

R.16.490
0

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Grado pag. 85
Número 90 del libro
de la biblioteca

T.D.
6/91

Excmo. Sr. Rector de la Universidad de Sevilla
Alvaro Laffitte



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

PAPEL REGULADOR DE LA FRUCTOSA-2,5-DIFOSFATO
EN LA GLUCOLISIS DE DIFERENTES TEJIDOS

Tesis presentada para optar al grado
de Doctor en Medicina y Cirugía
por

Antonio Gualberto Garcia
Director: Prof. Sobrino Beneyto



PAPEL REGULADOR DE LA FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO
EN LA GLUCOLISIS DE DIFERENTES TEJIDOS

Antonio Gualberto Garcia

EL DIRECTOR DE TESIS

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Sobrino Beneyto', written over a horizontal line.

Francisco Sobrino Beneyto

Prof. Titular Bioquímica
Dpto Bioquímica Médica y Biol. Mol.
Universidad de Sevilla



AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4
TELEFONO 37 78 70

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR
41009 - SEVILLA

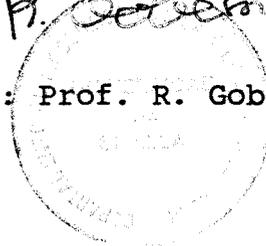
D. R. Goberna Ortiz, Catedrático Director del Dpto.
Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de
Sevilla,

CERTIFICA:
que el trabajo titulado " Papel regulador de la
Fructosa-2,6-difosfato en la glucólisis de diferentes
tejidos ", presentado por Antonio Gualberto García para
optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, ha sido
realizado en este departamento bajo la dirección del Prof.
F. Sobrino Beneyto.

Sevilla, a 6 de Marzo de 1990

F. Goberna

Fdo.: Prof. R. Goberna



Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en:

FEBS lett. 182, 327-330 (1985)

Biochem. Inter. 12, 767-774 (1986)

Biochem. J. 244, 137-142 (1987)

Biochem. J. 244, 235-238 (1987)

FEBS lett. 229, 91-94 (1988)

Biochem. Inter. 17, 69-76 (1988)

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Goberna, por su amable acogida en el departamento.

Al Prof. Sobrino, por la dirección de este trabajo y por su interés y constante estímulo.

A los doctores M.H. Rider y L. Hue, por su inestimable colaboración en el estudio de la Fructosa-2,6-difosfato en hematíes.

A la Prof. P. Molinero por su ayuda técnica en la cuantificación de la tiroxina en sangre.

A los miembros del Departamento de Bioquímica Médica y, en especial, a mis compañeros de estudios de tercer ciclo, por su ayuda y colaboración.

A P. Martin, que mecanografió buena parte de este trabajo.

INDICE

INTRODUCCION

Regulación de la glucólisis.....	10
Papel de la fosfofructokinasa-1.....	11
Descubrimiento de la fructosa-2,6-difosfato.....	15
Biosíntesis y degradación de la fructosa-2,6-difosfato.....	19
Regulación de la actividad enzimática por la fructosa-2,6-difosfato.....	24
Papel de la fructosa-2,6-difosfato en la regulación del flujo glucolítico hepático.....	32
Papel de la fructosa-2,6-difosfato en la regulación del flujo glucolítico en tejidos extrahepáticos.....	37
La fructosa-2,6-difosfato en células proliferantes....	39

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	41
---------------------------------	----

MATERIAL Y METODOS

Animales.....	48
Células.....	49
Metabolitos.....	52
Actividades enzimáticas.....	56
Materiales.....	61

RESULTADOS Y DISCUSION

Tejido adiposo Blanco.

1. Regulación hormonal de los niveles de Fru-2,6-P₂ en el tejido adiposo epididimario de rata por insulina y adrenalina. Papel del ácido octanoico.

Resultados.....	64
Discusión.....	67

2. Regulación de la Fru-2,6-P₂ por dicloroacetato y fenacina metosulfato y otros agentes en el tejido adiposo blanco de rata

Resultados y Discusión.....	70
-----------------------------	----

Tejido adiposo marrón. Fructosa-2,6-P₂ en el Tejido adiposo marrón de rata. Efecto de la aclimatación al frío.

Resultados y Discusión.....	73
-----------------------------	----

<u>Tejido muscular cardíaco. Efecto del hipotiroidismo experimental sobre las actividades PFK-1 y PFK-2 y la concentración de Fru-2,6-P2</u>	
Resultados.....	78
Discusión.....	85
<u>Hematíes. Presencia de Fructosa-2,6-difosfato en hematíes de rata.</u>	
Resultados y Discusión.....	90
<u>Células Y-1. Fructosa-2,6-difosfato en células de tumor adrenal Y-1. Efecto de la ACTH.</u>	
Resultados.....	96
Discusión.....	98
CONCLUSIONES.....	101
BIBLIOGRAFIA.....	104

INTRODUCCION

REGULACION DE LA GLUCOLISIS

LA FOSFOFRUCTOKINASA-1

DESCUBRIMIENTO DE LA FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO

BIOSINTESIS Y DEGRADACION DE LA FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO

REGULACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR LA FRU-2,6-P2

PAPEL DE LA FRU-2,6-P2 EN LA REGULACION DEL FLUJO
GLUCOLITICO

REGULACION DE LA GLUCOLISIS

La glucolisis constituye la primera fase de la degradación completa de la glucosa a anhídrido carbónico y agua. Además de su papel catabólico, la glucolisis también tiene una función anabólica, suministrando esqueletos carbonados para la síntesis de ácidos grasos, colesterol y aminoácidos. Su orientación metabólica depende del tipo de tejido y del estado hormonal y nutricional. Debido a esta ubicuidad no es sorprendente, por tanto, que existan complejos mecanismos para el control de la glucolisis íntimamente relacionados con los estados hormonal y nutricional.

Numerosos estudios han sido realizados para conocer los mecanismos de control de la glucolisis. Las llamadas reacciones limitantes de esta ruta metabólica han sido identificadas mediante análisis cuantitativo. Los estudios de KACSER Y BURNS (1973) y HEINRICH Y RAPOPORT (1974), que permiten calcular el grado de control a lo largo de diferentes pasos de una vía metabólica, indicaron que el control de la glucolisis se realiza fundamentalmente por la hexokinasa y la fosfofructokinasa-1 (PFK-1). Estos estudios

han sido aplicados a la glucólisis de eritrocitos (RAPAPORT, T. A. et al 1976) y levaduras (FELL, D.A. 1984) confirmando los resultados anteriores.

PAPEL DE LA FOSFOFRUCTOKINASA-1

La PFK-1 es un enzima alostérico con numerosos moduladores, circunstancia que le convierte en un óptimo candidato para la regulación por cambios en la concentración de estos metabolitos. Se han realizado numerosos estudios experimentales para conocer la regulación de la actividad PFK-1, especialmente en relación con el efecto Pasteur (para una revisión ver KREBS, 1972; RAMAIAH, 1974). El enzima hepático purificado es un tetramero con peso molecular aparente de 320.000 (MASSEY y DEAL, 1973; BRAND y SOLING, 1974; DUNAWAY y WEBER, 1974; KEMP, 1971). La curva de saturación por sustrato de la fructosa-6-fosfato presenta una cinética sigmoideal y esta alostéricamente influenciada por los efectores del enzima. El ATP, citrato, fosfoenolpiruvato y creatinfosfato son efectores negativos e incrementan la forma sigmoide de la curva. Los efectores como el AMP, fosfato inorgánico y la fructosa-1,6-difosfato, tienen un efecto opuesto e incrementan la afinidad aparente por el sustrato (para una revisión ver RAMAIAH, 1974; HOFMANN, 1976). Los cationes

monovalentes como el potasio o el amonio activan la PFK-1 y disminuyen la afinidad alostérica ejercida por el ATP (OTTO et al., 1976). Este patrón general de regulación es aplicable a la mayoría de los tejidos estudiados, sin embargo, ciertas variaciones órgano-específicas pueden ser encontradas, por ejemplo, el enzima hepático es más inhibido por el ATP y menos sensible a la activación por AMP que el muscular (KEMP, 1971; BRAD y SOLING, 1974; GONZALEZ y KEMP, 1978). El control por AMP, citrato y Fru-1,6-P2 presenta el interés añadido de su posible implicación en el control de la fructosadifosfatasa (UNDERWOOD y NEWSHOLME, 1965). El efecto inhibitorio de la Fru-1,6-P2 sobre la fructosa difosfatasa tiene probablemente poco interés fisiológico ya que requiere concentraciones de aproximadamente 0.1 mM. Por otro lado el efecto estimulador de este metabolito sobre la PFK-1 se alcanza a concentraciones micromolares (HOOD y HOLLAWAY, 1976; SOLING et al., 1977). Se ha postulado también una regulación directa de la PFK-1 por acción de la fructosadifosfatasa (UYEDA y LUBY, 1974; PROFFITT et al., 1976). Esta regulación por interacción directa entre ambas enzimas ha sido reinvestigada recientemente. Parece ser que la inhibición descrita es debida a desaparición de Fru-1,6-P2, activador de la PFK-1, promovida por la fructosadifosfatasa. Se observó que la adición de glucosa-1,6-difosfato, un análogo de la Fru-1,6-P2 que no es

degradado por la fructosadifosfatasa, prevenía dicha inhibición.

La velocidad máxima de la PFK-1 varía de acuerdo con el estado hormonal y nutricional del organismo; es aproximadamente de 0.5 micromol/min. por gr. de tejido húmedo en hígados de ratas ayunadas o diabéticas, y aproximadamente de 1.5 micromol./min. por gr. de tejido húmedo en ratas alimentadas (DUNAWAY y WEBER, 1974; SOLING y KLEINEKE, 1976). Se ha encontrado que una pequeña proteína de peso molecular aproximado de 3.500 protege la PFK-1 contra la desnaturalización e inhibe la inactivación de la misma por extractos lisosómicos (DUNAWAY y SEGAL, 1974). Su concentración en el hígado cambia de forma paralela con los niveles de PFK-1; sus niveles son muy bajos en hígados de ratas ayunadas o diabéticas, reapareciendo tras el tratamiento con glucosa e insulina (DUNAWAY y SEGAL, 1974, 1976). En un trabajo más reciente se ha sugerido que los niveles de PFK-1 hepáticos están regulados primariamente por los niveles de dicho factor estabilizante (DUNAWAY et al., 1978). Este factor es inestable en frío salvo en presencia de glucosa; su efecto sobre la cinética de la PFK-1 es similar al ejercido por el AMP (DUNAWAY y SEGAL; 1976). Es también capaz de interaccionar con la fructosadifosfatasa inhibiendo la estimulación de este enzima por el oleato (SANKARAN et al., 1975).

A partir de los trabajos de BRAND y SOLING, se concluyó que la PFK-1 hepática es un enzima que puede ser regulado por fosforilación-defosforilación (BRAND y SOLING, 1975; BRAND et al., 1976; SOLING et al, 1978). Los hallazgos de estos autores pueden resumirse en lo siguiente: una preparación de fosfofructokinasa que corresponde a la fracción proteica de un homogenado hepático que precipita a pH 5.5, puede ser completamente inactivada por la adición de magnesio y posteriormente reactivada por la adición de ATP. Los cambios de actividad se observan en el rango de la velocidad máxima. Dos formas del enzima pueden ser separadas por cromatografía en DEAE-celulosa. La forma activa es un tetrámero con un peso molecular aparente de 320.000. La forma inactiva, que no ha podido ser obtenida aislada de la activa, es un complejo con un peso molecular de 125.000. La transformación del tetrámero activo en el monómero inactivo es impedida por la Fru-1,6-P₂. La reactivación no depende de nucleótidos cíclicos y se acompaña de la incorporación de fosfato al enzima. Los experimentos de incorporación de ³²P demostraron que no existía una correlación directa entre la fosforilación y el aumento de la actividad. La actividad de la teórica fosfatasa inactivante puede ser separada de la actividad PFK-1. La actividad de la kinasa activante disminuye rápidamente durante el ayuno, incrementandose 6 horas después de la realimentación. Los hígados de animales

ayunados poseen una alta actividad fosfatasa mientras que en los animales alimentados dicha actividad es muy pequeña. La interconversión entre las formas activa e inactiva de la PFK-1 está influenciada por los niveles de glucosa extracelular. La adición de glucosa 30 mM al medio de perfusión de hígados procedentes de ratas ayunadas induce una activación de la actividad PFK-1 en pocos minutos. Este efecto ha sido atribuido por los autores citados a una rápida inactivación de la fosfatasa.

Por otro lado, MEDICINO et al. en 1978 describieron una fosforilación de la PFK-1 por la proteína kinasa hepática. La PFK-1 muscular no era, sin embargo, fosforilada. Los experimentos realizados no consiguieron demostrar ningún cambio en las propiedades cinéticas de la PFK-1.

La regulación de la actividad PFK-1 por la fructosa-2,6-difosfato (Fru-2,6-P₂) no fue descrita hasta 1980 y será resumida a continuación.

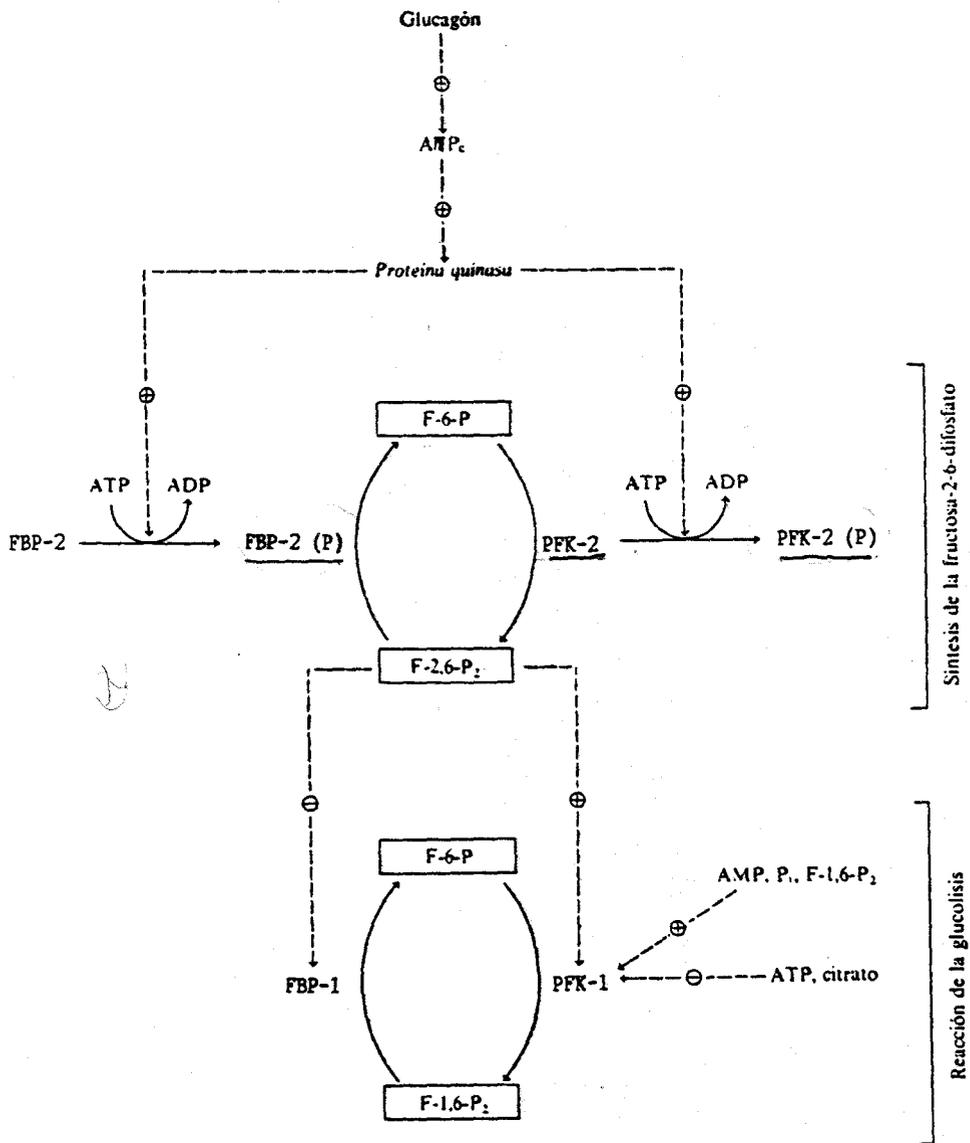
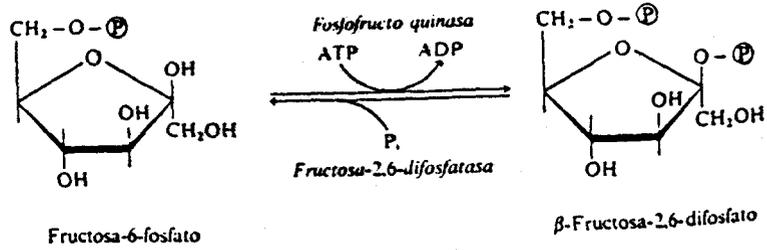
DESCUBRIMIENTO DE LA FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO

El estudio del mecanismo de acción del glucagón en la neoglucogénesis hepática condujo al descubrimiento de la fructosa-2,6-difosfato. Era bien conocido desde hace aproximadamente 30 años que el glucagón estimula la neoglucogénesis e inhibe la glucólisis en preparaciones

aisladas de hígado (SCHIMASSEK y MITZKAT, 1963) y este efecto había sido relacionado con la capacidad de esta hormona de incrementar las concentraciones de AMP cíclico (AMPC) (revisado por EXTON et al, 1970). Las medidas de las concentraciones de metabolitos intermediarios identificaron dos puntos reguladores, uno entre el piruvato y el fosfoenolpiruvato (SCHIMASSEK, 1963) y otro entre la fructosa-1,6-difosfato y la fructosa-6-fosfato (EXTON y PARK, 1969; WILLIAMSON et al., 1969).

La inactivación de la piruvatokinasa mediante la fosforilación por una proteínkinasa dependiente de AMPC ofreció una explicación para este punto regulador (revisado por ENGSTROM, 1978). Sin embargo, no se encontró una explicación satisfactoria para la regulación del ciclo fructosa-1,6-difosfato/fructosa-6-fosfato hasta 1980. Los estudios realizados posteriormente (VAN SCHAFTINGEN et al., 1980b; HUE, 1981) demostraron que el glucagón disminuía el flujo glucolítico a través de la PFK-1. En teoría, este efecto de la hormona podía ser debido a un cambio en la concentración de un efector o a una modificación covalente en el enzima. Se encontró que las concentraciones de Fru-6-P o AMP, dos efectores positivos, aumentaban, mientras que las de ATP, un inhibidor, disminuía; estos cambios sólo podían resultar en un incremento de la actividad de PFK-1.

La concentración de Fru-1,6-P₂, otro efector positivo del enzima, disminuía con el tratamiento con glucagón. Esto



podía indicar una consecuencia de la disminución del flujo a través de la PFK-1. Una modificación covalente de la PFK-1 fue seriamente considerada en 1979 cuando varios grupos de investigadores (CASTAÑO et al., 1979; CLARKE et al., 1979; KAGIMOTO y UYEDA, 1979; PILKIS et al., 1979) mostraron que la actividad de la PFK-1 era reducida en extractos de hepatocitos o de hígados que habían sido expuestos al glucagón. El cambio en las propiedades cinéticas de la PFK-1 consistía en una disminución de la afinidad por la Fru-6-P y un incremento en la inhibición por ATP.

VAN SCHAFTINGEN et al. en 1980b confirmaron la existencia de un cambio en las propiedades cinéticas de la PFK-1 inducidas por el glucagón en homogenados de hígado, pero encontraron que este cambio desaparecía si los extractos eran filtrados en Sephadex G 25 o si el enzima era purificado. La filtración a través del gel disminuía la afinidad de la PFK-1 por la Fru-6-P en los homogenados controles. Además, cuando una fracción de bajo peso molecular preparada por ultrafiltración de un extracto control de hepatocitos era combinado con el enzima filtrado en el gel, se restauraba la actividad enzimática a los niveles encontrados en los extractos no filtrados de hígado control, es decir, esta fracción estimulaba la PFK-1. Estos hallazgos permitieron concluir que el glucagón actuaba causando la desaparición de un estimulador de bajo peso

molecular de la PFK-1. La concentración de este estimulador en hepatocitos aislados de ratas en ayuno aumentaba en presencia de glucosa (VAN SCHAFTINGEN et al., 1980b).

El estimulador presentaba las siguientes propiedades: era destruido por la incubación con fosfatasa alcalina; en la filtración en gel aparecía en las mismas fracciones que la Fru-1,6-P₂; a diferencia de los nucleótidos, no era absorbido por el carbón activado; precipitaba como sal de bario en ausencia de etanol; no era transformado por la fructosa bifosfatasa-1; a diferencia de la fructosa-1,6-P₂, era rápidamente destruido por los medios ácidos incluso a baja temperatura (VAN SCHAFTINGEN et al., 1980b y 1980c). La última propiedad dió la clave para la identificación del estimulador. Cuando se incubaba en presencia de 0,01 M HCl el estimulador parcialmente purificado desaparecía con una vida media de 15 minutos, dando lugar a Fru-6-P y fosfato en una cantidad estequiométrica. Se concluyó que el estimulador consistía en una molécula de fructosa con dos fosforilaciones. Se sabía que los furanosilfosfatos eran ácidos biliares a baja temperatura (KALCKAR, 1947; KLENOW, 1953). El metabolito fructosa-2,6-bifosfato pudo ser obtenido al dejar reaccionar fructosa-6-fosfato con ácido fosfórico concentrado. Este compuesto presentaba las propiedades estimuladoras estudiadas. En principio, la cantidad del mismo sintetizada mediante este método era demasiado pequeña para la determinación de la configuración

anomérica por resonancia magnética nuclear. La síntesis de Fru-2,6-P₂ se logró mediante una modificación del método de PONTIS y FISCHER (1963); la purificación de la misma de la fructosa 1,6-P₂ se logró facilitando la destrucción de esta última por la fructosa bifosfatasa-1 o por calentamiento en presencia de alcalis. Los estudios de resonancia magnética nuclear indicaron la síntesis de este beta-anómero (HESBAIN-FRISQUE et al., 1981; PILKIS et al., 1981a; UYEDA et al., 1981b). El compuesto sintético tenía exactamente las mismas propiedades químicas y biológicas que el componente natural.

BIOSINTESIS Y DEGRADACION DE LA FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO

La presencia en el hígado de rata de un enzima que catalizaba la síntesis de Fru-2,6-P₂ a partir de Fru-6-P y ATP fue descrita simultaneamente por cuatro grupos de investigación independientes (EL-MAGHRABI et al., 1981; FURUYA y UYEDA, 1981; HUE et al., 1981a; VAN SCHAFTINGEN y HERS, 1981b). Este enzima es una 6-fosfofructo 2-kinasa (PFK-2). Su propiedad más característica es que puede ser inactivado por una proteína kinasa dependiente de AMPc (VAN SCHAFTINGEN et al., 1981b; EL-MAGHRABI et al., 1982 a,b,c; FURUYA et al., 1982a).

La hidrólisis de la Fru-2,6-P₂ a Fru-6-P y fosfato

inorganico es catalizada en el hígado por una fructosa-2,6-P₂ 2-fosfatasa (FBP-2) (VAN SCHAFTINGEN et al., 1982a; EL-MAGHRABI et al., 1982b). Al igual que la PFK-2 este enzima es controlado por fosforilación dependiente de AMPc; pero en este caso se encontró que el enzima era activado por la misma (VAN SCHAFTINGEN et al., 1982a; EL-MAGHRABI et al., 1982b,c). En el hígado, la actividad PFK-2 y FBPasa-2 es de 5-10 nmol/min/gr. a 30 °C (BARTRONS et al., 1983), aproximadamente 100 veces menor que la actividad PFK-1 o FBPasa-1. Una actividad PFK-2/FBP-2 pudo ser purificada mediante elución con fosfocelulosa (EL-MAGHRABI et al., 1982b), Fru-6-P sepharosa (SAKAKIBARA et al., 1984a) o Blue Sepharosa (VAN SCHAFTINGEN , 1985). Los autores anteriormente citados no consiguieron separar las actividades PFK-2 y FBP-2, lo que hace suponer que se trate de una sola proteína de capacidad bifuncional. El enzima purificado tiene un punto isoeléctrico de 6.6 y un peso molecular de 100 000-110 000. Esta formado por dos subunidades de peso molecular 49 000-55 000. La actividad específica del enzima purificado es del orden de 50 mU por mgr. de proteína a 25 °C para ambas actividades PFK-2/FBPasa-2. Posteriormente MURRAY et al. describieron en 1984 que un solo fosfopéptido era encontrado después de la digestión parcial del enzima, lo que hace pensar que ambas subunidades sean idénticas. Otras observaciones apoyan la tesis de que se trate de un enzima bifuncional. En primer

lugar, después de un ayuno superior a una semana, la actividad FBP-2 disminuye de igual forma que la actividad PFK-2 (HERS y VAN SCHAFTINGEN, 1984), lo que contradice la tónica general de que los enzimas neoglucogénicos aumenten con el ayuno. En segundo lugar, la activación de la FBP-2 se acompañe de la inactivación de la PFK-2. Este paralelismo ha sido observado en hepatocitos aislados después de la adición de glucagón y en extractos hepáticos incubados con AMPc y MgATP (BARTRONS et al., 1983), así como en experimentos con actividades purificadas PFK-2/FBP-2 y proteína Kinasa AMPc dependiente (MURRAY et al., 1984). A diferencia de la PFK-1, la PFK-2 hepática no es inhibida por las altas cocentraciones de ATP, para el cual muestra una cinética hiperbólica con una Km del orden de 0.2-0.4 mM (EL-MAGHRABI et al., 1981; VAN SCHAFTINGEN y HERS; 1981b; KRETSCHMER y HOFMANN, 1984; SAKAKIRABA et al. 1984). Probablemente el enzima se encuentre normalmente saturado por el ATP in vivo, excepto en condiciones de sobrecarga de fructosa (VAN DEN BERGHE et al., 1980) o anoxia (VINCENT et al., 1982; HUE, 1982).

