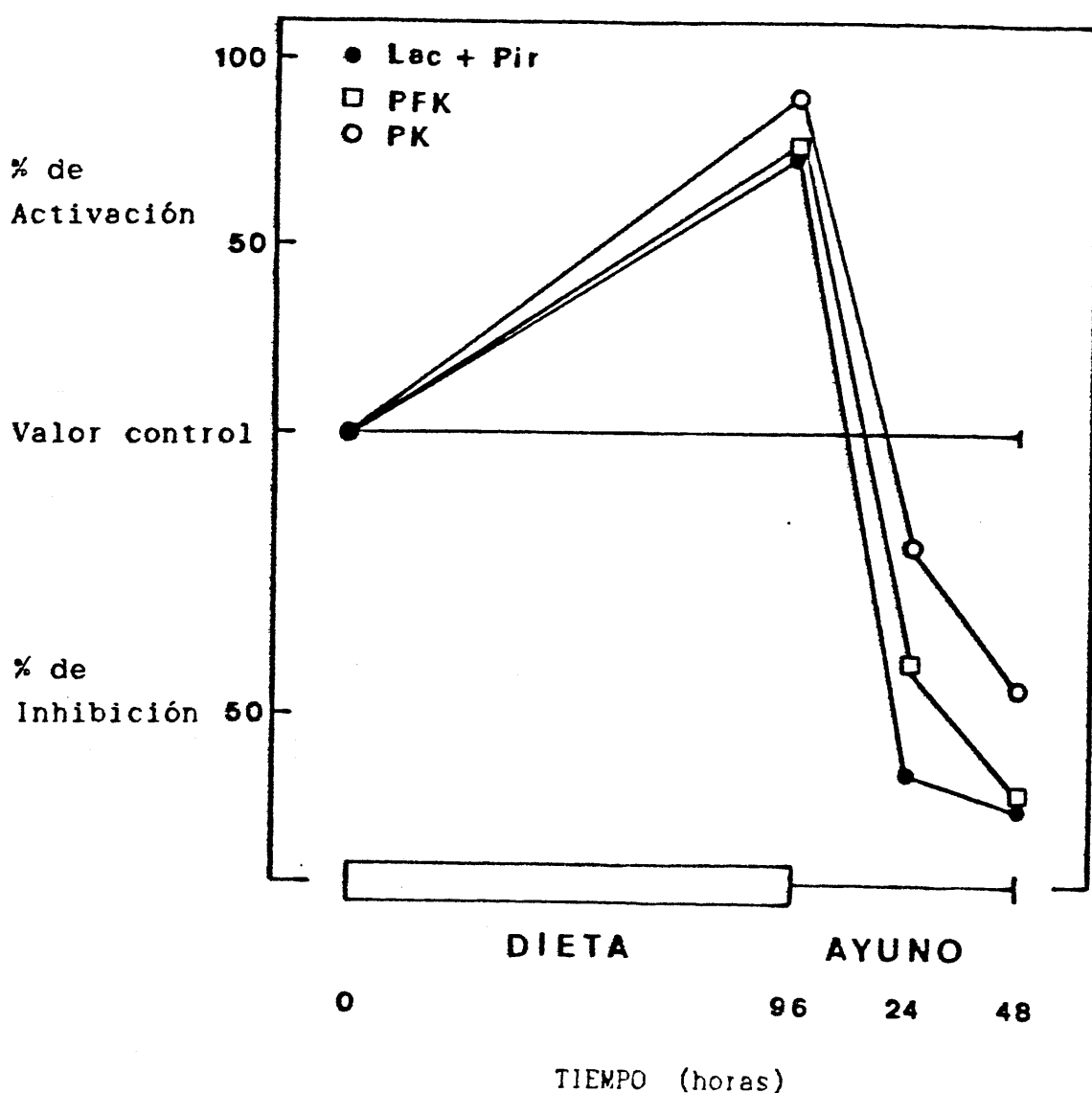


Los resultados se expresan como porcentajes respecto a los valores correspondientes al inicio de las diferentes situaciones nutricionales. A las 96 horas se calcula con respecto a las 0 horas; a las 24 y 48h con respecto a las 96h. En las actividades enzimáticas se representan los valores que corresponden a la velocidad subsaturante.

TABLE 32 y FIGURA 56

EVOLUCION DE LA CAPACIDAD GLUCOLITICA Y ENZIMAS RELACIONADOS EN CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE ALIMENTACION-AYUNO.

	DIETA		AYUNO	
	0 horas	96 horas	+24 horas	+48 horas
Lac+Pir	100%	+75%	-61%	-67%
PFK	100%	+77%	-41%	-66%
PK	100%	+91%	-20%	-45%

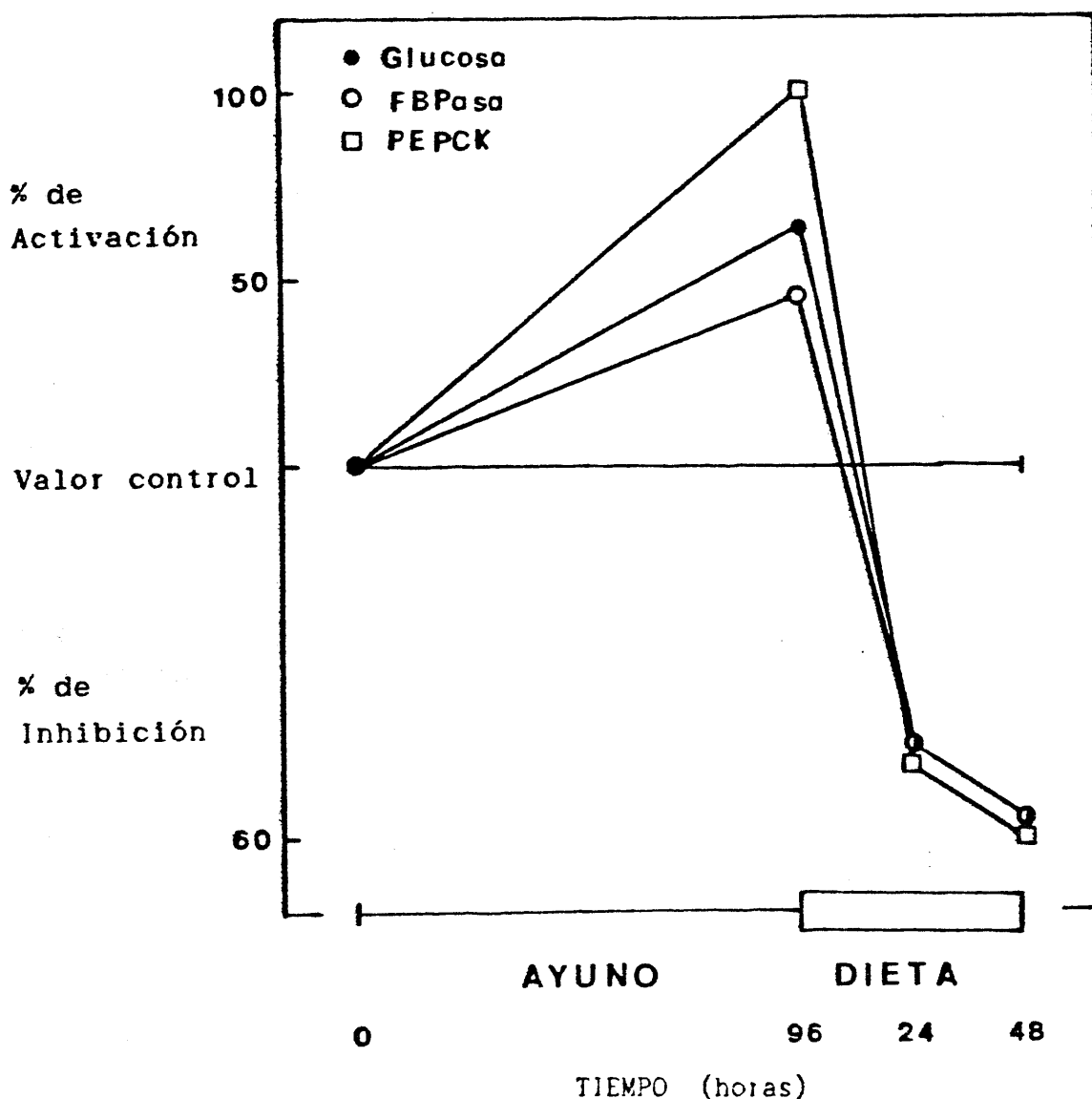


Los resultados se expresan como porcentajes respecto a los valores correspondientes al inicio de las diferentes situaciones nutricionales. A las 96 horas se calcula con respecto a las 0 horas; a las 24 y 48h con respecto a las 96h. En las actividades enzimáticas se representan los valores que corresponden a la velocidad subsaturante.

TABLA 33 y FIGURA 57

EVOLUCION DE LA CAPACIDAD GLUCONEOGENICA Y ENZIMAS RELACIONADOS EN CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE AYUNO-ALIMENTACION.

	DIETA		AYUNO	
	0 horas	96 horas	+24 horas	+48 horas
Glucosa	100%	+64%	-45%	-58%
FBPasa	100%	+47%	-45%	-58%
PEPCK	100%	+101%	-48%	-59%

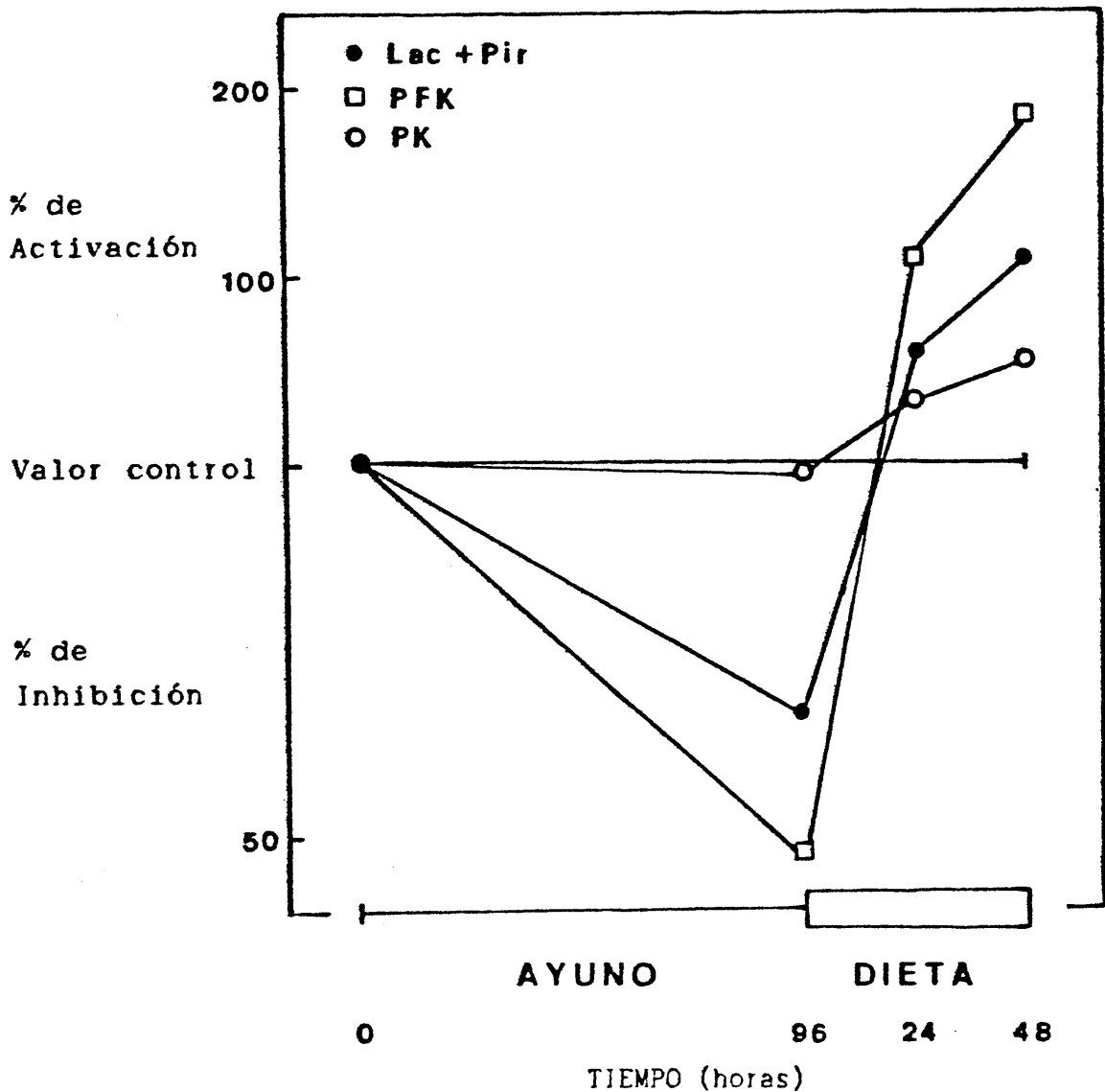


Los resultados se expresan como porcentajes respecto a los valores correspondientes al inicio de las diferentes situaciones nutricionales. A las 96 horas se calcula con respecto a las 0 horas; a las 24 y 48h con respecto a las 96h. En las actividades enzimáticas se representan los valores que corresponden a la velocidad subsaturante.

TABLA 34 y FIGURA 58

EVOLUCION DE LA CAPACIDAD GLUCOLITICA Y ENZIMAS RELACIONADOS EN CORTEZA RENAL DURANTE UN CICLO DE AYUNO-ALIMENTACION.

	DIETA		AYUNO	
	0 horas	96 horas	+24 horas	+48 horas
Lac+Pir	100%	-34%	+61%	+111%
PFK	100%	-53%	+111%	+188%
PK	100%	-2%	+32%	+56%



Los resultados se expresan como porcentajes respecto a los valores correspondientes al inicio de las diferentes situaciones nutricionales. A las 96 horas se calcula con respecto a las 0 horas; a las 24 y 48h con respecto a las 96h. En las actividades enzimáticas se representan los valores que corresponden a la velocidad subsaturante.

3.3.4.- Comportamiento de la gluconeogénesis y glucolisis y enzimas relacionados de corteza renal durante ciclos alternativos de alimentación-ayuno-alimentación y ayuno-alimentación-ayuno

Para corroborar los resultados obtenidos anteriormente, se realizaron experiencias en donde se incluían ciclos completos de alimentación-ayuno-alimentación y ayuno-alimentación-ayuno, con una duración de 96 horas-96 horas-48 horas respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 59, 60 y 61.

En la figura 59 se han representado conjuntamente las capacidades gluconeogénica y glucolítica de corteza renal en ambos ciclos de alimentación. El panel superior indica el comportamiento de estos procesos durante el ciclo dieta-ayuno-dieta. El panel inferior muestra los cambios observados durante el ciclo opuesto. En ambos casos se puede observar que los dos procesos metabólicos presentan un comportamiento claramente antiparalelo.

En la figura 60, se resumen los valores correspondientes a las actividades FBPasa y PFK a concentración subsaturante de sustrato durante ambos ciclos de alimentación. La figura 61, muestra los cambios observados en las actividades PK y PEPCK de corteza renal durante ambas situaciones nutricionales. Los cambios observados en la actividad de estas enzimas son semejantes a los que tienen lugar en los procesos gluconeogénico y glucolítico, presentando un comportamiento antiparalelo a lo largo del periodo experimental.

Figura 59.- EVOLUCION DE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA DE CORTEZA RENAL DURANTE CICLOS DE ALIMENTACION-AYUNO Y AYUNO-ALIMENTACION. La capacidad gluconeogénica se expresa como μ moles de glucosa/hora de incubación /gramo de tejido seco. La capacidad glucolítica se expresa como nmoles de lactato+piruvato/hora de incubación/mg de tejido seco. Cada punto corresponde a los valores obtenidos en 1 ó 2 experimentos.

Figura 60.- EVOLUCION DE LAS ACTIVIDADES FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA Y FOSFOFRUCTOQUINASA DE CORTEZA RENAL DURANTE CICLOS DE ALIMENTACION-AYUNO Y AYUNO-ALIMENTACION. Las actividades enzimáticas van expresadas en nmoles de sustrato transformadas/minuto/mg de proteína. Solamente se representan los valores a velocidad subsaturante. Cada punto corresponde a los valores obtenidos en 1 ó 2 experimentos.

Figura 61.- EVOLUCION DE LAS ACTIVIDADES FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASA Y PIRUVATO QUINASA DE CORTEZA RENAL DURANTE CICLOS DE ALIMENTACION-AYUNO Y AYUNO-ALIMENTACION. Las actividades enzimáticas van expresadas en nmoles de sustrato transformados/minuto/mg de proteína. Solamente se representan los valores a velocidad subsaturante. Cada punto corresponde a los valores obtenidos en 1 ó 2 experimentos.