La afinidad del enzima por la Fru-6-P y su velocidad máxima depende de la concentración de fosfato, pH y estado de fosforilación del enzima. En el caso del hígado, el fosfato disminuye la Km por la Fru-6-P y aumenta la velocidad máxima sin afectar a la Km por el ATP. La mitad del máximo efecto del fosfato es obtenido a

concentraciones del rango de 50-100 microm (VAN SCHAFTINGEN y Hers, 1981b), lo que hace pensar que probablemente este ion no tenga un importante papel regulador. En presencia de 5 mM de fosfato y a pH neutro, el enzima no fosforilado muestra una cinética hiperbólica frente a la Fru-6-P, con una Km de 50 microm (VAN SCHAFTINGEN y HERS, 1981b); VAN SCHAFTINGEN et al., 1981b; MURRAY et al., 1984). A bajas concentraciones de fosfato la curva es sigmoideal (LALOUX et al., 1985).

El efecto de la fosforilación sobre la actividad PFK-2 se relaciona con el efecto del PH del ensayo (VAN SCHAFTINGEN et al., 1981b). En presencia de 5mM de fosfato el enzima defosforilado muestra un pico de actividad a pH 6.5, diez veces superior a la del enzima fosforilado; dicho pico no aparece en el enzima fosforilado, cuya actividad máxima se presenta a pH 8 (VAN SCHAFTINGEN et al., 1981b), siendo esta igual a la del enzima no fosforilado.

La Fru-2,6-P₂ es un inhibidor no competitivo de la actividad PFK-2 hepática con respecto a la Fru-6-P y el ATP, con una Ki de de 50 microm (PILKIS et al., 1984; KITAJIMA et al., 1984; LALOUX et al., 1985). La inhibición por ADP es no competitiva con respecto a la Fru-6-P y competitiva respecto al ATP (KITAJIMA et al., 1984; KRETSCHMER y HOFMANN, 1984).

La PFK-2 hepática es inhibida por el citrato, el fosfoenolpiruvato (VAN SCHAFTINGEN y HERS, 1981b);

KRETSCHMER y HOFMANN, 1984; LALOUX et al., 1985), y el glicerol-3-P (CLAUS et al., 1982; VAN SCHAFTINGEN et al., 1984). La fosforilación aumenta la sensibilidad del enzima a la inhibición por citrato y fosfoenolpiruvato (VAN SCHAFTINGEN et al., 1981b).

A diferencia de la actividad PFK-2, la actividad FBP-2 presenta un pH óptimo de 5.5-6 (VAN SCHAFTINGEN et al., 1982a; EL-MAGHRABI et al., 1984). No existe un acuerdo general sobre la Km de la FBPasa-2 por su sustrato, la Fru-2,6-P₂. Han sido descritos valores entre los 0.1 micromM (VAN SCHAFTINGEN et al., 1982a; MURRAY et al., 1984; SAKAKIBARA et al., 1984) y los 10-100 μ M (EL-MAGHRABI et al., 1982b; FURUYA et al., 1982). La Fru-6-P es un importante inhibidor no competitivo del enzima, efecto que es parcialmente antagonizado por el glicerol-3-P, la dihidroxiacetona fosfato y el glicerol-2-P (VAN SCHAFTINGEN et al., 1982a; MURRAY et al., 1984; VAN SCHAFTINGEN et al., 1984).

La fosforilación de la FBP-2 no afecta a la Km pero incrementa la velocidad máxima 3 o 4 veces cuando el enzima es medido a pH neutro y en presencia de glicerol-2-P, glicerol-3-P o fosfato (VAN SCHAFTINGEN et al., 1982a; MURRAY et al., 1984). Aunque se ha descrito que la fosforilación no afecta a la sensibilidad a la inhibición por Fru-6-P (VAN SCHAFTINGEN et al., 1982a; MURRAY et al., 1984), otros autores indican una marcada inhibición por la

misma del enzima fosforilado (SAKAKIBARA et al., 1984a).

La velocidad máxima de la FBP-2 es incrementada por ATP, GTP e ITP (VAN SCHAFTINGEN et al., 1982a). Este efecto requiere la presencia de iones magnesio, manganeso o cobalto y es dependiente del pH y del estado de fosforilación del enzima.

REGULACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR LA FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO

Los efectos mejor caracterizados de la Fru-2,6-P₂ son los ejercidos sobre la cinética de los enzimas directamente implicados en la interconversión entre la fructosa-6-fosfato y la fructosa-2,6-difosfato, es decir, la fosfofructokinasa-1 y la fructosadifosfatasa-1.

1. 6-fosfofructo-1-kinasa

La fructosa-2,6-difosfato fue descubierta originalmente como un activador de la PFK-1 hepática. Este enzima tiene numerosos efectores; en ausencia de los mismos muestra una baja afinidad y un alto grado de cooperatividad hacia su sustrato, la fructosa-6-fosfato. La Fru-2,6-P₂ aumenta la afinidad del enzima hepático para la Fru-6-P, pero no tiene ningún efecto sobre la actividad máxima del enzima (PILKIS et al., 1982b; HERS et al., 1982; UYEDA et al., 1982). El

Ka para la Fru-2,6-P2 es aproximadamente 0,5 microm, que hace que este azúcar sea de 50 a 1000 veces más efectivo que la Fru-1,6-P2 (HERS et al., 1982; PILKIS et al., 1981), y 2500 veces más efectivo que la glucosa-1,6-P2 (HERS et al., 1982) en la estimulación del enzima. Este metabolito además libera a la PFK-1 de la inhibición por el ATP (HERS et al., 1982; UYEDA et al., 1982). También libera de la inhibición ejercida por el citrato sobre el enzima (UYEDA et al., 1981a). Otro importante efecto de este metabolito es potenciar la activación ejercida por el AMP (PILKIS et al., 1982a; VAN SCHAFTINGEN et al., 1981a; UYEDA et al., 1981a), actuando sinérgicamente con el mismo para liberar al enzima de la inhibición ejercida por las altas concentraciones de ATP (UYEDA et al., 1981a). Se ha descrito también que la Fru-2,6-P2 protege a la PFK-1 contra la inactivación por calor (UYEDA et al., 1981a), descenso del pH (SOLING et al., 1981), y la fosfofructokinasa fosfatasa (SOLING et al., 1981).

La Fru-2,6-P2 parece afectar a PFK-1 del músculo de conejo (UYEDA et al., 1981a), de los islotes del pancreas de rata (MALAISSE et al., 1981), de eritrocitos humanos (HEYLEN et al., 1982) y de riñón de cerdo (MUNYIYAPPA et al., 1983) con las mismas características observadas en los estudios de PFK-1 hepática. Este metabolito también activa la PFK-1 de tumor ascítico y de plaquetas mientras que ningún efecto fue observado por la adición de fructosa-1,6-P2 a

estos enzimas (BOSCA et al.,1982). Se ha observado que la PFK-1 de levaduras también es activada por la Fru-2,6-P2 (BARTRONS et al.,1982; NISSLER et al.,1983). Este enzima, al igual que ocurre con el enzima hepático, es activado por el AMP e inhibido por altas concentraciones de ATP. Se ha descrito que la Fru-2,6-P2 aumenta la afinidad de unión del AMP al enzima (KESSLER et al.,1982). En algunas células un grupo fosfato es transferido a la Fru-6-P en una reacción similar a la de la PFK-1, pero catalizada por la pirofosfato fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa (SABULARSE y ANDERSON, 1981). Este enzima, que fue primariamente estudiado en "mung beans", es muy dependiente en su actividad de la Fru-2,6-P2. VAN SCHAFTINGEN et al. en 1982b aislaron un enzima similar en las patatas que parece ser 10 veces más sensible que el anterior.

Como se ha descrito anteriormente, la fosforilación de la PFK-1 hepática y muscular puede ser catalizada in vitro por la adición de una proteína kinasa dependiente de AMP cíclico (PILKIS et al.,1982c). El glucagón estimula la incorporación de fosforo radiactivo en el enzima hepático in vivo (KAGIMOTO et al.,1979), así como en hepatocitos aislados (CLAUS et al.,1980) y en hígado perfundido (KAGIMOTO et al.,1980). El papel de la fosforilación se desconoce ya que no se han observado cambios cinéticos tras la misma, sin embargo, algunos autores como FURUYA y UYEDA en 1980a postularon que dicha fosforilación podía

alterar la afinidad del enzima por la Fru-2,6-P₂. Estos autores aislaron las formas del enzima de alto contenido en fosfato de las de bajo contenido y encontraron que las formas de bajo contenido presentaban una mayor afinidad por este metabolito. Es difícil realizar una clara apreciación de estos resultados si tenemos en cuenta los experimentos realizados por otros grupos de investigación; así, PILKIS et al. en 1982c mostraron que una digestión parcial con tripsina del enzima nativo provocaba una separación del punto de fosforilación, aumentando la afinidad del enzima por el sustrato y por la Fru-2,6-P₂. Sin embargo, FOE y KEMP en 1982 mostraron como la fosforilación de la PFK-1 muscular hacía que el enzima fuera más sensible a la inhibición alostérica por el ATP y el citrato, y menos sensible a la activación por AMP, glucosa-1,6-fosfato, fosfato inorganico y Fru-2,6-P₂. KEMP y colaboradores en 1981 demostraron que la fosforilación del enzima procedente del músculo esquelético se producía en el residuo serina situado a 7 residuos del extremo carboxiterminal de las subunidades, que, al igual que ocurría con el enzima hepático (PILKIS et al., 1982c), era muy sensible al ataque por tripsina. Parece probable que la fosforilación juegue algún papel en la regulación de la actividad enzimática, pero dicho papel no está claro en el momento actual. Si como se ha postulado la fosforilación del enzima inducida por el glucagón realmente disminuye la

actividad PFK-1 en el hígado, este mecanismo podría amplificar la inhibición provocada por el descenso de los niveles de Fru-2,6-P2.

2. Fructosa-1,6-difosfatasa

La fructosa-1,6-difosfatasa es un enzima de la gluconeogénesis que está regulado por su sustrato, iones metálicos y nucleótidos de adenina (TEJWANI, 1983). El enzima presenta una cinética hiperbólica con respecto a su sustrato, la fructosa-1,6-P2, pero una cinética alostérica es generalmente caracterizada debido a las curvas sigmoidales obtenidas por la inhibición por AMP (TEJWANI, 1983). Se sabe que la fructosa-2,6-P2 es un importante inhibidor de este enzima (PILKIS et al., 1981b). La inhibición ejercida por bajas concentraciones de Fru-2,6-P2 da lugar a una cinética hiperbólica con respecto al sustrato, indicando una inhibición competitiva por el centro activo (PILKIS et al., 1981b). Las concentraciones altas de Fru-2,6-P2 dan lugar a una respuesta sigmoidal a las concentraciones crecientes de sustrato (VAN SCHAFTINGEN y HERS, 1981a; PILKIS et al., 1981c). Estos resultados sugieren que la Fru-2,6-P2 puede interaccionar con el enzima en otro lugar diferente del centro catalítico (PILKIS et al., 1981c). McGrane et al. en 1983 estudiaron la unión de la Fru-2,6-P2 a la fructosa difosfatasa y encontraron que dicha unión se realizaba en una proporción

equimolar, y que cuando el centro catalítico del enzima era acetilado, este metabolito no se ligaba al enzima. Sin embargo, cuando el centro activo era protegido contra la acetilación mediante la presencia de fructosa 1,6-difosfato, la Fru-2,6-P2 era capaz de ligarse al enzima. Estos autores encontraron que la unión al enzima de la Fru-2,6-P2 competía con la adición de metilfructofuranósido-1,6-P2, analogo de la Fru-1,6-P2. En conclusión, la Fru-2,6-P2 se liga sólo al centro catalítico, lo que ha sido confirmado por otros autores (GOTTSCHALK et al., 1982; PONTREMOLI et al., 1982; GANSON et al., 1982).

La Fru-2,6-P2 también potencia la inhibición de la fructosa 1,6-difosfatasa por el AMP (PILKIS et al., 1981b y c). Diversos estudios han demostrado que este efecto es debido a la capacidad de la Fru-2,6-P2 de aumentar la afinidad del enzima por el AMP. Los resultados de PILKIS et al. en 1981c sugieren que la unión de la Fru-2,6-P2 al centro activo puede inducir un cambio conformacional en el enzima similar al inducido por la unión del AMP con el centro alostérico. Los resultados obtenidos con resonancia magnética nuclear indican que el centro catalítico y el centro alostérico para el AMP están muy próximos (BENKOVIC y DEMAINE, 1982).

La fructosa-1,6-difosfatasa, como ocurría con la PFK-1, puede presentarse como enzima fosforilado. La fosforilación del enzima in vitro puede ser catalizada por una

proteínkinasa dependiente de CAMP (RIOU et al., 1977; EKMAN y DAHLQVIST-EDBERG, 1981). La fosforilación in vivo (RIOU et al., 1977) y en hepatocitos aislados es estimulada por el glucagón (CLAUS et al., 1981). El efecto de la fosforilación sobre la actividad del enzima no está bien definido. RIOU et al. en 1977 encontraron muy pequeños cambios en la actividad, mientras que EKMAN y DAHLQVIST-EDBERG describieron un descenso de la $K_{0.5}$ para la Fru-1,6-P2 del 50%. MORIKOFER-ZWEZ et al. en 1981 describieron que la inyección de glucagón a ratas provocaba un aumento de dos veces de la K_i . Sin embargo, la actividad difosfatasa era medida en homogenados, y es posible que esta k_i aparente para la Fru-2,6-P2 estuviera incrementada debido a un aumento de la actividad fructosa-2,6-difosfatasa por acción del glucagón, con la consiguiente hidrólisis de Fru-2,6-P2.

En la actualidad, se conoce la secuencia de aminoácidos del punto de fosforilación de la fructosa-1,6-difosfatasa (PILKIS et al., 1980). Este se encuentra localizado cerca del extremo carboxiterminal de la subunidad enzimática. HOSEY y MARCUS en 1981 indicaron que de las difosfatasas hepáticas estudiadas por su grupo, sólo la procedente del hígado de rata presentaba un punto de fosforilación cerca del extremo carboxiterminal. Por tanto, la regulación por fosforilación de la actividad fructosa-1,6-difosfatasa, al igual que ocurre con la actividad PFK-1, es objeto de

debate en la actualidad. Se sabe, sin embargo, que la fructosa-1,6-difosfatasa de Saccharomyces cerevisiae (GANCEDO et al., 1983; POHLIG et al., 1983) y de Kluyveromyces fragilis (TOYODA y SY, 1984) puede ser fosforilada por una proteína kinasa y que la Fru-2,6-P₂ acelera este proceso. Este hecho podría explicar la observación de que la inactivación de fructosa-1,6-difosfatasa sea deficiente en mutantes con déficit de glucosafosfato isomerasa, pero no en mutantes con déficit de PFK-1 (CIRIACY y BREITENBACH, 1979; GANCEDO y GANCEDO, 1979). La inactivación por fosforilación se acompaña además de un descenso de la sensibilidad del enzima a la Fru-2,6-P₂ (GANCEDO et al., 1982). La fosforilación no afecta a la cinética del enzima del K. fragilis mientras que en el S. cerevisiae provoca un descenso del 50% en la velocidad máxima cuando esta es medida en presencia de magnesio. Por otro lado, se sabe que la fosforilación es responsable de la inactivación del enzima cuando se añade glucosa o dinitrofenol a suspensiones de levaduras (LENZ y HOLZER, 1980; MULLER y HOLZER, 1981; MAZON et al., 1982). Estas sustancias provocan un incremento del AMP cíclico intracelular en el S. cerevisiae (VAN DEER PLAAT y VAN SOLINGEN, 1974; MAZON et al., 1982; PURWIN et al., 1982). La inactivación causada por la glucosa se alcanza en una hora y se acompaña de la desaparición de enzima inmunoreactivo, lo que se interpreta

como la ruptura del mismo (FUNAYAMA et al., 1980).

3. Otros enzimas

Ha sido descrito que la fructosa-2,6-P2 activa la L-piruvatokinasa de forma menos efectiva que la fructosa-1,6-P2 (SOLING et al., 1981). Sin embargo, otros autores (PILKIS et al., 1982b; HERS y VAN SCHAFTINGEN, 1982) no han logrado reproducir estos resultados. HERS y VAN SCHAFTINGEN describieron además que la Fru-2,6-P2 no tiene efecto sobre la fosforilasa del glucógeno, la fosforilasa-fosfatasa, la fosfatasa de la sintasa del glucógeno, la glucokinasa, la glucosa-6-fosfatasa, la fosfoenolpiruvato-carboxikinasa o la acetil-CoA carboxilasa. GIBSON y SHINE en 1983 encontraron que la UDP-glucosa fosforilasa de la patata era estimulada por concentraciones micromolares de la Fru-2,6-P2, sugiriendo que otras rutas, además de la glucólisis y la gluconeogénesis, podrían ser reguladas por este metabolito.

PAPEL DE LA FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO EN LA REGULACION DEL FLUJO GLUCOLITICO HEPATICO

Para estudiar la interrelación entre la Fru-2,6-P2 y el flujo glucolítico hepático, podemos considerar tres estados



metabólicos: estado gluconeogénico, estado glucolítico y estado de máxima glucolisis.

El estado gluconeogénico es el que encontramos en las situaciones de ayuno, diabetes y tratamiento con glucagón (HERS y HUE, 1983; HUE, 1981). En esta situación la concentración de Fru-2,6-P₂ hepática es muy baja. Este hecho puede ser explicado por la inactivación de la PFK-2 y la activación de la FBP-2 como resultado de la fosforilación del enzima por una proteína kinasa dependiente de AMP cíclico (BARTRONS et al., 1983). Otros agentes que actúan a través del AMP cíclico pueden tener el mismo efecto. La caída de la concentración de Fru-2,6-P₂ conduce a la inhibición de la actividad PFK-1, y como el glucagón provoca también la inactivación de la piruvatokinasa (FELIU et al., 1976), el flujo glucolítico es bloqueado a ambos niveles (HERS y HUE, 1983; HUE, 1981). Sin embargo, cuando el glucagón es administrado a animales alimentados, la glucolisis es inhibida pero no completamente bloqueada (VAN SCHAFTINGEN et al., 1980a; VAN SCHAFTINGEN et al., 1980b; HUE, 1981). Esto es explicado por el hecho de que el glucagón estimula la ruptura del glucógeno, produciendo un incremento masivo de la concentración de hexosa-6-fosfato, que antagonizaría el efecto del glucagón sobre la PFK-2/FBPasa-2 (HUE y HERS, 1974).

Una disminución en la concentración de Fru-2,6-P₂ parece ser requerida para la activación de la gluconeogénesis por

el glucagón a partir de sustratos que entran en la misma a nivel de las triosas fosfato. Por el contrario, con sustratos que entran a nivel del piruvato, la inactivación de la piruvatokinasasa por el glucagón parece ser el punto regulador más importante (HUE y BARTRONS, 1984). Esta última conclusión ha sido posteriormente confirmada por GROEN et al. en el año 1984. Una disminución en la concentración de FRu-2,6-P₂ ha sido también encontrada en hepatocitos incubados con adenosina (BARTRONS et al., 1984), etanol (VAN SCHAFTINGEN et al., 1984) y una larga serie de precursores gluconeogénicos como lactato, piruvato, alanina o fructosa (HUE y BARTRONS, 1984; HUE et al., 1982). El mecanismo responsable del descenso de este metabolito en estas condiciones implicaría cambios en la PFK-2/FBPasa-2 inducidos por las variaciones en la concentración de diversos metabolitos. Así, el fosfoenolpiruvato, citrato y el glicerol-3-fosfato han sido estudiados al respecto, ya que se demostró que provocaban la inhibición de la actividad PFK-2 por fosforilación dependiente de AMP cíclico (VAN SCHAFTINGEN et al., 1986; VAN SCHAFTINGEN et al., 1984).

Por el contrario, en el estado anabólico, es decir, cuando unas altas cocentraciones de glucosa son alcanzadas en el medio, el hígado toma glucosa que es en parte empleada en la síntesis de glucagón, mientras que el resto es transformada en lactato y ácidos grasos. La estimulación

de la glucólisis por la glucosa puede ser explicada por el aumento de la Fru-2,6-P₂ inducida por la misma (VAN SCHAFTINGEN et al., 1980b; HUE et al., 1981). Parece ser que la sensibilidad a la glucosa de la glucólisis y la síntesis de glucógeno hepáticas son diferentes. En animales ayunados, la activación de la síntesis de glucógeno requiere una menor concentración de glucosa que la activación de la glucólisis. La situación opuesta es observada en animales alimentados. (HUE et al., 1984). La explicación propuesta por estos autores es que en el ayuno los depósitos de glucógeno son previamente restaurados (a partir de glucosa y de precursores gluconeogénicos), y sólo cuando esto sucede la gluconeogénesis es inhibida y la glucólisis activada.

Esta claro que cuando se realiza una carga de glucosa se observa un incremento en la concentración hepática de Fru-2,6-P₂ en animales normales. Sin embargo, unos niveles altos de fructosa bífostato pueden ser incluso encontrados durante el ayuno en ratas y ratones genéticamente predispuestos a la obesidad (HUE et al., 1982; CLAUS et al., 1982; HUE et al., 1983).

Los estudios realizados con hepatocitos aislados de ratas control han demostrado que la relación entre los niveles de Fru-2,6-P₂ y la producción de lactato se mantiene sólo cuando los primeros son altos (aproximadamente 5 nmol/gr.) (HUE et al., 1984). Esta falta

de correlación no esta totalmente explicada aunque se ha postulado que pudiera deberse a la activación del ciclo PFK-1/FBPasa-1 (VAN SCHAFTINGEN et al., 1980b) o la unión del metabolito a proteínas (HUE et al., 1984).

Por otro lado, un incremento en los niveles de Fru-2,6-P2 ha sido también observado en hepatocitos aislados incubados con bajas concentraciones de precursores gluconeogénicos como la fructosa, hidroxiacetona, lactato o piruvato (HUE et al., 1984). Por otro lado, la incubación de hepatocitos de ratas alimentadas con vasopresina y otros agonistas alfa-adrenérgicos parece ser que aumentan la concentración de Fru-2,6-P2 (HUE et al., 1981a y b). Según estos autores dicho incremento estaría producido por una ruptura del glucógeno por un mecanismo independiente del AMPc, que conduce a el aumento de Fru-6-P. Ya que la vasopresina tiene un pequeño efecto sobre la piruvatokinasasa (HUE et al., 1978; CHAN et al., 1978; CLAUS et al., 1979), mientras que provoca un estímulo de la piruvato Dehidrogenasa (HEMS et al., 1978; SIES et al., 1983), el incremento en la producción de lactato es menor que el esperado.

Por último, en las situaciones de anoxia, en la que encontramos una maxima glucolisis, la concentración de Fru-2,6-P2 permanece descendida, siendo por tanto no responsable del incremento en el flujo glucolítico (MINATOGAWA y HUE, 1984; HUE et al., 1982).

PAPEL DE LA FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO EN LA REGULACION DEL
FLUJO GLUCOLITICO EN TEJIDOS EXTRAHEPATICOS

La Fructosa-2,6-P₂ ha sido detectada en todos los tejidos de mamíferos, incluidos los eritrocitos (SOBRINO et al.,1987) que habían sido descartados en estudios previos (HEYLEN et al.,1982).

Se ha considerado que la Fru-2,6-P₂ es un importante regulador de la glucolisis cuando esta presenta un papel anabólico, ya que este metabolito es capaz de liberar a la PFK-1 de la inhibición ejercida por los altos niveles de ATP presentes en estas circunstancias. Esta hipótesis se ha comprobado en la glándula mamaria de rata, en la que la Fru-2,6-P₂ aumenta tres veces durante la lactación (SOCHOR et al.,1984). También se ha encontrado que en el tejido adiposo blanco, la insulina, que se sabe incrementa la glucolisis y la lipogénesis, provoca un aumento de la Fru-2,6-P₂ (SOBRINO y GUALBERTO; 1985), aunque otros autores han descrito un descenso en similares circunstancias (RIDER y HUE,1985). Se sabe que hormonas como la insulina y la adrenalina provocan un incremento en la concentración de Fru-2,6-P₂ y en el flujo glucolítico en el músculo esquelético y en el corazón (BOSCA et al.,1985; HUE et al.,1982; RIDER y HUE, 1984; RIDER y HUE, 1986a y b). Existen discrepancias en cuanto a la regulación de la Fru-2,6-P₂ por agentes adrenérgicos en el tejido adiposo

blanco; mientras que SOBRINO y GUALBERTO en 1985 han descrito que la adrenalina provoca un descenso de la concentración de Fru-2,6-P₂ en tejido adiposo epididimario, otros autores no han encontrado efecto o un pequeño descenso (RIDER y HUE, 1985) en preparaciones de adipocitos aislados.

En todos los tejidos estudiados, la concentración de Fru-2,6-P₂ depende del control de la PFK-2/FBPasa-2. La regulación de esta enzima por proteína kinasas dependientes de AMPc parece ser característica del hígado ya que difícilmente explicaría los resultados obtenidos en músculo y corazón por efecto de la adrenalina (HUE et al., 1982; NARABAYASHI et al., 1985). Estos autores han propuesto que el incremento en la concentración de azúcar difosfato se debe a la estimulación de la ruptura del glucógeno y aumento secundario de Fru-6-P. En el caso de la insulina se ha encontrado que provoca un aumento de la velocidad máxima de la PFK-2 (RIDER y HUE, 1984). Dicha activación persiste después de la purificación parcial del enzima, lo que hace pensar en la posibilidad de una modificación covalente.