FIGURA 59

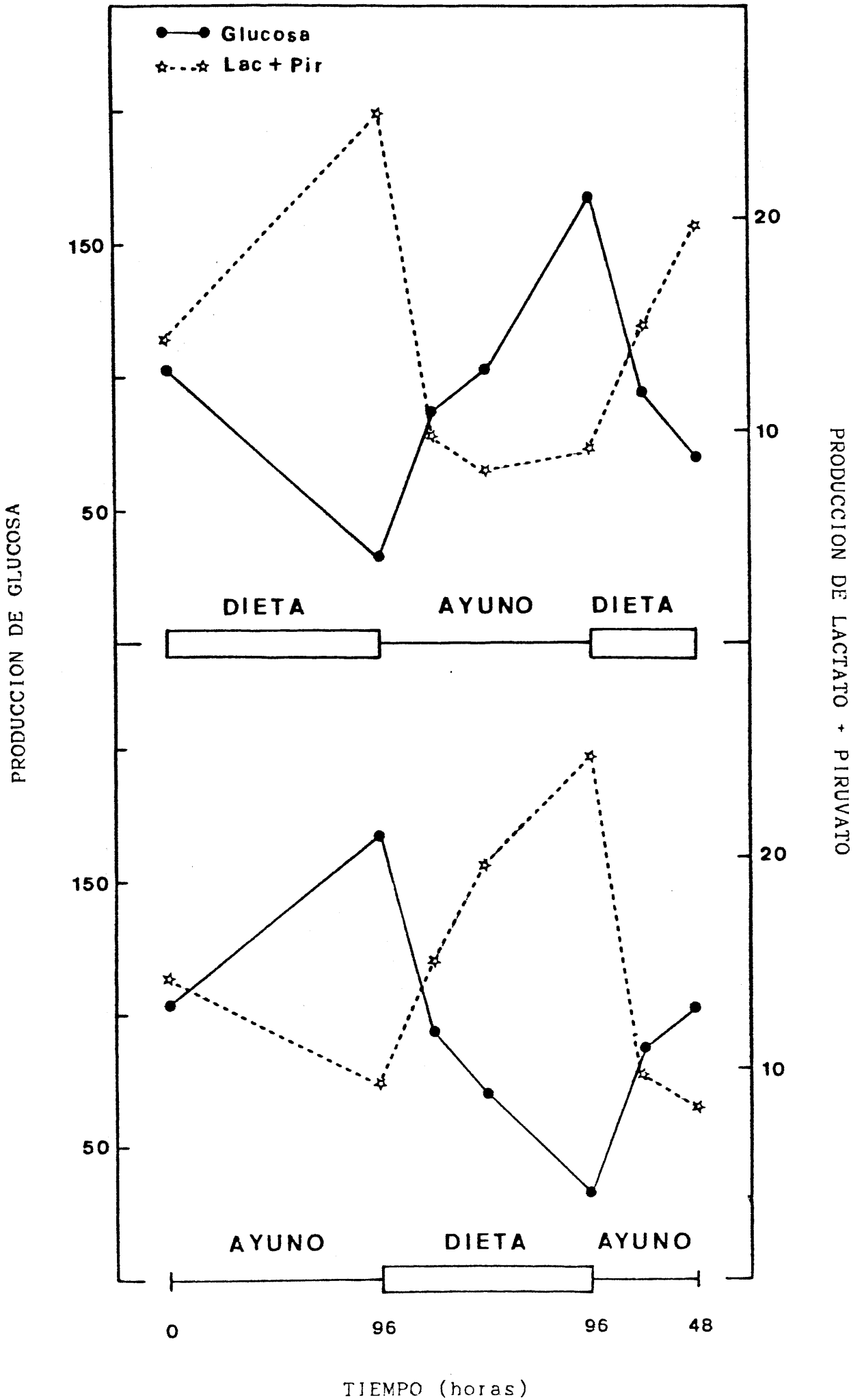


FIGURA 60

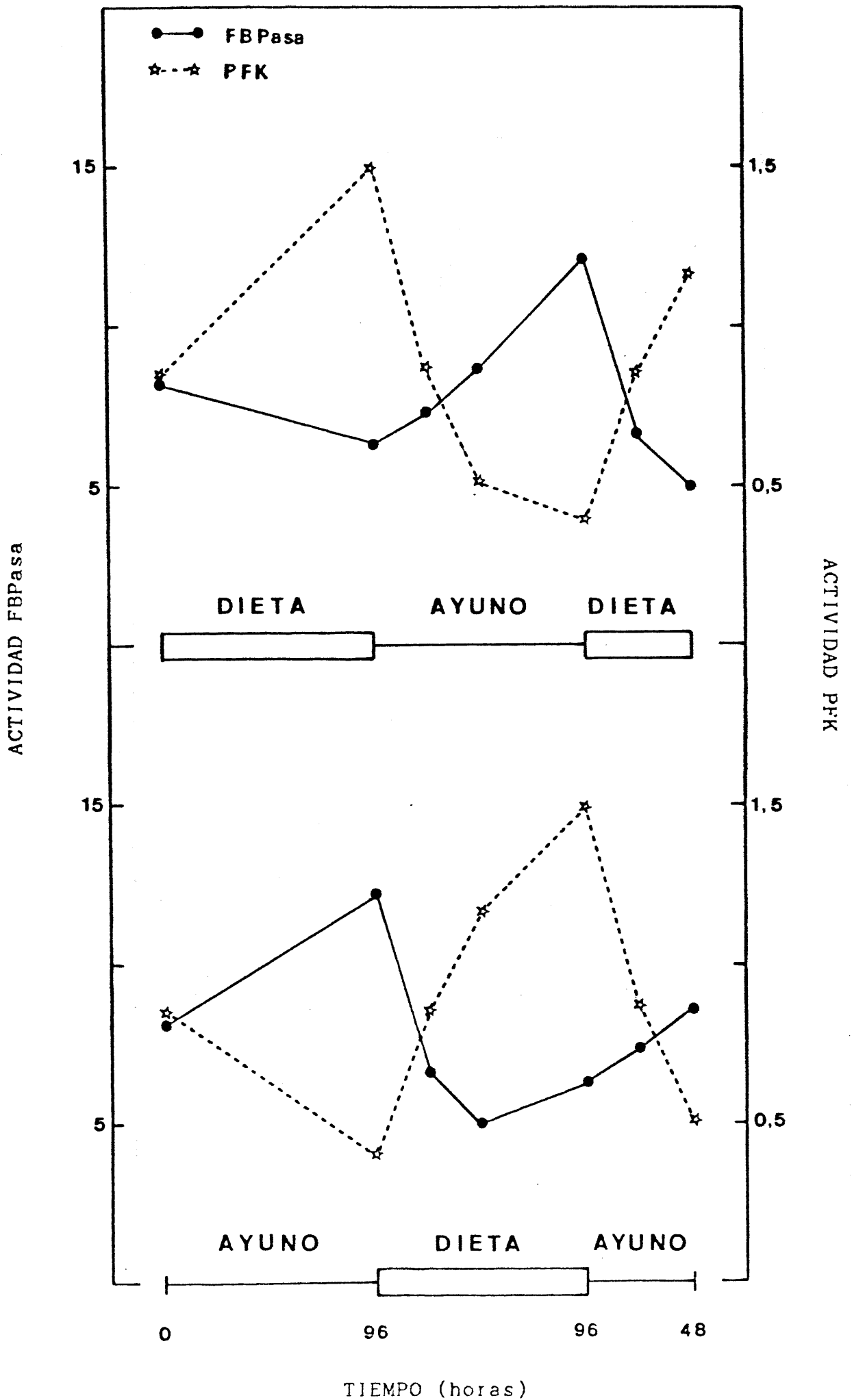
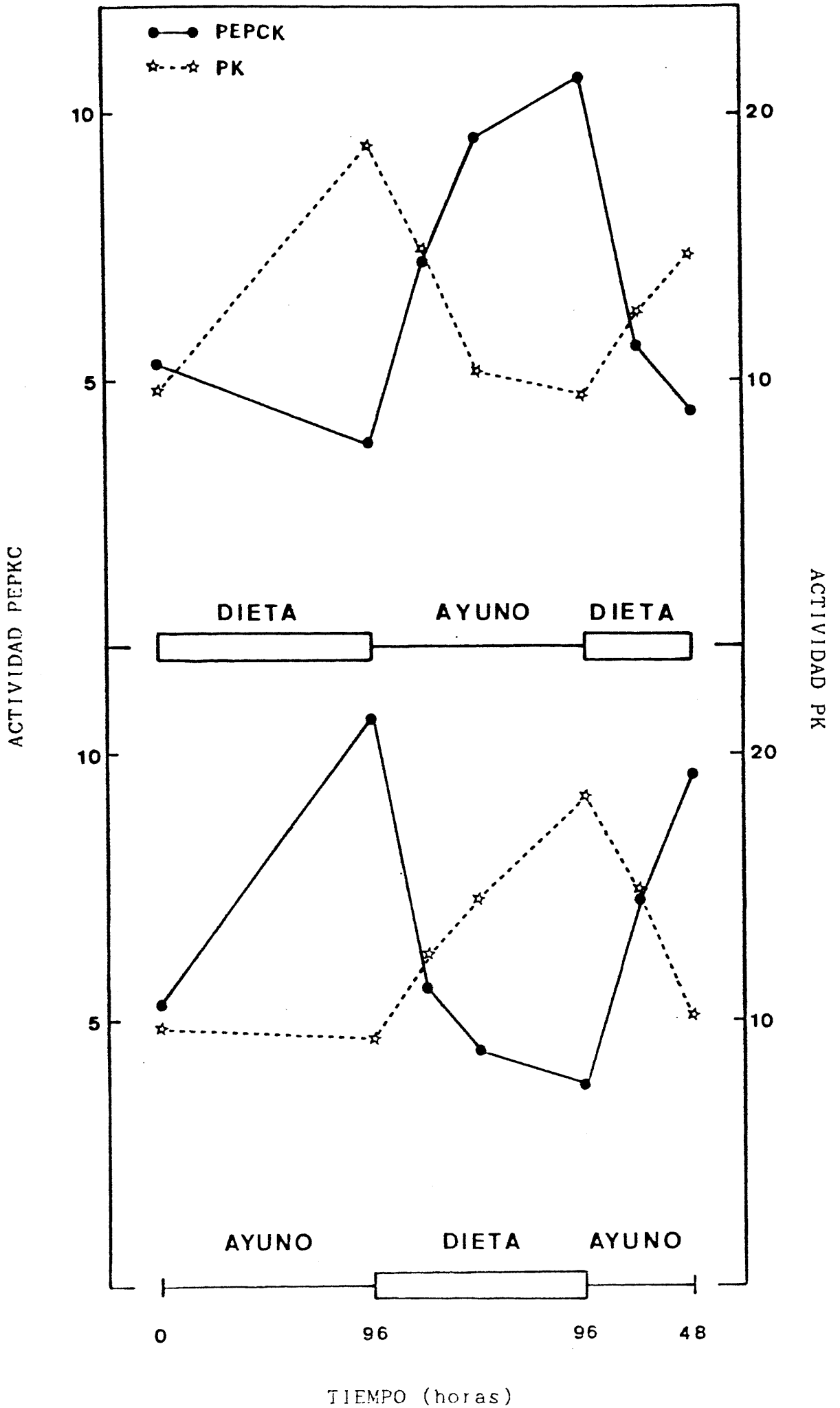


FIGURA 61



DISCUSION

COMENTARIOS GENERALES

Uno de los aspectos más importantes del metabolismo celular se centra en las reacciones de las enzimas que controlan el metabolismo. Las enzimas de la familia de las serina proteasas participan en los procesos de síntesis y degradación de proteínas, con el resto de las enzimas que participan en la oxidación y biosíntesis de los ácidos grasos, los lípidos orgánicos, tales como ácidos grasos, y el ciclo del catalismo energético por su implicación en el metabolismo de los ácidos tricarbónicos y triésteres.

Universalmente se define el metabolismo como el proceso bioquímico mediante el cual una célula transforma materia orgánica en energía y otros productos. Este proceso se realiza a través de una serie de reacciones químicas que implican la transformación de los nutrientes en energía y otros productos. El metabolismo se divide en dos tipos: el metabolismo catabólico, que implica la degradación de los nutrientes en energía y otros productos, y el metabolismo anabólico, que implica la síntesis de los nutrientes en energía y otros productos.

4 - DISCUSION

Por el contrario, el metabolismo anabólico se refiere a la síntesis de los nutrientes en energía y otros productos. Este proceso se realiza a través de una serie de reacciones químicas que implican la transformación de los nutrientes en energía y otros productos. El metabolismo anabólico se divide en dos tipos: el metabolismo catabólico, que implica la degradación de los nutrientes en energía y otros productos, y el metabolismo anabólico, que implica la síntesis de los nutrientes en energía y otros productos.

4 - DISCUSION

4.1.- COMENTARIOS GENERALES

Uno de los aspectos mas importantes del trabajo celular se centra en las relaciones existentes entre el tronco central del metabolismo intermediario, constituido por los procesos de síntesis y degradación de carbohidratos, con el resto de las rutas metabólicas implicadas en la oxidación y biosíntesis de los demás principios inmediatos orgánicos, tales como grasas y proteínas, y del metabolismo energético por su integración con el ciclo de los ácidos tricarbónicos y transporte electrónico mitocondrial.

Universalmente se define a la gluconeogénesis como el proceso biosintético mediante el cual las células, con dicha capacidad, son capaces de sintetizar glucosa a partir de precursores carbonados de naturaleza no glucídica, tales como piruvato y lactato, procedentes mayoritariamente del metabolismo de carbohidratos; glicerol, procedente de la degradación de triacilglicéridos, y una serie de aminoácidos, denominados glucogénicos, procedentes del metabolismo proteico.

Por el contrario, el proceso de oxidación de carbohidratos conocido como glucolisis se define como la capacidad que presentan los diferentes tipos de células para degradar glucosa hasta piruvato y lactato, de forma que dicho proceso oxidativo proporciona energía util para dichas células tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas gracias al posterior metabolismo mitocondrial del piruvato. Además, este conjunto de reacciones sirven como puntos de conexión en el metabolismo degradativo del resto de los macronutrientes, grasas y proteínas.

En mamíferos, mientras que el proceso glucolítico tiene lugar en todas las células del organismo, la gluconeogénesis ocurre, de forma significativa, solo en dos tejidos, hígado y corteza renal. Tradicionalmente se ha considerado al tejido hepático como el principal responsable del mantenimiento de unos niveles adecuados de glucosa en sangre, gracias, tanto al proceso de síntesis de novo de glucosa, como al de degradación del glucógeno almacenado en este órgano. De forma que la glucosa liberada por el hígado sirva para satisfacer las necesidades de este combustible metabólico en los tejidos periféricos que más la necesitan, tales como cerebro, eritrocitos y médula renal principalmente.

El significado biológico de la gluconeogénesis de corteza renal aún no está claro del todo. Parece ser que el papel que juega este proceso es el de contribuir de una forma constante, sin cambios aparentes y significativos, al mantenimiento de la homeostasis glucémica del animal (Kida y col., 1978). Sin embargo, en los últimos años se han puesto de manifiesto aportaciones importantes y significativas de la capacidad gluconeogénica renal en situaciones fisiológicas tales como el ayuno (Owen y col., 1969; Kida y col., 1978) y patológicas como diabetes, acidosis (Kida y col., 1978) e incapacidad funcional hepática (García-Ruiz y col., 1973; Lupiáñez y col., 1976; Faus y col., 1978; Sánchez-Pozo y col., 1982; Sánchez-Pozo y col., 1983a y 1983b; Brinkmann y col., 1978; Katz y col., 1979a). Estos cambios en la gluconeogénesis renal indican claramente que al menos, bajo determinadas circunstancias, la corteza renal es capaz de adaptarse a nuevas situaciones, especialmente cuando la capacidad gluconeogénica hepática se encuentra disminuida, con el fin de procurar unas concentraciones de glucosa en sangre adecuadas para el animal.

Por otra parte, se sabe que una de las principales características del proceso gluconeogénico hepático es su capacidad de adaptación ante las diferentes condiciones nutricionales del organismo, siendo esta capacidad de adaptación uno de los más importantes y significativos aspectos, desde el punto de vista metabólico, para los procesos de integración y coordinación química del ser vivo.

Como se ha comentado anteriormente, se ha considerado al hígado como el principal órgano encargado del mantenimiento de la homeostasis glucémica; por ello, prácticamente todos los trabajos aparecidos en la literatura bioquímica relacionados con la influencia de diferentes situaciones nutricionales sobre el proceso gluconeogénico, se basan en este órgano (Kohl y Cottam, 1976; Van Berkel y col., 1978; Cladaras y Cottam, 1980a y 1980b; Peret y col., 1981; Azzout y Peret, 1984a y 1984b; Azzout y col., 1984). Sin embargo, de la misma forma que la corteza renal es capaz de adaptarse a diferentes casos de incapacidad funcional hepática (García-Ruiz y col., 1973; Lupiáñez y col., 1976; Faus y col., 1978; Sánchez-Pozo y col., 1983a y 1983b; Brinkmann y col., 1978; Katz y col., 1979a), sería interesante comprobar si esta capacidad de adaptación ocurre igualmente ante diferentes situaciones nutricionales, ya que este hecho aportaría una prueba adicional acerca del importante papel metabólico que juegan las células de este tejido en la coordinación del metabolismo de carbohidratos y glucorregulación en el organismo completo.

Por todas estas razones, nuestra atención se ha centrado en conocer los posibles cambios adaptativos del metabolismo de carbohidratos de corteza renal en respuesta a diferentes condiciones nutricionales, tales como el ayuno y mediante la elección de diferentes dietas que

varian fundamentalmente en la composición de los niveles de carbohidratos y proteínas. Siendo una de ellas una dieta alta en carbohidratos y baja en proteínas y a la que se denomina a lo largo de esta memoria alta o rica en carbohidratos, y otra alta en proteínas y baja en carbohidratos, a la que se denomina alta o rica en proteínas.

4.2.- EFECTO DE DIFERENTES SITUACIONES NUTRICIONALES SOBRE LAS CAPACIDADES GLUCONEOGENICA Y GLUCOLITICA Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS RELACIONADAS CON ESTOS PROCESOS EN CORTEZA RENAL

Es conocido, suficientemente, que el riñón es un órgano muy heterogéneo desde el punto de vista metabólico, ya que sus diversas secciones presentan un comportamiento básicamente diferente. En nuestro trabajo se ha utilizado la corteza renal ya que ésta se ha definido como preferentemente gluconeogénica frente al comportamiento glucolítico de la médula renal.

Además, dentro de la propia corteza renal se han distinguido, por sus diferentes comportamientos metabólicos, dos tipos de fracciones tubulares, las fracciones proximales y distales del túbulo renal. Mientras que a la fracción proximal del túbulo se le ha considerado como zona gluconeogénica, a la porción distal se le reconoce como zona preferentemente glucolítica.

Por todo ello, se ha llevado a cabo este trabajo utilizando las diferentes fracciones aisladas y purificadas del túbulo renal. En cada una de ellas, se han estudiado tanto las capacidades gluconeogénica y glucolítica así como los principales enzimas relacionados con estos procesos, frente a las diferentes situaciones nutricionales mencionadas anteriormente.

Para el estudio de las capacidades gluconeogénica y glucolítica se ha utilizado a la dihidroxiacetona como sustrato para ambos procesos. Se conoce que este compuesto entra en el camino glucolítico/gluconeogénico a nivel de las triosas fosfato después de su conversión en dihidroxiacetona fosfato por la D-trioquinasa y/o glicerol quinasa (Veneziale, 1976). Su consiguiente derivación hacia la síntesis de glucosa o la producción de piruvato + lactato, depende fundamentalmente del estado metabólico del animal. En hígado, el destino es principalmente glucolítico en casos de alimentación y gluconeogénico en estados de ayuno (Pilkis y col., 1976; Foster y Blair, 1978). Además, la gluconeogénesis a partir de dihidroxiacetona es completamente independiente de la velocidad de resíntesis de fosfoenolpiruvato, no necesitando para ello el concurso de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Blair y col., 1973; Pilkis y col., 1976).

4.2.1.- Dieta alta en carbohidratos

Por lo que respecta a una dieta alta en carbohidratos, nuestros resultados muestran claramente que a lo largo del tiempo, tiene lugar un descenso en la síntesis de glucosa y un claro aumento en la velocidad de producción de piruvato + lactato. Sin embargo, estos cambios adaptativos por las características que presentan merecen un comentario mas detallado.

En primer lugar, y al principio de las experiencias, lo que determina una condición control, la síntesis de glucosa en ambas fracciones del túbulo presenta una mínima diferencia, aunque significativa, 45% y 55% del total de la capacidad gluconeogénica para la fracción distal y proximal respectivamente (tabla 1 y figura 2). Sin embargo la verdadera diferencia aparece a lo largo

del tiempo puesto que mientras en la fracción distal no varia, en la fracción proximal el flujo gluconeogénico disminuye significativamente a las 24 y 48 horas.

Por lo que respecta a la capacidad glucolítica, la situación varia cualitativamente. Ambas fracciones del túbulo presentan una diferencia clara y significativa en cuanto a su contribución al proceso total, 70% frente al 30% entre las fracciones distal y proximal, en la situación inicial o control. Se puede decir, en este caso, que efectivamente la porción distal del túbulo renal es preferentemente glucolítica si se compara con la proximal. No obstante el comportamiento a lo largo del tiempo es semejante al analizado anteriormente; mientras que la capacidad glucolítica de la fracción proximal no varia apreciablemente a lo largo del tiempo, sí lo hace, y de forma significativa, desde las 24 horas en la porción distal (tabla 1 y figuras 3 y 4).

Estos resultados, al igual de lo que ocurre en hígado, son consecuencia de una perfecta adaptación de la corteza renal a la dieta rica en carbohidratos y se corresponden con las actividades de los principales enzimas de estos procesos encontradas en estas condiciones, fructosa bisfosfatasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa.

Paralelamente a lo que ocurre con las capacidades gluconeogénica y glucolítica, los enzimas implicados en ambas rutas metabólicas sufren, igualmente, un proceso de adaptación frente al incremento de carbohidratos proporcionados por la dieta.

El enzima gluconeogénico, fructosa bisfosfatasa, disminuye su actividad a lo largo del tiempo de forma paralela a como lo hace el proceso gluconeogénico. Esta disminución de su actividad, solo tiene lugar en la fracción proximal del túbulo renal y exclusivamente a

concentraciones subsaturantes de sustrato, puesto que no varía la actividad a concentraciones saturantes. Hay que destacar que en condiciones normales, existe una mayor actividad, principalmente a velocidad máxima, en la fracción proximal, lo que está de acuerdo con la diferencia encontrada en ambas fracciones en la capacidad gluconeogénica (tablas 4 y 5, y figuras 15 y 17).

La fracción distal se destaca en la literatura bioquímica únicamente por su capacidad glucolítica (Schmidt y Guder, 1976; Schmidt y col., 1978). Sin embargo, nuestros resultados demuestran la presencia de una alta actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa, aunque ésta no se modifique por la alta presencia de carbohidratos en la dieta, manteniéndose constante su actividad durante todo el tiempo de experimentación tanto a concentraciones subsaturantes como saturantes de sustrato.