En tejidos como el cerebro, los eritrocitos, espermatozoides o el músculo en tetania, la glucólisis es la principal fuente de energía (KREBS, 1972). En los eritrocitos (SOBRINO et al., 1987), espermatozoides (PHILIPPE et al., 1986) y músculo en tetania (MINATOGAWA et al., 1984), la Fru-2,6-P₂ no parece estar implicada en el

control de la glucolisis ya que se concentración es muy baja o no esta relacionada con los cambios en el flujo glucolítico. En el cerebro se ha descrito que en condiciones de ayuno la concentración de la misma permanece constante (VAN SCHAFTINGEN, 1987).

LA FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO EN CELULAS PROLIFERANTES

A diferencia de otras células, las células con capacidad de proliferación se caracterizan por presentar una alta glucolisis en condiciones de aerobiosis (WEINHOUSE, 1976). El mecanismo bioquímico de este fenómeno no ha sido aún completamente explicado. En parte se ha atribuido a cambios en la actividades enzimáticas y en el transporte de hexosas (WEBER, 1976; EIGENBRODT, 1985). Estudios realizados en líneas celulares parecen implicar a la Fru-2,6-P₂ en el mantenimiento de altas tasas de flujo glucolítico en células proliferantes. Así, su concentración esta aumentada en células del adenocarcinoma hepático (DENIS et al., 1986) en relación con células hepáticas controles. Por el contrario, en células de carcinoma hepatocelular su concentración es similar a la de células control (LOISEAU et al., 1985), sin embargo se ha descrito que PFK-2 en estas células tiene características especiales (HUE Y RIDER, 1987).

Cuando cultivos de fibroblastos son estimulados con

altas concentraciones de insulina, factores de crecimiento o ésteres de phorbol se encuentra una activación de la PFK-2, aumento de la concentración de Fru-2,6-P₂, incremento del transporte de glucosa y del flujo glucolítico (DIAMOND et al., 1978; SCHNEIDER et al., 1978; BRUNI et al., 1983; FARNARARO et al., 1984). Cambios similares se producen cuando los fibroblastos son transformados por retrovirus que poseen los oncogenes v-src o v-fps pero no con los oncogenes v-mil o v-myc (BOSCA et al., 1986). Los cambios inducidos en la concentración de Fru-2,6-P₂ por el virus del Sarcoma de Rous que porta el oncogen v-src parece ser que dependen de una actividad tirosina Kinasa producto del oncogen.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En este trabajo experimental se proyectó investigar el papel regulador de la fructosa-2,6-difosfato sobre el metabolismo de los hidratos de carbono en diferentes tejidos extrahepáticos. Han sido estudiados los tejidos adiposos blanco y marrón, el corazón, los eritrocitos y las células tumorales suprarrenales Y-1. Estos tejidos han sido tomados en condiciones control y/o sometidos a diferentes estados metabólicos.

En el tejido adiposo blanco se proyectó comprobar el efecto del estado alimentario y diversas hormonas y metabolitos. Las hormonas estudiadas fueron la insulina y la adrenalina.

En el tejido adiposo marrón se verificó la regulación de la Fru-2,6-P₂ por la aclimatación al frío.

En el corazón se estudió el efecto del hipotiroidismo experimental sobre la actividades PFK-1, -2 y la concentración de Fru-2,6-P₂.

En eritrocitos se proyectó verificar la presencia de Fru-2,6-P₂ y su regulación por el pH extracelular.

Por último, se describe el efecto de la ACTH sobre la producción de Fru-2,6-P₂ en células Y-1.

a) Tejido adiposo blanco

Esta bien establecido que la adrenalina y la insulina incrementan el flujo glucolítico y la captación de glucosa en el tejido adiposo blanco (FLATT y BALL, 1964; HALPERIN y DENTON, 1969). Existen, sin embargo, algunas diferencias en las concentraciones de varios metabolitos intermediarios tras el tratamiento con estas hormonas. Así, en presencia de insulina, la concentración de hexosas fosfato y fructosa-1,6-P2 aumenta, mientras que la concentración de ATP y AMP no es alterada. Por el contrario, la adrenalina no modifica la concentración de los ésteres citados mientras que la concentración de ATP está disminuida (HALPERIN y DENTON, 1969; SAGGERSON y GREENBAUN, 1970). De acuerdo con esto se ha sugerido que el papel activador de la glucolisis ejercido por la adrenalina se realizaría a través de la estimulación de la PFK-1. De hecho, un aumento de la actividad PFK-1 ha sido observado por HALPERIN y DENTON, 1969. Por otro lado, la Fru-2,6-P2, el más potente activador de la PFK-1 (VAN SCHAFTINGEN et al., 1980b), ha sido descrita en el tejido adiposo blanco (HUE et al., 1982), aunque también se ha descrito que la actividad PFK-1 en el tejido adiposo blanco es activada por el AMPc (DENTON y RANDLE, 1966).

Entre los metabolitos que podrían modificar la regulación de la fructosa-2,6-difosfato en el tejido adiposo blanco, se estudió el efecto del dicloroacetato y la fenazina

metosulfato. Ambos compuestos estimulan la oxidación de glucosa en tejidos periféricos a través de mecanismos diferentes. Así, se ha descrito que el dicloroacetato activa la piruvato dehidrogenasa kinasa, incrementando la proporción de piruvato kinasa en su forma activa (WHITEHOUSE y RANDLE, 1973). Este efecto ha sido verificado en el tejido adiposo epididimario (WHITEHOUSE et al., 1974). El tratamiento de ratas con DCA provoca también un aumento en la actividad de la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa hepática (ANDERSON et al., 1975). La fenazina metosulfato promueve la liberación de piruvato en trozos de tejido adiposo blanco in vitro (SAGGERSON y GREENBAUM, 1970), y estimula la oxidación de las pentosas fosfato en el tejido adiposo, incrementando la actividad de algunas enzimas de este ciclo (McLEAN, 1960; GREENBAUM et al., 1971).

b) Tejido adiposo marrón

La aclimatación al frío esta claramente relacionada con un incremento en la cantidad de tejido adiposo marrón y de su contenido en mitocondrias (NICHOLS y LOCKE, 1984; THOMSON et al., 1969; CANNOM y NEDERGAAR, 1985). Por otro lado, se ha descrito que el tejido adiposo marrón juega un importante papel en control de la concentración de glucosa después de una sobrecarga de carbohidratos, especialmente en ratas aclimatadas al frío (COONEY y NEWSHOLME, 1982;

MCCORMACK y DENTON, 1977). Este hecho está relacionado con el descubrimiento de que las actividades hexokinasa y PFK-1 están incrementadas en el tejido adiposo marrón durante la aclimatación al frío (COONEY y NEWSHOLME, 1982). Ya que las hormonas tiroideas han sido relacionadas con la termogénesis (MULLER y SEITZ, 1984), se pensó que sería interesante comprobar si existe relación entre el estado tiroideo y la regulación del metabolismo de la glucosa durante la adaptación al frío.

c) Tejido muscular cardíaco

La mayoría de los estudios sobre el efecto de las hormonas tiroideas en el metabolismo de los carbohidratos han sido realizados en el hígado. Se ha descrito que el hipotiroidismo da lugar a una disminución en la glucólisis (BARGONI et al., 1966); así como que las actividades hepáticas piruvato kinasa (BOTTGGER et al., 1970) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (NOVELLO et al., 1969) están disminuidas tras la tiroidectomía. En el estudio realizado se planteó investigar si el hipotiroidismo provocaba cambios en las actividades PFK-1 y PFK-2.

d) Hematías

La Fru-2,6-P₂ no había sido descrita con anterioridad en los eritrocitos. En el estudio realizado se planteó investigar si ello es debido a un déficit de actividad PFK-

2 o a defectos de la técnica de medición.

e) Células Y-1

Se sabe que la glucolisis esta aumentada en las celulas tumorales (WARBUR, 1956) y que se ha descrito que la Fru-2,6-P2 esta incrementada en dichas células en comparación con las normales (HUE y RIDER, 1987; DENIS et al., 1986). Las celulas Y-1, son una línea celular de tumor adrenal que han sido empleadas frecuentemente en estudios sobre el control de la síntesis de hormonas corticosteroides (SCHIMMER, 1980) por acción de la ACTH. Estas células poseen una adenil ciclasa sensible a la ACTH (SCHIMER, 1972). En este sentido, es poco lo que se ha investigado en relación con la regulación de glucolisis durante este proceso. Al plantear este trabajo experimental se proyectó estudiar si la ACTH, inductor de la secreción de esteroides, provocaba cambios en la Fru-2,6-P2 y la glucolisis en estas células.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar macho en todos los experimentos.

En los experimentos de ayuno-realimentación, las ratas eran sometidas a un periodo de ayuno de 4 días y posteriormente alimentadas durante 2 a 5 días. Durante la realimentación el agua de beber contenía un 10% de glucosa.

En los experimentos con animales hipotiroideos, se indujo un hipotiroidismo experimental mediante la adición de Perclorato sódico al 1% en el agua de beber durante diferentes periodos hasta un máximo de 45 días.

En los experimentos con animales hipertiroideos se añadió 1 mgr./ml de tiroxina en el agua de beber durante 7 o 13 días.

En los experimentos de adaptación al frío, las ratas se mantuvieron en una cámara a 4 °C durante 13 días.

En el resto de los experimentos los animales se mantuvieron a temperatura ambiente y con agua y dieta estandar ad libitum.

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, excepto en los experimentos en los que se

obtuvieron eritrocitos mediante succión de la sangre aórtica o ventricular de animales anestesiados con Nembutal intraperitoneal (60 mgr/kgr).

CELULAS: INCUBACIONES Y METODOLOGIA

Tejido adiposo blanco: El tejido adiposo epididimario (100-150 mg) fue extraído rápidamente, cortado en pequeños trozos de 20-40 mg, y distribuido en viales de incubación. El tejido fue preincubado durante 15 minutos a 37 °C en una solución Krebs-Ringer bicarbonato a pH 7.4 con un 2% (p/v) de albúmina sérica bovina; posteriormente fue incubado en 3 ml de sol. fresca con las adiciones indicadas para cada experimento durante 20 minutos. Después de las incubaciones, cuando se realizaban mediciones de Fru-2,6-P₂, las células fueron inmediatamente homogenizadas en un Potter-Elvehjem con un ml de NaOH 100 mM calentado previamente y el homogenado fue mantenido 5 minutos a 80 °C. fracción grasa fue separada mediante centrifugación a 10.000 x g durante 5 min. y la fracción acuosa fue neutralizada con ácido acético a pH 8-8.5 para la posterior medida de Fru-2,6-P₂. Para la medida de otros metabolitos el tejido epididimario fue homogenizado en 1.5 ml de ácido perclórico 0.6 N. La solución era neutralizada con Bicarbonato potasico/ KOH/ Hepes (3 M/ 3 M/ 50 mM) y posteriormente se centrifugaba, descartándose el

precipitado.

Células musculares cardíacas: Para la medición de las actividades enzimáticas y metabolitos, los corazones eran rápidamente extraídos y congelados en nitrógeno líquido mediante pinzas de Wollenberger (Wollenberger et al., 1960). Para el estudio del efecto de la triyodotironina, los corazones de ratas hipotiroideas (Tiroxina en sangre menor de 0.2 microgr./ml.), eran cortados en trozos de aprox. 50 mg., repartidos en viales de incubación e incubados en 5 ml. de solución Krebs-Ringer tamponada con trietanolamina 50 mM pH 7.8 durante 5 horas a 37 °C mas las adiciones correspondientes. Tras la incubación el tejido fue rápidamente congelado por el procedimiento ya citado.

Eritrocitos: Las células fueron centrifugadas durante 5 minutos en una centrífuga de mesa. El plasma y la capa superior de leucocitos fue eliminado. Los eritrocitos eran lavados tres veces en una solución que contenía 50 mM glicilclicina/ 30 mM Cloruro sódico/ 5 mM de cloruro potasico/ 10 mM fosfato sódico/ 1 mM cloruro calcico/ 1 mM cloruro magnésico, a pH 6.9, 7.4 o 8.2 según el experimento realizado. Posteriormente las células eran resuspendidas en 4 volúmenes de mismo medio e incubadas a 37 °C y con las adiciones indicadas en cada caso. Al final de la incubación las células eran obtenidas por

centrifugación y lisadas mediante la adición de igual volumen de 15 mM TrisHCl pH 9.1/ 10 mM hidróxido sódico/ 20 mM fluoruro potasico/ 0.3 % (p/v) deoxicolato sódico a 0 °C. El lisado fue congelado a -20 °C, descongelado y centrifugado a 10.000 x g durante 15 minutos. posteriormente se tomaba 1 ml del sobrenadante y se filtraba a través de una columna (1.5 x 17 cm) de Sephadex G-25 fine equilibrada con 20mM trisHCl pH 9.1. Fracciones de 1 ml eran recogidas después del pico de la hemoglobina para la medición de Fru-2,6-P2 y 2,3-Difosfoglicerato. Para la medición de otros metabolitos las células eran deproteinizadas con acido perclórico 1 M y tratadas como se indica en la sección tejido adiposo blanco.

Tejido adiposo marrón: Para la medición de actividades enzimáticas y metabolitos el tejido era aislado de la zona interescapular y congelado en nitrógeno líquido por la técnica ya citada.

Células Y-1: Las células Y-1 eran cultivadas en Minimum Essential Medium suplementado con 2 mM de glutamina y 5% de suero fetal bovino. Las células crecieron en una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO₂ formando una monocapa en los botes de cultivo. El medio era renovado cada 3 días. Cuando las incubaciones iban a ser realizadas, el medio de cultivo era eliminado y las células lavadas tres veces con la

siguiente solución tampón: 126 mM cloruro sódico/ 3.8 mM cloruro potásico/ 14 mM bicarbonato sódico/ 0.9 mM fosfato disódico/ 0.6 mM fosfato potásico/ 0.6 mM sulfato magnésico/ 2.5 mM cloruro cálcico/ 20 mM Hepes pH 7.2. Las células eran preincubadas durante una hora en esta solución que posteriormente se sustituía por sol. fresca con las correspondientes adiciones. Al final de la incubación el medio era recogido y deproteinizado con 0.6 N de ácido perclórico. La capa celular era separada de la superficie plástica mediante lavado con una solución tripsina-EDTA. La suspensión de células era centrifugada en una microfuga durante 30 segundos y el precipitado era resuspendido en el medio apropiado en cada caso o congelado.

METABOLITOS

La medida de la Fru-2,6-P₂ se realizó mediante el método de VAN SCHAFTINGEN (VAN SCHAFTINGEN et al., 1982b) por activación de la fructosa-6-P 1-fosfotransferasa (Ver introducción). Básicamente este método consistió en la cuantificación de la producción de fructosa-1,6-fosfato por la P_{Pi}-PFK mediante las siguientes reacciones acopladas:

1. Fru-6-P + ATP ---► Fru-1,6-P₂
2. Fru-1,6-P₂ ---► Gli-3-P + DHAP
3. DHAP ---► Gli-3-P

4. Gli-3-P + NADH+H ---- Glicerol-3-P + NAD

siendo la reacción 1. catalizada por la PPI-PFK, la reacción 2. por la triosa isomerasa y las reacciones 3. y 4. por la aldolasa y la glicerol-3-fosfato dehidrogenasa respectivamente. La mezcla de reacción contenía 50 mM de Tris/HCl, pH 8, 5 mM de cloruro magnésico, 0.15 mM de NADH, 1 mM de Fru-6-P, 0.5 mM de pirofosfato, 0.5 mgr./ml. de aldolasa, 0.1 mgr./ml. de triosa isomerasa, 0.1 mgr./ml. de glicerol-3-fosfato dehidrogenasa y 5-30 μ l. de PPI-PFK preparada según el método descrito en la sección Enzimas. En las mediciones de Fru-2,3-P₂ se introdujeron estandar internos para detectar la posible presencia de inhibidores de la PPI-PFK.

El 2,3-difosfoglicerato fue medido como en VERDIER y ERICSON, 1984. El método consiste en el acoplamiento de las siguientes reacciones:

1. 2,3 DPG + H₂O ---► glicerato-3-P + fosfato
2. Glicerato-3-P + ATP ---► 1,3 DPG + ADP
3. 1,3 DPG + NADH+H ---► Gli-3-P + NAD + fosfato
4. Gli-3-P ---► DHAP
5. DHAP + NADH+H ---► Glicerol-3-P + NAD

Estas reacciones son catalizadas respectivamente por la fosfoglucomutasa, la fosfoglicerato Kinasa, la gliceraldehido-3-P Dhasa, la triosafosfato isomerasa y la glicerol-3-P Dhasa. La mezcla de reacción empleada fue: trietanolamina 50 mM pH 7.6, EDTA 5 mM, NADH+H 0.25 mM,

ATP 1 mM, Mercaptoetanol 0.25 mM, 2-P-Glicolato 1 mM, fosfoglucomutasa 20 mgr./ml., fosfoglicerato Kinasa 20 mgr./ml., gliceraldehido-3-P Dhasa 20 mgr./ml., triosafosfato isomerasa 20 mgr./ml. y glicerol-3-P Dhasa. Los cambios de extinción fueron medidos en un espectrofotómetro U.V. a 340 nm.

Las hexosas fosfato y el ATP eran medidos en los extractos perclóricos neutralizados según la técnica empleada en LOWRY Y PASSONNEAU, 1972. Los extractos perclóricos neutralizados se añadieron a un medio que contenía Tris ClH 12 mM pH 8.1, NADP 0.1 mM pH 6.5 en tampón fosfato 5 mM, Acetato de magnesio 5 mM, KCl 100 mM y Glucosa 10 mM. En pasos sucesivos se añadió 1 mg/ml de glucosa-6-P Dhasa, 1 mgr./ml de fosfoglucoisomerasa y la misma cantidad de hexokinasa. La medida se basa en las siguientes reacciones:

1. Glu-6-P + NADP ---► 6-P-Gluconolactona + NADPH
2. Fru-6-P ---► Glu-6-P
3. Glucosa + ATP ---► Glu-6-P

Los cambios en la concentración de NADP fueron medidos por fluorimetría con unas longitudes de onda de excitación y de emisión de 365 y 460 nm respectivamente. El glicerol fue medido como en (GARLAND y RANDLE, 1962). El método se basa en el acoplamiento de las siguientes reacciones:

1. Glicerol + ATP ---► Glicerol-1-P + ADP

2. PEP + ADP ---► Piruvato + ATP

3. Piruvato + NADH+H ---► lactato + NAD

El medio de reacción empleado fue: Trietanolamina HCl 100 mM pH 7.6, sulfato magnésico 6 mM, cloruro potásico 2 mM, fosfoenolpiruvato (PEP) 1 mM, ATP 2 mM, NADH+H 0.5 mM, piruvato Kinasa 10 mgr./ml., lactato deshidrogenasa 5 mgr./ml. y glicero Kinasa 1 mgr./ml. La concentración de glicerol en el medio fue proporcional a los cambios de extinción del NADH medidos a 366 nm.

Los ácidos grasos libres fueron medidos como en (Dumcombe, 1964). El método consiste en separar los ácidos grasos libres de las proteínas a las cuales pueden estar unidos mediante una mezcla heptano-cloroformo. En una segunda fase los ácidos grasos liberados reaccionan con cobre divalente, formandose un complejo que es quelado por la bathocuproína dando un color amarillo. La medida de la extinción de esta solución coloreada es cuantificada a 460 nm.

El DNA fue medido mediante el método de KINASE Y ROBINS, 1958. La extracción de las muestras de DNA se realizó mediante tratamiento sucesivo del tejido cardíaco con HCl 10 N, ácido tricloroacético 5 %, éter etílico 90 %, etanol 98 % y liofilización. Los aldehidos del tipo R-CH₂-CHO (desoxiribosa) dan lugar a compuestos fluorescentes cuando reaccionan con el ácido D-aminobutírico en un medio HCl 4 N. La medida de la fluorescencia se realizó a unas longitudes de onda de excitación y de emisión de 410 y 520

nm respectivamente. Los valores encontrados en el músculo cardíaco fueron 1.82 ± 0.18 y 1.91 ± 0.11 mg/gr tejido en ratas control e hipotiroideas respectivamente.

Las proteínas fueron medidas por el método de LOWRY et al., 1951, usando albúmina bovina sérica como standard. El método se basa en la reacción de las proteínas con el medio Folin-Ciocalteu para dar un complejo coloreado. Este color se forma por la formación de complejos entre el cobre alcalino y las proteínas y la reducción del fosfomolibdato por tirisina y triptófano. La formación de estos complejos se determinó por espectrometría a 750 nm.

Las medidas de la concentración de tiroxina en sangre fueron realizadas por la profesora P. Molinero, Dpto. Bioquímica Médica, Universidad de Sevilla. Para ello se empleó un kit de Diagnostic Products Co., Los Angeles, CA, USA.

ACTIVIDADES ENZIMATICAS

La actividad PFK-1 fue medida mediante el método descrito por RIDER y HUE, 1985, por espectrofotometría a 340 nm y 25 °C, excepto que los tejidos fueron homogenizados en 50 volúmenes/peso del tejido de 50 mM Hepes/ 100 mM Cloruro pot sico/ 50 mM fluoruro sódico, pH 7.4 a 0 °C. La mezcla de reacción fue: Hepes 50 mM pH 7.0 o 7.8, KCl 100 mM, cloruro magnésico 5 mM, cloruro amónico

1 mM, NADH+H 0.25 mM, aldolasa 5 mgr./ml., triosa isomerasa 2.5 mgr./ml., glicerol-3-P Dhasa 2.5 mgr./ml. y fructosa-6-P, AMP, fosfato, ATP y fructosa-2,6-P₂ según se indica en cada caso. En algunos experimentos la medida de la actividad PFK-1 fue realizada en condiciones óptimas, es decir, en presencia de 5 mM fosfato potásico/ 5 mM fructosa-6-P/ 1.5 mM ATP/ 1.25 mM AMP, a pH 7.8. Para los estudios cinéticos, el ensayo se realizó en condiciones subóptimas, 2.5 mM de ATP a pH 7.0, más los sustratos indicados en cada apartado. La actividad PFK-1 fue expresada en micromol de Fru-1,6-P₂ formados por min y por mgr de proteínas o DNA.

Para estudiar el efecto de la Fru-2,6-P₂ sobre cinética de la PFK-1, se purificó parcialmente dicho enzima a partir de extractos cardíacos. Dicha purificación se realizó mediante precipitación y tratamiento con calor por el método descrito previamente por MANSOUR et al., 1966 y TAURI et al., 1972. Brevemente, corazones de cinco ratas eran cortados en pequeños trozos y homogenizados en 4 volúmenes (v/p) de 50 mM Hepes/ 100 mM fluoruro sódico/ 15 mM EGTA, a pH 7.4 a 0 °C. El homogenado era centrifugado a 24 000 x g durante 15 minutos. Se añadió una solución de sulfato amónico saturado al sobrenadante, bajo agitación continua, hasta alcanzar una concentración del 42 %. Se centrifugó nuevamente a 24 000 x g durante 15 minutos. El precipitado fue descartado. Al nuevo sobrenadante se le añadió una solución de sulfato amónico saturado hasta

alcanzar una concentración del 60 %. Después de otra centrifugación a la misma velocidad, el sobrenadante era eliminado y el precipitado era disuelto en un volumen mínimo de mezcla de homogenización suplementada con 5 mM Mercaptoetanol y ajustado a pH 8 a 0 °C. El extracto era calentado a 48 °C bajo agitación continua durante 15 minutos y posteriormente centrifugado a 24 000 x g 15 minutos. El sobrenadante era empleado para los ensayos de actividad PFK-1.

La actividad PFK-2 fue medida según el método descrito por RIDER y HUE, 1984. El tejido era homogenizado a 4 °C en 5 volúmenes de 20 mM Hepes, 30 mM de KCl, 20 mM de NaF, 5 mM de EDTA y 1 mM de ditioneol, pH 7.5. Después de centrifugar a 40.000 x g durante 20 minutos se descartaba el precipitado y el sobrenadante se empleaba para medir la actividad PFK-2 (estabilizada con un 20% de glicerol) o para realizar una purificación parcial de la actividad PFK-2 mediante precipitación con polietilenglicol. Esta se realizaba mezclando el 1 vol. del sobrenadante anterior con 1 vol. de solución al 40% de polietilenglicol (6000) en el medio de homogenización. La mezcla era agitada durante 1-4 horas y posteriormente se obtenía un precipitado mediante una centrifugación de 2 minutos en una microfuga Eppendorf. La purificación de PFK-2 de eritrocitos se realizó como sigue: 30 ml de eritrocitos eran lavados en 150 mM de cloruro sódico y lisados mediante la adición de igual

volumen de agua, seguida de la adición de 4 volúmenes de solución 20 mM Hepes/ 50 mM cloruro potásico/ 2 mM EDTA/ 5 mM cloruro magnésico/ 5 mM fosfato potásico/ 15 mM 2-mercaptoetanol/ 0.1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride, pH 7.5. Después de centrifugar 15 min. a 10 000 x g, se tomó el sobrenadante y se agitó durante 2 horas a 4 °C con 30 ml. de Affi-Gel Blue equilibrado con el buffer anteriormente citado. El gel fue lavado en un filtro Büchner hasta que la densidad óptica a 280 nm del filtrado descendió a cero y colocado en una columna de 2.5 cm x 6 cm. La actividad PFK-2 fue eluida a 0.25 M mediante un gradiente de 0.05-0.5 de KCl.

La actividad PFK-2 fue analizada a 30 °C en un vol. final de 0.2 ml que contenía 50 mM Hepes, 100 mM de KCl, 20 mM de NaF, 5 mM de fosfato potásico, 1 mM de ditioeritritol, pH 7.1 y las concentraciones de Fru-6-P y MgATP indicadas en cada caso. A los 10-20 min. la reacción era detenida por la adición de 0.2 ml. de 50 mM de NaOH. La mezcla de reacción era calentada a 80 °C durante 10 min. y la Fru-2,6-P₂ producida era medida por el método ya indicado. La actividad se expresó como pmoles de Fru-2,6-P₂ formados por minuto y por mgr. de proteína o de ADN.

Para la purificación de la fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa se empleaba el método descrito por VAN SCHAFTINGEN et al., 1982b. Se tomaban unos 250-500 grs. de patatas peladas y se homogenizaban en 2 vol. de 20 mM de

Hepes, 20 mM de acetato potásico, 2 mM de ditiotritol, pH 8.2 a 4 °C. El homogenado era filtrado mediante una gasa y se llevaba a pH 8.2. Se añadía pirofosfato sódico y cloruro de magnesio hasta alcanzar una concentración de 2 mM en cada caso. Se elevaba la temperatura de la mezcla a 59 °C, manteniéndose la misma durante 5-10 min. posteriormente se enfriaba y se ajustaba el pH a 7.1. los siguientes pasos se realizaban a 4 °C. Se añadía 6 gr/100ml de polietilenglicol (6000) ; Se agitaba durante 15-30 min y se centrifugaba a 400 x g durante 10 min. Al sobrenadante se añadían 8 gr/100 ml de polietilenglicol (6000) y se repetía el procedimiento anterior, centrifugando en este caso a 4000 x g. El precipitado obtenido era resuspendido en un vol. mínimo de 20 mM Tris HCL, 20 mM KCl , 2 mM de ditiotritol, pH 8.2. La actividad PPI-PFK de la mezcla era empleada para la cuantificación de la Fru-2,6-P2. Antes de ser empleada la mezcla era centrifugada en una microfuga Eppendorf, descartándose el precipitado.

Para las mediciones de piruvato-kinasa, el tejido adiposo marrón o el músculo cardíaco fueron homogenizados en 5 ml de una solución que contenía 100 mM de cloruro potásico y 50 mM de buffer Gly-Gly, pH 7.4. Los homogenados fueron centrifugados a 15.000 x g durante 30 minutos. Se eliminó la presencia de pequeñas moléculas pasando el sobrenadante a través de una columna de Sephadex G-25 (fine). Las alícuotas fueron ensayadas para averiguar la

actividad piruvato-kinasa según el método empleado en FELIU et al., 1976. Básicamente el método consiste en acoplar las reacciones catalizadas por la piruvato kinasa y la lactato dehidrogenasa gracias al piruvato producido por la primera que actúa con el NADH+H como sustrato de la segunda. Se midió el cambio de extinción a 340 nm de una mezcla de reacción que contenía: Gly-Gly 50 mM pH 7.4, KCl 150 mM, cloruro magnésico 50 mM, NADH+H 0.2 mM, ADP 0.13 mM, PEP 0.1-5 mM y lactato dehidrogenasa 10 mgr./ml.

La actividad lactico-deshidrogenasa fue analizada como en SAGGERSON, 1974. Se midió el cambio de absorbancia a 340 nm de una solución que contenía piruvato 5 mM y 0.2 mM de NADH+H.

MATERIALES

Todos los reactivos y enzimas purificados, a excepción de los citados a continuación, fueron de grado analítico y obtenidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A. y Boehringer G.m.b.H., Mannheim, Germany.

El dicloroacetato fue obtenido de Ega-Chemie (West Germany).

La insulina (Actrapid) fue obtenida de Novo Laboratories. La tiroxina fue donada por los laboratorios Leo (España). La triyodotironina procedió de un kit de Diagnostic Products Co. (Los Angeles, CA, U.S.A.)

Minimum Essential Medium y la solución tripsina-EDTA fueron obtenidos de Microbiological Associated.

La Fru-2,6-P2 fue donada por Los doctores E. V. Schaftingen y H.G. Hers (Université Catholique de Lovain, Brussels, Belgium).

FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO EN EL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO:

1. REGULACION HORMONAL DE LOS NIVELES DE FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO POR INSULINA Y ADRENALINA. PAPEL DEL OCTANOICO.
2. REGULACION DE LOS NIVELES DE FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO POR DICLOROACETATO Y FENACINA MESOSULFATO.

Nuestros estudios sobre el papel regulador de la Fru-2,6-P2 en el tejido adiposo blanco se han centrado en la regulación hormonal por adrenalina e insulina y en el efecto sobre los niveles de este metabolito del ácido octanoico, dicloroacetato y la fenacina metosulfato.

1. REGULACION HORMONAL DE LOS NIVELES DE FRU-2,6-P2 EN EL TEJIDO ADIPOSEO EPIDIDIMARIO DE RATA POR INSULINA Y ADRENALINA. PAPEL DEL ACIDO OCTANOICO.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra como la Fru-2,6-P2 esta incrementada en el tejido adiposo blanco epididimario de ratas alimentadas que han sido sometidas previamente a un periodo de ayuno. El valor de 0.1 nmol/gr. de tejido encontrado en ratas alimentadas coincide con datos que han sido previamente indicados en la literatura (HUE et al., 1982). Ya que es bien conocido que el tejido adiposo tiende a acumular glucógeno durante la alimentación después de un periodo de ayuno (TUERKISCHER y WERTHEIMER, 1946), es posible que el incremento encontrado en la Fru-2,6-P2 sea

TABLA 1

Efecto del estado alimentario sobre los niveles de Fru-2,6-P2 en el tejido adiposo blanco epididimario.

Estado Alimentario		Fru-2,6-P2 nmol/gr.tej.
Alimentado	(6)	0.140±0.009
ayuno (4 días)	(1)	0.062
Realimentado	(3)	0.820±0.03
(2 días)		
Realimentado	(3)	1.120±0.01
(3 días)		
Realimentado	(3)	0.620±0.05
(5 días)		

Entre paréntesis se indica el número de observaciones. Cada observación corresponde a un pool de trozos de tejido adiposo epididimario procedente de 5 ratas .

debido a su formación a apartir de Glu-6-P originada en la degradación espontanea del glucógeno.

La figura 1 muestra como la exposición de trozos de tejido adiposo blanco a adrenalina provoca una clara disminución en la concentración de Fru-2,6-P₂. Este efecto ha sido encontrado tanto en animales alimentados como en los alimentados tras un periodo de ayuno. En la primera condición (con un bajo contenido de glucógeno), la mitad de la máxima inhibición fue encontrada a una concentración de 0.5 microM de adrenalina. Esta figura indica también la relación inversa observada entre la disminución de la Fru-2,6-P₂ y la aparición de glicerol y acidos grasos libres en el medio, lo que sugiere que la misma molécula o moléculas regulan ambos procesos, es decir, el metabolismo de la Fru-2,6-P₂ y la lipólisis.

Por el contrario, la insulina presentó un efecto estimulante sobre la síntesis de Fru-2,6-P₂ (figura 2). Los experimentos ilustrados en esta figura, fueron realizados con trozos de tejido adiposo de ratas alimentadas y preincubadas con 10 mM de glucosa durante 20 minutos antes de la adición de insulina. Estas condiciones fueron seleccionadas para estudiar el efecto de la insulina ya que cuando los trozos de tejido eran preincubados sin glucosa o provenían de ratas alimentadas tras ayuno se obtenían datos irregulares. La concentración de glucosa a la cual se obtuvo una máxima respuesta en la síntesis de

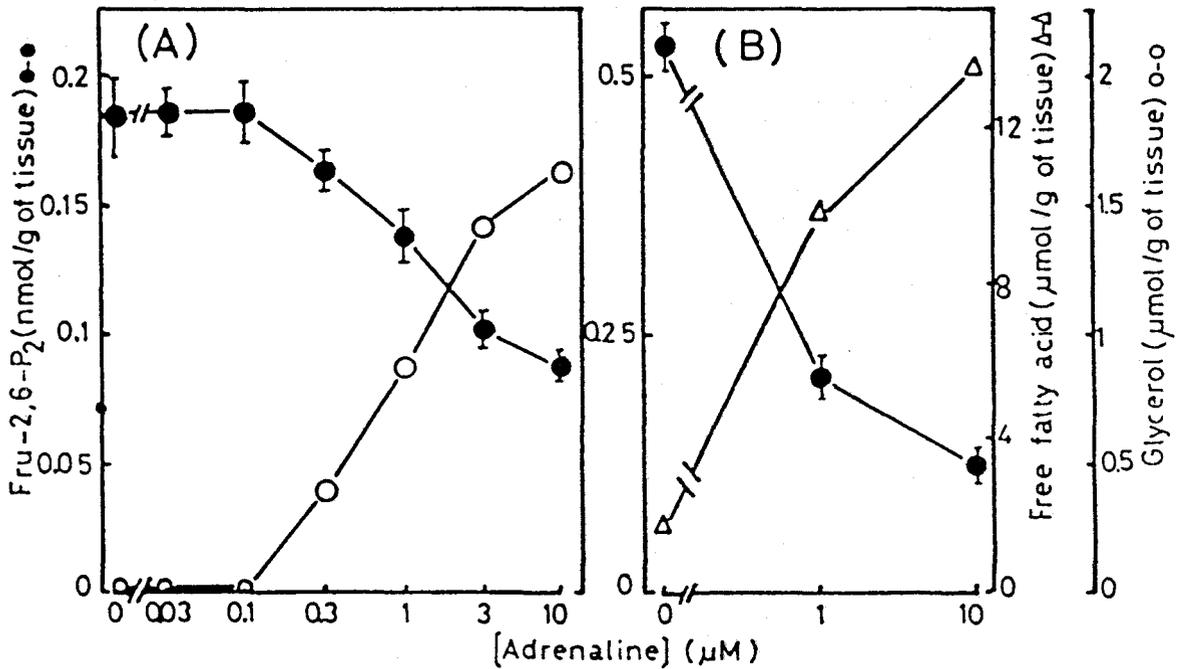


Figura 1. Efecto de la dosis de adrenalina sobre los niveles intracelulares de Fru-2,6-P₂ (●) y la liberación al medio de glicerol (○) (A) o ácidos grasos libres (Δ) (B). En (A) las ratas fueron alimentadas de forma estándar mientras que en (B) se les sometió a un tratamiento de ayuno-realimentación. Los trozos de tejido adiposo fueron preincubados sin adiciones durante 20 minutos y posteriormente incubados con glucosa 25 mM y adrenalina durante 20 minutos. Los puntos de la grafica representan el valor medio \pm error estándar de tres observaciones por triplicado.

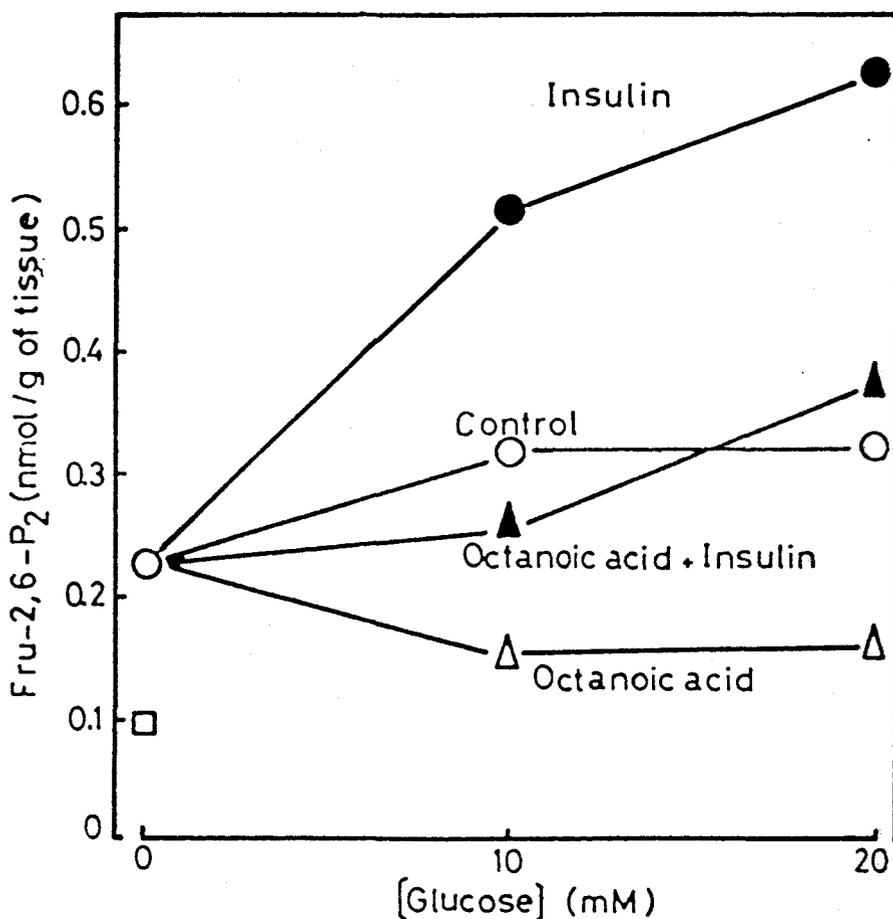


Figura 2. Efecto de la glucosa, insulina y ácido octanoico sobre los niveles intracelulares de Fru-2,6-P₂. Trozos de tejido adiposo blanco procedente de ratas normalmente alimentadas fueron preincubados con glucosa 10 mM durante 20 min y posteriormente incubados con glucosa 10 mM y 40 mU/ml de insulina o 2 mM de ácido octanoico durante 20 minutos. El contenido de Fru-2,6-P₂ en células preincubadas sin glucosa es indicado por (□). Los puntos indican el valor medio ± error estándar de un experimento por triplicado.

Fru-2,6-P2 fue variable en varios experimentos, pero un efecto activador era ya obtenido claramente con una concentración de 5 mM de glucosa. Tanto la insulina como la glucosa aumentaban rápidamente los niveles de Fru-2,6-P2 en 5-10 minutos tras la administración, manteniéndose constantes durante 20-30 minutos. Un pequeño descenso fue observado en periodos más largos.

Recientemente ha sido publicado que el ácido oleico estimula la actividad PFK-1 en extractos de adipocitos (LEDERER y HERS, 1984). La figura 2 muestra el efecto del ácido octanoico sobre los niveles de Fru-2,6-P2 en trozos de tejido adiposo blanco epididimario incubados. Claramente el ácido octanoico disminuye la síntesis de este metabolito, tanto en presencia de insulina o con glucosa en el medio de incubación. Resultados similares fueron encontrados con el ácido palmítico.

Para comprender el mecanismo responsable de las variaciones observadas en la concentración de Fru-2,6-P2, varios metabolitos de la glucólisis fueron medidos en trozos de tejido adiposo preincubados con 10 mM de glucosa y posteriormente incubados con adrenalina, insulina y ácido octanoico. Los resultados obtenidos son presentados en la tabla 2. Los niveles de ATP eran disminuidos en presencia de adrenalina, pero no fueron modificados por la adición de insulina. El contenido de hexosas-6-fosfato fue claramente incrementado por la insulina, mientras que no se



TABLA 2

Efecto de la adrenalina, insulina y ácido octanoico sobre la concentraciones de glucosa-6-P, Fru-6-P y ATP en trozos de tejido adiposo epididimario incubados

	Glu-6-P	Fru-6-P	ATP
	nmol/gr.tej.húmedo		
Control	7.31±0.75	2.52±0.31	165.5±9.1
Adrenalina	5.49±0.49	1.40±0.47	104.0±12.3 *a
Insulina	17.90±2.05 **a	5.97±0.86 *a	173.0±6.2
Insulina y octanoico	16.20±1.03	3.05±0.30	112.0±7.90 *b

encontraron cambios en las incubaciones realizadas en presencia de adrenalina. El ácido octanoico disminuyó los niveles de ATP inducidos por la insulina. Estos resultados están claramente de acuerdo con lo previamente encontrado por otros autores (HALPERIN y DENTON, 1969; SAGGERSON y GREENBAUN, 1970).

En experimentos realizados en condiciones similares la liberación de lactato al medio de incubación fue claramente aumentada al doble por la adición de insulina: valores de 1.12 micromol/gr. de tejido en condiciones control y de 2.32 micromol/gr. de tejido en la incubación con insulina. En las incubaciones en presencia de adrenalina, un incremento de tres veces fue observado en la producción de lactato.

DISCUSION

El incremento de los niveles de Fru-2,6-P₂ en los trozos de tejido adiposo epididimario incubados por la insulina y el descenso en los mismos por acción de la adrenalina está de acuerdo con la hipótesis sugerida de que diferentes mecanismos explican la estimulación de la glucólisis por ambas hormonas en el tejido adiposo (HALPERIN y DENTON, 1969). Se ha propuesto la hipótesis de que en el hígado el papel regulador de la Fru-2,6-P₂ está limitado a

condiciones pletóricas, es decir, con altos niveles de ATP. En esta situación, la Fru-2,6-P₂ liberaría a la PFK-1 de la inhibición ejercida por los altos niveles de ATP. Por el contrario, cuando el contenido en ATP es bajo, el papel regulador no sería ejercido por este metabolito, sino por otros como el AMP, el fosfato inorgánico o el AMP cíclico (HUE, 1982).

Los resultados presentados indican que este doble mecanismo de control de la glucólisis es también aplicable al tejido adiposo. De hecho, en presencia de insulina son encontrados altos niveles de ATP y Fru-6-P, precursores de la síntesis de Fru-2,6-P₂. Sin embargo, después de la adición de adrenalina la situación opuesta es observada. Tal disminución inducida por la adrenalina podría estar correlacionada con los cambios de los metabolitos intermediarios indicados en la hipótesis de HUE antes citada. Sin embargo, LEDERER y HERS, 1984 no han observado cambios en los niveles de Fru-2,6-P₂ después de la adición de noradrenalina a incubaciones de adipocitos.

Por otro lado, los bajos niveles de Fru-2,6-P₂ encontrados en presencia de ácido octanoico podrían ser interpretados por la acción desacoplante de los ácidos grasos (PRESSMAN y LARDY, 1956) y por la disminución en la concentración de Fru-6-P (SAGGERSON y GREENBAUN, 1970). Estos datos podrían sugerir que el efecto depresor de la adrenalina sobre la concentración de Fru-2,6-P₂ no sólo es

debido a un aumento del AMP cíclico, que disminuye la concentración de Fru-2,6-P₂ (VAN SCHAFTINGEN et al., 1981a), sino también a la probable acción de los ácidos grasos liberados por la lipólisis inducida por la misma.

El efecto de la adrenalina sobre los niveles de Fru-2,6-P₂ podría ser mediado también por otros metabolitos. Así, el contenido en glicerol-3-P es aumentado tras la adición de adrenalina (HALPERIN y DENTON, 1969). Se sabe que este metabolito estimula la fructosa-2,6-difosfatasa (VAN SCHAFTINGEN et al., 1982a); por tanto, bajos niveles de Fru-2,6-P₂ podrían ser predecidos en incubaciones con adrenalina. Sin embargo, en el caso de la insulina, el papel del glicerol-3-P no parece ser tan importante, ya que la insulina incrementa tanto los niveles de glicerol-3-P (HALPERIN y DENTON, 1969) y Fru-2,6-P₂.

En resumen, mientras que el papel estimulador de la glucólisis ejercido por la insulina en el tejido adiposo podría ser explicado por el incremento en la concentración de Fru-2,6-P₂, el mecanismo de estimulación de la glucólisis por la adrenalina no parece estar relacionado con este metabolito.

2. REGULACION DE LA FRU-2,6-P2 POR DICLOROACETATO, FENACINA METOSULFATO Y OTROS METABOLITOS EN EL TEJIDO ADIPOSEO EPIDIDIMARIO DE RATA.

RESULTADOS Y DISCUSION

El efecto del dicloroacetato (DCA) y la fenacina metosulfato (PMS) sobre la concentración de Fru-2,6-P2 en trozos de tejido adiposo epididimario de ratas alimentadas y realimentadas tras una fase de ayuno es indicado en la tabla 3. En el tejido adiposo de las ratas realimentadas tanto el DCA como el PMS producían un significativo incremento en la concentración de Fru-2,6-P2. El incremento obtenido fue de un 64% para el DCA y de un 80% para el PMS en relación con sus respectivos valores controles. En ratas alimentadas este efecto era menos aparente. La incubación de trozos de tejido adiposo con adenosina provocó un incremento en la concentración de Fru-2,6-P2, incremento que fue aumentado por la adición de PMS. Tal y como se indicó anteriormente, la insulina incrementa los niveles de Fru-2,6-P2 en el tejido adiposo; en experimentos realizados se encontró que este efecto no era potenciado por el DCA o el PMS.

Estos datos presentados añaden nuevas evidencias para interpretar la estimulación por DCA y PMS del metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo previamente encontrada

TABLA 3: Efecto del dicloroacetato y la fenacina metosulfato sobre la concentración de Fru-2,6-P2 en tejido adiposo epididimario de ratas alimentadas y realimentadas tras un periodo de ayuno.

Estado Nutricional	Adiciones	Fru-2,6-P2 nmol/gr	Cambio (%)
Alimentadas	Controles	0.28 ± 0.02	100
	DCA	0.34 ± 0.08	124
	PMS	0.33 ± 0.08	120
Ayuno 3 días y realimentación 2 días	Controles	0.53 ± 0.01	100
	PMS	0.96 ± 0.10 *	180
	Adenosina	0.70 ± 0.05 *	100
	PMS + Aden.	0.94 ± 0.09	134
Ayuno 4 días y realimentación 2 días	Controles	1.03±0.05	100
	DCA	1.69±0.06 *	164

Los trozos de tejido adiposo fueron incubados con 20 mM de glucosa 20 minutos en todas las condiciones. Las concentraciones de DCA, PMS y adenosina fueron 5 mM, 50 uM y 100 uM respectivamente. Los resultados estan expresados en valor medio ± desviación típica estandard de tres observaciones diferentes realizadas por duplicado. * indica P < 0.01 en diferencias pareadas respecto control.

por SAGGERSON y GREENBAUN, 1970 y STACPOOLE y FELTS, 1970. En el caso del DCA podría también sugerirse una explicación parcial para la disminución de la gluconeogénesis observada en el hígado (STACPOOLE, 1977) debido al efecto inhibitor de la Fru-2,6-P₂ sobre la fructosa-1,6-difosfatasa (VAN SCHAFTINGEN y HERS, 1981a).

También ha sido estudiado el efecto de varios precursores neoglucogénicos sobre la concentración de Fru-2,6-P₂. Estos resultados se muestran en la tabla 4. La incubación de trozos de tejido adiposo epididimario con dibutiril cAMP, piruvato y lactato causó un descenso en la concentración de este metabolito. El descenso de la Fru-2,6-P₂ inducido por el cAMP ha sido bien establecido en los hepatocitos (HERS y VAN SCHAFTINGEN, 1982), pero ningún resultado había sido publicado en tejidos extrahepáticos. La inhibición ejercida por el piruvato y el lactato está de acuerdo con resultados previos encontrados en hepatocitos (HUE et al., 1982). Se ha encontrado también que la manosa disminuye la síntesis de Fru-2,6-P₂ dependiente de glucosa, lo cual podría ser debido a un efecto competitivo de la manosa por el transportador de glucosa. La incubación de tejido adiposo con fluorocitrato, acetato, clofibrato y etilmalimida no provocó cambios en la concentración de Fru-2,6-P₂.

TABLA 4

Contenido de Fructosa-2,6-P2 en trozos de tejido adiposo blanco epididimario de ratas alimentadas incubados con diversos sustratos.

Expto. no.	Adiciones	Fru-2,6-P2 nmol/gr.	Cambio (%)
1	Control	0.535 ± 0.01	100
	10 mM piruvato	0.435 ± 0.02 *	81
	10 mM Lactato	0.310 ± 0.03 *	58
2	Control	0.311 ± 0.01	100
	10 mM manosa	0.190 ± 0.03 *	61
	0.1 mM dibutiril cAMP	0.204 ± 0.01 *	65
3	Control	0.276 ± 0.02	100
	5 mM fluorocitrato	0.275 ± 0.03	99
	5 mM acetato	0.250 ± 0.03	90
	1 mg/ml clofibrato	0.241 ± 0.02	87
4	Control	0.342 ± 0.02	100
	30 mM etilmaleimida	0.380 ± 0.02	113

(Para otros detalles experimentales ver tabla 3)

FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO EN EL TEJIDO ADIPOSO MARRON DE RATA.
EFECTO DE LA ACLIMATACION AL FRIO.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Metabolismo de la glucosa durante la adaptación al frío en el tejido adiposo marrón de rata.

Los niveles de Fru-2,6-P2 y las actividades PFK-2 y piruvato kinasa en el tejido adiposo marrón se indican en la tabla 5. Cuando se mantenían las ratas a 4 °C durante 13 días, el tejido adiposo de estas doblaba la concentración de Fru-2,6-P2 y la actividad PFK-2. Ya que este metabolito es considerado (ver introducción) como regulador de la glucolisis, su incremento durante la adaptación al frío debe hacernos pensar en un incremento en el flujo a través de la PFK-1. Este hecho es reforzado por el incremento encontrado en la actividad piruvato kinasa (tabla 5) . Un incremento en estas condiciones de la hexokinasa y la PFK-1 ha sido ya previamente descrito por COONEY y NEWSHOLME en 1982. Este incremento de la Fru-2,6-P2 podría aumentar la velocidad del ciclo Fru-6-P/Fru-1,6-P2, con la consiguiente producción de calor, tal y como es conocido en el músculo (CHALLIS et al., 1985). La cantidad de Fru-2,6-P2 es similar a la encontrada en el tejido adiposo blanco (0.32 pmol/gr. tejido húmedo)

TABLA 5

Efecto de la exposición al frío y del tratamiento con tiroxina sobre los niveles de Fru-2,6-P2 y pirivatokinasa en el tejido adiposo marrón.

Ratas	Fru-2,6-P2 nmol/gr. tej.	PFK-2 microU/ U LDH	PK U/U LDH
Control (6)	0.33 ± 0.05	1.37 ± 0.05	7.00 ± 1.00
Expuestas Frío (8)	0.74 ± 0.05	2.86 ± 0.16	29.49 ± 1.20
Frío y tiroxina (5)	1.32 ± 0.12	4.08 ± 0.18	43.97 ± 2.20

El tejido adiposo marrón fue homogenizado y tratado tal y como se explica en la sección Material y Métodos. Los valores expresados indican el valor medio +/- el error standard. El número de ratas empladas es indicado entre paréntesis.