Cuando se analizan las relaciones porcentuales entre velocidad subsaturante y velocidad máxima, índice perfecto para el reconocimiento del posible mecanismo de regulación que opera en este enzima, se observa que, mientras a lo largo del tiempo no varía en la porción distal, disminuye significativamente en la fracción proximal del túbulo renal. Este comportamiento estaría de acuerdo con cambios de influencia alostérica o modulación covalente, que operarían como mecanismos moleculares responsables de dicha capacidad de regulación, y no por mecanismos de síntesis de novo de enzima.

Por lo que respecta a los enzimas glucolíticos, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa, y al igual de lo que ocurre en hígado bajo estas condiciones (Pilkis y col., 1981b; Van Schaftingen y col., 1981; Uyeda y col., 1981; Smith y Freedland, 1981; Sommercorn y col., 1984), la actividad de estos enzimas presenta un aumento significativo a lo largo del tiempo (tablas 6 y 8,

figuras 18 y 21), y de la misma forma a como ocurría con la capacidad glucolítica en estas circunstancias, estos cambios solo tienen lugar en la fracción distal del túbulo renal.

Cuando se analizan, para ambos enzimas, las relaciones existentes entre las velocidades a ambas concentraciones de sustrato, subsaturante y saturante, se observa que, en ambos casos, solo aumentan progresivamente y a largo del tiempo las correspondientes a la fracción distal del túbulo renal (tablas 7 y 9, figuras 20 y 23). Igualmente, en estos casos se descartan como mecanismos reguladores en las actividades de estos enzimas, a los procesos de síntesis de novo de proteína.

En un análisis global del comportamiento de la corteza renal frente a un aporte rico en carbohidratos, se puede destacar la existencia, bajo estas condiciones, de un doble mecanismo de adaptación que se pone en marcha en este tejido. Por un lado, disminuyendo la velocidad gluconeogénica debido a una menor necesidad de síntesis de glucosa, y por otro, una mayor utilización de glucosa aumentando paralelamente las actividades de los enzimas glucolíticos.

Hay que destacar que la adaptación de cada proceso ocurre en una fracción diferente del túbulo renal. La porción proximal, preferentemente gluconeogénica, se adapta rápidamente a las diferentes concentraciones de glucosa circulante disminuyendo su producción; en cambio, la fracción distal se adapta en estas condiciones hacia un mayor consumo de glucosa, incrementándose significativamente la actividad de los principales enzimas responsables.

Es importante destacar que los cambios que ocurren a nivel de la corteza renal total en ambos procesos y a lo largo del tiempo, presentan cambios porcentuales semejantes a los que tienen lugar en los enzimas respon-

sables de ambos procesos (tabla 10).

El hecho de que las actividades del enzima gluconeogénico de la fracción distal y de los enzimas glucolíticos de la fracción proximal no varien, bajo estas condiciones y a lo largo del tiempo, podría ser explicado por la existencia en estas fracciones del túbulo renal de isoenzimas insensibles a estos mecanismos de modificación y por tanto con diferente comportamiento cinético (Dunaway, 1983).

Una de las principales características que presentan los animales sometidos a una dieta rica en carbohidratos, consiste en un aumento de hasta 10 veces en la relación insulina/glucagon (Tiedgen y Seitz, 1980; Peret y col., 1981). Este aumento en los niveles orgánicos de insulina y disminución de los de glucagon podría explicar los cambios obtenidos en ambos procesos. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Krebs y col. (1963) que muestran una respuesta adaptativa del riñón, aunque en sentido contrario, tras someter a los animales a una dieta baja en carbohidratos. Los cambios encontrados fueron independientes a la edad del animal.

Actualmente se considera al ciclo catalizado por la fosfofructoquinasa y fructosa 1,6-bisfosfatasa como el punto principal de regulación del proceso glucolítico/gluconeogénico en donde juega un importante papel regulador la presencia o ausencia de fructosa 2,6-bisfosfato, principal activador de la fosfofructoquinasa (Claus y col., 1980; Van-Schaftingen y col., 1980; Richards y col., 1980; Hue y col., 1981b) e inhibidor de la fructosa 1,6-bisfosfatasa (Mörikofer-Zwez y col., 1981; Pilkis y col., 1981c; Van-Schaftingen y Hers, 1981b).

En este sentido, Sommercorn y Freedland (1984) muestran que las dietas altas en carbohidratos incrementan considerablemente las concentraciones de fructosa

2,6-bisfosfato, las cuales, basadas en los estudios in vitro, podrían aumentar el proceso glucolítico por activación de la fosfofructoquinasa (Pilkis y col., 1981b; Van Schaftingen y col., 1981; Uyeda y col., 1981) y por inhibición de la fructosa 1,6-bisfosfatasa (Pilkis y col., 1981c; Van Schaftingen y Hers, 1981b); aunque Nieto y Castaño (1980) no encuentran cambios significativos en la actividad fosfofructoquinasa hepática, ni a concentraciones subsaturantes de fructosa 6-fosfato ni a velocidad máxima del enzima cuando los animales son alimentados con una dieta rica en carbohidratos.

De acuerdo con nuestros resultados, Sommercorn y col. (1984) muestran un aumento de la actividad fosfofructoquinasa renal por fructosa 2,6-bisfosfato y 6-fosfogluconato, el cual ocurre a concentraciones subsaturantes de sustrato, sin que afecte a la velocidad máxima.

Recientemente, se ha descrito al 6-fosfogluconato como otro importante metabolito regulador del proceso glucolítico, capaz de activar a los dos principales enzimas de este proceso, fosfofructoquinasa (Sommercorn y Freedland, 1982) y piruvato quinasa (Smith y Freedland, 1979 y 1981). Mas recientemente, estos mismos autores muestran que las dietas altas en carbohidratos incrementan las concentraciones de 6-fosfogluconato y que éste es capaz de activar la fosfofructoquinasa de diferentes tejidos de rata, entre ellos la de corteza renal, mediante la disminución del valor $S_{0,5}$ para la fructosa 6-fosfato sin afectar la velocidad máxima (Sommercorn y Freedland, 1984; Sommercorn y col., 1984). Estos resultados estan de acuerdo con Bannister (1984) que también encuentra una activación de la fosfofructoquinasa y piruvato quinasa de hígado de pollo por 6-fosfogluconato a concentraciones subsaturantes de sus respectivos sustratos.

La respuesta de la fosfofructoquinasa al 6-fosfogluconato es hiperbólica, con una constante de activación similar a las concentraciones de 6-fosfogluconato en los tejidos. Bajo la mayoría de las condiciones, los efectos de este compuesto y de la fructosa 2,6-bisfosfato son aditivas (Sommercorn y col., 1984).

La concentración de 6-fosfogluconato está asociada con la naturaleza lipogénica de las dietas altas en carbohidratos, y su influencia sobre los enzimas glucolíticos puede determinar una importante coordinación entre las dos rutas metabólicas que contribuyen al suministro de sustratos para la síntesis de ácidos grasos, el ciclo de las pentosas fosfato mediante el cual se provee a las células de NADPH, y la glucólisis que junto a la piruvato deshidrogenasa, suministra el acetyl-CoA, necesarios para la biosíntesis de ácidos grasos.

Además, un flujo glucolítico celular activo, y en particular una actividad fosfofructoquinasa incrementada, provoca un aumento considerable de las concentraciones de fructosa 1,6-bisfosfato, principal activador alostérico de la piruvato quinasa en su forma defosforilada (Llorente y col., 1970; Van Berkel y col., 1974).

4.2.2.- Dieta alta en proteínas

Durante la ingestión de un exceso de proteínas, la velocidad del suministro intestinal de aminoácidos se encuentra fuertemente incrementada, de forma que cualquier aminoácido que no es utilizado por las células para la síntesis proteica, será transformado metabólicamente en sus correspondientes α -cetoácidos, siendo los principales destinos de estos intermediarios los de su utilización oxidativa a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y/o los de su conversión en carbohidratos

y/o lípidos (Eisenstein y Strack, 1971; Rémésy y col., 1978; Peret y col., 1981; Rémésy y col., 1983).

Al igual que con los carbohidratos, el hígado es también el primer tejido que tiene la oportunidad de eliminar de la sangre los aminoácidos absorbidos. Como regla general, el hígado deja pasar a su través la mayoría de los aminoácidos procedentes de la dieta, a menos que la concentración de aminoácidos sea excepcionalmente elevada como ocurre en nuestras condiciones experimentales (Rémésy y col., 1978). Los aminoácidos catabolizados en el hígado se pueden oxidar completamente a CO_2 y agua, o bien los intermediarios pueden usarse como sustratos de la gluconeogénesis, lipogénesis o cetogénesis. Así, los aminoácidos en exceso que no son necesarios para la síntesis de proteínas, acaban siendo convertidos en glucosa, triacilglicéridos o cuerpos cetónicos, mientras que el nitrógeno amínico se convierte en urea. Los aminoácidos no retenidos por el hígado se pueden utilizar de la misma manera en otros tejidos (Krebs, 1972; Newsholme y Start, 1973; Ruderman y col., 1976).

Los resultados mostrados en esta memoria, indican claramente que la corteza renal responde a la dieta alta en proteínas con un aumento significativo, a lo largo del tiempo, de la capacidad gluconeogénica, sin cambios aparentes en la velocidad glucolítica.

Por lo que respecta al proceso gluconeogénico, se demuestra que éste se incrementa a lo largo del tiempo solo en la fracción proximal del túbulo renal (tabla 2 y figura 5), siendo este aumento muy ligero durante las primeras horas de la administración de esta dieta. Esto estaría de acuerdo con Demigné y col. (1985) que encuentran un incremento de insulina, durante las primeras horas, necesaria en el periodo de máxima absorción de

nutrientes.

Por otra parte, los niveles gluconeogénicos no cambian en la fracción distal del túbulo. De nuevo esta fracción, aparece insensible ante la nueva situación nutricional. Esta respuesta del riñón a una dieta rica en proteínas constituye una reacción adaptativa a fin de ajustar el metabolismo a las necesidades del organismo completo.

Al contrario de lo que ocurre en corteza renal, el hígado presenta un aumento de la gluconeogénesis a las cinco horas del comienzo de la administración de la dieta alta en proteínas, hasta alcanzar un máximo entre las 10 y 24 horas, para permanecer prácticamente constante hasta las 48 horas (Azzout y col., 1984). En corteza renal es precisamente entre este último periodo donde se alcanza el máximo de actividad.

Nuestros resultados están de acuerdo con los mostrados por Krebs y col. (1963). En este caso, administrando a los animales durante 3 a 5 días una dieta compuesta únicamente por caseína y margarina, encontraron un incremento significativo de la capacidad gluconeogénica renal, prácticamente del orden del 100%.

Por lo que respecta a la capacidad glucolítica, la administración de una dieta alta en proteínas no proporcionó cambios aparentes en la glucólisis, medida como producción de piruvato y lactato, en ambas fracciones del túbulo renal, proximal y distal.

El incremento de la síntesis renal de glucosa, bajo estas condiciones, está explicada en parte por el comportamiento paralelo seguido por la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa (tabla 11 y figura 24). Se puede comprobar como la actividad de este enzima no varía a lo largo del tiempo en el túbulo distal, a ninguna de las concentraciones de sustrato utilizadas, subsaturante y en

condiciones de velocidad máxima. Esto se confirma cuando se analiza la relación entre las velocidades a ambas concentraciones de sustrato, no observándose cambios en esta relación a lo largo del tiempo experimental (tabla 12 y figura 26).

Sin embargo, la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa se incrementó de forma paralela al de la capacidad gluconeogénica en la fracción proximal del túbulo renal, de acuerdo con los resultados obtenidos por Mokrasch y col. (1956) en cortes de corteza renal de rata. Este incremento ocurre, durante las primeras 48 horas, solo cuando se mide la actividad a concentraciones subsaturantes de fructosa 1,6-bisfosfato, mientras que no se observaron cambios a velocidad máxima, lo que confirma que la modulación de la actividad de este enzima se debe probablemente a mecanismos alostéricos o de modificación covalente y no a variaciones en la concentración celular del enzima. El aumento en los valores de la relación entre las velocidades a concentraciones celulares y saturantes, parece confirmar esta hipótesis (tabla 12 y figura 26).

Por otra parte, desde hace bastante tiempo se ha demostrado, que una dieta de características semejantes produce también un incremento en la actividad glucosa 6-fosfatasa (Freedland y Harper, 1958). Mas tarde, Weber y MacDonald (1961) demostraron el papel que juegan la dieta rica en proteínas y las hormonas de la corteza adrenal en el control de los niveles de actividades de glucosa 6-fosfatasa, fosfohexosaisomerasa y fosfoglucomutasa.

Durante la administración de una dieta rica en proteínas, Peret y col. (1981) demuestran que la actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa aumenta dentro de las primeras 24 horas y permanece elevada durante un periodo de 40 días, siendo este aumento del orden de 3 veces superior a la actividad correspondiente a una dieta

baja en proteínas.

Las variaciones en los niveles hormonales bajo estas condiciones parecen explicar los cambios que ocurren a nivel enzimático y del proceso gluconeogénico. La concentración de glucagon aumenta en ratas alimentadas con dietas ricas en proteínas (Eisenstein y Strack, 1978; Peret y col., 1981).

Esta hormona podría ser un candidato para la estimulación del transporte celular de aminoácidos a través de AMP cíclico (Tews y col., 1975). De hecho, el glucagon podría inducir una estimulación bifásica de la entrada de los aminoácidos, la primera fase sobre su dependencia en la polarización de la membrana celular y la segunda fase sobre la síntesis de proteínas (Edmondson y Lumeng, 1980). Además el AMP cíclico puede también estimular la captación de alanina por un efecto sobre el metabolismo intracelular (McGivan y col., 1981). Finalmente, Fafournoux y col. (1982) sugieren que a través de estos cambios hormonales, la dieta alta en proteínas estimula el sistema de transporte A de aminoácidos.

Bajo estas mismas condiciones, los niveles de insulina plasmática caen dentro de las primeras 24 horas pero retornan a los valores normales después de 4 días. El glucagon cambia mas gradualmente, alcanzando un máximo sobre el cuarto día, declinando hasta cerca de los valores controles dentro del día 24. Consecuentemente, la relación insulina/glucagon es menor durante los primeros cuatro días (Peret y col., 1981; Demigné y col., 1985). Peret y col. (1981) muestran que la dieta alta en proteínas proporciona un elevado incremento de la actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, que junto a la caída de la relación insulina/glucagon proporciona el factor que probablemente regula la síntesis de este enzima en un plazo corto (Hopgood y col., 1973; Tilghman y col.,

1974; Pilkis y col., 1978)

Las actividades de los enzimas glucolíticos responden de forma aparentemente opuesta al comportamiento de la capacidad glucolítica bajo estas condiciones. La actividad fosfofructoquinasa no varía en la porción proximal de túbulo renal a ninguna de las concentraciones de sustrato ensayadas, mientras que aumenta significativamente en la fracción distal del túbulo a concentraciones subsaturantes de fructosa 6-fosfato a las 16 horas, siguiendo aumentando hasta el final de la experiencia. Esta actividad no sufre cambios a concentraciones saturantes (tabla 13 y figura 27). El aumento, a lo largo del tiempo, de la relación entre la velocidad subsaturante y velocidad máxima, indica que dichos cambios se deben más a modificaciones en la actividad del enzima existente que a cambios en la concentración proteica (tabla 14 y figura 29).

Por lo que respecta a la actividad piruvato quinasa, su comportamiento frente a una dieta rica en proteínas es semejante al que tiene lugar en la actividad fosfofructoquinasa. Solo en la fracción distal del túbulo renal, y a una concentración subsaturante de fosfoenolpiruvato, aumenta la actividad de este enzima a lo largo de toda la experiencia, siendo este aumento superior al encontrado para la fosfofructoquinasa. No se encontraron variaciones en la actividad correspondiente a los túbulos proximales (tabla 15 y figura 30).

Es interesante poner de manifiesto que a partir de las 24 horas tras la administración de una dieta alta en proteínas, la actividad piruvato quinasa aumenta proporcionalmente a ambas concentraciones de sustrato ensayadas, lo que pone de manifiesto, que este cambio en la actividad del enzima se debe fundamentalmente, a un

incremento en la síntesis del enzima bajo estas condiciones, lo que contrasta con los mecanismos reguladores reseñados hasta el momento. Este comportamiento se comprueba cuando se analizan las relaciones entre la velocidad subsaturante y velocidad máxima, mediante las cuales, se puede observar un incremento hasta las 24 horas, para posteriormente permanecer constante hasta las 48 horas (tabla 16 y figura 32).

La aparente contradicción existente entre las actividades de estos enzimas glucolíticos y la producción de piruvato y lactato a partir de dihidroxiacetona en ratas alimentadas con una dieta alta en proteínas, podría ser explicada por un flujo acelerado del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en estas condiciones, que tiene lugar gracias al incremento de intermediarios de esta ruta que proporciona la degradación de los aminoácidos en exceso suministrados a la célula a partir de esta dieta. Debido a esto, la mayor parte del piruvato y lactato producidos serían utilizados inmediatamente dentro de las mitocondrias.

En el hígado, el comportamiento glucolítico es diferente. Azzout y col. (1984) muestran que la producción de piruvato y lactato disminuye durante las primeras 10 horas, permaneciendo constantes estos niveles hasta las 48 horas, y sin embargo no encuentran cambios ni en la actividad piruvato quinasa ni en las concentraciones de fructosa 1,6-bisfosfato. Si por otra parte, las concentraciones hormonales indican que el proceso glucolítico debe estar frenado, puesto que la relación insulina/glucagon es baja durante el periodo experimental (Peret y col., 1981; Demigné y col., 1985), otros factores deberán estar envueltos en el control de la glucólisis durante la alimentación de una dieta alta en proteínas, de tal forma que estos factores podrían estar relaciona-

dos, mas, con la disponibilidad de sustratos y/o efectores que con la propia acción hormonal (Azzout y col., 1984).

4.2.3.- Ayuno

Podemos dividir, por conveniencia, al periodo experimental de ayuno en dos fases, un periodo de ayuno temprano y un ayuno prolongado. Estos periodos estan caracterizados por problemas metabólicos diferentes, en donde la transición de una fase a otra se lleva a cabo de una forma bastante gradual.

El ayuno temprano comienza inmediatamente después del periodo postabsortivo y persiste hasta alrededor de 20 horas después de la última alimentación. Se caracteriza por la liberación de glucosa hepática a partir del contenido de glucógeno (Hers, 1976; Goldstein y Curnow, 1978) y la movilización de ácidos grasos a partir del tejido adiposo (Owen y col., 1969; Ruderman y col., 1976). Puesto que la glucogenolisis no es capaz por sí misma de producir la suficiente glucosa hacia el final de este periodo, se hace necesario que el proceso gluconeogénico se ponga en marcha para proveer al animal la glucosa adicional que necesita.

El periodo de ayuno prolongado ocurre desde alrededor de las 24 horas hasta después de varios días. Durante este tiempo se producen cambios complejos en el suministro orgánico de combustibles metabólicos. Este periodo se caracteriza por una alta velocidad de la gluconeogénesis, hepática y renal, y un incremento paulatino en la concentración de compuestos cetónicos en sangre (Krebs y col., 1963; Owen y col., 1969; Hanson y Garber, 1972; Kida y col., 1978).

Las actividades gluconeogénicas hepática y renal, permiten en estas condiciones de ayuno, mantener los niveles de glucosa sanguíneos necesarios para satisfacer las necesidades de este combustible metabólico en el resto de los tejidos periféricos que utilizan preferentemente la glucosa.

Los resultados que se presentan en esta memoria, demuestran claramente un aumento de la capacidad gluconeogénica y una disminución del proceso glucolítico en corteza renal a lo largo del periodo de ayuno.