(SOBRINO y GUALBERTO, 1985). Los resultados expuestos indican el aumento en la capacidad para oxidar la glucosa en estas condiciones y sugieren la aparición en este estado un incremento en la síntesis de los enzimas implicados. La tabla 5 muestra también el efecto de la tiroxina sobre los parámetros indicados. El estado hipertiroideo esta asociado con una clara estimulación de la actividad PFK-2, piruvato kinasa y de la concentración de Fru-2,6-P₂. Estos datos pueden ser de interés en relación con el incremento observado en el metabolismo oxidativo tras la administración de tiroxina (PALACIOS-ROMERO y MOWBRAY, 1979; CRESPO-ARMAS y MOWBRAY, 1987).

2. Parametros cinéticos de la PFK-2 del tejido adiposo marrón.

La adaptación al frío produce un aumento en la actividad maxima de la PFK-2 y en la concentración de Fru-2,6-P₂. Las características cinéticas de la PFK-2 han sido también estudiadas es este apartado. La figura 3 muestra la dependencia de la actividad PFK-2 de la concentración de Fru-6-P. El efecto de la adaptación al frío se encontró a nivel de la velocidad máxima, mientras que ningún cambio se verificó en la Km aparente del enzima. Ya que el enzima fue estudiado tras la purificación parcial con polietilenglicol, no parece probable que dicho incremento encontrado en la Vmax sea debido a la presencia o ausencia

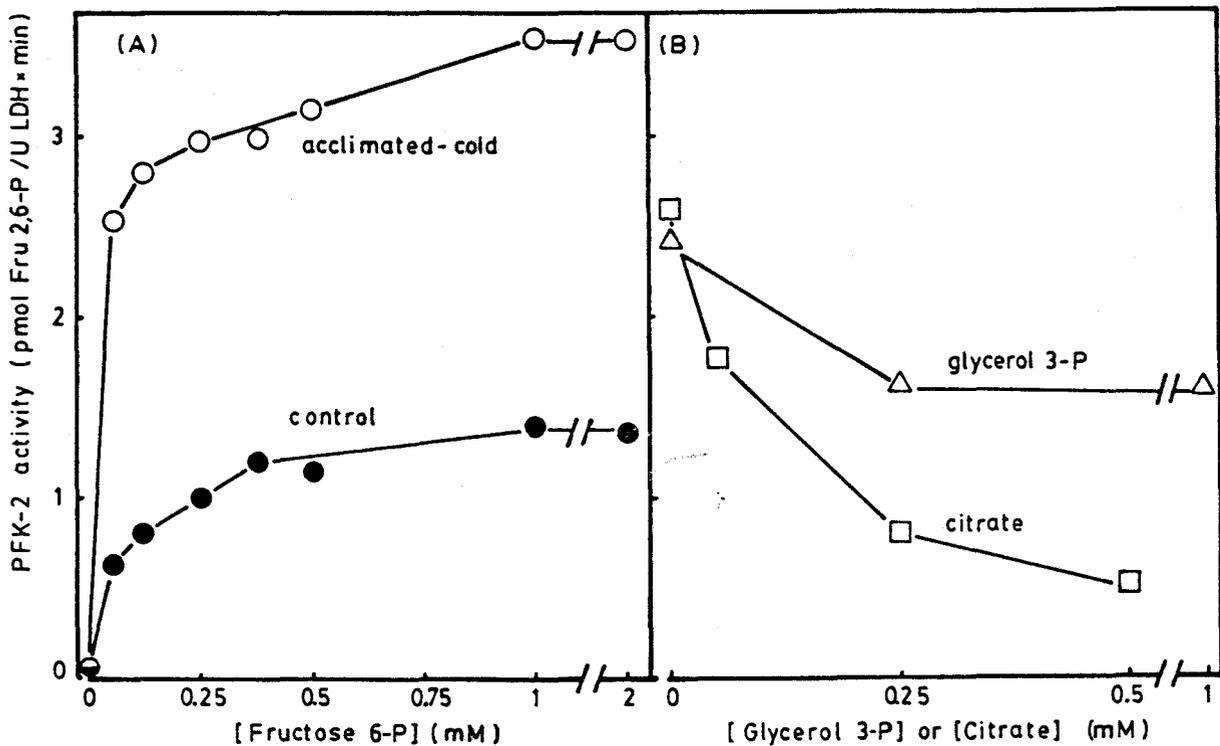


Figura 3. Afinidad de la PFK-2 por la Fru-2,6-P₂ (A) y efecto del glicerol y el citrato sobre la actividad PFK-2 (B) en tejido adiposo marrón. El enzima fue parcialmente purificado de ratas controles (●) o aclimatadas al frío (○, △, □). Las concentraciones de Fru-6-P y ATP en (B) fueron respectivamente 0.1 y 0.5 mM.

de efectores. Recientemente se ha postulado la existencia de varios isoenzimas de la PFK-2 (RIDER et al., 1985). La figura 3B muestra como la actividad PFK-2 encontrada en el tejido adiposo marrón es inhibida por bajas concentraciones de citrato. Por el contrario, dicha actividad ligeramente inhibida por el glicerol-3-P, lo que hace pensar en las características descritas por RIDER et al, 1985 para el isoenzima cardíaco.

3. Efecto del estado tiroideo sobre La actividad piruvato kinasa en el tejido adiposo marrón y en el corazón..

Es un hecho comunmente aceptado que las hormonas tiroideas inducen una estimulación de la utilización de glucosa en el músculo y en el tejido adiposo (CZECH et al., 1980). GUALBERTO et al. describieron en 1987 que en el músculo cardíaco el hipotiroidismo provocaba un descenso en las actividades PFK-1 y PFK-2, mientras que un hipertiroidismo de corta duración (7 días) no producía cambios en dichas actividades. La tabla 6 muestra el efecto de los estados tiroideos sobre la actividad piruvato kinasa en el tejido adiposo marrón y el músculo cardíaco. En el tejido adiposo marrón el hipotiroidismo no produjo ningún efecto respecto al control, mientras que el tratamiento con tiroxina aumentó la actividad piruvato kinasa. Estos resultados se corresponden con los observados en la tabla 5 en ratas adaptadas al frío. Una situación diferente

TABLA 6

Efecto del estado tiroideo sobre la actividad piruvatokinasa en tejido adiposo marrón y en músculo cardíaco.

Ratas	Actividad Piruvatokinasa mU/mgr. de proteínas	
	Tej. Adiposo Marrón	Músculo Cardíaco
Eutiroideas (6)	64.6 ± 3.4	650 ± 15
Hipotiroideas (7)	73.9 ± 2.5	600 ± 11
Hipertiroideas (7)	160.7 ± 5.8	634 ± 12

El tejido adiposo marrón y el músculo cardíaco fueron homogenizados y filtrados en Sephadex G-25. La piruvatokinasa fue medida en las fracciones eluidas. el número de ratas estudiadas se indica entre paréntesis.

es la encontrada en el tejido muscular cardíaco, donde ni el hipotiroidismo ni el hipertiroidismo alteraron la actividad del enzima.

Conclusiones.

Este estudio demuestra que la exposición al frío y la administración de tiroxina in vivo pueden aumentar varias veces ciertas actividades enzimáticas de la glucólisis en el tejido adiposo marrón. En base a los resultados obtenidos se podría concluir también que la Fru-2,6-P₂ tiene un importante papel en la regulación de la glucólisis durante el periodo de aclimatación al frío. Por otro lado, es un hecho bien documentado el papel que tienen las hormonas tiroideas en la estimulación de la termogénesis (para una revisión ver MULLER y SEITZ, 1984). Los resultados presentados indican que el incremento de las actividades PFK-2 y piruvato kinasa mediarían este efecto. Es importante también recalcar que el efecto de la aclimatación al frío es específico para el tejido adiposo marrón, no presentandose modificaciones en el tejido cardíaco estudiado.

FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO EN CORAZON: EFECTO DEL
HIPOTIROIDISMO EXPERIMENTAL SOBRE LAS ACTIVIDADES PFK-1 Y
PFK-2 Y LA CONCENTRACION DE FRU-2,6-P2

RESULTADOS

1. Características del hipotiroidismo inducido por perclorato sódico.

La administración de perclorato sódico al 1% en agua de beber indujo un progresivo hipotiroidismo (ALEXANDER y WOLFF, 1966; ORTIZ-CARO et al., 1983) que se caracterizó por por bajas concentraciones de tiroxina en la sangre de las ratas (figura 4). La concentración de Tiroxina en sangre de ratas eutiroides fue de 4.8 ugr./100 ml., lo que coincide con lo descrito previamente (SEGAL et al., 1985; St. GERMAIN y GALTON, 1985).

Los corazones de los animales hipotiroideos, tras treinta días de tratamiento con perclorato, pesaban aproximadamente la mitad que los de las ratas eutiroides. Se observó también una disminución de un 50% en el peso de las ratas después del tratamiento indicado.

El estado hipotiroideo no modificó el contenido de DNA en los corazones en relación con el peso del tejido.

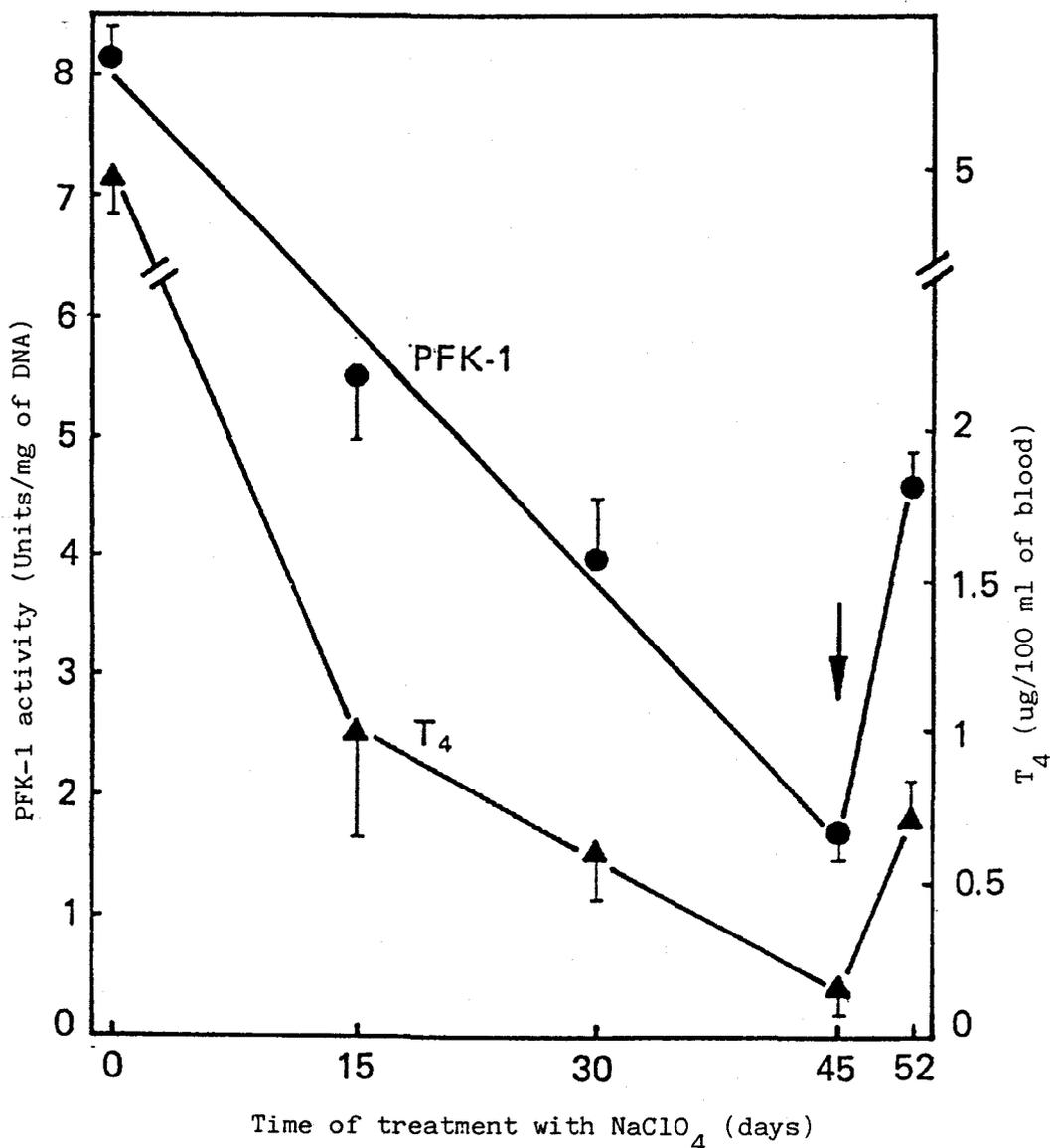


Figura 4. Respuesta al tratamiento con perclorato sódico. La PFK-1 (actividad máxima) y la tiroxina (T₄) fueron medidas como se indica en la sección Material y Métodos. Cada punto indica el valor medio \pm error estándar de al menos 5 muestras. La flecha indica cuando el tratamiento con perclorato fue suprimido.

2. Correlación entre la concentración de tiroxina y la actividad PFK-1.

Como se indicó anteriormente, el tratamiento con perclorato sódico al 1% indujo un marcado hipotiroidismo definido por una drástica disminución de la concentración sanguínea de tiroxina. El desarrollo del hipotiroidismo se acompañó de una progresiva disminución de la actividad PFK-1 cardíaca. El tratamiento con perclorato durante periodos inferiores a una semana no tuvo ningún efecto sobre ambos parámetros (resultados no mostrados).

Después de 45 días de administración del perclorato, la concentración de tiroxina en sangre era casi indetectable y la actividad PFK-1 cardíaca disminuyó a un 25% del valor encontrado en corazones de ratas eutiroides. La actividad PFK-1 medida en corazones de ratas eutiroides fue de aproximadamente 13 U/gr. peso, lo que coincide con valores previamente descritos (para una revisión ver NEWSHOLME y LEECH, 1983).

Se encontró además una rápida reversibilidad del efecto antes descrito; siete días después de que el perclorato fuera omitido de la dieta, la concentración de tiroxina en sangre estaba marcadamente incrementada, al mismo tiempo que se encontraba una recuperación de la actividad PFK-1 cardíaca (ver figura 4).

Para descartar la existencia de un posible efecto directo

del perclorato sódico sobre la actividad PFK-1 cardíaca, se administró conjuntamente dicha sal y tiroxina a dosis de 0.5 y 1 mgr./l en la bebida ad libitum. Los resultados presentados en la tabla 7 demuestran que el cambio de la actividad PFK-1 depende de la concentración en sangre de tiroxina y no de la administración de perclorato, no produciéndose descenso de la actividad cuando la hormona y la sal se administran simultáneamente.

La correlación entre la actividad cardíaca PFK-1 y la concentración sanguínea de tiroxina queda demostrada en la figura 5. Para realizar esta curva, además de los resultados obtenidos por el tratamiento indicado en la tabla 7, se obtuvieron valores adicionales administrando a ratas en la bebida 0.5 y 1 mgr./l de tiroxina ad libitum durante una semana (ratas hipertiroideas). Se encontró una curva hiperbólica en la que la mitad de la máxima actividad PFK-1 cardíaca se alcanza con una concentración de tiroxina en sangre de 0.5 microgr./100 ml.

3. Propiedades cinéticas de la PFK-1 cardíaca.

Se incubó extractos de corazón de ratas eutiroideas e hipotiroideas con concentraciones crecientes de fructosa-6-fosfato (Fru-6-P) (0.01 a 5 mM) en óptimas condiciones de medida, tal y como se ha indicado en la sección Material y Métodos. Los homogenados de corazones de ratas

TABLA 7

Efecto de la administración simultanea de perclorato sódico y tiroxina sobre la actividad PFK-1 cardíaca y la concentración sanguínea de tiroxina en ratas.

Se administró a las ratas Perclorato sódico al 1% solo o simultaneamente con tiroxina a dosis de 0.5 y 1 mgr./l en el agua de beber ad libitum durante 30 días. Los corazones de las ratas fueron rápidamente extraídos y congelados mediante pinzas planas previamente enfriadas en nitrógeno líquido. La actividad PFK-1 (condiciones óptimas) y la concentración de tiroxina en sangre fueron analizadas como se indica en la sección Material y Métodos. El número de ratas usadas en cada caso se indica entre paréntesis.

adiciones	actividad PFK-1 U/mgr. DNA	Tiroxina microgr./dl sangre
Control (16)	8.03 ±0.20	4.80 ±0.10
Perclorato sódico (5)	3.88 ±0.30	1.55 ±0.39
Perclorato + Tiroxina (0.5mgr/ml)	8.12 ±0.11	5.01 ±0.11
Perclorato + Tiroxina (1 mgr/ml)	8.78 ±0.06	5.08 ±0.50

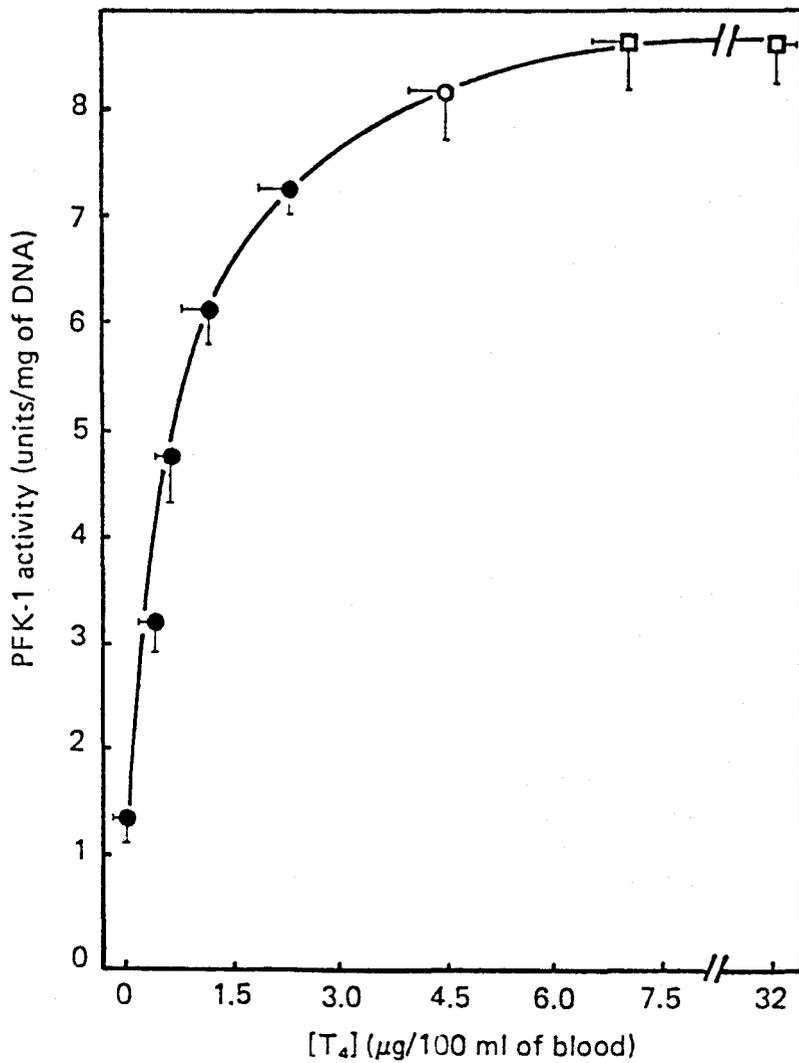


Figura 5. Correlación entre la actividad PFK-1 cardíaca y las concentraciones en sangre de tiroxina (T_4). Se emplearon ratas control (o), hipotiroideas (●) e hipertiroideas (□). Cada punto indica el valor medio \pm error estándar de al menos 5 muestras.

hipotiroideas mostraron una clara disminución de la actividad PFK-1 para todas las concentraciones de Fru-6-P con respecto a los corazones de ratas eutiroideas. Sin embargo, no se encontraron variaciones en el valor de la K_m aparente que fue de de 0.04 mM en ambos estados.

La figura 6a muestra resultados similares; en este caso se empleó PFK-1 parcialmente purificada, lo cual descarta la posibilidad de que la disminución de la actividad pudiera ser debida a factores presentes en el homogenado hipotiroideo.

Para obviar la posibilidad de que las condiciones óptimas, empleadas en el experimento anterior, pudieran camuflar hipotéticas variaciones (por ejemplo, de K_m aparente) de la actividad en el estado hipotiroideo, se realizaron experimentos bajo condiciones subóptimas, es decir, a pH 7 y en presencia de ATP 2.50 mM y AMP 0.10 mM. La figura 6b muestra la cinética del enzima en ambos estados, eutiroideo e hipotiroideo, bajo condiciones subóptimas. El valor de la K_m aparente fue de 0.13 y 0.14 mM respectivamente. Estos datos demuestran una marcada disminución de la actividad PFK-1 cardíaca, sin modificaciones de la K_m aparente para la Fru-6-P, cuando la concentración en sangre de tiroxina disminuye.

El paso siguiente fue estudiar si el enzima procedente de ratas hipotiroideas mantiene su capacidad de responder

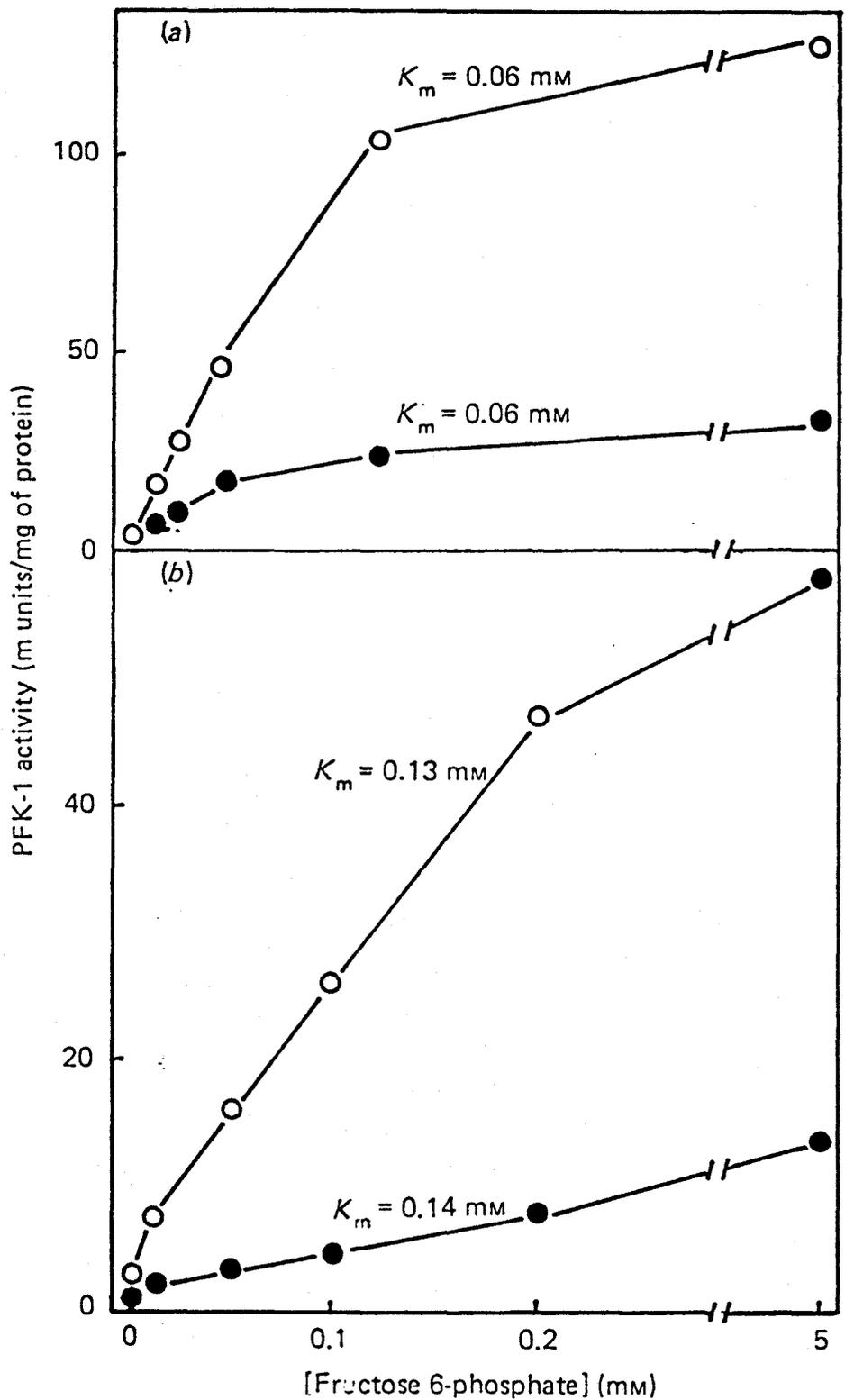


Figura 6. Afinidad de la PFK-1 cardíaca control (o) e hipotiroidea (●) por la Fru-6-P. La actividad PFK-1 fue medida en condiciones óptimas (a) y subóptimas (b). Los detalles experimentales se indican en el texto.



a los conocidos activadores de la PFK-1: el adenosinmonofosfato (AMP) y la fructosa-2,6-difosfato (Fru-2,6-P₂).