El incremento en la síntesis renal de glucosa ocurre, principalmente, a partir de las 16 horas del periodo de ayuno, incrementándose fuertemente a partir de este tiempo hasta el final del tiempo experimental. Este aumento ocurre en los túbulos proximales, llegando a ser del orden del 200%. Sin embargo, la capacidad gluconeogénica en los túbulos distales no varía significativamente (tabla 3 y figura 9).

Por el contrario, y de forma opuesta, la capacidad glucolítica disminuye progresivamente a lo largo del tiempo. Estos cambios tienen lugar en la fracción distal del túbulo renal, llegando a alcanzar valores semejantes a los del túbulo proximal al final del tiempo experimental; mientras que no existen variaciones en la producción de lactato y piruvato en la fracción proximal del túbulo renal (tabla 3 y figura 11).

Estos resultados se confirman con los obtenidos con las actividades de los enzimas implicados en ambos procesos, y por los mostrados en la literatura bioquímica. La actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa aumenta significativamente en la fracción proximal del túbulo renal. Este incremento tiene lugar exclusivamente a concentraciones subsaturantes de fructosa 1,6-bisfosfato. De

nuevo, la fracción distal del túbulo no presenta cambios en la actividad enzimática a lo largo del tiempo a ninguna de las concentraciones de sustrato ensayadas (tabla 18 y figura 33). Como se desprende de la tabla 19 y figura 35, estos cambios se deben principalmente a modulaciones en la actividad del enzima existente en la célula, al incrementarse la relación entre la velocidad subsaturante y la velocidad máxima.

El enzima glucolítico, fosfofructoquinasa, muestra un comportamiento de signo opuesto al correspondiente a la fructosa 1,6-bisfosfatasa. Su actividad disminuye significativamente en la fracción distal del túbulo renal, y a concentraciones subsaturantes de sustrato, sin que se modifique en condiciones de velocidad máxima. Asimismo, la actividad no sufre variaciones bajo ninguna de las concentraciones de sustrato utilizadas, en la porción proximal del túbulo (tabla 20 y figura 36). Como muestra la relación entre las velocidades, estos cambios parecen deberse más a modificaciones alostéricas y/o covalentes que a un proceso de síntesis del enzima (tabla 21 y figura 38).

Los resultados obtenidos con la piruvato quinasa durante el ayuno muestran que su actividad no se modifica bajo ninguno de los aspectos o situaciones analizadas (tabla 22 y figura 39). Los resultados aparecidos en la literatura acerca del enzima hepático son algo contradictorios. Krebs y Eggleston (1965) encuentran una disminución de la actividad del enzima durante el ayuno debido a un aumento en su degradación frente a la síntesis (Van Berkel y col., 1976 y 1978; Cladaras y Cottam, 1980a y 1980b; Poole y Bloxham, 1982). Sin embargo, Kohl y Cottam (1976) encontraron que la disminución de la actividad piruvato quinasa no era tan marcada como la de la concen-

tración del enzima, lo que indicaba un cierto incremento en la actividad específica del enzima durante el ayuno. Por otra parte, Hopkirk y Bloxham (1979) sí encuentran una actividad inferior en ayuno, pero Cimbala y col. (1985) utilizando un método muy sensible para la determinación de la piruvato quinasa encuentran resultados que están de acuerdo con los del Kohl y Cottam (1976). En el mismo sentido, Azzout y Peret (1984a) y Azzout y col. (1984) no observan cambios en la actividad piruvato quinasa durante las primeras 24 horas de ayuno, aunque sí después de este tiempo.

Es bien conocido que durante el ayuno, los principales factores responsables de los cambios metabólicos que en él tienen lugar, están asociados a un aumento en la concentración de glucagón y una disminución de insulina en plasma (Cahill y col., 1966; Marliss y col., 1970), lo que explicaría el aumento de la gluconeogénesis y la disminución de la glucólisis renal. La corteza adrenal es también esencial en la adaptación metabólica al ayuno por sus efectos a nivel del hígado y tejidos periféricos, así como por sus efectos permisivos en ciertas respuestas hormonales, entre ellas las de los glucocorticoides (Steele, 1975; Exton y col., 1976; Caldwell y col., 1978).

El ayuno produce un aumento significativo en la actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa tanto hepática como renal (Hanson y Garber, 1972) que no está mediado por cambios en la concentración de esteroides circulantes, ya que el incremento gluconeogénico es similar en animales controles y adrenalectomizados (Pogson y col., 1976). El aumento de la actividad de este enzima está asociado a nueva síntesis de enzima (Beale y col., 1982; Cimbala y col., 1982).

Por otra parte, la actividad glucosa 6-fosfatasa se incrementa en ayuno por un aumento en la síntesis de

nuevo enzima (Hers y Hue, 1983), mientras que en las mismas condiciones se reprime la síntesis de hexoquinasa hepática (Pilkis, 1970).

Los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato disminuyen en una gran cantidad incluso después de 24 horas de ayuno, como consecuencia de un aumento de glucagon circulante, activando la fructosa 1,6-bisfosfatasa e inhibiendo la fosfofructoquinasa (Neely y col., 1981; Pilkis y col., 1982b; Pilkis y col., 1983b).

4.3.- GLUCONEOGENESIS, GLUCOLISIS Y ENZIMAS RELACIONADOS DURANTE CICLOS DE ALIMENTACION-AYUNO Y AYUNO-ALIMENTACION

Una de las mejores formas de adquirir un conocimiento mas profundo de las relaciones entre las principales rutas metabólicas y de la capacidad de respuesta adaptativa de un determinado tejido, consiste en estudiar y familiarizarse con los cambios que tienen lugar en el metabolismo durante ciclos alternativos de alimentación-ayuno. Estos ciclos permiten un consumo variable de combustible para poder afrontar una demanda metabólica variable.

En nuestro caso concreto, hemos utilizado una dieta alta en carbohidratos, que se corresponde con la situación de alimentación dentro de los ciclos estudiados. Esta dieta, en comparación con la situación de ayuno, es capaz de remarcar mas profundamente los cambios que tienen lugar en el comportamiento de los procesos gluconeogénico y glucolítico, así como de los enzimas relacionados con estas rutas metabólicas. Además, se ha utilizado la corteza renal completa, por haber puesto de manifiesto anteriormente los cambios que ocurren en las

diferentes fracciones del túbulo renal.

Los resultados presentados en esta memoria muestran que tanto en el ciclo alimentación-ayuno como en ayuno-alimentación, las velocidades de producción de piruvato + lactato a partir de glucosa como sustrato glucolítico y la producción de glucosa a partir de piruvato como sustrato gluconeogénico, por corteza renal, cambian progresivamente y en direcciones opuestas durante el periodo de alimentación o ayuno, característicos de estos ciclos (tablas 25 y 26, y figuras 45 y 46). Hay que resaltar el hecho de que los cambios mas importantes ocurren en los momentos en los cuales la situación nutricional cambia, es decir, al pasar de la alimentación al ayuno y al contrario; posteriormente, las variaciones que tienen lugar son de menor intensidad. Esto demuestra de una forma clara la capacidad de adaptación de la corteza renal ante el aporte o no de macronutrientes por la dieta.

Como se ha demostrado anteriormente, los cambios adaptativos de la capacidad gluconeogénica solo estarán presentes en la fracción proximal del túbulo renal, mientras que los que tienen lugar en la capacidad glucolítica, se deben a la adaptación que este proceso sufre en la fracción distal del túbulo.

Los cambios que tienen lugar en las actividades enzimáticas implicadas en estos procesos, explican de una manera perfecta el comportamiento gluconeogénico y glucolítico de la corteza renal. La actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa, durante estos ciclos, cambia de forma paralela al proceso gluconeogénico, aunque estas variaciones solo tienen lugar a concentraciones subsaturantes de sustrato, lo que pone de manifiesto que los cambios en la actividad enzimática se deben a modulaciones alostéricas y/o covalentes del enzima, sin que varíe su concentración bajo estas condiciones (tablas 27 y 28, figuras 49 y 51).

La razón insulina/glucagon característica durante estos ciclos, explica estos comportamientos. Durante el periodo de alimentación, la disminución de glucagon (Tiedgen y Seitz, 1980; Peret y col., 1981) proporciona un aumento de los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato, 6-fosfogluconato (Sommercorn y Freedland, 1984) y fructosa 1,6-bisfosfato, y una disminución de AMP cíclico, permitiendo de esta manera una actividad reducida de la fructosa 1,6-bisfosfatasa y una activación de los enzimas glucolíticos como se analizará mas adelante.

Durante el ayuno, cambia la relación insulina/glucagon (Cahill y col., 1966; Marliss y col., 1970; Tiedgen y Seitz, 1980). En este caso, el glucagon promueve efectos opuestos, un aumento de AMP cíclico y una disminución en los niveles de fructosa 2,6-bisfosfato (Neely y col., 1981; Pilkis y col., 1982b; Pilkis y col., 1983b), dando lugar a un aumento de la actividad gluconeogénica y una reducción de la actividad glucolítica.

La actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, cambia también de forma paralela al comportamiento gluconeogénico durante estos ciclos. Sin embargo, la actividad de este enzima sufre cambios, tanto a velocidad subsaturante como a velocidad máxima, y además estos son proporcionales a lo largo de todo el periodo experimental, lo que indica que este enzima se regula, principalmente, por cambios en la síntesis de novo de enzima, aumentando o disminuyendo su concentración dentro de la célula (tablas 27 y 28, figuras 50 y 52). Este comportamiento está de acuerdo con lo que ampliamente se muestra en la literatura bioquímica (Tilghman y col., 1976; Seitz y col., 1980; Peret y col. 1981; Salavert y Iynedjian, 1982; Cimbala y col., 1982; Andreone y col., 1982; Beale y col., 1982; Iynedjian y col., 1985).

Igualmente, las actividades de los enzimas glucolíticos cambian de forma paralela a las variaciones de la capacidad glucolítica de corteza renal durante estos ciclos de alimentación y ayuno. Durante el ciclo de alimentación-ayuno, las actividades fosfofructoquinasa y piruvato quinasa aumentan durante el periodo de alimentación, para descender posteriormente durante el ayuno. Estos cambios ocurren solo a concentraciones subsaturantes de sustrato y no a velocidad máxima, descartando un mecanismo de síntesis proteica como responsable de las capacidades reguladoras de estos enzimas (tabla 29 y figura 53).

Como comentábamos anteriormente, durante el periodo de alimentación aumenta la relación insulina/glucagon (Tiedgen y Seitz, 1980; Peret y col., 1981) de forma que disminuyen los niveles de glucagon y AMP cíclico, permitiendo el estado defosforilado y activo de estos enzimas (Feliú y col., 1977; Ishibashi y Cottam, 1978a y b; Pilkis y col., 1978; El-Maghrabi y col., 1980; Pilkis y col., 1980; Pilkis y col., 1982a; El-Maghrabi y col., 1982c; Richards y col., 1982; El-Maghrabi y col., 1982d), además bajo estas condiciones, aumentan las concentraciones de fructosa 2,6-bisfosfato, potente activador de la fosfofructoquinasa (Pilkis y col., 1981b; Van Schaftingen y col., 1981; Uyeda y col., 1981). El flujo glucolítico se encuentra aumentado, lo que permite que el incremento en los niveles de fructosa 1,6-bisfosfato, active alostéricamente a la piruvato quinasa (Llorente y col., 1970; Van Berkel y col., 1974). Durante el ayuno, la secuencia de eventos es opuesta y por tanto influyen inhibiendo la actividad de estos enzimas.

Aunque durante el ciclo de ayuno-alimentación el comportamiento de los enzimas glucolíticos es prácticamente semejante al caso anterior (tabla 30 y figura 54),

es importante destacar el hecho de que la piruvato quinasa no se modifica durante todo el periodo de ayuno, y sí después de ser alimentados los animales con la dieta, incrementándose su actividad. Este comportamiento particular ya se había puesto de manifiesto durante el estudio con los túbulos renales aislados. Esto sugiere que, entre otras razones, el efecto del glucagon sobre la fosforilación de la piruvato quinasa que existe in vitro, podría perderse durante la preparación experimental, al igual que ocurre en el caso de los hepatocitos (Azzout y Peret, 1984a), o que esta fosforilación no presente significado funcional en corteza renal. De acuerdo con esto, ha sido mostrado que la razón de la actividad piruvato quinasa en extractos crudos, o hepatocitos aislados de ratas alimentadas o ayunadas, fue siempre alta, pudiendo disminuir por la adición de glucagon o AMP cíclico (Blair y col., 1976; Claus y col., 1979).

En cualquier caso, cuando se analizan globalmente los porcentajes de activación o inhibición de todos estos parámetros en los distintos ciclos de alimentación y ayuno, se encuentra un perfecto paralelismo entre el comportamiento de los procesos estudiados y la actividad de los enzimas implicados en los mismos (figuras 55, 56, 57 y 58).

Por último, se realizaron ciclos alternativos completos de ayuno-alimentación-ayuno y alimentación-ayuno-alimentación, a fin de corroborar mas aún los resultados obtenidos anteriormente, así como los cambios adaptativos que tienen lugar en la corteza renal ante estas situaciones. En estos casos, los cambios obtenidos fueron semejantes a los ya vistos y siempre con sentidos opuestos entre ambos procesos. Se pone de manifiesto, por tanto, una indudable capacidad de adaptación de la corteza renal ante diferentes influencias nutricionales,

lo que permite conocer mejor las características reguladoras de la gluconeogénesis y glucólisis de corteza renal.

5 - CONCLUSIONES

Resumen

Las capacidades glomerulares y arteriales de la corteza renal presentan, respecto a la distribución, características específicas. En particular, en relación a la contracción periférica de los vasos próximos del túbulo para la regulación de la tasa de escape de la poleca, se ha observado que la distribución del orden de los vasos arteriales y venales que respecta a la capacidad de flujo sanguíneo entre ambas fracciones en estas zonas, difiere de las que muestran muchos otros tipos de vasos en los tubos proximales. Asimismo, se ha observado que el orden del flujo sanguíneo en las zonas de los pedos puede definir, como se ilustra en algunos de estos casos, 5 - CONCLUSIONES proximales son arteriales y los distales son glomerulares.

Palabras

El comportamiento de los vasos de la corteza renal en las condiciones de vasoconstricción periférica, en particular, en relación a la contracción de los vasos próximos del túbulo para la regulación de la tasa de escape de la poleca, se ha observado que la distribución del orden de los vasos arteriales y venales que respecta a la capacidad de flujo sanguíneo entre ambas fracciones en estas zonas, difiere de las que muestran muchos otros tipos de vasos en los tubos proximales. Asimismo, se ha observado que el orden del flujo sanguíneo en las zonas de los pedos puede definir, como se ilustra en algunos de estos casos, 5 - CONCLUSIONES proximales son arteriales y los distales son glomerulares.

5 - CONCLUSIONES

Primera

Las capacidades gluconeogénica y glucolítica de corteza renal presentan, respecto a su localización y contribución, características específicas. En condiciones normales, la contribución gluconeogénica de la fracción proximal del túbulo renal es ligeramente mayor que la correspondiente a la porción distal del túbulo, siendo su distribución del orden del 55% y 45% respectivamente. Por lo que respecta a la capacidad glucolítica, la diferencia entre ambas fracciones es mucho mayor. Los túbulos distales se muestran mucho más activos glucolíticamente que los túbulos proximales, siendo su distribución porcentual del orden del 70% y 30% respectivamente. Por tanto, podemos definir, desde un punto de vista de localización tisular de estos procesos, que mientras los túbulos proximales son eminentemente gluconeogénicos, los túbulos distales son glucolíticos y gluconeogénicos.

Segunda

El comportamiento de los procesos gluconeogénico y glucolítico en ambas fracciones del túbulo renal, y bajo nuestras condiciones experimentales, es cualitativa y cuantitativamente diferente. Mientras que el proceso gluconeogénico presente en la fracción proximal del túbulo renal, y el proceso glucolítico de la porción distal responden en mayor o menor grado a las diferentes influencias nutricionales ensayadas en esta memoria, no lo hacen en la fracción contraria bajo ninguna de ellas. Por tanto podemos concluir que desde un punto de vista funcional, los túbulos proximales se comportan como

gluconeogénicos mientras que los distales lo hacen como eminentemente glucolíticos.

Tercera

La alimentación con una dieta alta en carbohidratos da lugar a cambios importantes, a lo largo del tiempo, en las velocidades de síntesis de glucosa y producción de lactato + piruvato a partir de dihidroxiacetona. La síntesis de glucosa, en la fracción proximal del túbulo, disminuye progresivamente hasta alcanzar los valores correspondientes al túbulo distal, y al contrario, la velocidad glucolítica en la porción distal del túbulo aumenta considerablemente. Estos cambios se deben, fundamentalmente, a los que tienen lugar en las actividades de los enzimas reguladores implicados en ambos procesos, fructosa bisfosfatasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa, y que actúan en cada una de las fracciones mencionadas, puesto que se corresponden con una disminución de la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa en los túbulos proximales y un aumento en las actividades fosfofructoquinasa y piruvato quinasa en los túbulos distales.

Cuarta

Los cambios que operan en las actividades de estos enzimas, fructosa bisfosfatasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa, de diferente localización intratubular, ocurren solo a concentraciones subsaturantes de sustrato, sin que se modifiquen a concentraciones de sustrato correspondientes a velocidades máximas, lo que permite concluir que dichos cambios no se deben a mecanismos que controlan la velocidad de síntesis proteica, sino más bien, a aquellos que operan a nivel de modulación

alostérica y/o covalente, y/o aquellos que regulan el suministro de sustratos o efectores; teniendo en cuenta que, en su mayoría, son los mismos factores los que actúan sobre las dos clases de enzimas ensayados, aunque de forma opuesta.

Quinta

Un exceso de aminoácidos en la ingesta proporciona un aumento significativo en la capacidad gluconeogénica de los túbulos proximales, que se corresponde con un incremento de la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa de la misma localización, y solo a concentraciones subsaturantes de sustrato. La capacidad glucolítica, en cambio, no presenta variación alguna en la fracción distal del túbulo. Sin embargo, las actividades fosfofructoquinasa y piruvato quinasa de la misma localización aumentan significativamente. Esta aparente contradicción podría ser explicada por el hecho de que el piruvato y lactato generado durante el proceso glucolítico, es inmediatamente utilizado por el ciclo de los ácidos tricarbónicos, gracias al extraordinario aumento de intermediarios del mismo que se generan durante la degradación de los aminoácidos.

Sexta

Una dieta alta en proteínas, provoca un aumento en la actividad piruvato quinasa de la fracción distal del túbulo renal a partir de las 24 horas de su administración. Este incremento tiene lugar tanto a concentraciones subsaturantes como saturantes de fosfoenolpiruvato, lo que probablemente indica que, bajo estas condiciones nutricionales, dicha actividad enzimática se ve modificada por un incremento en la síntesis de novo del enzima y

por tanto de su concentración celular.

Séptima

Durante el ayuno, las velocidades gluconeogénica y glucolítica de corteza renal se modifican extraordinariamente. La síntesis de glucosa aumenta, a lo largo del tiempo, en la fracción proximal del túbulo, mientras que la glucólisis disminuye en la fracción distal. Estas variaciones, se deben a los cambios que tienen lugar en los enzimas implicados; ya que se ponen de manifiesto, un aumento de la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa en el túbulo proximal a concentraciones subsaturantes de sustrato, y una disminución de la actividad fosfofructoquinasa, también a concentraciones celulares de sustrato, en el túbulo distal. La actividad piruvato quinasa no se modifica a lo largo de todo el periodo experimental.

Octava

Durante los ciclos de alimentación y ayuno, las capacidades gluconeogénica y glucolítica de corteza renal responden de forma opuesta, siguiendo un comportamiento similar al que tiene lugar durante las dos situaciones que intervienen, tanto de los procesos en sí, como de las actividades enzimáticas que participan. En el caso de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, su actividad cambia proporcionalmente a ambas concentraciones de sustrato utilizadas, subsaturante y la correspondiente a velocidad máxima, indicando que su capacidad reguladora se corresponde con los mecanismos que controlan la velocidad de síntesis del enzima, de la misma forma a lo que ocurre con el enzima hepático.