4. Efecto del AMP y la fructosa-2,6-difosfato.

Se estudió el efecto del AMP (figura 7) y de la fructosa-2,6-difosfato (figura 8) sobre la curva de actividad PFK-1 a diferentes concentraciones de F6P. Los resultados demostraron que la actividad PFK-1 presenta una gran dependencia con respecto a las concentraciones de ambos efectores, tanto en las preparaciones eutiroides como en las hipotiroideas. Estos estudios cinéticos fueron realizados bajo condiciones subóptimas de medida de la actividad PFK-1. De esta forma se encontró una gran sensibilidad del enzima a la variación de las concentraciones de ambos efectores, siendo la K_m aparente para la Fru-6-P del mismo orden de magnitud en ambos estados metabólicos. Tanto en los experimentos realizados incrementando la concentración de AMP, como en los que se aumento la concentración de fructosa-2,6-difosfato, la velocidad máxima obtenida para la preparación hipotiroidea fue notablemente menor que para la preparación hipótiroidea; aproximadamente unas cinco veces en ambos casos. Estos experimentos coinciden en la observación, ya indicada, de que el estado hipotiroideo afecta a la

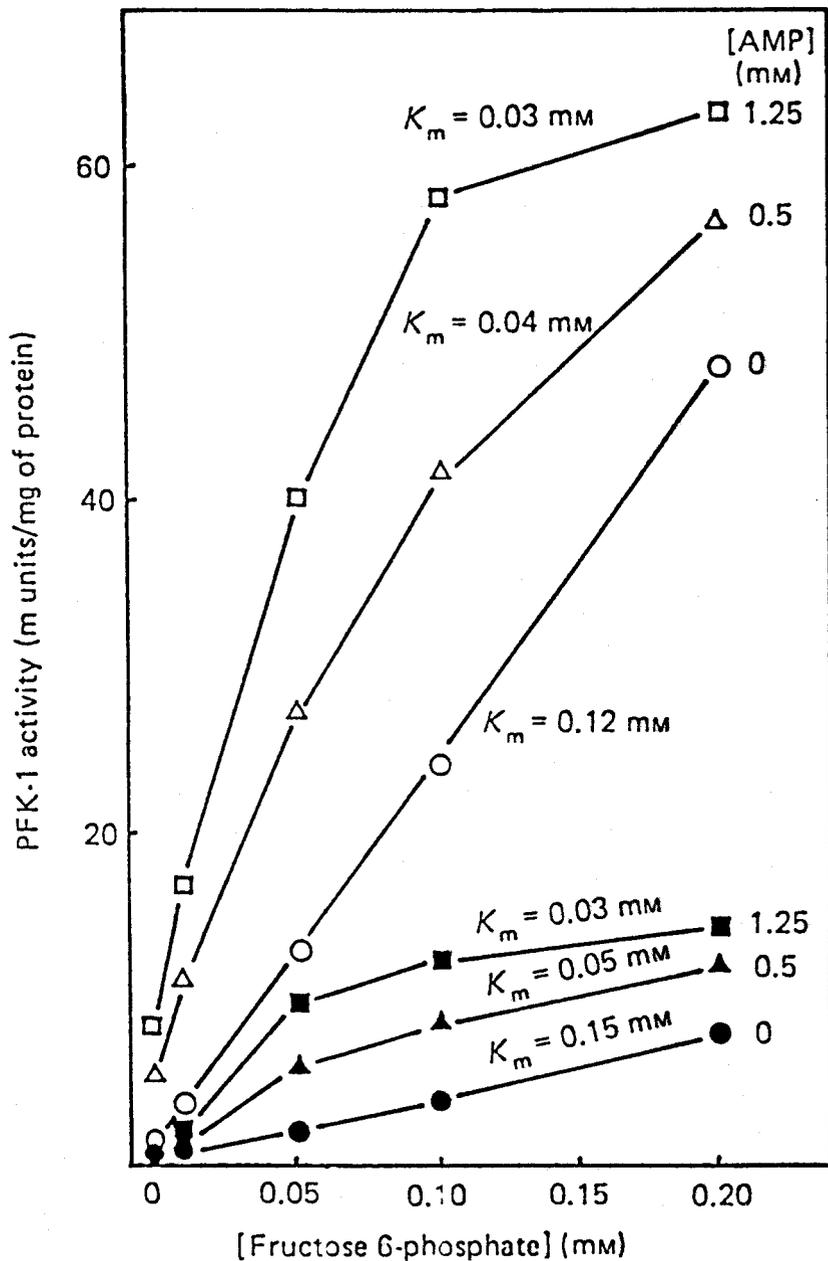


Figura 7. Efecto del AMP sobre la afinidad por la Fru-6-P de la PFK-1 cardíaca parcialmente purificada. La actividad PFK-1 de ratas control (o, Δ , \square) e hipotiroideas (o, \blacktriangle , \blacksquare) fue medida en condiciones subóptimas, es decir, en presencia de ATP 2,5 mM y a pH 7.0. La concentración de tiroxina en sangre de ratas hipotiroideas fue de 0.2 ugr/100 ml. El calculo de las K_m se realizó mediante microrordenador (Texas Instruments) tomando, además de los representados, valores de actividad PFK-1 correspondientes a concentraciones de Fru-6-P 0.5, 1.25, 2.5 y 5 mM.

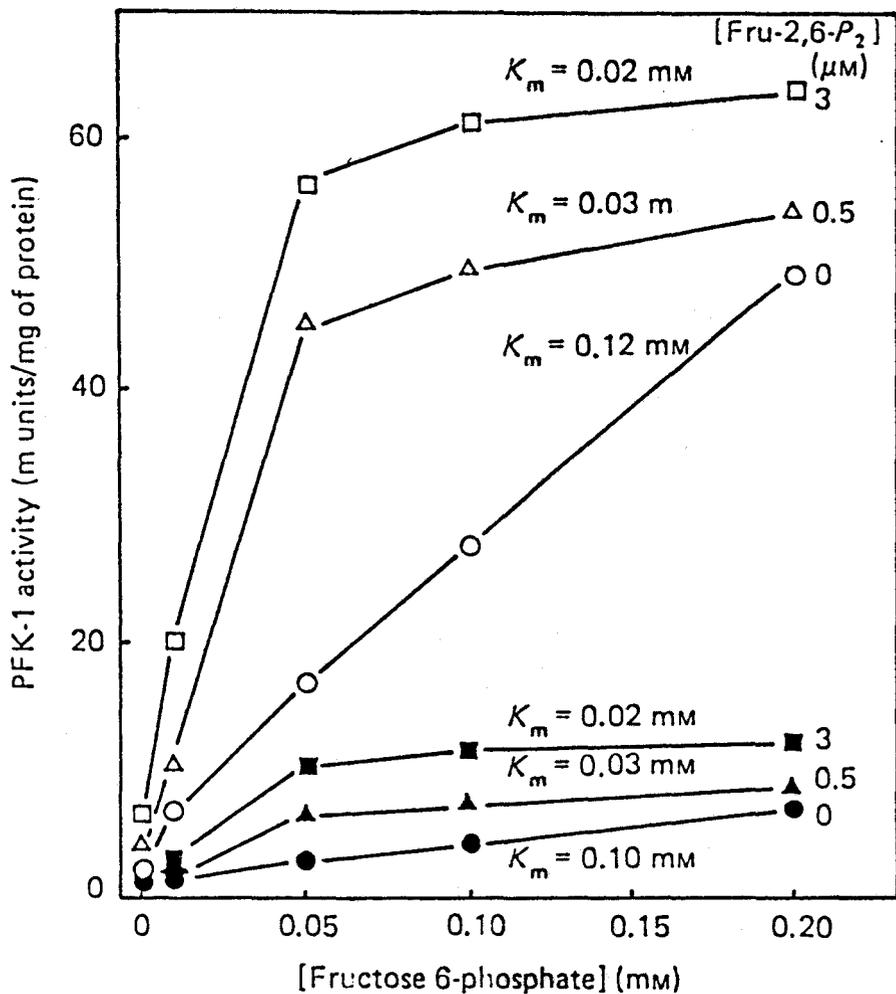


Figura 8. Efecto de la Fru-2,6-P₂ sobre la afinidad por la Fru-6-P de la PFK-1 cardíaca parcialmente purificada. Los símbolos y condiciones de medida son los mismos que en la figura 7 excepto que en este caso la concentración de AMP en todos los puntos fue 0.1 mM.

velocidad máxima de la actividad PFK-1 cardíaca, sin que se encuentren cambios en la K_m aparente para la Fru-6-P.

La figura 9 ilustra el efecto de las concentraciones crecientes de AMP y fructosa-2,6-difosfato sobre la actividad PFK-1 en corazón. Estos experimentos fueron realizados a pH 7.0 y en presencia de 2.50 mM de ATP. En (9a), la concentración de Fru-6-P y de AMP fue de 0.1 mM en ambos casos; en (9b) la concentración de Fru-6-P fue de 0.05 mM. El resto de los componentes estaban a las concentraciones indicadas como condiciones subóptimas descritas en la sección Material y Métodos. Las actividades máximas encontradas en (9a) y (9b) fueron 63.50 y 41.20 mU/mgr.de proteínas respectivamente. Estas condiciones fueron fijadas con el fin de obtener una mejor respuesta del enzima a las concentraciones crecientes de AMP y fructosa-2,6-difosfato; El empleo de condiciones óptimas (ATP 1.5 mM, AMP 1.25, pH básico) resulta en una mayor actividad generalizada con poca sensibilidad a los cambios en la concentración del efector, como se comprobó en experimentos preliminares (resultados no mostrados). La adición de la fructosa-2,6-bifosfato y el AMP no supuso una recuperación de la actividad PFK-1 normal en las preparaciones hipotiroideas. Aunque la actividad PFK-1 hipotiroidea fue menor para todas las concentraciones de los efectores, no se observó un cambio en la sensibilidad a

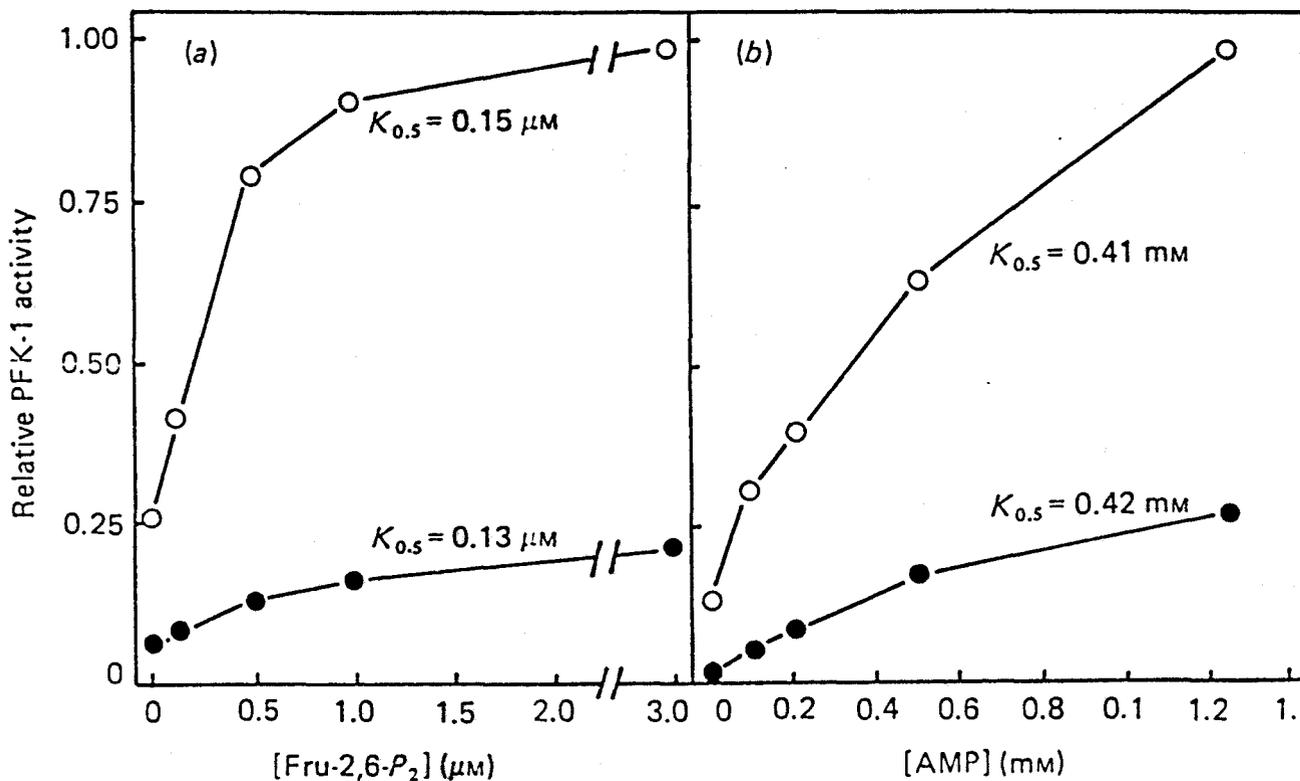


Figura 9. Efecto de la Fru-2,6-P₂ (a) y el AMP (b) sobre la actividad PFK-1 cardíaca parcialmente purificada de ratas control (o) e hipotiroideas (●). Las medidas fueron realizadas en presencia de 2,5 mM de ATP a pH 7.0. En (a) las concentraciones de AMP y Fru-6-P fueron ambas de 0.1 mM; en (b) la concentración de Fru-6-P fue de 0.05 mM. La actividad máxima encontrada en (a) y (b) fue de 63.5 y 41.2 mU/mgr de proteínas respectivamente. Para el cálculo de la K_{0.5} en (b) se emplearon valores correspondientes a una concentración de AMP de 1.5 y 2.5 mM. Para más detalles véase figura 7.

los mismos, siendo la $K_{0.5}$ para cada efector similar en ambos estados metabólicos.

En resumen, estos resultados sugieren que la pérdida de la actividad PFK-1 cardíaca en el estado hipotiroideo no es debido a una pérdida de las propiedades regulatorias del enzima.

5. Efecto de la triyodotironina sobre la actividad PFK-1 cardíaca en ratas hipotiroideas.

El siguiente paso fue estudiar si el efecto del hipotiroidismo es inhibir la síntesis de novo del enzima. Para realizar estos estudios se empleó cicloheximida, potente inhibidor de la síntesis de proteínas. La tabla 8 muestra como los fragmentos de tejido cardíaco de ratas hipotiroideas (Tiroxina en sangre 0.1 microgr/100 ml) incubados con 0.125 microgr/ml de triodotironina durante cinco horas presentaban una clara restauración de la actividad PFK-1. Este efecto era parcialmente suprimido

Se comprobó además que la cicloheximida no presentaba un efecto directo sobre la actividad PFK-1 de los fragmentos de corazón incubados.

6. Fructosa-2,6-difosfato y actividad PFK-2.

En la tabla 9 se resumen los resultados obtenidos en

TABLA 8

Efecto de la triyodotironina y la cicloheximida sobre la actividad PFK-1 en corazones de ratas hipotiroideas in vitro.

Estado tiroideo	Adiciones	Actividad PFK-1 unidades/mgr. DNA
1. Normal	no incubado	8.03 ± 0.2
2. Hipotiroideo	no adiciones	1.62 ± 0.2
	cicloheximida	1.59 ± 0.1
	T ₃	4.38 ± 0.3
	T ₃ + cicloheximida	2.81 ± 0.2

mediante la adición al medio de incubación de 35 microgr/ml de cicloheximida. Los corazones de ratas hipotiroideas (T₄ < 0.2 microgr/dl) fueron cortados en pequeños trozos de 50 mgr. e incubados en una solución Krebs-Ringer tamponada con trietanolamina 50 mM a pH 7.8 durante 5 horas, a 37 °C. Las concentraciones de triyodotironina y cicloheximida fueron respectivamente de 0.12 microgr./ml y 35 microgr./ml. La concentración de glucosa fue 20 mM en todos los casos. Los resultados muestran el valor medio ± error standard de 2 experimentos realizados por triplicado.

TABLA 9

Actividad PFK-2 y concentraciones de Fru-2,6-P2 en corazones de ratas normales e hipotiroideas.

Estado tiroideo	Actividad PFK-2 unidades/mgr.DNA	Fru-2,6-P2 nmol/mgr.DNA
Normal (5)	0.27 ± 0.02	3.07 ± 0.67
Hipotiroideo (7)	0.12 ± 0.02	1.52 ± 0.47

Los corazones fueron congelados y posteriormente procesados para la medición de PFK-2 y Fru-2,6-P2, según se indica en la sección Material y Métodos. Los niveles de tiroxina en sangre fueron 4.9 ± 0.8 en ratas normales y 0.14 ± 0.4 microgr./dl en ratas hipotiroideas. El número de ratas empleadas en cada experimento se indica entre paréntesis. Los resultados muestran el valor medio \pm error standard.

cuanto a la concentración de Fru-2,6-P2 y la actividad PFK-2 cardíacas en ratas hipotiroideas. La actividad PFK-2 desciende a la mitad del valor obtenido en corazones controles, descenso que es menor al obtenido en la actividad PFK-1 en similares circunstancias. La concentración de Fru-2,6-P2 en este estado metabólico fue también la mitad del valor encontrado en animales controles.

DISCUSION

los resultados encontrados ponen de manifiesto que ciertos cambios en el estado tiroideo tienen un efecto significativo sobre las actividades cardíacas PFK-1 y PFK-2. Cuando se añadió tiroxina a la dieta de ratas se observó un incremento de la concentración en sangre de la hormona. Dicho incremento no se acompañó de cambios significativos en la actividad PFK-1 cardíaca. De igual forma, ha sido descrito que la administración de triyodotironina a ratas no provoca cambios en la actividad piruvato dehidrogenasa en el corazón (HOLNESS et al., 1985). La administración oral de perclorato sódico, inhibidor de la síntesis de tiroxina, supuso una disminución de los niveles circulantes de tiroxina. Este descenso se acompañó de una disminución de la actividad fosfofructokinasa (figuras 4 y 5).

Cuando un estado hipotiroideo severo fue alcanzado, es decir, cuando las concentraciones de tiroxina en sangre descendieron por debajo de los 0.1 microgr./100 ml., se registró un descenso de cuatro veces en la actividad PFK-1 cardíaca, y de la mitad en la actividad PFK-2. Paralelamente estos niveles bajos de tiroxina se acompañaron de un descenso en la concentración de fructosa-2,6-difosfato en el corazón.

Es importante indicar que los cambios cinéticos de la disminución de la concentración de tiroxina circulante y de la actividad PFK-1 cardíaca fueron diferentes, precediendo el descenso de la tiroxina al de la actividad enzimática. El drástico descenso requerido en la concentración de tiroxina para causar una disminución importante en la actividad PFK-1 cardíaca podría explicar la poca capacidad de las hormonas tiroideas para regular algunas rutas metabólicas de carbohidratos y lípidos.

Este efecto fue demostrado a concentraciones saturantes y subsaturantes de Fru-6-P, estando la velocidad del enzima disminuida en todos los casos. A pesar del descenso observado en la actividad PFK-1 cardíaca, este estudio también demuestra que no existen cambios en la afinidad del enzima por el sustrato tanto a condiciones óptimas como subóptimas de ensayo.

Para conocer el posible mecanismo del descenso de la actividad PFK-1 cardíaca, fueron consideradas varias

posibilidades. En primer lugar, se consideró que este descenso de la actividad enzimática pudiera ser debido a una disminución de la síntesis del mismo, ya que ha sido profusamente descrito el efecto permisivo de las hormonas tiroideas sobre la síntesis de proteínas (para una revisión ver OPPENHEIMER, 1979). Esta posibilidad es reforzada por los resultados obtenidos mediante la recuperación de la actividad PFK-1 cardíaca en incubaciones in vitro de trozos de corazón hipotiroideo a los que se adicionó triyodotironina (tabla 8). Además se comprobó que la recuperación antes descrita quedaba limitada por la incorporación al medio de cicloheximida, potente inhibidor de la síntesis proteica.

En segundo lugar se consideró que el efecto observado sobre la actividad PFK-1 pudiera ser causado por una disminución en las concentraciones de algunos activadores del enzima del tipo del AMP o la fructosa-2,6-difosfato, o a una disminución de la sensibilidad del enzima a los mismos. Esta posibilidad parece poco probable ya que el enzima PFK-1 parcialmente purificado de los corazones hipotiroideos fue sensible a la activación por AMP y fructosa-2,6-difosfato. Sin embargo, la incubación con altas concentraciones de estos activadores no supuso una recuperación de la actividad eutiroides a los niveles alcanzados en el estado eutiroides (figuras 7,8 y 9).

Todo lo expuesto nos permite concluir que la disminución

de la actividad PFK1 cardíaca cuando las concentraciones en sangre de tiroxina estan experimentalmente disminuidas, puede ser explicada por una disminución en la síntesis de este enzima.

Como ya hemos indicado, los niveles bajos de tiroxina en sangre provocados por un estado hipotiroideo experimental severo, se acompañaron de un descenso de la concentración de fructosa-2,6-fosfato en corazón y de la actividad PFK-2 cardíaca a la mitad de lo encontrado en animales eutiroideos (tabla 9). Ya que el papel clave de la fructosa difosfato en la activación de la fosfofructokinasa-1 cardíaca ha sido previamente establecido, es razonable asumir que las bajas concentraciones de esta molécula pueden contribuir a la disminución de la glucólisis descrita durante el hipotiroidismo (BURNS y REDDY, 1975).

En resumen, el descenso de la actividad fosfofructokinasa en el estado hipotiroideo puede sugerir una interpretación molecular de la disminución del metabolismo de los carbohidratos durante el mismo.

PRESENCIA DE LA FRU-2,6-P2 EN LOS HEMATIES DE RATA.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Inhibición de la Fructosa-6-fosfato -1-fosfotransferas (PPi-PFK) y la PFK-2 por el 2-3-difosfoglicerato.

Como ya se ha indicado, había sido descrita la ausencia de Fru-2,6-P2 en Hematíes (HEYLEN et al., 1982). El estudio de la recuperación de muestras de Fru-2,6-P2 añadidas a extractos de eritrocitos reveló que dichos extractos contenían un potente inhibidor de la medición de la Fru-2,6-P2 mediante la técnica de la activación de la PPi-PFK, ya que dichos extractos añadidos no eran cuantificados cuando se empleaba el método anterior. Ya que se conoce que el 2-3-difosfoglicerato (2,3-DPG) es un inhibidor de numerosos enzimas (CHIBA y SASAKI, 1978) y que se encuentra en los eritrocitos a alta concentraciones (del orden mM), se comprobó la probable inhibición de la PPi-PFK mediante este metabolito. La figura 10 muestra que en las condiciones usuales de ensayo (VAN SCHAFTINGEN et al., 1982b), el 2,3-DPG inhibe la PPi-PFK con lo cual la medición de Fru-2,6-P2 no es posible mediante el método de activación de la PPi-PFK corrientemente empleado. La inhibición ejercida por el 2,3-DPG fue aparentemente no

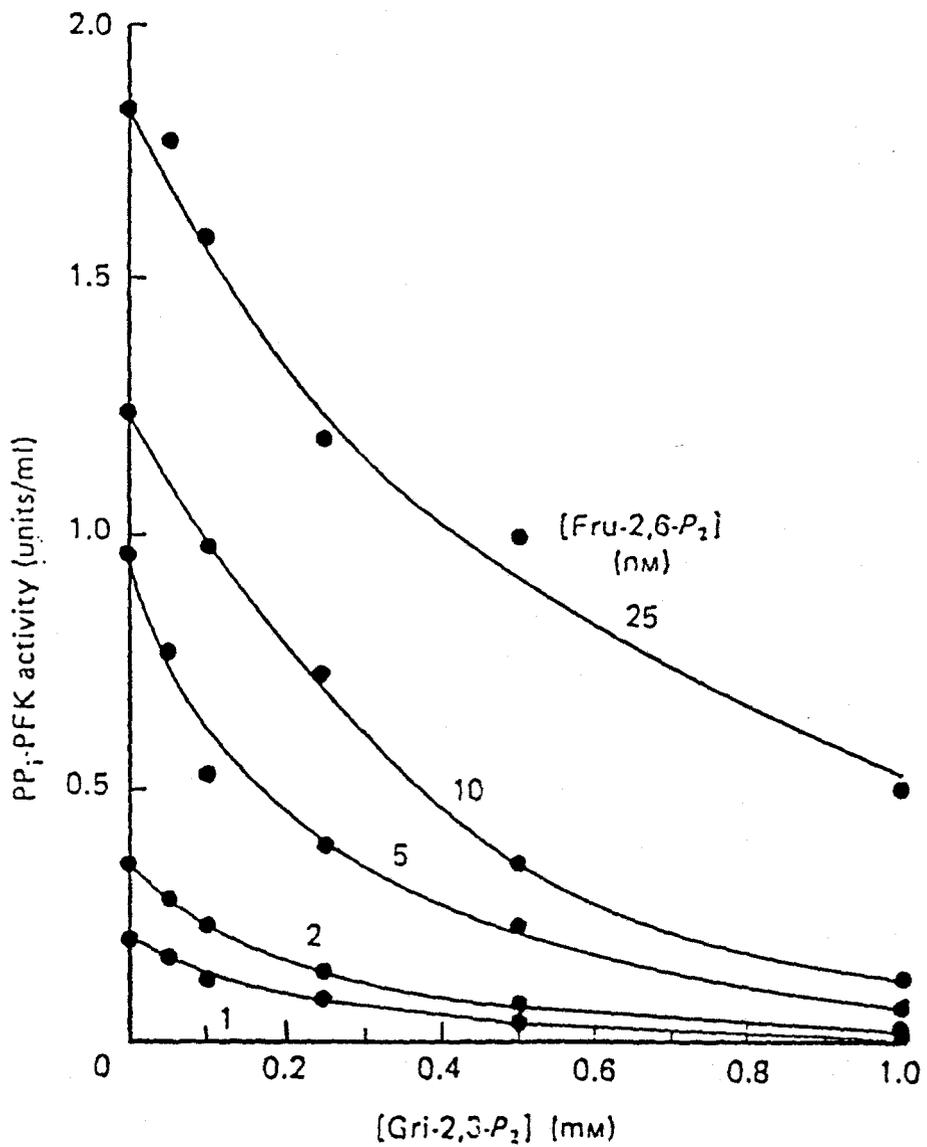


Figura 10. Inhibición de la Fru-6-P 1-fosfotransferasa (PPI-PFK) por el 2,3-Difosfoglicerato (Gri-2,3-P₂). La actividad enzimática fue medida a pH 8 y en presencia de 1 mM de pirofosfato y 1 mM de Fru-6-P. Para más detalles experimentales véase Material y Métodos.

competitiva con una K_i de 0.13 mM. Además, cuando se realizó la purificación parcial de la PFK-2 de eritrocitos, se comprobó que el 2,3-DPG inhibía este enzima con una K_i aparente de 0.5 mM analizada a concentraciones subsaturantes de sustratos (figura 11). Similares resultados fueron obtenidos con la PFK-2 purificada a partir del hígado y del músculo. Como en los eritrocitos la concentración de 2,3-DPG es aproximadamente 10 veces mayor que la K_i aparente para la inhibición de la PFK-2, se podría esperar que en circunstancias fisiológicas normales dicho enzima esté completamente inhibido.