Conclusión final

De los resultados expuestos en esta memoria, podemos concluir que la corteza renal es capaz de poner en marcha los mecanismos adecuados de adaptación frente a las influencias de diferentes situaciones nutricionales. Esta capacidad de adaptación, característica de aquellas células con una gran actividad metabólica, indica que este tejido juega un papel importante en el mantenimiento del estado glucostático del animal, y permite reconocer los principales puntos y características reguladoras que operan en el control del proceso glucolítico/gluconeogénico de corteza renal en mamíferos.

BIBLIOGRAPHIA

OLIV, P.A.J., and BILLYS, J. (1963). "Effect of the
the mitochondrial DNA on the synthesis of proteins
and lipids". *J. Biol. Chem.* 238: 1500-1504.

OLIV, P.A.J., and BILLYS, J. (1964). "Effect of
treatment of rats with carbon tetrachloride on
protein and lipid synthesis in liver and
isolated hepatocytes". *J. Biol. Chem.* 239: 1500-1504.

OLIV, P.A.J., and BILLYS, J. (1965). "Effect of
the response to carbon tetrachloride on
the synthesis of protein and lipids". *J. Biol. Chem.* 240: 1500-1504.

OLIV, P.A.J., and BILLYS, J. (1966). "Effect of
base changes in the DNA on the synthesis of
protein and lipids". *J. Biol. Chem.* 241: 1500-1504.

OLIV, P.A.J., and BILLYS, J. (1967). "Effect of
glucose on the synthesis of protein and lipids
in liver". *J. Biol. Chem.* 242: 1500-1504.

6 - BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, J. (1963). "The synthesis of
protein and lipids in liver". *J. Biol. Chem.* 238: 1500-1504.

ANDERSON, J. (1964). "The synthesis of
protein and lipids in liver". *J. Biol. Chem.* 239: 1500-1504.

ANDERSON, J. (1965). "The synthesis of
protein and lipids in liver". *J. Biol. Chem.* 240: 1500-1504.

ANDERSON, J. (1966). "The synthesis of
protein and lipids in liver". *J. Biol. Chem.* 241: 1500-1504.

ANDERSON, J. (1967). "The synthesis of
protein and lipids in liver". *J. Biol. Chem.* 242: 1500-1504.

6 - BIBLIOGRAFIA

ADAM, P.A.J. and HAYNES, R.C.Jr (1969). "Control of hepatic mitochondrial CO₂ fixation by glucagon, epinephrine and cortisol". J. Biol. Chem., 244: 6444-6450.

ALLAN, E.H. and TITHERADGE, M.A. (1984). "Effect of treatment of rats with dexamethasone in vivo on gluconeogenesis and metabolite compartmentation in subsequently isolated hepatocytes". Biochem.J., 219: 117-123.

ALLEYNE, G.A.O. and SCULLARD, G.H. (1969). "Renal metabolic response to acid-base changes. I. Enzymatic control of ammoniogenesis in the rat". J.Clin.Invest., 48: 364-370.

ALLEYNE, G.A.O. (1970). "Renal metabolic response to acid base changes. II. The early effects of metabolic acidosis on renal metabolism in the rat". J.Clin.Invest., 49: 943.

ANDERSON, J.W. and STOWRING, L. (1973). "Glycolytic and gluconeogenic enzyme activities in renal cortex of diabetic rats". Am.J.Physiol., 224: 930.

ANDREONE, T.L.; BEALE, E.G.; BAR, R.S. and GRANNER, D.K. (1982). "Insulin decreases phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) mRNA activity by a receptor-mediated process". J.Biol.Chem., 257: 35-38.

AZZOUT, B. and PERET, J. (1984a). "Pyruvate kinase activity in isolated rat hepatocytes during a feeding cycle and during fasting". Diabete and Metabolisme, 10: 165-170.

AZZOUT, B. and PERET, J. (1984b). "Development of gluconeogenesis from dihydroxyacetone in rat hepatocytes during a feeding cycle and starvation". Biochem.J., 218: 975-981.

AZZOUT, B.; CHANEZ, M.; BOIS-JOYEUX, B. and PERET, J. (1984). "Gluconeogenesis from dihydroxyacetone in rat hepatocytes during the shift from a low protein, high carbohydrate to a high protein, carbohydrate-free diet". J.Nutr., 114: 2167-2178.

BABCOCK, D.F.; CHEN, J.L.J.; YIP, B.P. and LARDY, H.A. (1979). "Evidence for mitochondrial localization of

hormone-responsive pool of Ca^{++} in isolated hepatocytes". *J.Biol.Chem.*, 254: 8117-8120.

BAEK, Y.H. and NOWAK, T. (1982). "Kinetic evidence for a dual cation role for muscle pyruvate kinase". *Arch.Biochem.Biophys.*, 217: 491-497.

BANNISTER, D.W. (1984). "Activation of phosphofructokinase and pyruvate kinase by 6-phosphogluconate in chicken liver (*Gallus domesticus*): no evidence for a regulatory role". *Int.J.Biochem.*, 16: 895-899.

BARNETT, C.A. and WICKS, W.D. (1971). "Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and tyrosine transaminase in hepatoma cell cultures. I. Effects of glucocorticoids, N6, O2'-dibutyryl cyclic adenosine 3'-5' monophosphate and insulin in Reuber H35 cells." *J.Biol.Chem.*, 246: 7201-7206.

BEALE, E.G.; HARTLEY, J.L. and GRANNER, D.K. (1982). "N6, O2'-dibutyryl cyclic AMP and glucose regulate the amount of messenger RNA coding for hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)". *J.Biol.Chem.*, 257: 2022-2028.

BENNETT, F.L. and ALLEYNE, G.A.O. (1976). "Gluconeogenesis and ammoniogenesis in rat kidney: Effect of 3-mercaptopicolinic acid". *FEBS Lett.*, 65: 215-219.

BERGMEYER, H.U. and BERNT, E. (1974). "Determination with glucose oxidase and peroxidase". In: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer, H.U. ed.) pp. 1205-1212. Velay Chemie Academic Press Inc. New York and London.

BERRY, M.N. and FRIEND, D.S. (1969). "High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study". *J.Cell.Biol.*, 43: 506-520.

BLACKMORE, P.F.; BRUMLEY, F.T.; MARKS, J.L. and EXTON, J.H. (1978). "Studies on α -adrenergic activation of hepatic glucose output. Relationship between α -adrenergic stimulation of calcium efflux and activation of phosphorylase in isolated rat liver parenchymal cells". *J.Biol.Chem.*, 253: 4851-4858.

BLACKMORE, P.F.; DEHAYE, J.P. and EXTON, J.H. (1979). "Studies on α -adrenergic activation of hepatic glucose output. The role of mitochondrial calcium release in α -adrenergic activation of phosphorylase in perfused rat liver". *J.Biol.Chem.*, 254: 6945-6950.

BLACKSHEAR, P.J.; HOLLOWAY, P.A.H. and ALBERTI, K.G.M. (1974). "The effects of starvation and insulin on the release of gluconeogenesis substrates from extra-splanchnic tissues in vivo". FEBS Lett., 48: 310-313.

BLACKSHEAR, P.J.; HOLLOWAY, P.A.H. and ALBERTI, K.G.M.M. (1975). "The effects of inhibition of gluconeogenesis on ketogenesis in starved and diabetic rats". Biochem.J., 148: 353-362.

BLAIR, J.B.; COOK, D.E. and LARDY, H.A. (1973). "Influence of glucagon on the metabolism of xylitol and dihydroxyacetone in the isolated perfused rat liver". J.Biol. Chem., 248: 3601-3607.

BLAIR, J.B.; CIMBALA, M.A.; FOSTER, J.L. and MORGAN, R.A. (1976). "Hepatic pyruvate kinase. Regulation by glucagon, cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate and insulin in the perfused rat liver". J.Biol.Chem., 251: 3756-3762.

BLAIR, J.B. and WALKER, R.G. (1984). "Rat liver pyruvate kinase: influence of ligands on activity and fructose 1,6-bisphosphate binding". Arch.Biochem.Biophys., 232: 202-213.

BOGUSKY, R.T.; LOWENSTEIN, L.M. and AOKI, T.T. (1983). "The relationship between glutamate deamination and gluconeogenesis in kidney". Biochem.J., 210: 695-698.

BOITEUX, A.; HESS, B. and SEL'KOV, E.E. (1980). "Creative functions of instability and oscillations in metabolic systems". Curr.Top.Cell.Regul., 17: 171-203.

BOITEUX, A. and HESS, B. (1981). "Design of glycolysis". Phil.Trans.R.Soc.Lond., B293: 5-22.

BRINKMANN, A.; KATZ, N.; SASSE, D. and JUNGERMANN, K. (1978). "Increase of the gluconeogenic and decrease of the glycolytic capacity of rat liver with a change of the metabolic zonation after partial hepatectomy". Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 359: 1561-1571.

BROSNAN, J.T. (1982). "Pathways of carbon flux in gluconeogenesis". Federation Proc., 41: 91-95.

BUTLEN, D. and MOREL, F. (1985). "Glucagon receptors along the nephron: [¹²⁵I] glucagon binding in rat tubules". Pflügers Arch., 404: 348-353.

CAHILL, G.F.Jr.; HERRERA, M.G.; MORGAN, A.P.; SOELDNER, J.S.; STEINKE, J.; LEVY, P.L.; REICHARD, G.A.Jr. and KIPNIS, D.M. (1966). "Hormone-fuel interrelationships during fasting". *J.Clin.Invest.*, 45: 1751.

CALDWELL, M.D.; LACY, W.W. and EXTON, J.H. (1978). "Effects of adrenalectomy on the amino acid and glucose metabolism of perfused rat hind limbs". *J.Biol.Chem.*, 253: 6837-6844.

CARBONELL, J.; FELIU, J.E.; MARCO, R. and SOLS, A. (1973). "Pyruvate kinase. Classes of regulatory isoenzymes in mammalian tissues". *Eur.J.Biochem.*, 37: 148.

CARLSEN, S.A.; SCHMELL, E.; WEIGEL, P.H. and ROSEMAN, S. (1981). "The effect of the method of isolation on the surface properties of isolated rat hepatocytes". *J.Biol.Chem.*, 256: 8058-8062.

CASTAÑO, T.G.; NIETO, A. and FELIU, J.E. (1979). "Inactivation of phosphofructokinase by glucagon in rat hepatocytes." *J.Biol.Chem.*, 254: 5576-5579.

CIMBALA, M.A.; LAMERS, W.H.; NELSON, K.; MONAHAN, J.E.; YOO-WARREN, H. and HANSON, R.W. (1982). "Rapid changes in the concentration of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in rat liver and kidney. Effects of insulin and cyclic AMP". *J.Biol.Chem.*, 257: 7629-7636.

CIMBALA, M.A.; LAU, D. and DAIGNEAULT, J.F. (1985). "Starvation and feeding with a high-carbohydrate diet induce changes in the specific activity of rat hepatic pyruvate kinase". *Biochem.J.*, 226: 299-303.

CLADARAS, C. and COTTAM, G.L. (1980a). "Turnover of liver pyruvate kinase". *Arch.Biochem.Biophys.*, 200: 426-433.

CLADARAS, C. and COTTAM, G.L. (1980b). "Dietary alteration of translatable mRNA sequences coding for rat liver pyruvate kinase". *J.Biol.Chem.*, 255: 11499-11503.

CLAUS, T.H.; EL-MAGHRABI, M.R. and PILKIS, S.J. (1979). "Modulation of the phosphorylation state of rat liver pyruvate kinase by allosteric effectors and insulin". *J.Biol.Chem.*, 254: 7855-7864.

CLAUS, T.H.; SCHLUMPF, J.R.; EL-MAGHRABI, M.R.; PILKIS, J. and PILKIS, S.J. (1980). "Mechanism of action of glucagon on hepatocyte phosphofructokinase activity". *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 77: 6501-6506.

CLAUS, T.H.; SCHLUMPF, J.; PILKIS, J.; JOHNSON, R.A. and PILKIS, S.J. (1981). "Evidence for a new activator of rat liver phosphofructokinase". *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 98: 359-366.

CLAUS, T.H.; SCHLUMPF, J.R.; EL-MAGHRABI, M.R. and PILKIS, S.J. (1982). "Regulation of the phosphorylation and activity of 6-phosphofructo 1-kinase in isolated hepatocytes by α -glycerolphosphate and fructose 2,6-bisphosphate". *J. Biol.Chem.*, 257: 7541-7548.

COHEN, J.J. and BARAC NIETO, M. (1973). "Renal metabolism of substrates in relation to renal function". In: *Handbook of physiology. Renal physiology*, Ed. by J. Orloff and R.W. Berliner. Washington, D.C. Am.Physiol.Soc., p.909-926.

COLOMBO, G. and LARDY, H.A. (1981). "Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from rat liver cytosol. Divalent cation involvement in the decarboxylation reactions". *Biochemistry*, 20: 2758-2768.

COLOMBO, G.; CARLSON, G.M. and LARDY, H.A. (1981). "Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from rat liver cytosol. Dual-cation requirement for the carboxylation reaction". *Biochemistry*, 20: 2749-2757.

CORREDOR, C.; BOSCA, L. and SOLS, A. (1984). "Biphasic effect of fructose 2,6-bisphosphate on the liver fructose 1,6-bisphosphatase: mechanistic and physiological implications". *FEBS Lett.*, 167: 199-202.

CZOK, R. and LAMPRECHT, W. (1974). "Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate". In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U.ed) pp. 1446-1451. Velay Chemie Academic Press Inc. New York and London.

CHAMBERS, J.W.; GEORG, R.H. and BASS, A.D. (1968). "Effects of catecholamines and glucagon on amino acid transport in the liver". *Endocrinology*, 83: 1185-1192.

CHAN, T.M. and FREEDLAND, R.A. (1976). "Effects of glucagon on gluconeogenesis from lactate and propionate in the perfused rat liver". *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 151: 372-375.

CHAN, T.M. and EXTON, J. (1977). " α -adrenergic-mediated accumulation of adenosine 3':5'-monophosphate in calcium-depleted hepatocytes". *J.Biol.Chem.*, 252: 8645:8651.

CHAN, T.M. and EXTON, J.H. (1978). "Studies on α -adrenergic activation of hepatic glucose output. Studies on α -adrenergic inhibition of hepatic pyruvate kinase and activation of gluconeogenesis". J.Biol.Chem., 253: 6393-6400.

CHERRINGTON, A.D.; ASSIMACOPOULOS, F.D.; HARPER, S.C.; CORBIN, J.D.; PARK, C.R. and EXTON, J.H. (1976). "Studies on the α -adrenergic activation of hepatic glucose output. II. Investigation of the roles of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate dependent protein kinase in the actions of phenylephrine in isolated hepatocytes". J.Biol.Chem., 251: 5209-5218.

CHERRINGTON, A.D.; WILLIAMS, P.S.; SHULMAN, G.I. and LACY, W.W. (1981). "Differential time course of glucagon's effect on glycogenolysis and gluconeogenesis in the conscious dog". Diabetes, 30: 180-187.

CHIASSON, J.L.; LILJENQUIST, J.E.; LACY, W.W.; JENNINGS, A.S. and CHERRINGTON, A.D. (1977). "Gluconeogenesis: methodological approaches in vivo". Federation Proc., 36: 229-235.

DE CASTRO, F.T.; BROWN, R.R. and PRICE, J.M. (1957). "Intermediate metabolism of tryptophan". J.Biol.Chem., 228: 777-784.

DEMIGNÉ, C.; FAFOURNOUX, P. and RÉMÉSY, C. (1985). "Enhanced uptake of insulin and glucagon by liver in rats adapted to a high protein diet". J.Nutr., 115: 1065-1072.

DILEEPAN, K.N.; LUPIAÑEZ, J.A. and WAGLE, S.R. (1980). "Involvement of α -adrenergic stimuli and calcium in somatostatin-induced gluconeogenesis in renal cortex". Life Sciences, 26: 2067-2072.

DILEEPAN, K.N. and WAGLE, S.R. (1985). "Minireview. Somatostatin: a metabolic regulator". Life Sciences, 37: 2335-2343.

DITULLIO, N.W.; BERKOFF, C.E.; BLANK, B.; KOSTOS, V.; STACK, E.J. and SAUNDERS, H.L. (1974). "3-mercaptopycolinic acid, an inhibitor of gluconeogenesis". Biochem.J., 138: 387-394.

DUNAWAY, G.A. (1983). "A review of animal phosphofructokinase isozymes with an emphasis on their physiological role". Mol.Cell.Biochem., 52: 75-91.

DUNN, A.; CHENOWETH, M. and BEVER, K. (1978). "Use of ^3H and ^{14}C doubly labeled glucose and amino acids in the study of hormonal regulation of gluconeogenesis in rats". *Federation Proc.*, 36: 245-252.

EDMONDSON, J.W. and LUMENG, L. (1980). "Biphasic stimulation of amino acid uptake by glucagon in hepatocytes". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 96: 61-68.

EISENSTEIN, A.B. and STRACK, I. (1971). "Effect of high protein feeding on gluconeogenesis in rat liver". *Diabetes*, 20: 577-585.

EISENSTEIN, A.B.; STRACK, I. and STEINER, A. (1974). "Glucagon stimulation of hepatic gluconeogenesis in rats fed a high protein, carbohydrate-free diet". *Metabolism*, 23: 15-23.

EL-MAGHRABI, M.R.; HASTON, S.; FLOCKHART, D.; CLAUS, T. and PILKIS, S.J. (1980). "Studies on the phosphorylation and dephosphorylation of L-type pyruvate kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase." *J.Biol.Chem.*, 255: 668-675.

EL-MAGHRABI, M.R.; CLAUS, T.H.; PILKIS, J. and PILKIS, S.J. (1981). "Partial purification of a rat liver enzyme that catalyzes the formation of fructose 2,6-bisphosphate". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 101: 1071-1077.

EL-MAGHRABI, M.R.; CLAUS, T.H.; McGRANE, M.M. and PILKIS, S.J. (1982a). "Influence of phosphorylation on the interaction of effectors with rat liver pyruvate kinase". *J. Biol.Chem.*, 257:233-240

EL-MAGHRABI, M.R.; CLAUS, T.H.; PILKIS, J.; FOX, E. and PILKIS, S.J. (1982b). "Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphatase". *J.Biol.Chem.*, 257: 7603-7607.

EL-MAGHRABI, M.R.; FOX, E.; PILKIS, J. and PILKIS, S.J. (1982c). "cAMP-dependent phosphorylation of rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 106: 794-802.

EL-MAGHRABI, M.R.; CLAUS, T.H.; PILKIS, J. and PILKIS, S.J. (1982d). "Regulation of 6-phosphofructo 2-kinase activity by cAMP-dependent phosphorylation". *Proc.Natl. Acad.Sci.USA*, 79: 315-319.

EXTON, J.H. and PARK, C.R. (1967). "Control of gluconeogenesis in liver .I. General features of gluconeogenesis in the perfused liver of rats". J.Biol.Chem., 242: 2622-2636.

EXTON, J.H. (1972). "Progress in endocrinology and metabolism. Gluconeogenesis." Metabolism, 21: 949-990.

EXTON, J.H.; FRIEDMANN, N.; WONG, E.H.; BRINEAUX, J.P.; CORBIN, J.D. and PARK, C.R. (1972). "Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue". J.Biol.Chem., 247: 3579-3588.

EXTON, J.H.; HARPER, S.C.; TUCKER, A.L.; FLAGG, J.L. and PARK, C.R. (1973). "Effect of adrenalectomy and glucocorticoids replacement on gluconeogenesis in perfused livers from diabetic rats". Biochem.Biophys.Acta., 329: 41-57.

EXTON, J.H.; MILLER, T.B.Jr; HARPER, S.C. and PARK, C.R. (1976). "Carbohydrate metabolism in perfused livers of adrenalectomized and steroid-replaced rats". Am.J.Physiol., 230: E163-E179.

FAFOURNOUX, P.; RÉMÉSY, C. and DEMIGNÉ, C. (1982). "Stimulation of amino acid transport into liver cells from rats adapted to a high-protein diet". Biochem.J., 206: 13-18.

FAUS, M.J.; LUPIAÑEZ, J.A.; VARGAS, A. and SANCHEZ-MEDINA, F. (1978). "Induction of rat kidney gluconeogenesis during acute liver intoxication by carbon tetrachloride". Biochem.J., 174: 461-468.

FELDMAN, D. (1977). "Glucocorticoids receptors and regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in rat kidney and adipose tissue". Am.J.Physiol., 2: E147.

FELIU, J.E.; HUE, L. and HERS, H. (1976). "Hormonal control of pyruvate kinase activity and of gluconeogenesis in isolated hepatocytes". Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 73: 2762-2766.

FELIU, J.E.; HUE, L. and HERS, H.G. (1977). "Regulation in vitro and in vivo of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent inactivation of rat liver pyruvate kinase type L". Eur.J.Biochem., 81: 609-617.

- FERRÉ, P.; PÉGORIER, J.P.; WILLIAMSON, D.H. and GIRARD, J. (1979). "Interactions in vivo between oxidation of non-esterified fatty acids and gluconeogenesis in the newborn rat". *Biochem.J.*, 182: 593-598.
- FERRÉ, P.; SATABIN, P.; EL MANOUBI, L.; CALLIKAN, S. and GIRARD, J. (1981). "Relationship between ketogenesis and gluconeogenesis in isolated hepatocytes from newborn rats". *Biochem.J.*, 200: 429-433.
- FLEIG, W.E.; GEERLING, I.; RÖBEN, H. and DITSCHUNEIT, H. (1984). "Effects of insulin, glucagon and dexamethasone on pyruvate kinase in cultured hepatocytes". *Biochim. Biophys.Acta.*, 805: 165-173.
- FOLDES, M. and BARRITT, G.J. (1977). "Regulation by calcium ions of pyruvate carboxylation pyruvate transport, and adenine nucleotide transport in isolated rat liver mitochondria". *J.Biol.Chem.*, 252: 5372-5380.
- FOSTER, D.O.; RAY, P.D. and LARDY, H.A. (1966). "Studies on the mechanism underlying adaptative changes in rat liver phosphoenolpyruvate carboxykinase". *Biochemistry*, 5: 555-562.
- FOSTER, J.L. and BLAIR, J.B. (1978). "Acute hormonal control of pyruvate kinase and lactate formation in the isolated rat hepatocyte". *Arch.Biochem.Biophys.*, 189: 263-276.
- FRANCOIS, J.; VAN-SCHAFTINGEN, E. and HERS, H.G. (1983). "On the mechanism of inhibition of neutral liver fructose 1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate". *Eur.J. Biochem.*, 134: 269-273.
- FRIEDMANN, B.; GOODMAN, E.H.Jr. and WEINHOUSE, S. (1967). "Effects of insulin and fatty acids on gluconeogenesis in the rat". *J.Biol.Chem.*, 242: 3620-3627.
- FRIEDMANN, N. and RASMUSSEN, H. (1970). "Calcium, manganese and hepatic gluconeogenesis". *Biochim.Biophys. Acta.*, 222: 41-52.
- FRIEDRICHS, D. and SCHONER, W. (1973). "Stimulation of renal gluconeogenesis by inhibition of the sodium pump". *Biochim.Biophys.Acta.*, 304: 142-160.
- FURUYA, E. and UYEDA, K. (1980). "An activation factor of liver phosphofructokinase". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 77: 5861-5864.

FURUYA, E.; YOKOYOMA, M. and UYEDA, K. (1982). "Regulation of fructose 6-phosphate 2-kinase by phosphorylation and dephosphorylation: possible mechanism for coordinated control of glycolysis and glycogenolysis". Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 79: 325-329.

GANCEDO, J.M.; MAZON, M.J. and GANCEDO, C. (1983). "Fructose 2,6-bisphosphate activates the cAMP-dependent phosphorylation of yeast fructose 1,6-bisphosphatase in vitro". J.Biol.Chem., 258: 5998-5999.

GARBER, A.J.; KARL, I.E. and KIPNIS, D.M. (1976). "Alanine and glutamine of aminoacid release from skeletal muscle. IV. β -adrenergic inhibition of aminoacid release". J.Biol.Chem., 251: 851-857.

GARCIA-RUIZ, J.P.; MORENO, F.; SANCHEZ-MEDINA, F. and MAYOR, F. (1973). "Stimulation of rat kidney phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in experimental liver disease induced by galactosamine". FEBS Lett., 34: 113-116.

GARRISON, J.C. and HAYNES, R.C.Jr. (1973). "Hormonal control of glycogenolysis and gluconeogenesis in isolated rat liver cells". J.Biol.Chem., 248: 5333-5343.

GARRISON, J.C.; BORLAND, M.K.; FLORIO, V.A. and TWIBLE, D.A. (1979). "The role of calcium ion as a mediator of the effects of angiotensin II, catecholamines, and vasopressin on the phosphorylation and activity of enzymes in isolated hepatocytes". J.Biol.Chem., 254: 7147-7156.

GARRISON, J.C. and WAGNER, J.D. (1982). "Glucagon and the Ca^{2+} -linked hormones, angiotensin, norepinephrine, and vasopressin stimulate the phosphorylation of distinct substrates in intact hepatocytes". J.Biol.Chem., 257: 13135-13143.

GAWEHN, K. and BERGMAYER, H.U. (1974). "L-(+)-lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD". In: Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U. ed) pp. 1492-1495. Velay Chemie Academic Press Inc. New York and London.

GERICH, J.E.; KARAM, J.H. and FORSHAM, P.H. (1973). "Stimulation of glucagon secretion by epinephrine in man". J.Clin.Endocrinol.Metab., 37: 479-481

GERICH, J.E.; LORENZI, M.; BIER, D.M.; TSALIKIAN, E.; SCHNEIDER, V.; KARAM, J.H. and FORSHAM, P.H. (1976).

"Effect of physiological levels of glucagon and growth hormone on human carbohydrate and lipid metabolism". *J. Clin. Invest.*, 57: 875-884.

GERICH, J.E.; RAPTIS, S. and ROSENTHAL, J. (1978). "Somatostatin symposium". *Metabolism.*, 27, suppl.1: 1129-1469.

GERICH, J.; DAVIS, J.; LORENZI, M.; RIZZA, R.; BOHANNON, N.; KARAM, J.; LEWIS, S.; KAPLAN, R.; SCHULTZ, T. and CRYER, P. (1979). "Hormonal mechanisms of recovery from insulin-induced hypoglycemia in man". *Am.J.Physiol.*, 236: E380-E385.

GOLDBERG, A.L.; TISCHLER, M.; DE MARTINO, G. and GRIFFIN, G. (1980). "Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle". *Federation Proc.*, 39: 31-36.

GOLDHAMMER, A.R. and PARADIES, H.H. (1979). "Phosphofructokinase: structure and function". *Curr.Top.Cell.Regul.*, 15: 109-141.

GOLDSTEIN, D.E. and CURNOW, R.T. (1978). "Effect of starvation on hepatic glycogen metabolism and glucose homeostasis". *Metabolism*, 27: 315-323

GOODMAN, A.D.; FUISZ, R.E. and CAHILL, G.F.Jr. (1966). "Renal gluconeogenesis in acidosis, alkalosis and potassium deficiency: its possible role in regulation of renal ammonia production". *J.Clin.Invest.*, 45: 612-619.

GOODMAN, M.N. (1975). "Effect of 3-mercaptopycolinic acid on gluconeogenesis and gluconeogenic metabolite concentrations in the isolated perfused rat liver". *Biochem.J.*, 150: 137-139.

GRANA, E. and LILLA, L. (1960). "On the adrenocorticotrophic activity of some sympathomimetic amines". *Arch.Int. Pharmacodyn.Ther.*, 126: 203-213.

GRONOW, G. and WEISS, C. (1976). "Renal cell substrate oxidation at physiological concentrations". In: *Use of isolated liver cells and kidney tubules in metabolic studies*. Ed. by J.M. Tager, H.D. Söling and J.R. Williamson. p. 391-394.

GUDER, W.; WIESNER, W.; STUKOWSKI, B. and WIELAND, O. (1971). "Metabolism of isolated kidney tubules". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.*, 352: 1319-1328.

GUDER, W.G. and RUPPRECHT, A. (1975). "Metabolism of isolated kidney tubules. Independent actions of catecholamines on renal cyclic adenosine 3':5'-monophosphate levels and gluconeogenesis". *Eur.J.Biochem.*, 52: 283-290.

GUDER, W.G. and RUPPRECHT, A. (1976). "Hormonal regulation of gluconeogenesis in isolated rat kidney tubule fragments" In: *Use of isolated liver cells and kidney tubules in metabolic studies*. Ed. J.M. Tager, H.D. Söling y J.R. Williamson, p. 379-388.

GUDER, W.G. (1979). "Stimulation of renal gluconeogenesis by angiotensin II". *Biochim.Biophys.Acta.*, 584: 507-519.

GULLINO, P.; WINITZ, M.; BIRNBAUM, S.M.; CORNFIELD, J.; OTEY, M.C. and GREENSTEIN, J.P. (1955). "Toxicity of individual essential aminoacids and their diastereoisomers and the effect on blood-sugar levels". *Arch.Biochem. Biophys.*, 58:252-255.

GUNN, J.M.; HANSON, R.W.; MEYUHAS, O.; RESHEF, L. and BALLARD, F.J. (1975). "Glucocorticoids and the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the rat". *Biochem.J.*, 150: 195-203.

GUNN, J.M.; GALLARD, F.J. and HANSON, R.W. (1976). "Influence of hormones and medium composition on the degradation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) and total protein in Reuber H35 cells". *J.Biol.Chem.*, 251: 3586-3593.

HAGENFELDT, L. (1979). "Metabolism of free fatty acids and ketone bodies during exercise in normal and diabetic man". *Diabetes*, 28 suppl. 1: 66-70.

HANSEN, W. and BOTTERMANN, P. (1975). "Glycolysis and its interaction with a gluconeogenic precursor in perfused rat liver". *Diabetologia*, 11: 445-449.

HANSON, R.W. and GARBER, A.J. (1972). "Phosphoenolpyruvate carboxykinase. I. Its role in gluconeogenesis". *Am.J. Clin.Nutr.*, 25: 1010.

HAYNES, R.C.Jr. (1965). "The control of gluconeogenesis by adrenal cortical hormones". *Adv.Enzym.Regul.*, 3: 111-119.

HEMS, D.A. and WHITTON, P.D. (1973). "Stimulation by vasopressin of glycogen breakdown and gluconeogenesis in the perfused rat liver". *Biochem.J.*, 136: 705-709.

HENNING, H.V.; STUMPF, B.; OHLY, B. and SEUBERT, W. (1966). "On the mechanisms of gluconeogenesis and its regulation. III. The gluconeogenic capacity and the activities of pyruvate carboxylase and PEP-carboxylase of rat kidney and rat liver after cortisol treatment and starvation". *Biochem.J.*, 344: 274.

HERS, H.G. (1976). "The control of glycogen metabolism in the liver". *Ann.Rev.Biochem.*, 45: 167-189.

HERS, H.G. and VAN-SCHAFTINGEN, E. (1982). "Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery". *Biochem.J.*, 206: 1-12.

HERS, H.G. and HUE, L. (1983). "Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis". *Ann.Rev.Biochem.*, 52: 617-653.

HETENYI, G.Jr. (1982). "Correction for the metabolic exchange of ^{14}C for ^{12}C atoms in the pathway of gluconeogenesis in vivo". *Federation Proc.*, 41: 104-109.

HOPGOOD, M.F.; BALLARD, F.J.; RESHEF, L. and HANSON, R.W. (1973). "Synthesis and degradation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver and adipose tissue. Changes during a starvation-refeeding cycle". *Biochem.J.*, 134: 445-453.

HOPKIRK, T.J. and BLOWHAM, D.P. (1979). "Studies on the biosynthesis of hepatic pyruvate kinase and its correlation with enhanced hepatic lipogenesis in meal-trained rats". *Biochem.J.*, 182: 383-397.

HORTELANO, P.; FAUS, M.J. and SANCHEZ-MEDINA, F. (1981). "Rat liver and kidney gluconeogenesis after acute intoxication with carbon tetrachloride". In: *Industrial and Environmental xenobiotics*. Ed. by I. Gut, M. Cirkt and Plaa, G.L., p. 121-131.

HUE, L.; FELIU, J.E. and HERS, H.G. (1978). "Control of gluconeogenesis and of enzymes of glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. A parallel study of the effect of phenylephrine and of glucagon". *Biochem.J.*, 176: 791-797.

HUE, L.; VAN-SCHAFTINGEN, E. and BLACKMORE, P.F. (1981a). "Stimulation of glycolysis and accumulation of a stimulator of phosphofructokinase in hepatocytes incubated with vasopressin". *Biochem.J.*, 194: 1023-1026.

HUE, L.; BLACKMORE, P. and EXTON, J.H. (1981b). "Fructose 2,6-bisphosphate: Hormonal regulation and mechanism of its formation in liver". *J.Biol.Chem.*, 256: 8900-8903.

HUE, L. and BARTRONS, R. (1984). "Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control by glucagon of gluconeogenesis from various precursors in isolated rat hepatocytes". *Biochem.J.*, 218: 165-170.

HUTSON, N.J.; BRUMLEY, F.T.; ASSIMACOPOULOS, F.D.; HARPER S.C. and EXTON, J.H. (1976). "Studies on the α -adrenergic activation of hepatic glucose output. I. Studies on the α -adrenergic activation of phosphorylase and gluconeogenesis and inactivation of glycogen synthase in isolated rat liver parenchymal cells". *J.Biol.Chem.*, 251: 5200-5208.

INGLE, D.J. (1952). "The role of the adrenal cortex in homeostasis". *J.Endocrinol.*, 8: 23-27.

ISHIBASHI, H. and COTTAM, G.L. (1978a). "Glucagon-stimulated phosphorylation of pyruvate kinase in hepatocytes". *J.Biol.Chem.*, 253: 8767-8771.

ISHIBASHI, H. and COTTAM, G.L. (1978b). "Cyclic AMP stimulated phosphorylation of liver pyruvate kinase in hepapocytes". *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 85: 900-905.

IVERSEN, J. (1973). "Adrenergic receptors and the secretion of glucagon and insulin from the isolated, perfused canine pancreas". *J.Clin.Invest.*, 52: 2102-2116.

IYNEDJIAN, P.B.; BALLARD, F.J. and HANSON, R.W. (1975). "The regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis in rat kidney cortex. The role of acid base balance and glucocorticoids". *J.Biol.Chem.*, 250: 5596.

IYNEDJIAN, P.B. and HANSON, R.W. (1977). "Messenger RNA for renal phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Its translation in a heterologous cell-free system and its regulation by glucocorticoids and by changes in acid base balance". *J.Biol.Chem.*, 252: 8398-8403.

IYNEDJIAN, P.B.; AUBERGER, P.; GUIGOZ, Y. and LECAM, A. (1985). "Pretranslational regulation of tyrosine aminotransferase and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis by glucagon and dexamethasone in adult rat hepatocytes". *Biochem.J.*, 225: 77-84.

JEFFERSON, L.S.; LI, J.B. and RANNELS, S.R. (1977). "Regulation by insulin of aminoacid release and protein turnover in the perfused rat hemicorpus". *J.Biol.Chem.*, 252: 1476-1483.

JUNGERMANN, K.; PROBOT, I.; ANDERSON, B. and WOLFLE, D. (1983). "Significance of substrates, hormones and hepatocyte heterogeneity for the regulation of hepatic glycolysis and gluconeogenesis". In: *Isolation, characterization, and use of hepatocytes* (ed. R.A. Harris and N.W. Cornell). Elsevier, New York.

KAGIMOTO, T. and UYEDA, K. (1979). "Hormone-stimulated phosphorylation of liver phosphofructokinase in vivo". *J.Biol.Chem.*, 254: 5584-5587.

KAMM, D.E.; FUISZ, R.E.; GOODMAN, A.D. and CAHILL, G.F.Jr. (1967). "Acid base alterations and renal gluconeogenesis: effect of pH, bicarbonate concentration and pCO_2 ". *J.Clin.Invest.*, 46: 1172.

KAMM, D.E. and ASHER, R.R. (1970). "Relation between glucose and ammonia production in renal cortical slices". *Am.J.Physiol.*, 218: 1161-1165.

KATZ, N.; BRINKMANN, A. and JUNGERMANN, K. (1979a). "Compensatory increase of the gluconeogenic capacity of rat kidney after partial hepatectomy". *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*, 360: 51-57.

KATZ, N.R.; NAUCK, M.A. and WILSON, P.T. (1979b). "Induction of glucokinase by insulin under the permissive action of dexamethasone in primary rat hepatocyte cultures". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 88:23-29.

KATZ, J. (1982). "Importance of sites of tracer administration and sampling in turnover studies". *Federation Proc.*, 41: 123-128.

KATZ, J. and MCGARRY, J.D. (1984). "The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism?". *J.Clin. Invest.*, 74: 1901-1909.

KEECH, B. and BARRITT, G.J. (1967). "Allosteric activation of sheep kidney pyruvate carboxylase by the magnesium ion (Mg^{2+}) and the magnesium adenosine triphosphate ion ($MgATP^{2-}$)". *J.Biol.Chem.*, 242: 1983-1987.

KESSAR, P. and SAGGERSON, E.D. (1980). Evidence that catecholamines stimulate renal gluconeogenesis through an α_1 -type of adrenoceptor". *Biochem.J.*, 190: 119-123.

KIDA, K.; NAKAJO, S.; KAMIYA, F.; TOYAMA, Y.; NISHIO, T. and NAKAGAWA, H. (1978). "Renal net glucose release in vivo and its contribution to blood glucose in rats". *J. Clin. Invest.*, 62: 721-726.

KIMMICH, G.A. and RASMUSSEN, H. (1969). "Regulation of pyruvate carboxylase activity by calcium in intact rat liver mitochondria". *J. Biol. Chem.*, 244: 190-199.

KIMMIG, R.; MAUCH, T.J. and SCHOLZ, R. (1983). "Actions of glucagon on flux rates in perfused rat liver. 2. Relationship between inhibition of glycolysis and stimulation of respiration by glucagon". *Eur. J. Biochem.*, 136: 617-620.

KLAHR, S.; NAWAR, T. and SCHOOLWERTH, A.C. (1973). "Effects of catecholamines on ammoniogenesis and gluconeogenesis by renal cortex in vitro". *Biochim. Biophys. Acta.*, 304: 161-168.

KNEER, N.M.; BOSCH, A.L.; CLARK, M.G. and LARDY, H.A. (1974). "Glucose inhibition of epinephrine stimulation of hepatic gluconeogenesis by blockade of the α -receptor function". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 4523-4527.

KNEER, N.M.; WAGNER, M.J. and LARDY, H.A. (1979). "Regulation by calcium of hormonal effects on gluconeogenesis". *J. Biol. Chem.*, 254: 12160-12168.

KOHL, E.A. and COTTAM, G.L. (1976). "Alteration in liver pyruvate kinase protein and catalytic activity upon starvation and refeeding". *Arch. Biochem. Biophys.*, 176: 671-682.

KOSTER, J.F. and HULSMANN, W.C. (1970). "The influence of inorganic phosphate and phosphorylated hexoses on the activity of pyruvate kinase". *Arch. Biochem. Biophys.*, 141: 98-101.

KREBS, H.A. and YOSHIDA, T. (1963). "Muscular exercise and gluconeogenesis". *Biochem. J.*, 338: 241.

KREBS, H.A.; BENNETT, D.A.H.; De GASQUET, P.; GASCOYNE, T. and YOSHIDA, T. (1963). "Renal gluconeogenesis: the effect of diet on the gluconeogenic capacity of rat kidney cortex slices". *Biochem. J.*, 86: 22-27.