Los dos efectos inhibitorios del 2,3-DPG explican porqué hasta ahora la Fru-2,6-P₂ no había sido descrita en los eritrocitos de mamíferos. De lo anterior se deduce que la Fru-2,6-P₂ debería estar presente en eritrocitos que no contienen 2,3-DPG, como es el caso de los eritrocitos de las aves. Recientes estudios han descrito la presencia de este metabolito en los hematíes de pollo (ESPINET et al., 1986). La Fru-2,6-P₂ podría, por tanto, estar también presente en circunstancias en las que descienda la concentración de 2,3-DPG.

2. Fru-2,6-P₂ en eritrocitos de mamíferos.

En una primera serie de experimentos se intentó realizar la detección de Fru-2,6-P₂ en extractos deproteinizados de eritrocitos. Ya que el 2,3-DPG inhibe la medida de la Fru-

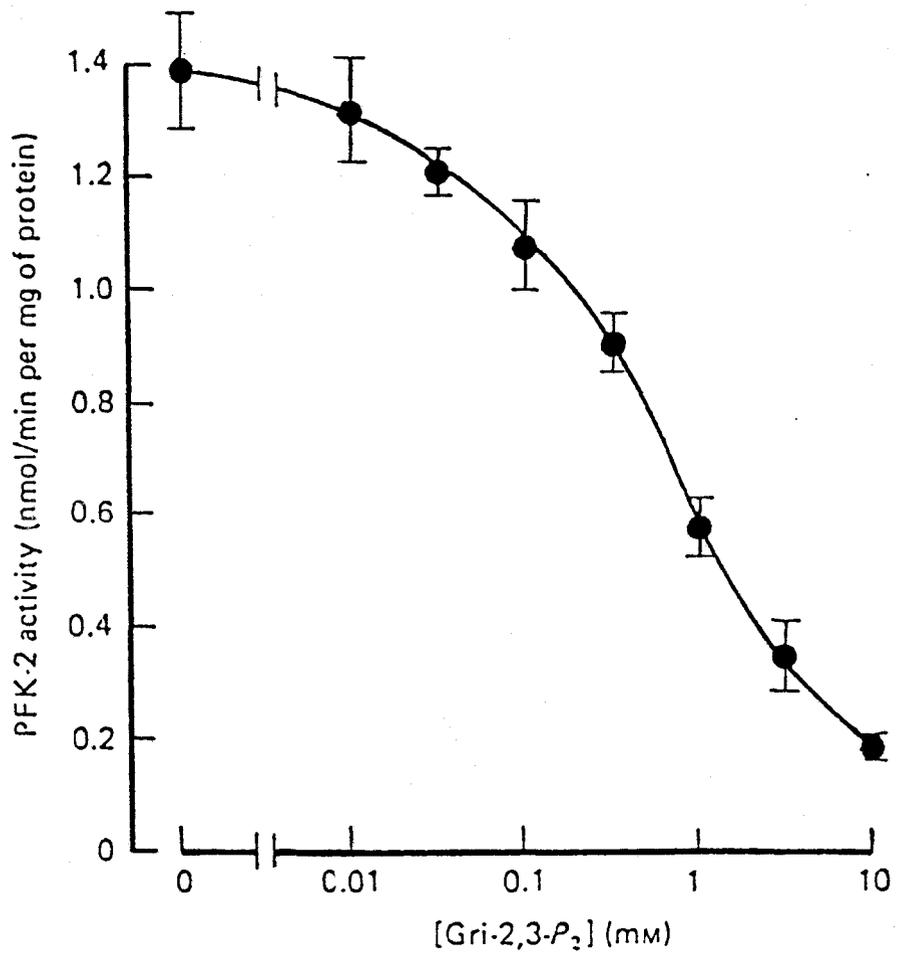


Figura 11. Inhibición de la actividad PFK-2 por el 2,3-Difosfoglicerato (Gri-2,3-P₂). La actividad PFK-2 fue medida a pH 7.1 en presencia de 0.1 mM de Fru-6-P, 5 mM de MgATP y 5 mM de Fosfato potasio. Los puntos indican el valor medio \pm error estándar de tres experimentos.

2,6-P2, estos dos fosfoesteres fueron separados por cromatografía de intercambio iónico tal y como se describan en la sección de material y métodos. En estas condiciones, la concentración de Fru-2,6-P2 encontrada en extractos de eritrocitos aislados fue menor de 20 nmol/l de células. La concentración de este metabolito en el músculo e hígado de ratas es 20 y 1000 veces mayor respectivamente (HUE et al., 1984; MINATOGAWA y HUE, 1984). Sin embargo, este método de separación ofrecía muchas dificultades técnicas ya que las propiedades cromatograficas de la Fru-2,6-P2 y el 2,3-DPG resultaron ser muy similares. Por tanto, se investigó la posibilidad de conseguir un descenso de la concentración de 2,3-DPG en hematíes intactos.

Previamente RAPOPORT et al., en 1977, habían demostrado que la concentración de 2,3-DPG en los eritrocitos descendía de forma cronodependiente en condiciones de acidosis (pH 6.9), mientras que se mantenía estable a pH 7.4 y aumentaba ligeramente a pH 8.2. La tabla 10 confirma estos hallazgos; además, de acuerdo con otros resultados previamente publicados (MINAKAMI et al., 1964; ARESE et al., 1981), la concentración de Fructosa-6-fosfato, sustrato de la PFK-2, se mantuvo durante la incubación de cuatro horas a pH 6.9, mientras que descendió a pH 7.4 y 8.2. La concentración de ATP se mantuvo relativamente constante en las tres condiciones expuestas. La concentración de Fru-2,6-P2 aumentó a pH 6.9, hasta

TABLA 10. Concentraciones de varios metabolitos en eritrocitos de rata incubados a diferentes pH en presencia de 20 mM de glucosa

Metabolito	Tiempo de incubación (h)	pH 6.9	pH 7.4	pH 8.2
Glu-6-P	0	48 ± 6	43	41
nmol/ml	4	39 ± 8	13	4
Fru-6-P	0	20 ± 5	13	11
nmol/ml	4	25 ± 2	3	1
ATP	0	1.11 ± 0.06	1.06	1.07
micromol/ml	4	0.89 ± 0.04	0.98	0.72
2,3-DPG	0	6.2 ± 0.3	5.8	6.6
micromol/ml	4	0.6 ± 0.1	5.1	5.5
Fru-2,6-P2	0	22 ± 2	-	-
pmol/ml	2	157 ± 10	-	-
	4	260 ± 20	<20	<20

Los valores expresados para pH 6.9 indican el valor medio ± S.E.M. Otros resultados expresan el valor medio de tres experimentos. Todos ellos están referidos a ml. de células

alcanzar un valor de 260 pmoles/ml de células, cuando la concentración de 2,3-DPG era de 0.6 micromol/ml de células.

Es importante señalar que al contrario de lo que ocurría con la síntesis de Fru-2,6-P₂, los trabajos citados demuestran que la glucólisis es estimulada cuando el pH es incrementado de 7 a 8.

Por otro lado, la Fru-2,6-P₂, que fue sintetizada mediante previa preincubación durante cuatro horas a pH 6.9 y en presencia de 10 mM de glucosa, persistió al menos dos horas cuando el pH era elevado a 7.4 u 8.2. En las últimas condiciones, la concentración de 2,3-DPG que era menor de 0.5 micromol/ml de células después de 4 horas de incubación a pH 6.9, alcanzó un valor de 2.5 micromol/ml de células después de dos horas de incubación a pH 8.2.

De los experimentos anteriores se dedujeron las condiciones óptimas de incubación para la medida de la Fru-2,6-P₂. Cuando los eritrocitos fueron previamente preincubados sin glucosa a pH 6.9 para permitir la desaparición de 2,3-DPG y posteriormente incubados al mismo pH en presencia de varias concentraciones de glucosa, se observó un aumento glucosa dependiente en las concentraciones de Fru-2,6-P₂ (tabla 11). Este aumento fue mucho menor o ausente cuando las células eran incubadas a pH 7.4 u 8.2.

Se comprobó también el efecto del pH sobre la actividad PFK-2 de eritrocitos. A pH 7.5 y 8.5, la actividad fue del

TABLA 11

Influencia de la concentración de glucosa sobre la concentración de Fru-2,6-P2 en eritrocitos de rata incubados a diferentes valores de pH.

Concentración de Glucosa mM (mM)	Fru-2,6-P2 pmol/ml de células		
	pH 6.9	7.4	8.2
0	<20	<20	<20
5	86 ± 15	25 ± 3	23 ± 2
10	107 ± 9	47 ± 1	22 ± 4
20	116 ± 19	33 ± 1	22 ± 2
40	144 ± 21	-	23 ± 2

Los eritrocitos fueron incubados durante 4 horas a pH 6.9 en ausencia de glucosa y luego lavados e incubados al pH indicado durante una hora en presencia de las concentraciones de glucosa indicadas. Los resultados se expresan en valor medio ± error estandar para tres diferentes observaciones.



93 y 66% respectivamente de la actividad medida a pH 7.0.

Conclusiones generales

Las concentraciones de Fru-2,6-P2 en los eritrocitos dependen claramente del pH de incubación. A un pH fisiológico, la concentración es difícilmente detectable. Sin embargo, a pH 6.9, se observó un aumento glucosadependiente de la concentración de Fru-2,6-P2. Probablemente, el efecto del pH no se realice directamente a través del control de la PFK-2, ya que la actividad PFK-2 a pH 7.0 y 7.5 es prácticamente la misma. Parece más probable que el efecto del pH se deba a un mecanismo indirecto sobre la concentración de 2,3-DPG. Este componente es un inhibidor de la PFK-2 y su concentración en células aisladas es aproximadamente 10 veces el valor de la K_i aparente para la PFK-2. Parece ser que la Fru-2,6-P2 no desarrolla un importante papel en el control de la glucólisis de los eritrocitos. Células que por otra parte dependen exclusivamente de la misma para su demanda de energía.

Por otro lado, la inhibición de la P_{Pi}-PFK por el 2,3-DPG explica el fallo en la medición de la Fru-2,6-P2. Este método, que tiene la ventaja de ser muy sensible: permite a detección de cantidades de hasta 1 pmol (VAN SCHAFTINGEN, 1984), es sin embargo influenciado por las concentraciones de este metabolito y de sales.

LA FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO EN CELULAS DE TUMOR ADRENAL Y-1.
EFECTO DE LA ACTH.

RESULTADOS

La capacidad de la ACTH para inducir la liberación de lactato por parte de las células Y-1 fue investigada en experimentos preliminales. A tiempo 0 de incubación, el medio standard de cultivo fue retirado y sustituido por 4 ml de medio de incubación cuya composición se indica en la sección Material y Métodos. Las células fueron incubadas durante 1 hora sin sustratos (preincubación) para degradar el glucógeno u otros carbohidratos que pudieran estar almacenados en las células. Posteriormente, las células eran lavadas e incubadas de nuevo en medio de incubación con las adiciones indicadas en cada caso. En condiciones basales, es decir, con una glucosa de 5 mM, la liberación de lactato fue de 5.2 ± 0.3 micromol/mgr de proteínas x 4 horas. La curva dosis-respuesta para la ACTH se representa en la figura 12. La ACTH produce un considerable incremento en la liberación de lactato al medio de incubación. La mitad del máximo efecto fue alcanzado con 3 microgr/ml de ACTH, y el máximo efecto prácticamente con 5 microgr/ml de ACTH. Dosis de la hormona menores de 0.5 microgr/ml no tuvieron efecto. Tales concentraciones de hormona están en

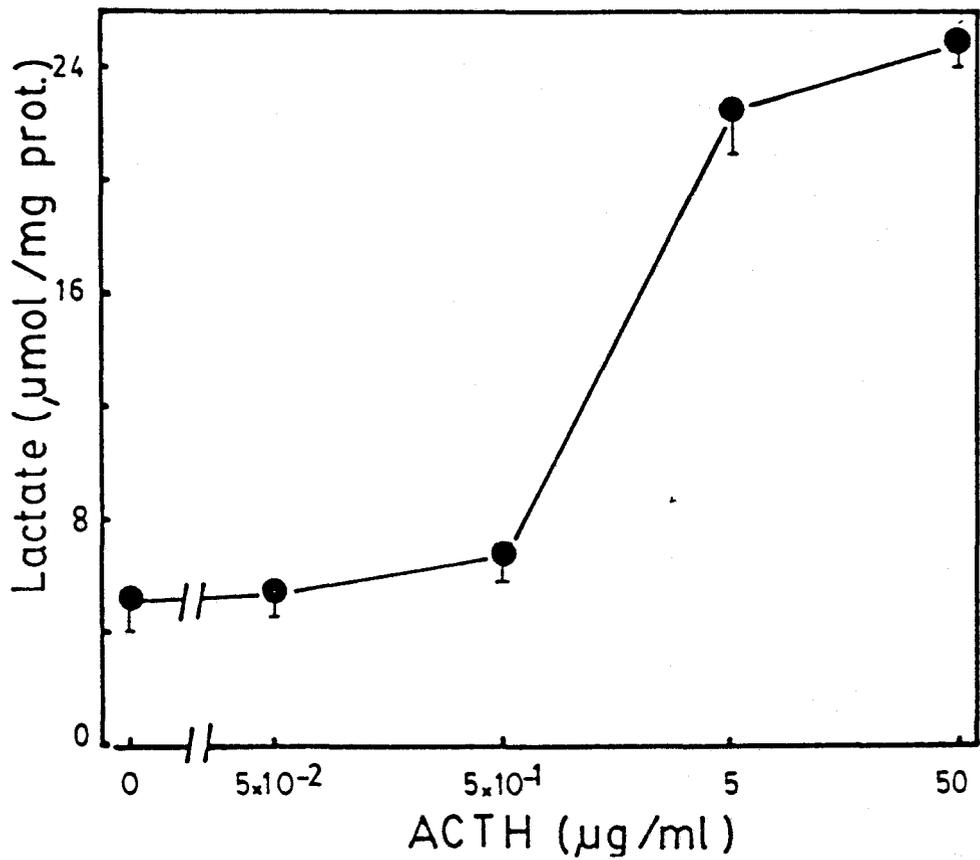


Figura 12. Efecto de diferentes dosis de ACTH sobre la liberación de lactato por células Y-1. Las células fueron preincubadas 1 hora sin sustratos y posteriormente incubadas 4 horas en presencia de 5 mM de Glucosa. Para mas detalles véase la sección Células de Material y Métodos.

el mismo orden de magnitud que las reportadas en los estudios de esteroidogénesis. En los experimentos realizados con 5 microgr/ml de ACTH la máxima estimulación de la glucólisis fue de 4 veces los niveles basales.

La figura 13 ilustra la acción de la glucosa y la ACTH sobre diversos parámetros glucolíticos. El incremento en la concentración de glucosa produjo un aumento en los niveles intracelulares de Fru-2,6-P₂, de 7.0 ± 0.8 sin glucosa a 16.8 ± 1.3 pmol/mgr de proteínas de Fru-2,6-P₂ en presencia de 50 mM de glucosa. La adición de la hormona estimuló aproximadamente 3 veces la síntesis de Fru-2,6-P₂ en relación a sus correspondientes controles. Es notable que el efecto de la ACTH fue visto incluso en la ausencia de glucosa. Este hecho puede ser interpretado por el bien conocido efecto glucogenolítico de la ACTH (HAYNES, 1958), y, por tanto, por un aumento en la concentración de hexosas fostato.

La figura 13 muestra también como en similares condiciones la ACTH produce un estable incremento de la actividad PFK-1, con un patrón muy similar al encontrado para la Fru-2,6-P₂. La estimulación de los parámetros anteriores fue reflejada por un incremento en la concentración de lactato liberado al medio. La máxima respuesta fue ya alcanzada con una concentración de glucosa de 5 mM tanto en presencia como en ausencia de ACTH. Los datos presentados en la figura 13 sugieren que existe una

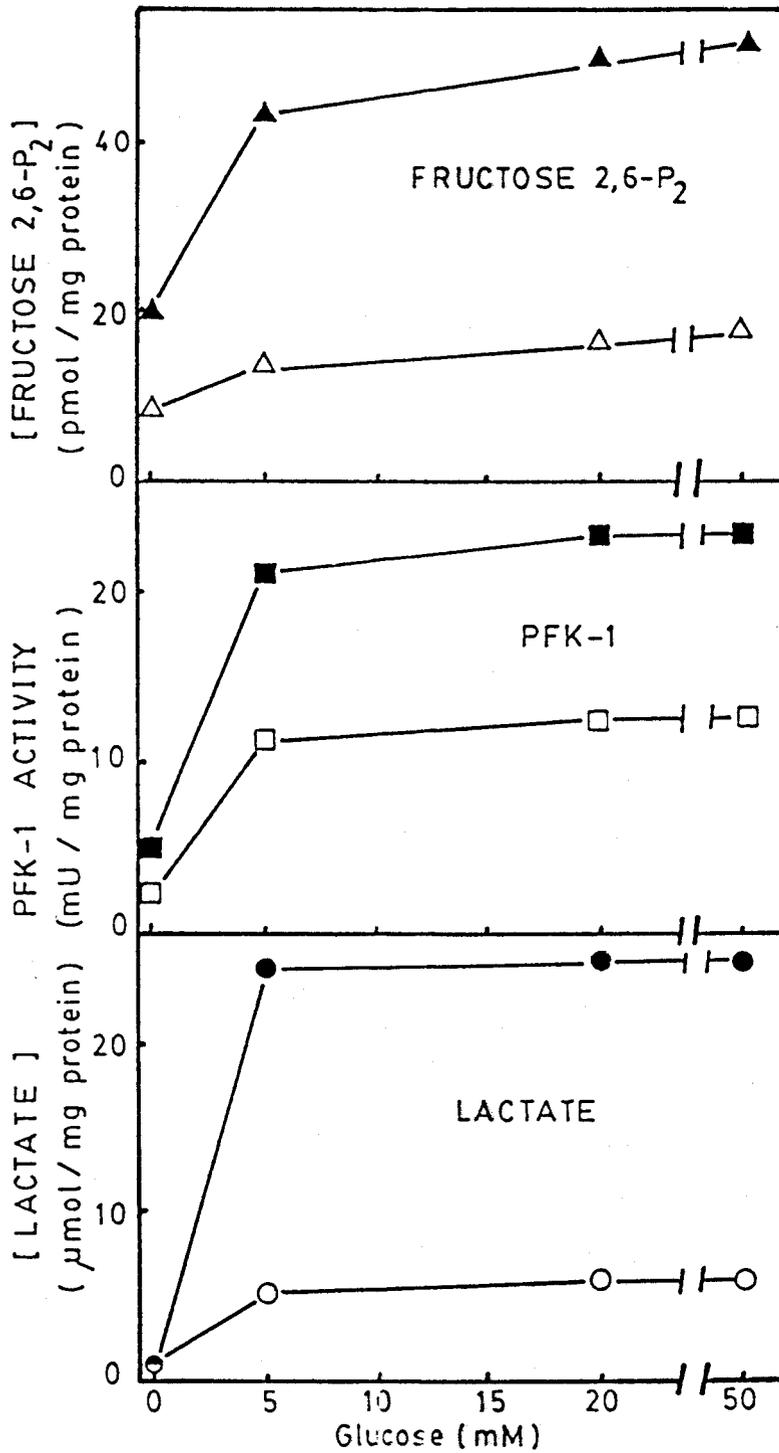


Figura 13. Dosis-respuesta de la glucosa sobre células controles (o, □, △) y estimuladas con ACTH 5 ugr/ml (●, ▲, ■). Para mas detalles véase texto.

relación entre el flujo glucolítico y los niveles de Fru-2,6-P2, es decir, que este metabolito presenta un papel regulador de la glucolisis en estas células tumorales.

El análisis de la actividad PFK-2 en extractos parcialmente purificados de células Y-1 dio un valor de 0.4 ± 0.02 pmoles de Fru-2,6-P2 sintetizados por minuto y por mgr. de proteína; este valor era incrementado 3 veces por la acción de la ACTH (n=3 en células tratadas y no tratadas).

Por otro lado, se ha descrito que los iones Ca^{2+} tienen un papel crítico en la secreción de esteroides estimulada por la ACTH (LEFKOWITZ, 1970). En la tabla 12 se muestra como ni los iones calcio ni el dibutiril-AMP cíclico modificaron significativamente la liberación de lactato y la producción de Fru-2,6-P2, lo que sugiere que estos pueden actuar a diferentes niveles que la glucolisis en las células Y-1.

DISCUSION

Estos datos indican que el contenido en Fru-2,6-P2 esta sujeto a la regulación por ACTH en las células de tumor adrenal Y-1. La hormona causó un incremento simultaneo en la liberación de lactato, concentración de Fru-2,6-P2 y actividad PFK-1, así como un incremento en la actividad

TABLA 12

Efecto del dibutil-AMPC y el calcio divalente sobre la secreción de lactato y el contenido de Fru-2,6-P2 en células Y-1

Adiciones	Lactato micromol/mgr prot.	Fru-2,6-P2 pmol/mgr prot.
Control	6.16 ± 1.8	7.5 ± 1.4
Ca ²⁺	6.66 ± 2.8	6.0 ± 2.3
db-AMPC	6.83 ± 1.9	9.7 ± 1.8
Ca ²⁺ + db-AMPC	8.08 ± 2.5	7.5 ± 1.4

Las células Y-1 fueron incubadas con las siguientes adiciones: 2.5 mM de Ca²⁺, 2 mM de dibutil-AMPC y 2 mM de isobutil metil xantina. La concentración de glucosa fue 50 mM en todas las condiciones. Se indica el valor medio y el error standard de 3 experimentos.

PFK-2. Los niveles de Fru-2,6-P2 encontrados son similares a aquellos que han sido observados en el adenocarcinoma de colon humano HT-29 (DENIS et al., 1986).

Ha sido ya anteriormente descrita la elevación de algunos intermediarios glucolíticos después del tratamiento de glándulas adrenales de rata con ACTH. Entre ellos, el incremento de los niveles de AMPc y el descenso de la relación ATP/AMP podría explicar la activación de la actividad PFK-1 (BELL et al., 1970). Estos resultados unidos a los de la presente tesis, sugieren un aumento simultáneo de la actividad adenilciclase (SCHIMMER et al., 1976) y de la Fru-2,6-P2 después del tratamiento de las células Y-1 con ACTH. Todo ello podría indicar que la actividad PFK-2 en estas células no está principalmente regulada por fosforilación por una proteína kinasa dependiente de AMPc como ocurre en el enzima hepático (RIDER y HUE, 1986), sino que, por el contrario, la PFK-2 de las células Y-1 sea una isoenzima semejante a la del corazón (RIDER y HUE, 1986), que muestra un bajo nivel de inactivación por fosforilación por proteína kinasa AMP cíclico dependiente. La posibilidad de que la PFK-2 de las células Y-1 fuera estimulada por AMPc, como ocurre en las levaduras (FRANÇOIS et al., 1984) parece quedar descartada por los datos mostrados en la tabla 12.

Se ha sugerido que la esteroidogénesis es regulada por ACTH a través de mecanismos que no requieren la

participación del AMPc (COTE y YASUMURA, 1978). En este sentido, ha sido postulado un posible papel del GMPC (PERCHELLET et al., 1977), aunque esto ha sido discutido por otros autores (SCHIMMER, 1980). Por otro lado, las actividades proteinkinasa C y M han sido recientemente descritas en el tejido adrenal (VILGRAIN et al., 1984). Por lo tanto, el estudio de una posible regulación por estas enzimas o por el GMPC de la PFK-2 podría ser preceptivo a fin de comprender el mecanismo por el cual la ACTH estimula la producción de Fru-2,6-P2 en células de tumor adrenal Y-1.

CONCLUSIONES

1. En el tejido adiposo blanco epididimario de rata, la adición de adrenalina in vitro provocó la disminución de los niveles intracelulares de Fru-2,6-P2. La insulina, por el contrario, aumentó al doble dichos niveles. Esto sugiere que ambas hormonas estimulan la glucólisis en este tejido por mecanismos diferentes.

2. Los resultados obtenidos indican que la Fru-2,6-P2 tiene un papel en el incremento de la glucólisis durante la aclimatación al frío en el tejido adiposo marrón. Durante la misma se comprueba un aumento de los niveles de Fru-2,6-P2 y de las actividades PFK-2 y piruvato kinasa. Estos incrementos son favorecidos por el tratamiento in vivo con tiroxina.

3. El descenso de la glucólisis experimentado en el corazón hipotiroideo se acompaña de una drástica reducción de los niveles de Fru-2,6-P2 y de las actividades PFK-1 y PFK-2. La actividad PFK-1 cardíaca en el animal hipotiroideo muestra una gran dependencia de sus reguladores habituales: AMP y Fru-2,6-P2.

4. Se describe por vez primera la presencia de Fru-2,6-P₂ en los eritrocitos. Su papel regulador de la glucólisis en estas células es discutible ya que en circunstancias normales (pH 7.4, 2,3-DPG 5 mM) su concentración es mínima, debido a la inhibición de la PFK-2 por el 2,3-DPG.

5. Los resultados indican que la estimulación de la glucólisis en células Y-1 provocada por la ACTH está mediada por un aumento de los niveles de Fru-2,6-P₂ y de la actividad PFK-1.

6. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la regulación de la glucólisis por la insulina, tiroxina, ACTH y aclimatación al frío en los tejidos antes citados, esta mediada por cambios en la concentración de Fru-2,6-P₂; lo cual no es el caso de la adrenalina. También se verificó que aunque la Fru-2,6-P₂ esta presente en los hematíes, no participa en la regulación de la glucólisis en las condiciones citadas.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, W.E. y WOLFF, J. (1966)
Endocrinology, 78, 581-590
- ANDERSON, J.W., KAROUNOS, D. y YONEYAMA, T. (1985)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149, 814-821
- ARESE, P., BOSIA, A., PESCARMONA, G.P. y TILL, U. (1981)
Cell Calcium 2, 509-524
- BARGONI, N., GRILLO, M.A., RINAUDO, M.T., FOSSA, T., TOURN, M.L. y BOZZI, M.L. (1966).
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 344, 42-46
- BARTRONS, R., HUE, L., VAN SCHAFTINGEN, E. y HERS. H.G. (1983).
Biochem. J. 214, 829-837.
- BARTRONS, R., VAN SCHAFTINGEN, E. y HERS, H.G. (1984)
Biochem. J. 218, 157-163
- BARTRONS, R., VAN SCHAFTINGEN, E., VISSERS, S. y HERS, H.G. (1982).
FEBS lett. 143, 137-140
- BELL, J., BROOKER, G. y HARDING, B.W. (1970)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 938-943
- BENKOVIC, S.J. y De MAINE, M.M. (1982)
Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 53, 45-82
- BOSCA, L., ARAGON, J.J. y SOLS, A. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 486-491
- BOSCA, L., CHALLISS, R.A.J. y NEWSHOLME, E.A. (1985)
Biochim. Biophys. Acta 828, 151-154
- BOSCA, L., MOJENA, M., GYSDAEL, J., ROUSSEAU, G.G. y HUE, L. (1986).
Biochem. J. 236, 595-599
- BOTTGER, I., KRIEGEL, H. y WIELAND, O. (1970)
Eur. J. Biochem. 13, 253-257
- BRUNI, P., FARNARARO, M., VASTA, V. y D'ALESSANDRO, A. (1983).
FEBS lett. 159, 39-42
- BURNS, A.H. y REDDY, W.J. (1975)
J. Mol. Cardiol. 7, 553-561
- CANNON, B. y NEDERGAAR, J.J. (1985)
Assays Biochem. 20, 110-164

- CASTAÑO, J.G., NIETO, A. y FELIU, J.E. (1979).
J. Biol. Chem. 254, 5576-5579.
- CHALLIS, R.A.J., ARCH, R.S. y NEWSHOLME, E.A. (1985)
Biochem. J. 231, 257
- CHAN, T.M. y EXTON, J.H. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 6393-6400
- CHIBA, H. y SASAKI, R. (1978)
Curr. Top. Cell. Regul. 14, 75-116
- CIRIACY, M. y BREITENBACH, I. (1979).
J. Bacteriol. 139, 152-160
- CLARKE, S.D., WATKINS, P.A. y LANE, M.D. (1979)
J. Lipid Res. 20, 974-985
- CLAUS, T.H., EL-MAGHRABI, M.R. y PILKIS, S.J. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 7855-7864
- CLAUS, T.H. y PILKIS, S.J. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 664-668
- CLAUS, T.H., SCHLUMPF, J.R., EL-MAGHRABI, M.R., McGRANE,
M. y PILKIS, S.J. (1981).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 716-723
- CLAUS, T.H., SCHLUMPF, J.R., EL-MAGHRABI, M.R. y PILKIS,
S.J. (1982)b. J. Biol. Chem. 257, 7541-7548
- CLAUS, T.H., SCHLUMPF, J.R., EL-MAGHRABI, M.R., PILKIS, J.
y PILKIS, S.J. (1980).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6501-6506
- COONEY, C.S. y NEWSHOLME, E.A. (1982)
FEBS lett. 148, 198-200
- COTE, T.E. y YASUMURA, S. (1978)
Acta Endocrinol. 87, 811-819
- CRESPO-ARMAS, A. y MOWBRAY, J. (1987)
Biochem. J. 241, 657-661
- CZECH, M.M., MALBON, C.C. y KERMAN, K. (1980)
J. Clin. Invest. 66, 574-582
- DENIS, C., PARIS, H. y MURAT, J.C. (1986)
Biochem. J. 239, 531-536
- DE VISSCHER, M. y INGENBLEEK, Y. (1980) in The Thyroid
Gland (De Visscher, M. ed.), pp. 377-412. Raven Press. New

York

- DIAMOND, I., LEGG, A., SCHNEIDER, J.A. y ROZENGURT, E. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 866-871
- DUNAWAY, G.A., KASTEN, T.P. y NAQUI, D. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 7831-7833
- EIGENBRODT, E., FISTER, P. y REINACHER, M. (1985) in Regulation of carbohydrate metabolism (Beitner, R., ed.), vol. 2, pp. 141-179, CRC Press, Boca Raton, FL
- EKMAN, P. y DAHLQVIST-EDBERG, U. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 662, 265-270
- EL-MAGHRABI, M.R., CLAUS, T.H., PILKIS, J., FOX, E. y PILKIS, S.J. (1982b). *J. Biol. Chem.* 257, 7603-7607
- EL-MAGHRABI, M.R., CLAUS, T.H., PILKIS, J. y PILKIS, S.J. (1981). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 1071-1077
- EL-MAGHRABI, M.R., CLAUS, T.H., PILKIS, J. y PILKIS, S.J. (1982a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 315-319
- EL-MAGHRABI, M.R., FOX, E., PILKIS, J. y PILKIS, S.J. (1982)c. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 749-756
- ENGSTROM, L. (1978) *Curr. Top. Cell. Regul.* 13, 29-51
- ESPINET, C., BARTRONS, R. y CARRERAS, J. (1986) *FEBS lett.* 209, 254-256
- EXTON, J.H., MALLETT, L.E., JEFFERSON, L.S., WONG, E.H.A., FRIEDMANN, N., MILLER, T.B.Jr. y PARK, C.R. (1970). *Rec. Prog. Horm. Res.* 26, 411-461
- EXTON, J.H. y PARK, C.R. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 1424-1433
- FARNARARO, M., VASTA, V. y D'ALESSANDRO, A. (1984) *FEBS lett.* 171, 117-120
- FELIU, J.E., HUE, L. y HERS, H.G. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2762-2766
- FELL, D.A. (1984) *Trends biochem. Sci.* 9, 515-516
- FOE, L.G. y KEMP, R.G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 6368-6372
- FRANCOIS, J., VAN SCHAFTINGEN, E. Y HERS H.G. (1984)

- Eur. J. Biochem. 145, 187-193
- FUNAYAMA, S., GANCEDO, J.M. y GANCEDO, C. (1980)
Eur. J. Biochem 109, 61-66
- FURUYA, E. y UYEDA, K. (1980a)
J. Biol. Chem. 255, 11656-11659
- FURUYA, E. y UYEDA, K. (1980b)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5861-5864
- FURUYA, E. y UYEDA, K. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 7109-7112
- FURUYA, E., YOKOYAMA, M. y UYEDA, K. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 264-270
- GANCEDO, J. M., GANCEDO, C. (1979)
Eur. J. Biochem. 101, 455-460
- GANCEDO, J.M., MAZON, M.J. y GANCEDO, C. (1982)
Arch. Biochem. Biophys. 218, 478-482
- GANCEDO, J.M., MAZON, M.J. Y GANCEDO, C. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 5998-5999
- GANSON, N.J. y FROMM, H.J. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 233-239
- GARLAND, P.B., RANDLE, P.J. y NEWSHOLME, E.A. (1963)
Biochem. J. 93, 665-673
- GEENBAUM, A.L., GUMAA, K.A. y McLEAN, P. (1971)
Archs. Biochem. Biophys. 143, 617-663
- GIBSON, D.M. y SHINE, W.E. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2491-2494
- GOTTSCHALK, M.E., CHATTERJEE, T., EDELSTEIN, I. y MARCUS, F. (1982). J. Biol. Chem. 257, 8016-8020
- GUALBERTO, A., MOLINERO, P. y SOBRINO, F. (1987)
Biochem. J. 244, 137-142
- HAYNES, R.C. (1958)
J. Biol. Chem. 233, 1220-1222
- HEINRICH, R. y RAPOPORT, T.A. (1974)
Eur. J. Biochem. 42, 89-95
- HEMS, D.A., McCORMACK, J.G. y DENTON, R.M. (1978)
Biochem. J. 176, 627-629

- HERS, H.G. y HUE, L. (1983)
Annu. Rev. Biochem. 52, 617-653
- HERS, H.G. y VAN SCHAFTINGEN, E. (1982)
Biochem. J. 206, 1-12
- HERS, H.G. y VAN SCHAFTINGEN, E. (1984)
Adv. Cycl. Nucl. Prot. Phosphoryl. Res. 17, 343-349
- HESBAIN-FRISQUE, A.M., VAN SCHAFTINGEN, E. y HERS, H.G.
(1981). Eur. J. Biochem. 117, 325-327
- HEYLEN, A., VAN SCHAFTINGEN, E. y HERS, H.G. (1982)
FEBS lett. 143, 141-143
- HOHORST, H.J. (1963)
en Methods of Enzymatic Analysis (Bermayer, H.U., ed.) pp
266-270, Academic Press, New York
- HOLNESS, M.J., PALMER, T.N. y SUGDEN, M.C. (1985)
Biochem. J. 232, 255-259
- HOSEY, M.M. y MARCUS, G. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 91-94
- HUE, L. (1981)
Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 52, 247-331
- HUE, L. (1982)
Biochem. J. 206, 359-365
- HUE, L. y BARTRONS, R. (1984)
Biochem. J. 218, 165-170
- HUE, L., BLACKMORE, P.F. y EXTON, J.H. (1981a)
J. Biol. Chem. 256, 8900-8903
- HUE, L., BLACKMORE, P.F., SHIKAMA, H., ROBINSON-STEINER,
A. y EXTON, J.H. (1982)b. J. Biol. Chem. 257, 4308-4313
- HUE, L., FELIU, J.E. y HERS, H.G. (1978)
Biochem. J. 176, 791-797
- HUE, L. y HERS, H.G. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 540-548
- HUE, L. y RIDER, M.H. (1987)
Biochem. J. 245, 313-324
- HUE, L., SOBRINO, F. y BOSCA, L. (1984)
Biochem. J. 224, 779-786

- HUE, L. y VAN DE WERVE, G. (1982)
FEBS lett. 145, 263-266
- HUE, L., VAN DE WERVE, G. y JEANRENAUD, B. (1983)
Biochem. J. 214, 1019-1022
- HUE, L., VAN SCHAFTINGEN, E. y BLACKMORE, P.F. (1981b)
Biochem. J. 194, 1023-1026
- KACSER, H. y BURNS, J.A. (1973)
Symp. Soc. Exp. Biol. 27, 65-104
- KAGIMOTO, T. y UYEDA, K. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 5584-5587
- KAGIMOTO, T. y UYEDA, K. (1980)
Arch. Biochem. Biophys. 200, 792-799
- KALCKAR, H.M. (1947)
J. Biol. Chem. 167, 477-486
- KEMP, R.G., FOE, L.G., LATSHAW, S.P., POORMAN, R.A. y HEINRIKSON, R.L. (1981). J. Biol. Chem. 256, 7282-7286
- KESSLER, R., NISSLER, K., SCHELLENBERGER, W. y HOFFMAN, E. (1982). Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 506-510
- KISSANE, J.M. y ROBINS, E. (1958)
J. Biol. Chem. 233, 184-188
- KITAJIMA, S., SAKAKIBARA, R. y UYEDA, K. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 6896-6903
- KLENOW, H. (1953)
Arch. Biochem. Biophys. 46, 186-200
- KREBS, H.A. (1972)
Essays Biochem. 8, 1-34
- KRETASCHMER, M. y HOFMANN, E. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 124, 793-796
- LAKER, M.E. y MAYES, P.A. (1981)
Biochem. J. 196, 247-255
- LALOUX, M., VAN SCHAFTINGEN, E., FRANÇOIS, J. y HERS, H.G. (1985). Eur. J. Biochem. 148, 155-159
- LAMPRECHT, W. y TRAUTSCHOLD, I. (1963)
in Methods of Enzymatic Analysis (bergmeyer, H.U., ed.),
pp. 543-551. Academic Press, New York

- LEFKOWITZ, R.J., ROTH, J. y PASTAN, I. (1970)
Nature 228, 864,-866
- LENZ, A.G., y HOLZER H. (1982)
FEBS lett. 109, 271-274
- LOISEAU, A.M., ROUSSEAU, G.G. y HUE, L. (1985)
Cancer Res. 45, 4263-4269
- LOWRY, O.H. y PASSONNEAU, J.V. (1972)
A Flexible System of Enzymatic Analysis, pp. 179-182,
Academic Press, New York
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J.FARR, A.L. y RANDALL, L.J.
(1951). J. Biol. Chem. 193, 265-275
- MALAISSÉ, W.J., MALAISSÉ-LAGAE, F., SENER, A., VAN
SCHAFTINGEN, E. y HERS, H.G. (1981)
FEBS lett. 125, 217-219
- MANSOUR, T.E. (1972)
Curr. Top. Cell. Regul. 5, 1-46
- MANSOUR, T.E., WAKID, N. y SPROUSE, H.M. (1966)
J. Biol. Chem. 241, 1512-1521
- MAZON, M.J., GANCEDO, J.M. y GANCEDO, C. (1982)
Eur. J. Biochem. 127, 605-608
- MCCORMACK, J.G. y DENTON, R.M. (1977)
Biochem. J. 166, 627-630
- MCGRANE, M. M., EL-MAGHRABI, M.R. y PILKIS, S.J. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 10445-10454
- MCLEAN, P. (1960)
Biochim. Biophys. Acta 37, 296
- MINAKAMI, S., SAITO, T., SUZUKI, C. y YOSHIKAWA, H. (1964).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 748-751
- MINATOGAWA, Y. y HUE, L. (1984)
Biochem. J. 223, 73-79
- MORIKOFER-ZWEZ, S., STOECKLING, F.B. y WALTER, P. (1981)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 104-111
- MULLER, D. y HOLZER H. (1981)
Biochem. Biophys. Res. Commun 103, 926-933
- MULLER, M.J. y SEITZ, H.J. (1984)
Klin. Wochenschr. 62, 11-18

- MUNIYAPPA, K., LIBACH, F.H. y MENDICINO, J. (1983)
Life Sci. 32, 271-278
- MURRAY, K.J., EL-MAGHRABI, M.R., KOUNTZ, P.D., LUKAS, T.J.,
SODERLING, T.R. y PILKIS, S.J. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 7673-7681
- NAKASHIMA, T., TRAUROG, A. y KRULICH, L. (1981)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 167, 45
- NARABAYASHI, H., LAWSON, J.W.R. y UYEDA, K. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 9750-9758
- NEWSHOLME, E.A. y LEECH, A.R. (1983)
Biochemistry for the Medical Sciences, pp. 210-211. John
Wiley and sons. Chichester.
- NEWSHOLME, E.A. y RANDLE, P.J. (1964)
Biochem. J. 93, 641-651
- NICHOLS, D.G. y LOCKE, R.H. (1984)
Physiol. Rev. 64, 1-64
- NISSLER, K., OTTO, A., SCHELLENBERGER, W. y HOFMANN, E.
(1983). Biochem. Biophys. Res. Commun. 111, 294-300
- NOVELLO, F., GUMAA, J.A. y McLEAN, P. (1969)
Biochem. J. 111, 713-725
- OBREGON, M.J., SANTISTEBAN, P., RODRIGUEZ-PEÑA, A.,
PASCUAL, A., CARTAGENA, P., RUIZ-MARCOS, A., LAMAS, L.,
ESCOBAR DEL REY, F. y MONREALE DE ESCOBAR, G. (1984)
Endocrinology 115, 614-624
- OPPENHEIMER, J.H. (1979)
Science 203, 971-979
- ORTIZ-CARO, J., PASTOR, R.M. y JOLIN, T. (1983)
Acta Endocrinol. 103, 81-87
- PALACIOS-ROMERO, R. y MOWBRAY, J. (1987)
Biochem. J. 241, 657-661
- PERCHELLET, J.P., SHANKER, G. Y SHARMA, R.K. (1977)
Science 199, 311-312.
- PHILIPPE, B., ROUSSEAU, G.G. y HUE, L. (1986)
FEBS lett. 200, 169- 172
- PILKIS, S.J., EL-MAGHRABI, M.R., CLAUS, T.H., TAGER, H.S.,
STEINER, D.E., KEIM, P. y HEINRIKSON, R. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 2770-2775

- PILKIS, S.J., EL-MAGHRABI, M.R., McGRANE, M., CLAUS, T.H. (1982a). Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 41, 2623-2628
- PILKIS, S.J., EL-MAGHRABI, M.R., McGRANE, M., PILKIS, J. y CLAUS, T.H. (1981b). J. Biol. Chem. 256, 3619-3622
- PILKIS, S.J., EL-MAGHRABI, M.R., McGRANE, M., PILKIS, J. y CLAUS, T.H. (1981c). J. Biol. Chem. 256, 11489-11495
- PILKIS, S.J., EL-MAGHRABI, M.R., McGRANE, M., PILKIS, J., FOX, E. y CLAUS, T.H. (1982b) Mol. Cell. Endocrinol. 25, 245-266
- PILKIS, S.J., EL-MAGHRABI, M.R., PILKIS, J., CLAUS, T.H. y CUMMING, D.A. (1981a). J. Biol. Chem. 256, 3171-3174
- PILKIS, S.J., EL-MAGHRABI, M.R., PILKIS, J. y CLAUS, T.H. (1982c). Arch. Biochem. Biophys. 215, 379-389
- PILKIS, S.J., REGEN, D.M., STEWART, H.B., PILKIS, J., PATE, T.M. y EL-MAGHRABI (1984). J. Biol. Chem. 259, 949-958
- PILKIS, S.J., SCHLUMPF, J., PILKIS, J. y CLAUS, T.H. (1979). Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 960-967
- POGSON, C.I. y RANDLE, P.J. (1966) Biochem. J. 100, 683-693
- POHLIG, G., WINGENDER-DRISSEN, R., NODA, T. y HOLZER, H. (1983). Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 317-324
- PONTIS, H.G. y FISCHER, C.L. (1963) Biochem. J. 89, 452-459
- PONTREMOLI, S., MELLONI, E., MICHETTI, M., SALAMINO, F., SPARATORE, B. y HORECKER, B.L. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 218, 609-613
- PURWIN, C., LEIDIG, F. y HOLZER, H. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 1482-1489
- RAPOPORT, I., BERGER, H., ELSNER, R. y RAPOPORT, S.M. (1977). Eur. J. Biochem. 73, 421-427
- RAPOPORT, T.A., HEINRICH, R. y RAPOPORT, S.M. (1976) Biochem. J. 154, 449-469
- RIDER, M.H., FORET, D. y HUE, L. (1985) Biochem. J. 231, 193-196
- RIDER, M.H. y HUE, L. (1984)

FEBS lett. 176, 484-488

RIDER, M.H. y HUE, L. (1985)
Biochem. J. 225, 421-428

RIDER, M.H. y HUE, L. (1986a)
Biochem. J. 240, 57-61.

RIDER, M.H. y HUE, L. (1986b)
Biochem. Soc. Trans. 14, 321-322

RIOU, J.P., CLAUS, T.H., FLOCKHART, D.A., CORBIN, J.D. y
PILKIS, S.J. (1977).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4615-4619

SABULARSE, D.C. y ANDERSON, R.L. (1981)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 848-855

SAGGERSON, E.D. y GREENBAUM, L. (1970)
Biochem. J. 119, 193-219

SAKAKIBARA, R., KATAJIMA, S. y UYEDA, K. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 41-46

SCHIMASSEK, H. y MITZKAT, H.J. (1963)
Biochem. Z. 337, 510-518

SCHIMMER, B.P. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3134-3138.

SCHIMMER, B.P. (1980)
en Adv Cyclic Nucleotide Res. (Greengard, P. y Robinson,
G.A. ed.) vol. 13, pp 181-214, Raven Press, New York.

SCHIMMER, B.P. y ZIMMERMAN, A.E. (1976)
Mol. Cell Endocrinol. 4, 263-270.

SCHNEIDER, J.A., DIAMOND, I. y ROZENGURT, E. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 872-877

SEGAL, J., COPPENS, A. y INGBAR, S.H. (1985)
Endocrinology 116, 1707-1711

SIES, H., GRAF, P. y CRANE, D. (1983)
Biochem. J. 212, 271-278

SOBRINO, F. y GUALBERTO, A. (1985)
FEBS lett. 182, 327-330

SOBRINO, F., GUALBERTO, A. y GONZALEZ-RIVERO, J. (1986)
Biochem. Int. 12, 767-774.

- SOBRINO, F., RIDER, M.H., GUALBERTO, A. y HUE, L. (1987)
Biochem. J. 244, 235-238
- SOCHOR, M., GREENBAUM, A.L. y McLEAN, P. (1984)
FEBS lett. 169, 12-16
- SOLING, H.D., KUDUZ, J. y BRAND, I.A. (1981)
FEBS lett. 130, 390-413
- SOLS, A., CASTAÑO, J.G., ARAGON, J.J., DOMENECH, P.A., LAZO, P.A. y NIETO, A. (1981) in Metabolic Interconversion of enzymes (Holzer, H., ed.), pp. 111-123. Springer-Verlag, Berlín.
- STACPOOLE, P.W. (1977)
Metabolism, 26, 107-116
- STACPOOLE, P.W. y FELTS, J.M. (1970)
Metabolism, 19, 71-78
- STADTMAN, E.R. (1966)
Adv. Enzymol. 28, 141-154
- St.GERMAIN, D.L. y GALTON, V.A. (1985)
J. Clin. Invest. 75, 679-688
- SUKO, J. (1973)
J. Physiol. 228, 563-582
- TARUI, S., KONO, N. y UYEDA, K. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 1138-1145
- TEJWANI, G.A. (1983)
Adv. Enzymol. relat. Areas Mol. Biol. 54, 121-194
- THOMSON, J.F, HABEEK, D.A., NANCE, S.L. y BEETHAN, K.L. (1969). J. Cell. Biol. 41, 312-334
- UYEDA, K., FURUYA, E. y LUBY, L.J. (1981a)
J. Biol. Chem. 256, 8394-8399
- UYEDA, K., FURUYA, E., RICHARDS, C.S., YOKOYAMA, M. (1982).
Mol. Cell. Biochem. 48, 97-120
- UYEDA, K., FURUYA, E. y SHERRY, A.D. (1981b)
J. Biol. Chem. 256, 8679-8684
- VAN DEN BERGHE, G., BONTEMPS, F. y HERS, H.G. (1980)
Biochem. J. 188, 913-920
- VAN SCHAFTINGEN, E. (1984)
in Methods in Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.),

3a ed., vol. 6, pp. 335-341. Verlag Chemie, Weinheim

VAN SCHAFTINGEN, E. (1985)

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur. Université Catholique de Lovain. Belgique.

VAN SCHAFTINGEN, E. (1987)

Adv. Enzymol. 59, 315-395

VAN SCHAFTINGEN, E., BARTRONS, R. y HERS, H.G. (1984)

Biochem. J. 222, 511-518

VAN SCHAFTINGEN, E., DAVIES, D.R. y HERS, H.G. (1981b)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 362-368

VAN SCHAFTINGEN, E., DAVIES, D.R. y HERS, H.G. (1982a)

Eur. J. Biochem. 124, 143-149

VAN SCHAFTINGEN, E. y HERS, H.G. (1981a)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2861-2863

VAN SCHAFTINGEN, E. y HERS, H.G. (1981b)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 1078-1084

VAN SCHAFTINGEN, E. y HERS, H.G. (1986)

Eur. J. Biochem. 159, 359-365

VAN SCHAFTINGEN, E., HUE, L. y HERS, H.G. (1980a)

Biochem. J. 192, 263-271

VAN SCHAFTINGEN, E., HUE, L. y HERS, H.G. (1980b)

Biochem. J. 192, 887-895

VAN SCHAFTINGEN, E., HUE, L. y HERS, H.G. (1980c)

Biochem. J. 192, 897-901

VAN SCHAFTINGEN, E., JETT, M.F., HUE, L., HERS, H.G.

(1981a). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3483-3486

VAN SCHAFTINGEN, E., LEDERER, B., BARTRONS, R. y HERS, H.G.

(1982b). Eur. J. Biochem. 129, 191-195

VERDIER, C.H. y ERICSON, A. (1984)

en Method of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.), 3a ed. vol. 6 pp. 547-561. Verlag Chemie, Weinheim.

VILGRAIN, I., COCHECH, C. y CHAMBAZ, E.M. (1984)

J. Biol. Chem. 259, 3403-3406.

VINCENT, M.F., VAN DEN BERGHE, G. y HERS, H.G. (1982)

Biochem. J. 202, 117-123

WARBURG, O. (1956)
Science, 123, 309-314.

WEBER, G. (1977)
N. Engl. J. Med. 296, 486-551

WEINHOUSE, S. (1976)
Z. Krebsforsch. 87, 115-126

WHITEHOUSE, S., COOPER, R.H. y RANDLE, P.J. (1974)
Biochem. J. 141, 761-774

WHITEHOUSE, S. y RANDLE, P.J. (1973)
Biochem. J. 134, 651-653

WILLIAMSON, J.R., BOWNING, E.T., THURMAN, R.G. y SCHOLZ,
R. (1969). J. Biol. Chem. 244, 5055-5064

WOLLENBERGER, A., RISTAU, O. y SCHOFFA, G. (1960)
Pflugers Arch. 270, 399-412

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Resolvido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
a el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
ANTONIO GUALBERTO GARCIA

PAPEL REGULADOR DE LA FRUCTOSA-2,6-DIFOSFATO
EN LA GLUCOLISIS DE DIFERENTES TEJIDOS.

APTO con laude
por unanimidad

6 de abril

1990

El Vocal,
F. M. Vega

El Vocal,

El Vocal,

El Doctorado,
B. G. G. G.

El Doctorado

El Doctorado,