KREBS, H.A. and EGGLESTON, L.V. (1965). "The role of pyruvate kinase in the regulation of gluconeogenesis". *Biochem. J.*, 94: 3C-4C.

KREBS, H.A.; SPEAKE, R.N. and HEMS, R. (1965). "Acceleration of renal gluconeogenesis by ketone bodies and fatty acids". *Biochem.J.*, 94: 712-720.

KREBS, H.A. (1972). "Some aspects of the regulation of fuel supply in omnivorous animals". *Adv.Enzym.Regul.*, 10: 397-420.

KREBS, H.A.; LUND, P. and STUBBS, M. (1976). "Interrelations between gluconeogenesis and urea synthesis". In: *Gluconeogenesis. its regulation in mammalian species* (Hanson, R.W. and Mehlman, M.E. eds) pp. 269-291, John Wiley and Sons, New York.

KRUGER, F.A.; CARHART, J.M. and AUSTAD, R.A. (1964). "The glucose-fatty acid cycle and the liver". *J.Lab.Clin.Med.*, 64: 876.

KUROKAWA, K. and MASSRY, S.G. (1973). "Evidence for stimulation of renal gluconeogenesis by catecholamines". *J.Clin.Invest.*, 52: 961-964.

LARDY, H.A. (1966). "Gluconeogenesis: pathway and hormonal regulation". *Harvey Lect.*, 60: 261-278.

LARDY, H.A. and MERRYFIELD, M.L. (1981). "Ferroactivador and the regulation of gluconeogenesis". *Curr.Top.Cell.Regul.*, 18: 243-254.

LASSERS, B.W.; WAHLQVIST, M.L. and KAIJSER, L. (1971). "Relationship in man between plasma free fatty acids and myocardial metabolism of carbohydrate substrates". *Lancet*, ii: 448-450.

LECAM, A. and FREYCHET, P. (1976). "Glucagon stimulates the A system for neutral amino acid transport in isolated hepatocytes of adult rat". *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 72: 893-901.

LECAM, A. and FREYCHET, P. (1978). "Effect of glucocorticoids on amino acid transport in isolated rat hepatocytes". *Mol.Cell.Endocrinol.*, 9: 205-214.

LEDERER, B.; VISSERS, S.; VAN-SCHAFTINGEN, E. and HERS, H.G. (1981). "Fructose 2,6-bisphosphate in yeast". *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 103: 1281-1287.

LI, J.B. and JEFFERSON, L.S. (1977). "Effect of isoproterenol on amino acid levels and protein turnover in skeletal muscle". *Am.J.Physiol.*, 232: E243-E249.

LJUNGSTRÖM, O.; BERGLUND, L. and ENGSTRÖM, L. (1976). "Studies on the kinetic effects of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent phosphorylation of purified pig-liver pyruvate kinase type L". *Eur.J.Biochem.*, 68: 497-506.

LJUNGSTRÖM, O. and EKMAN, P. (1977). "Glucagon-induced phosphorylation of pyruvate kinase (type L) in rat liver slices". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 78: 1147-1155.

LONG, C.N.H., KATZIN, B. and FRY, E.G. (1940). "The adrenal cortex and carbohydrate metabolism". *Endocrinology*, 26: 309-344.

LONGSHAW, I.D.; ALLEYNE, G.A.O. and POGSON, C.I. (1972). "The effects of steroids, ammonium chloride acidosis on phosphoenolpyruvate carboxykinase in kidney cortex. II. The kinetics of enzyme induction". *J.Clin.Invest.*, 51: 22.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, J.L. and RANDALL, R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J.Biol.Chem.*, 193: 265-275.

LUPIAÑEZ, J.A.; FAUS, M.J.; MUÑOZ-CLARES, R. and SANCHEZ-MEDINA, F. (1976). "Stimulation of rat kidney gluconeogenic ability by inhibition of liver gluconeogenesis". *FEBS Lett.*, 61: 277-281.

LUPIAÑEZ, J.A.; DILEEPAN, K.N. and WAGLE, S.R. (1979a). "Stimulation of gluconeogenesis by somatostatin in rat kidney cortex slices". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 89: 735-742.

LUPIAÑEZ, J.A.; DILEEPAN, K.N. and WAGLE, S.R. (1979b). "Interrelationship of somatostatin, insulin and calcium in the control of gluconeogenesis in kidney cortex slices". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 90: 1153-1158.

LLORENTE, P.; MARCO, R. and SOLS, A. (1970). "Regulation of liver pyruvate kinase and the phosphoenolpyruvate crossroads". *Eur.J.Biochem.*, 13: 45-54.

MacDONALD, D.W.R. and SAGGERSON, E.D. (1977). "Hormonal control of gluconeogenesis in tubule fragments from renal cortex of fed rats. Effects of α -adrenergic stimuli, glucagon, theophylline and papaverine". *Biochem.J.*, 168: 33-42.

- MALLETTE, L.E.; EXTON, J.H. and PARK, C.R. (1969). "Effects of glucagon on amino acid transport and utilization in the perfused rat liver". *J.Biol.Chem.*, 244: 5724-5728.
- MARIE, J.; SIMON, M.-P. and KAHR, A. (1982). "Cotranslation of L and L' pyruvate kinase messenger RNAs from human fetal liver". *Biochim.Biophys.Acta.*, 696: 340-344.
- MARLISS, E.B.; AOKI, T.T.; UNGER, R.H.; SOELDNER, J.S. and CAHILL, G.F.Jr. (1970). "Glucagon levels and metabolic effects in fasting man". *J.Clin.Invest.*, 49: 2256-2270.
- MARLISS, E.B.; AOKI, T.T.; POZEFSKY, T.; MOST, A.S. and CAHILL, G.F.Jr. (1971). "Muscle and splanchnic glutamine and glutamate metabolism in postabsorptive and starved man". *J.Clin.Invest.*, 50: 814-817.
- MARTIN, A.D.; ALLAN, E.H. and TITHERADGE, M.A. (1984). "The stimulation of mitochondrial pyruvate carboxylation after dexamethasone treatment of rats". *Biochem.J.*, 219: 107-115.
- MARTINEZ-LOPEZ, M. (1985). "Aislamiento y purificación de diferentes fragmentos tubulares de corteza renal. Estudios sobre distribución metabólica y efectores". Memoria de licenciatura. Universidad de Granada.
- MATSUMURA, T. and THURMAN, R.G. (1984). "Predominance of glycolysis in pericentral regions of the liver lobule". *Eur.J.Biochem.*, 140: 229-234.
- MATSUMURA, T.; KASHIWAGI, T.; MEREN, H. and THURMAN, R.G. (1984). "Gluconeogenesis predominates in periportal regions of the liver lobule". *Eur.J.Biochem.*, 144: 409-415.
- McDANIEL, H.G.; BOSHELL, B.R. and REDDY, W.J. (1973). "Hypoglycemic action of tryptophan". *Diabetes*, 22: 713-718.
- McPHERSON, G.A. and SUMMERS, R.J. (1982). "A study of α 1-adrenoceptors in rat renal cortex: comparison of [3 H] prazosin binding with the α 1-adrenoceptor modulating gluconeogenesis under physiological conditions". *Br.J. Pharmacol.*, 77: 177-184.

- MEEK, D.W. and NIMMO, H.G. (1984a). "The allosteric properties of rat liver fructose 1,6-bisphosphatase". *Biochem.J.*, 222: 131-138.
- MEEK, D.W. and NIMMO, H.G. (1984b) "Effects of phosphorylation on the kinetic properties of rat liver fructose 1,6-bisphosphatase". *Biochem.J.*, 222: 125-130.
- MELLENDEZ-HEVIA, E.; SIVERIO, J.M. and PEREZ, J.A. (1983). "Studies on glycolysis in vitro: role of glucose phosphorylation and phosphofructokinase activity on total velocity". *Int.J.Biochem.*, 16: 469-476.
- MERRYFIELD, M.L. and LARDY, H.A. (1982). " Ca^{2+} -mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase occurs via release of Fe^{2+} from rat liver mitochondria". *J.Biol.Chem.*, 257: 3628-3635.
- MILLER, T.B.Jr.; EXTON, J.H. and PARK, C.R. (1971). "A block in epinephrine-induced glycogenolysis in hearts from adrenalectomized rats". *J.Biol.Chem.*, 246: 3672-3678.
- MILLER, L.L. (1973) "Technique of isolated rat liver perfusion". In: *Isolated liver perfusion and its application*. Edited by I. Bartosek, A. Guaitani and L.L. Miller. New York: Raven, pp. 11-52.
- MIRSKY, A.; PERISUTTI, G. and JINKS, R. (1957). "The hypoglycemic action of metabolite derivatives of L-tryptophan by month". *Endocrinology*, 60: 318-324.
- MIYANAGA, O.; NAGANO, M. and COTTAM, G.L. (1982). "Effect of insulin on liver pyruvate kinase in vivo and in vitro". *J.Biol.Chem.*, 257: 10617-10623.
- MÖRIKOFER-ZWEZ, S.; STOECKLIN, F.B. and WALTER, R. (1981) "Fructose 1,6-bisphosphatase in rat liver cytosol: Activation after glucagon treatment in vivo and inhibition by fructose 2,6-bisphosphate in vitro". *Biochem.Biophys.Res. Commun.*, 101: 104-111.
- MUNNICH, A.; MARIE, J.; REACH, G.; VAULONT, S.; SIMON, M.P. and KAHN, A. (1984). "In vivo hormonal control of L-type pyruvate kinase gene expression. Effects of glucagon, cyclic AMP, insulin, cortisone and thyroid hormones on the dietary induction of mRNAs in the liver". *J.Biol.Chem.*, 259:10228-10231.

NAGAI, K.; SUDA, M.; YAMAGISHI, O.; TOYAMA, Y. and NAKAGAWA, H. (1975). "Studies on the circadian rhythm of phosphoenolpyruvate carboxykinase. III. Circadian rhythm in the kidney". *J.Biochem.Tokio*, 77: 1249-1254.

NAGATA, N. and RASMUSSEN, H. (1970a). "Parathyroid hormone, cAMP, Ca^{2+} and renal gluconeogenesis". *Proc.Natl. Acad.Sci.USA*, 65: 368.

NAGATA, N. and RASMUSSEN, H. (1970b). "Renal gluconeogenesis: effects of Ca^{2+} and H^{+} ". *Biochim.Biophys.Acta.*, 215:1.

NEELY, P.; EL-MAGHRABI, M.R.; PILKIS, S.J. and CLAUS, T.H. (1981). "Effect of diabetes, insulin, starvation and refeeding on the level of rat hepatic fructose 2,6-bisphosphate". *Diabetes*, 30: 1062-1064.

NEWGARD, C.B.; MOORE, S.V.; FOSTER, D.W. and McGARRY, J.D. (1984). "Efficient hepatic glycogen synthesis in refeeding rats requires continued carbon flow through the gluconeogenic pathway". *J.Biol.Chem.*, 259: 6948-6963.

NEWSHOLME, E.A. and START, C. (1973). "Regulation in metabolism". John Wiley and Sons, London, U.K.

NEWSHOLME, E.A. (1976). "Carbohydrate metabolism in vivo: regulation of the blood glucose level". *Clinics in Endocrin. Metabolism.*, 5: 543-578.

NIETO, A. and CASTAÑO, J.G. (1980). "Control in vivo of rat liver phosphofructokinase by glucagon and nutritional changes". *Biochem.J.*, 186: 953-957.

NOGUCHI, T.; INOUE, H.; CHEN, H.L.; MATSUBARA, K. and TANAKA, T. (1983). "Molecular cloning of DNA complementary to rat L-type pyruvate kinase mRNA. Nutritional and hormonal regulation of L-type pyruvate kinase mRNA concentration". *J.Biol.Chem.*, 258: 15220-15223.

NOGUCHI, T.; INOUE, H. and TANAKA, T. (1985). "Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase in diabetic rat liver by insulin and dietary fructose". *J.Biol.Chem.*, 260: 14393-14397.

NORDLIE, R.C.; ARION, W.J. and GLENDE, E.A.Jr. (1965). "Liver microsomal glucose 6-phosphatase, inorganic pyrophosphatase and pyrophosphateglucose phosphotransferase IV. Effects of adrenalectomy and cortisone administration

on activities assayed in the absence and presence of deoxycholate". J.Biol.Chem., 240: 3479-3484.

OLIVER, J.R. and WAGLE, S.R. (1975). "Studies on the inhibition of insulin release, glycogenolysis and gluconeogenesis by somatostatin in the rat islets of Langerhans and isolated hepatocytes". Biochem.Biophys.Res. Commun., 62: 772-777.

OWEN, O.E.; FELIG, P.; MORGAN, A.P.; WAHREN, J. and CAHILL, G.F.Jr. (1969). "Liver and kidney metabolism during prolonged starvation". J.Clin.Invest., 48: 574-583.

PAGLIARA, A.S. and GOODMAN, A.D. (1969). "Effect of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate on production of glucose and ammonia by renal cortex". J.Clin.Invest., 48: 1408-1412.

PARKS, W.C. and DRAKE, R.L. (1982). "Insulin mediates the stimulation of pyruvate kinase by a dual mechanism". Biochem.J., 208: 333-337.

PERET, J.; FOUSTOCK, S.; CHANEZ, M.; BOIS-JOYEUX, B. and ASSAN, R. (1981). "Plasma glucagon and insulin concentrations and hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate kinase activities during and upon adaptation of rats to a high protein diet". J.Nutr., 111: 1173-1184.

PILKIS, S.J. (1970). "Hormonal control of hexokinase activity in animal tissues". Biochim.Biophys.Acta., 215: 461.

PILKIS, S.J.; RIOU, J.P. and CLAUS, T.H. (1976). "Hormonal control of [¹⁴C]-glucose synthesis from [U-¹⁴C]-dihydroxyacetone and glycerol in isolated rat hepatocytes". J.Biol.Chem., 251: 7841-7852.

PILKIS, S.J.; PILKIS, J. and CLAUS, T.H. (1978). "Effect of fructose diphosphate and phosphoenolpyruvate on inactivation of pyruvate kinase in hepatocyte homogenates". Biochem.Biophys.Res.Commun., 81: 139-146.

PILKIS, S.J.; SCHLUMPF, J.R.; PILKIS, J. and CLAUS, T.H. (1979). "Regulation of phosphofructokinase activity by glucagon in isolated rat hepatocytes". Biochem.Biophys. Res.Commun., 88: 960-967.

PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; COVEN, B.; CLAUS, T.H.; TAGER, H.S.; STEINER, D.F.; KEIM, P.S. and HEINRIKSON,

- R.L. (1980). "Phosphorylation of rat hepatic fructose 1,6-bisphosphatase and pyruvate kinase". *J.Biol.Chem.*, 255: 2770-2775.
- PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; McGRANE, M.M.; PILKIS, J. and CLAUS, T.H. (1981a). "The role of fructose 2,6-bisphosphate in regulation of fructose 1,6-bisphosphatase". *J.Biol.Chem.*, 256: 11489-11495.
- PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; PILKIS, J.; CLAUS, T.H. and CUMMING, D.A. (1981b). "Fructose 2,6-bisphosphate. A new activator of phosphofructokinase". *J.Biol.Chem.*, 256: 3171-3174.
- PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; PILKIS, J. and CLAUS, T.H. (1981c). "Inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate". *J.Biol.Chem.*, 256: 3619-3622.
- PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; McGRANE, M.; PILKIS, J.; FOX, E. and CLAUS, T.H. (1982a). "Fructose 2,6-bisphosphate: a new mediator of hormone action at the fructose 6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate substrate cycle". *Mol.Cell.Endocrin.*, 25: 245-266.
- PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; McGRANE, M. and CLAUS, T.H. (1982b). "Regulation by glucagon of hepatic pyruvate kinase, phosphofructokinase and fructose 1,6-bisphosphatase". *Federation Proc.*, 42: 2623-2628.
- PILKIS, S.J.; CHRISMAN, T.D.; EL-MAGHRABI, M.R.; COLOSIA, A.; FOX, E.; PILKIS, J. and CLAUS, T. (1983a). "The action of insulin on hepatic fructose 2,6-bisphosphate metabolism". *J.Biol.Chem.*, 258: 1495-1503.
- PILKIS, S.J.; CHRISMAN, T.D.; BURGESS, B.; McGRANE, M.; COLOSIA, A.; PILKIS, J.; CLAUS, T.H. and EL-MAGHRABI, M.R. (1983b). "Rat hepatic 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: a unique bifunctional enzyme". *Adv.Enzyme.Regul.*, 21:147-173.
- PILKIS, S.J.; REGEN, D.M.; CLAUS, T.H. and CHERRINGTON, A.D. (1985). "Role of hepatic glycolysis and gluconeogenesis in glycogen synthesis". *Bioessays*, 2: 273-276.
- POGGIOLI, J.; BERTHON, B. and CLARER, M. (1980). "Calcium movements in situ mitochondria following activation of α -adrenergic receptors in rat liver cells". *FEBS Lett.*, 115: 243-246.

POGSON, C.I.; LONGSHAW, I.D.; ROOBOL, A.; SMITH, S.A. and ALLEYNE, G.A.O. (1976). "Phosphoenolpyruvate carboxykinase and renal gluconeogenesis" In: Gluconeogenesis. Its regulation in mammalian species, (Hanson, R.W. y Mehlman, M.A. eds.) pp.335-368, John Wiley and Sons. New York.

POOLE, G.P. and BLOXHAM, D.P. (1982). "The turnover of L-type pyruvate kinase in cultured rat hepatocytes". *Biochem.J.*, 204: 89-95.

PORTE, D.Jr; GRABER, A.L.; KUZUYA, T. and WILLIAMS, R.H. (1966). "The effect of epinephrine on immunoreactive insulin levels in man". *J.Clin.Invest.*, 45: 228-236.

PORTE, D.Jr. and BAGDADE, J.D. (1970). "Human insulin secretion: an integrated approach". *Annu.Rev.Med.*, 21: 219-240.

PROBST, I, and JUNGERMANN, K. (1983). "Short-term regulation of glycolysis by insulin and dexamethasone in cultured rat hepatocytes". *Eur.J.Biochem.*, 135: 151-156.

RADZIUK, J. (1982). "Developments in the tracer measurement of gluconeogenesis and glycogenesis in vivo: an overview". *Federation Proc.*, 41: 88-90.

RALL, T.W.; SUTHERLAND, E.W. and BERTHER, J. (1957). "The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates". *J.Biol.Chem.*, 224: 463-475.

RAMBERG, C.F.Jr. (1977). "The role of tracer methodology in the study of glucose recycling and gluconeogenesis in vivo". *Federation Proc.*, 36: 225-228.

RANDLE, P.J.; NEWSHOLME, E.A. and GARLAND, P.B. (1964). "Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate and of alloxan-diabetes and starvation on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles". *Biochem.J.*, 93: 652-665.

RANNELS, D.E.; PEGG, A.E.; RANNELS, S.R. and JEFFERSON, L.S. (1978). "Effect of starvation on initiation of protein synthesis in skeletal muscle and heart". *Am.J. Physiol.*, 235: E126-E133.

REED, J. and LARDY, H.A. (1970). "Mode of action of hypoglycemic agents. III. Studies on 5-methoxy indole-2-carboxylic acid and quinaldic acid". *J.Biol.Chem.*, 245: 5297-5303.

- REINHART, P.H.; TAYLOR, W.M. and BYGRAVE, F.L. (1984). "The role of calcium ions in the mechanism of action of α -adrenergic agonists in rat liver". *Biochem.J.*, 223: 1-13.
- RÉMÉSY, C.; DEMIGNÉ, C. and AUFRÈRE, J. (1978). "Inter-organ relationships between glucose, lactate and amino acids in rats fed high-carbohydrate or high-protein diets". *Biochem.J.*, 170: 321-329.
- RÉMÉSY, C.; FAFOURNOUX, P. and DEMIGNÉ, C. (1983). "Control of hepatic utilization of serine, glycine and threonine in fed and starved rats". *J.Nutr.*, 113: 28-39.
- RENNIE, M.J. and HOLLOSZY, J.O. (1977). "Inhibition of glucose uptake and glycogenolysis by availability of oleate in well oxygenated perfused skeletal muscle". *Biochem.J.*, 168: 161-170.
- REYNOLDS, C.H. (1980). "Activation and inactivation of phosphoenolpyruvate carboxykinase by ferrous ions". *Biochem.J.*, 185: 451-454
- RICHARDS, C.S. and UYEDA, K. (1980). "Changes in the concentration of activation factor of phosphofruktokinase in hepatocytes in response to glucose and glucagon". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 97: 1535-1540.
- RICHARDS, C.S.; FURUYA, E. and UYEDA, K. (1981). "Regulation of fructose 2,6-P₂ concentration in isolated hepatocytes". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 100: 1673-1679.
- RICHARDS, C.S. and UYEDA, K. (1982a). "The effect of insulin and glucose on fructose 2,6-P₂ in hepatocytes". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 109: 394-401.
- RICHARDS, C.S. and UYEDA, K. (1982b). "Hormonal regulation of fructose-6-P, 2-kinase and fructose 2,6-P₂ by two mechanisms". *J.Biol.Chem.*, 257: 8854-8861.
- RICHARDS, C.S.; YOKOYOMA, M.; FURUYA, E. and UYEDA, K. (1982). "Reciprocal changes in fructose 6-phosphate 2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase activity in response to glucagon and epinephrine". *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 140: 1073-1079.
- RIOU, J.P.; CLAUS, T.H. and PILKIS, S.J. (1978). "Stimulation by glucagon of in vivo phosphorylation of rat hepatic pyruvate kinase". *J.Biol.Chem.*, 253: 656-659.

- RITTENHOUSE, J.; CHATTERJEE, T.; MARCUS, F.; REARDON, I. and HEINRIKSON, R.L. (1983). "Amino acid sequence of the COOH-terminal region of fructose 1,6-bisphosphatase in relation to cyclic AMP-dependent phosphorylation". *J. Biol.Chem.*, 258: 7648-7652.
- RIZZA, R.A.; HAYMOND, M.W.; MILES, J.M.; VERDONK, C.A.; CRYER, P.E. and GERICH, J.E. (1980). "Effect of α -adrenergic stimulation and its blockade on glucose turnover in man". *Am.J.Physiol.*, 238: E467-E472.
- ROGNSTAD, R.A. (1984). "Effect of oleate on glucose control of gluconeogenesis". *IRCS Mec.Sci.*, 12: 756-757.
- ROOBOL, A. and ALLEYNE, G.A.O. (1973). "Regulation of renal gluconeogenesis by calcium ions, hormones and adenosine 3'-5' cyclic monophosphate". *Biochem.J.*, 134: 157-165.
- ROSS, B.D.; HEMS, R. and KREBS, H.A. (1967). "The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver". *Biochem.J.*, 102: 942-951.
- ROSS, B.D. (1976). "Effect of inhibition of gluconeogenesis on ammonia production in the perfused rat kidney". *Clin.Sci.Mol.Med.*, 50: 493-498.
- RUDERMAN, N.B.; ROSS, P.S.; BERGER, M. and GOODMAN, M.N. (1974). "Regulation of glucose and ketone-body metabolism in brain of anaesthetized rats". *Biochem.J.*, 138: 1-10.
- RUDERMAN, N.B.; AOKI, T.T. and CAHILL, G.F.Jr. (1976). "Gluconeogenesis and its disorders in man". In: *Gluconeogenesis. Its regulation in mammalian species*, (Hanson, R.W. and Mehlman, M.A. eds.) pp. 515-532, John Wiley and Sons. New York.
- SABULARSE, D.C. and ANDERSON, R.L. (1981). "D-fructose 2,6-bisphosphate: a naturally occurring activator for inorganic pyrophosphate. D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase in plants". *Biochem.Biophys.Res. Commun.*, 103: 848-855.
- SAGGERSON, E.D. and CARPENTER, L.A. (1979). "Ouabain and K^+ removal blocks α -adrenergic stimulation of gluconeogenesis in tubule fragments from fed rats". *FEBS Lett.*, 106: 189-192.

SAGGERSON, E.D.; KESSAR, P. and CARPENTER, C.A. (1980). "Regulation of renal gluconeogenesis by alpha-adrenergic action". *Int.J.Biochem.*, 12: 107-111.

SALAVERT, A. and IYNEDJIAN, P.B. (1982). "Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis in rat liver cells. Rapid induction of specific mRNA by glucagon or cyclic AMP and permissive effect of dexamethasone". *J.Biol.Chem.*, 257: 13404-13412.

SAMMOLS, E.; MARRI, G. and MARKS, V. (1965). "Promotion of insulin secretion by glucagon". *Lancet*, 2: 415-416.

SANCHEZ-POZO, A.; LUPIAÑEZ, J.A.; GIL, A. and SANCHEZ-MEDINA, F. (1982). "A sensitive method for determining quinolinic acid in animal tissues". *Anal.Biochem.*, 127: 159-163.

SANCHEZ-POZO, A.; LUPIAÑEZ, J.A.; CORNO, A.; PITA, M.L. and SANCHEZ-MEDINA, F. (1983a). "Differential effects of L-tryptophan administration on hepatic and renal gluconeogenesis in rats". *Molecular Physiology*, 3: 143-150.

SANCHEZ-POZO, A.; LUPIAÑEZ, J.A.; GIL, A.; VARGAS, A.M. and SANCHEZ-MEDINA, F. (1983b). "Role of renal gluconeogenesis in the maintenance of glycaemia after L-tryptophan administration in rats". *Horm.Metabol.Res.*, 15: 171-175.

SCHMIDT, U. and GUDER, G. (1976). "Sites of enzyme activity along the nephron". *Kidney Int.*, 9: 233-242.

SCHMIDT, H.; SCHOLZ, M.; MALL, A.; SCHMIDT, U.; GUDER, W.G. and DUBACH, U.C. (1978). "Carbohydrate metabolism in rat kidney: heterogeneous distribution of glycolytic and gluconeogenic key enzymes". In: *Biochemical Nephrology*. Ed. by W.G. Guder and U. Schmidt Bern. Huber. pp. 282-289.

SCHMIDT, H.; MALL, A.; SCHOLZ, M. and SCHMIDT, U. (1980). "Unchanged glycolytic capacity in rat kidney under conditions of stimulated gluconeogenesis". *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.*, 361: 819-827.

SCRUTTON, M.C. and UTTER, M.F. (1968). "The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues". *Ann. Rev.Biochem.*, 37: 249-302.

SEGLER, P.O. (1972). "Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca^{2+} on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver". *Exp.Cell.Res.*, 74: 450-454.

SEITZ, H.J.; TIEDGEN, M. and TARNOWSKI, W. (1980). "Regulation of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Role of dietary proteins and amino acids in vivo and in the isolated perfused rat liver". *Biochim.Biophys.Acta.*, 632: 473-482.

SHERWIN, R.S.; HENOLER, R.G. and FELIG, P. (1975). "Effect of ketone infusions on amino acid and nitrogen metabolism in man". *J.Clin.Invest.*, 55: 1382-1390.

SHOJI, S. and PENNINGTON, R.J.T. (1977). "The effect of cortisone on protein breakdown and synthesis in rat skeletal muscle". *Mol.Cell.Endocrinol.*, 6: 159-169.

SMITH, S.A. and POGSON, C.I. (1977). "Tryptophan and the control of plasma glucose concentrations in the rat". *Biochem.J.*, 168: 495-506.

SMITH, S.B. and FREEDLAND, R.A. (1979). "Activation of pyruvate kinase by 6-phosphogluconate". *J.Biol.Chem.*, 254: 10644-10648.

SMITH, S.B. and FREEDLAND, R.A. (1981). "Regulation of pyruvate kinase by 6-phosphogluconate in isolated hepatocytes". *Am.J.Physiol.*, 240: E279-E285.

SODERLING, T.R.; CORBIN, J.D. and PARK, C.R. (1973). "Regulation of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. II. Hormonal regulation of the adipose tissue enzyme". *J.Biol.Chem.*, 248: 1822-1829.

SOKAL, J.E. and SARCIONE, E.J. (1964). "Failure of physiological concentrations of epinephrine to affect glycogen levels in isolated rat liver". *Nature London*, 204: 881-883.

SOKAL, J.E. (1966). "Glucagon: an essential hormone". *Am.J.Med.*, 41: 331-339.

SOMMERCORN, J. and FREEDLAND, R.A. (1982). "Regulation of hepatic phosphofructokinase by 6-phosphogluconate". *J.Biol.Chem.*, 257: 9424-9428.

SOMMERCORN, J. and FREEDLAND, R.A. (1984). "Effects of diets on concentrations of 6-phosphogluconate and fructose 2,6-bisphosphate in rat livers and an assay of fructose 2,6-bisphosphate with an improved method". *J.Nutr.*, 114: 1462-1469.

SOMMERCORN, J.; STEWARD, T. and FREEDLAND, R.A. (1984). "Activation of phosphofructokinase from rat tissues by 6-phosphogluconate and fructose 2,6-bisphosphate". *Arch. Biochem. Biophys.*, 232: 579-584.

SPENCE, J.T. and PITOT, H.C. (1979). "Hormonal regulation of glucokinase in primary cultures of adult rat hepatocytes". *J. Biol. Chem.*, 254: 12331-12336.

STALMANS, W. (1976). "The role of the liver in the homeostasis of blood glucose". *Curr. Top. Cell. Regul.*, 11: 51-97.

STEELE, R. (1975). "Influences of corticosteroids on protein and carbohydrate metabolism". In: *Handbook of Physiology Endocrinology*, edited by R.O. Greep and E.B. Astwood. Washington, D.C. Am. Physiol. Soc., sect. 7, vol. VI, chapt. 11, pp. 135-167.

STEINER, K.E.; WILLIAMS, P.E.; LACY, W.W. and CHERRINGTON, A.D. (1981). "Effects of the insulin/glucagon molar ratio on glucose production in the dog". *Fed. Proc.*, 40: 3481.

STRUCK, E.; ASHMORE, J. and WIELAND, O. (1966). "Effects of glucagon and long chain fatty acids on glucose production by isolated perfused rat liver". *Adv. Enzym. Regul.*, 4: 219-224.

SUGDEN, M.C.; WATTS, D.I.; PALMER, T.N. and MYLES, D.D. (1983). "Direction of carbon flux in starvation and after refeeding: In vitro and in vivo effects of 3-mercaptopicolinate". *Biochem. Int.*, 7: 329-337.

TAYLOR, C.B. and BAILEY, E. (1967). "Activation of liver pyruvate kinase by fructose 1,6-diphosphate". *Biochem. J.*, 102: 32c.

TEJWANI, G.A. (1983). "Regulation of fructose-bisphosphatase activity". *Adv. Enzymol.*, 54: 121-193.

THOMPSON, E.B. and LIPPMAN, M. (1974). "Mechanism of action of glucocorticoids". *Metabolism*, 23: 159-202.

TIEDGEN, M. and STEITZ H.G. (1980). "Dietary control of circadian variation in serum insulin, glucagon and hepatic cyclic AMP". *J. Nutr.*, 110: 876-882.

TILGHMAN, S.M.; HANSON, R.W.; RESHEF, L.; HOPGOOD, M.F. and BALLARD, F.J. (1974). "Rapid loss of translatable messenger RNA of phosphoenolpyruvate carboxykinase during glucose repression in liver". Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 71: 1304-1308.

TILGHMAN, S.M.; HANSON, R.W. and BALLARD, F.J. (1976). "Hormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in mammalian tissues". In: Gluconeogenesis. Its regulation in mammalian species (Hanson, R.W. and Mehlman, M.A. eds.) pp. 47-91, John Wiley and Sons. New York.

TITHERADGE, M.A. and COORE, H.G. (1976). "The mitochondrial pyruvate carrier, its exchange properties and its regulation by glucagon". FEBS Lett., 63: 45-50.

TOLBERT, M.E.M.; BUTCHER, F.R. and FAIN, J.N. (1973). "Lack of correlation between catecholamine effects on cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and gluconeogenesis in isolated rat liver cells". J.Biol.Chem., 248: 5686-5692.

TOLBERT, M.E.M. and FAIN, J.N. (1974). "Studies on the regulation of gluconeogenesis in isolated rat liver cells by epinephrine and glucagon". J.Biol.Chem., 249: 1162-1164.

TOMAS, F.M.; MUNRO, H.N. and YOUNG, V.R. (1979). "Effect of glucocorticoids administration on the rate of muscle protein breakdown in vivo in rats, as measured by urinary excretion of N tau-methylhistidine". Biochem.J., 178: 139-146.

UNGER, R.H.; DOBBS, R.E. and ORCI, L. (1978). "Insulin, glucagon and somatostatin secretion in the regulation of metabolism". Ann.Rev.Physiol., 40: 307-343.

UTTER, M.F. and SCRUTTON, M.C. (1969). "Pyruvate carboxylase". Curr.Top.Cell.Regul., 1: 253-296.

UYEDA, K. (1979). "Phosphofructokinase". In: Advances in Enzymology (Edited by Meister, A.) Vol. 48, pp. 193-244. Wiley, New York.

UYEDA, K.; FURUYA, E. and SHERRY, A.D. (1981). "The structure of "activation factor" for phosphofructokinase". J.Biol.Chem., 256: 8679-8684.

UYEDA, K.; FURUYA, E.; RICHARS, C.S. and YOKOYAMA, M. (1982). "Fructose 2,6-P₂, chemistry and biological function". Mol.Cell.Biochem., 48: 97-120.

VAN BERKEL, T.J.C.; KOSTER, J.F.; KRUIJT, J.K. and HULSMANN, W.C. (1974). "On the regulation and allosteric model of L-type pyruvate kinase from rat liver". *Biochim. Biophys. Acta.*, 370: 450-458.

VAN BERKEL, T.J.C.; KRUIJT, J.K.; KOSTER, J.F.; HULSMANN, W.C. (1976). "Cyclic nucleotides, pyruvate and hormone-induced changes in pyruvate activity in isolated hepatocytes". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72: 917-925.

VAN BERKEL, T.J.C.; KRUIJT, J.K.; VAN DEN BERG, G.B. and KOSTER, J.F. (1978). "Difference in the effect of glucagon and starvation upon L-type pyruvate kinase from rat liver". *Eur. J. Biochem.*, 92: 553-561.

VAN-SCHAFTINGEN, E. and HERS, H.G. (1980). "Synthesis of a stimulator of phosphofructokinase most likely fructose 2,6-bisphosphate from phosphoric acid and fructose 6-phosphoric acid". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 96: 1524-1531.

VAN-SCHAFTINGEN, E.; HUE, L. and HERS, H.G. (1980). "Control of the fructose 6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose and glucagon". *Biochem. J.*, 192: 887-895.

VAN-SCHAFTINGEN, E. and HERS, H.G. (1981a). "Phosphofructokinase-2. The enzyme that forms fructose 2,6-bisphosphate from fructose 6-phosphate and ATP". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101: 1078-1084.

VAN-SCHAFTINGEN, E. and HERS, H.G. (1981b). "Inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2861-2863.

VAN-SCHAFTINGEN, E.; JETT, M.F.; HUE, L. and HERS, H.G. (1981). "Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 3483-3486.

VENEZIALE, C.M.; WALTER, P.; KNEER, N. and LARDY, H.A. (1967). "Influence of L-tryptophan and its metabolites in gluconeogenesis in the isolated perfused liver". *Biochemistry*, 6: 2129-2138.

VENEZIALE, C.M. (1976). "Influence of glucagon on the metabolism of fructose, D-glyceraldehyde, and dihydroxyacetone in rat liver". In: *Gluconeogenesis. Its regulation in mammalian species* (Hanson, R.W. and Mehlman, M.A. eds.), pp. 463-480. John Wiley and Sons, New York.

- VINAY, P.; GOUGOUX, A. and LEMIEUX, G. (1981). "Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules". *Am.J. Physiol.*, 241: F403-F411.
- WAGLE, S.R. and INGEBRETSEN, W.R. (1975). "Isolation, purification and metabolic characteristics of rat liver hepatocytes". In: *Methods in Enzymology* (J.M. Lowenstein, ed.), Vol. XXXV, pp. 579-594. Academic Press, New York.
- WALSH, K.X.; MILLIKIN, D.M.; SCHLENDER, K.K. and REIMAN, E.M. (1980). "Stimulation of phosphorylase kinase by the calcium dependent regulator". *J.Biol.Chem.*, 255: 5036-5042.
- WALTER, P. (1976). "Pyruvate carboxylase: intracellular localization and regulation", In: *Gluconeogenesis. Its regulation in mammalian species* (Hanson, R.W. and Mehlman, M.A. ed.) pp. 239-265. John Wiley and Sons. New York.
- WEINHOUSE, S. (1976). "Regulation of glucokinase in liver". *Curr.Top.Cell.Regul.*, 11: 1-50.
- WEIR, G.C. and WEIR, S.B. (1977). "Somatostatin: its diverse physiologic roles and diverse therapeutic implications". *Hosp.Formul.*, 12: 157-161.
- WHITTON, P.O.; RODRIGUES, L.M. and HEMS, D.A. (1978). "stimulation by vasopressin, angiotensin and oxytocin of gluconeogenesis in hepatocyte suspensions". *Biochem.J.*, 176: 893-898.
- WILLIAMSON, J.R., (1967). "Effects of fatty acids, glucagon and anti-insulin serum on the control of gluconeogenesis and ketogenesis in rat liver". *Adv.Enzym.Regul.*, 5: 229-255.
- WILLIAMSON, J.R.; BROWNING, E.T. and OLSON, M.S. (1968). "Interrelations between fatty acid oxidation and the control of gluconeogenesis in perfused rat liver". *Adv. Enzym.Regul.*, 6: 67-100.
- WIMHURST, J.M. and MANCHESTER, K.L. (1970). "Role of bivalent cations in the control of enzymes involved in gluconeogenesis". *FEBS Lett.*, 10: 33-37.
- WOJTCZAK, A.B.; WALAJTYS-RODE, E.I. and GEELLEN, M.J.H. (1978). "Interrelations between ureogenesis and gluconeogenesis in isolated hepatocytes. The role of anion transport and the competition for energy". *Biochem.J.*, 170: 379-385.

YAMAGUCHI, M. and YAMAMOTO, T. (1977). "Effect of calcitonin on serum glucose concentration in rats". *Chem.Pharm.Bull.*, 25: 2189-2194.

YAMAGUCHI, M. (1980). "Effect of calcitonin and epinephrine on serum glucose concentration in rats". *Chem. Pharm.Bull.*, 28: 3693:3695.

YAMAGUCHI, M. (1981). "Calcitonin increases serum glucose concentration independently of insulin secretion in rats". *Chem.Pharm.Bull.*, 29: 1455-1458.

YAMAGUCHI, M. and WILLIAMSON, J.R. (1983). "Stimulatory effect of calcitonin on calcium uptake and glucose production in isolated rat hepatocytes". *Horm.Metab.Res.*, 15: 176-180.

YAMAGUCHI, M. and MOMOSE, K. (1984). "Effect of calcitonin on fructose 1,6-diphosphatase activity in rat liver: role of cytosolic calcium concentration". *Horm.Metab.Res.*, 16: 650-653.

YIP, B.P. and LARDY, H.A. (1981). "The role of calcium in the stimulation of gluconeogenesis by catecholamines". *Arch.Biochem.Biophys.*, 212: 370-377.

YOREK, M.A.; RUFO, G.A.Jr. and RAY, P.D. (1980). "Gluconeogenesis in rabbit liver. III. The influences of glucagon, epinephrine, α - and β -adrenergic agents on gluconeogenesis in isolated hepatocytes". *Biochim.Biophys. Acta.*, 632: 517-526.